

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jasmina V. Bašić

**ISPITIVANJE KORELACIJE IZMEĐU  
HEMIJSKE STRUKTURE, FIZIČKO-  
HEMIJSKIH I RETENCIONI  
PARAMETARA I ANTIMIKROBNE  
AKTIVNOSTI NOVOSINTETISANIH  
DERIVATA PROPIOFENONA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Jasmina V. Bašić

**EXAMINATION OF CORRELATION  
BETWEEN CHEMICAL STRUCTURE,  
PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND  
RETENTION PARAMETERS AND  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEWLY  
SYNTHESIZED DERIVATIVES OF  
PROPIOPHENONE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTOR:

---

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

ČLANOVI KOMISIJE:

---

dr sc. Marina Milenković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Slavica Stevanović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Deo doktorske disertacije koji se odnosi na analizu i merenje antimikrobne aktivnosti ispitivanih jedinjenja je urađen na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Teza predstavlja nastavak istraživačkog rada doc.dr Branke Ivković, kojoj se zahvaljujem na ideji vezanoj za izbor teme, na pomoći u eksperimentalnom radu i pisanju teze.*

*Mom metoru, prof. dr Zorici Vujić želim da se zahvalim na svojoj nesebičnoj stručnoj i ljudskoj pomoći i podršci koju mi je davala. Profesorka Zorica je moj „vetar u leđa“, osoba neobične energije i humanosti, od koje sam toliko naučila.*

*Izuzetnu zahvalnost dugujem i prof. dr Marini Milenković sa Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na podršci, mnogobrojnim savetima i idejama i na svemu onome što me je naučila o radu u mikrobiološkoj laboratoriji. Veliko hvala i doc.dr Dragani Božić sa Katedre za mikrobiologiju i imunologiju na ogromnoj pomoći u eksperimentalnom radu, objašnjenjima i sugestijama.*

*Zahvaljujem se prof. dr Slavici Števanović na svesrdnoj pomoći i korisnim savetima tokom završne izrade doktorske disertacije.*

*Želim da izrazim svoju zahvalnost svim svojim prijateljima i kolegama na lepim rečima podrške i razumevanja.*

*Hvala mom predivnom i plemenitom tati Vasiliju, koji je moja snaga i hvala mojoj strpljivoj i nežnoj deci Duši i Kolji, čija me ljubav grejala i radovala u svakom momentu. Hvala mom suprugu Danilu na podršci i razumevanju.*

*Ovaj rad posvećujem mojoj zvezdi vodilji, inspiraciji mog života, mojoj predivnoj, jedinstvenoj mami Dragi, koja je svojim blagim osmehom uvek umela da učini da verujem...Zauvek je uz mene.*



# ISPITIVANJE KORELACIJE IZMEĐU HEMIJSKE STRUKTURE, FIZIČKO-HEMIJSKIH I RETENCIONIH PARAMETARA I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NOVOSINTETISANIH DERIVATA PROPIOFENONA

## REZIME

Pojava rezistencije mikroorganizama na postojeće antimikrobne lekove predstavlja globalni kliničko-terapijski problem i usmerava interes istraživača ka novim ciljnim mestima delovanja budućih antimikrobnih lekova. Modulatori jonskih kanala poslednjih decenija postaju sve važniji ciljni molekuli u medicinskoj hemiji jer jonski kanali, kao sastavni deo svake žive ćelije, igraju ključnu ulogu u njenoj deobi, proliferaciji, ekscitaciji i apoptozi. Ispitivanja su pokazala da aktivnost modulatora jonskih kanala, između ostalih, imaju i jedinjenja propiofenonske strukture (halkoni i propafenonski derivati).

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je sinteza šest halkonskih jedinjenja *Claisen-Schmidtovom* aldolnom kondenzacijom iz 2-hidroksiacetofenona i mono- ili disupstituisanih benzaldehida. Struktura sintetisanih jedinjenja potvrđena je spektroskopskim metodama, snimanjem IR i NMR spektara. Predmet daljeg istraživanja obuhvata, pored novosintetisanih halkona, 6 propafenonskih derivata, propafenon i 6 halkonskih derivata sintetisanih u okviru ranijih istraživanja.

Primenom RP HPLC metode, eksperimentalno su određeni hromatografski parametri  $t_r$  i  $t_0$ , faktor kapaciteta  $k$  i izračunat parametar lipofilnosti  $\log k_w$  za svih 12 halkonskih derivata. Na osnovu korelacije  $\log k_w$  vrednosti i  $\log P$  standardnih supstanci izračunate su vrednosti  $\log P$  sintetisanih jedinjenja. Primenom modifikovane metode mućkanja („*shake flask*“) određen je distribicioni koeficijent propafenona i šest propafenonskih derivata. Eksperimentalno dobijeni podaci  $\log P$  i  $\log D$  su korelisani sa vrednostima dobijenim korišćenjem različitih programskih paketa.

Ispitana je antimikrobna aktivnost derivata halkona i propafenona na: osam standardnih laboratorijskih sojeva mikroorganizama (6 sojeva Gram pozitivnih bakterija i dva soja Gram negativnih bakterija), 7 izolovanih bolničkih i vanbolničkih MRSA sojeva i 11 sojeva kliničkih izolata *P. Aeruginosa*. Eksperimenti su pokazali da jedinjenja propafenonske grupe pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na halkone. Da bi se odredio deo strukture odgovoran za antimikrobno dejstvo halkona i uspostavila korelacija između strukture i antimikrobne aktivnosti izvedena je *QSAR* analiza. Za izvođenje studije odabrani su deskriptori koji opisuju vodonik

donorske osobine funkcionalnih grupa i deskriptori koji definišu kiselost fenolske grupe. Primenom genetskog algoritma racionalizovan je broj deskriptora i sveden na dva koja pokazuju najbolju korelaciju sa antimikrobnom aktivnošću halkona.

Kako su propafenon i njegovi analozi modulatori funkcije jonskih kanala izvedene su *docking* studije sa kristalografskim strukturama zatvorenog i otvorenog bakterijskog KcsA kanala sa ciljem da se definišu ključne interakcije. Istraživanja su pokazala da se vezivno mesto propafenona i analoga nalazi u pori kanala; da su ključne interakcije karbonilne grupe, sekundarne alkoholne i sekundarne amino grupe sa Thr<sup>75</sup>; da su značajne hidrofobne  $\pi$ -alkil interakcije sa Ile<sup>100</sup> i da fluoro grupa 5OF derivata ostvaruje elektrostatičku interakciju sa Gly<sup>104</sup>.

*Docking* studijama ispitana je i interakcija propafenonskih derivata sa transportnim porinom *Pseudomonas aeruginosa*. Ispitivanje je rađeno sa kristalografskom strukturom OccK4 porina. *Docking* rezultati ukazuju da se vezivno mesto ispitivanih jedinjenja nalazi u unutrašnjosti porina, između tri unutrašnje petlje, da najveći afinitet vezivanja pokazuje 5PCH3 jedinjenje koje ostvaruje najbolju interakciju sa hidrofobnim džepom.

Ispitan je uticaj fluoriranih propafenonskih derivata na produkciju biofilma i pigmenta piocijanina kod 8 sojeva kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*. Dobijeni rezultati pokazuju da je inhibicija produkcije biofilma dozno zavisna i da je produkcija piogenina kod svih ispitivanih sojeva je smanjena.

Primenom PAMPA testa i *in silico* simulacijom u računarskom programu MembranePlus ispitana je permeabilnost propiofenonskih derivata. Eksperimentalno dobijeni podaci ukazuju da je retencija halkona >99,99% što može biti razlog slabog antimikrobnog efekta prema *P. aeruginosa* soju.

Primenom ADMET prediktora predviđen je farmakokinetički i toksikološki profil ispitivanih jedinjenja.

**Ključne reči:** propafenon, halkon, propiofenonski derivati, Log P, Log D, QSAR, *Docking*, jonski kanali, porini, antimikrobna aktivnost, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

**UDK broj: 615.33:616-092.7:004.94(043.3)**

# INVESTIGATION OF CORRELATION BETWEEN THE CHEMICAL STRUCTURE, PHYSICAL-CHEMICAL AND RETENTION PARAMETERS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEWLY SYNTHESIZED PROPIOPHENONE DERRIVATIVES

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a global problem in clinical treatment and it directs researchers' attention to new target activity sites of future antimicrobials. Over the past decades, ion channel modulators have become increasingly important target molecules in medical chemistry since ion channels, being an integral part of every living cell, play a crucial role in cell division, proliferation, excitation and apoptosis. Studies have shown that compounds with propiophenone structure (chalcones and propafenone derivatives), among others, have the activity of ion channel modulators.

This doctoral thesis describes the synthesis of six chalcone compounds by *Claisen-Schmidt* aldol condensation from 2-hydroxyacetophenone and mono- or disubstituted benzaldehydes. The structure of synthesized compounds was confirmed with spectroscopic methods, by recording IR and NMR specters. Subject of further research includes, besides newly synthesized chalcones, 6 propafenone derivatives, propafenone and 6 chalcone derivatives synthesized within earlier research.

Application of RP HPLC method enabled the experimental determination of chromatographic parameters  $t_r$  and  $t_0$ , capacity factor  $k$  and calculation of lipophilicity parameter  $\text{Log } k_w$  for all 12 chalcone derivatives.  $\text{Log } P$  values for synthesized compounds were calculated on the basis of the correlation between  $\text{Log } k_w$  value and  $\text{Log } P$  of standard substances. The distribution coefficient of propafenone and six propafenone derivatives was determined by applying the modified *shake-flask* method. Experimentally obtained  $\text{Log } P$  and  $\text{Log } D$  data were correlated with values obtained through using different software packages.

The antimicrobial activity of chalcone derivatives and propafenone derivatives was tested on: eight standard laboratory microbial strains (6 strains of Gram positive bacteria and two strains of Gram negative bacteria), 7 isolated hospital and community MRSA strains and 11 strains of clinical isolates of *P. aeruginosa*. The experiments showed that compounds from propafenone group show better antimicrobial activity in comparison to chalcones. *QSAR* analysis was performed in order to determine the part of the structure responsible for antimicrobial activity of

chalcones and to establish the correlation between the structure and the antimicrobial activity. Descriptors characterizing hydrogen donor properties of functional groups and descriptors defining the acidity of phenol group were selected for further study. Application of the genetic algorithm rationalized the number of descriptors and it reduced it to two of them showing the best correlation with antimicrobial activity of chalcones.

Since propafenone and its analogues are modulators of ion channel function, *docking* studies were performed with crystallographic structures of closed and open bacterial KcsA channel, in order to define the crucial interactions. Research showed that: binding site of propafenone and analogues has been placed in the channel pore; interactions of carbonyl group, secondary alcohol and secondary amino group with Thr<sup>75</sup> are crucial; hydrophobic  $\pi$ -alkyl interactions with Ile<sup>100</sup> are significant and that fluoro group of 5OF derivative is engaged in electrostatic interaction with Gly<sup>104</sup>.

*Docking* studies also tested the interaction between propafenone derivatives with transport porin of *Pseudomonas aeruginosa*. Study was performed with crystallographic structure of OccK4 porin. *Docking* results show that binding site of investigated compounds is within the porin, between three inner loops, and that 5PCH3 compound, which achieves the highest interaction with hydrophobic pocket, shows the highest binding affinity.

The effect of fluorinated propafenone derivatives to biofilm and pyocyanin pigment production was investigated in 8 strains of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. The results show that inhibition of biofilm production is dose-dependent and that pyrogenin production in all investigated strains is reduced.

The permeability of propiophenone derivatives was determined by conducting PAMPA test and *in silico* simulation in computer software MembranePlus. Experimentally obtained data show that chalcone retention is >99,99%, which might be the reason for the weak antimicrobial effect against *P. aeruginosa* strain.

Pharmacokinetic and toxicological profile of investigated compounds was predicted by applying ADMET predictors.

**Keywords:** propafenone, chalcone, propiophenone derivatives, Log P, Log D, QSAR, *Docking*, ion channels, porins, antimicrobial activity, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical-medical chemistry and structure analysis

**UDC number:** 615.33:616-092.7:004.94(043.3)

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Opšti deo.....</b>	<b>2</b>
1.1.1.	Propafenonski derivati.....	3
1.1.2.	Halkoni .....	4
<b>1.2.</b>	<b>Dizajn molekula leka.....</b>	<b>6</b>
1.2.1.	Vodeći molekul ( <i>Lead</i> ) i farmakofora.....	6
1.2.2.	Odnos strukture i dejstva ( <i>Structure Activity Relationships; SAR studije</i> ).....	7
1.2.3.	Kvantitativni odnos strukture i biološke aktivnosti ( <i>QSAR</i> ) .....	8
1.2.4.	Kvantitativni odnos strukture i retencije ( <i>QSRR</i> ).....	11
1.2.5.	Molekulski deskriptori.....	12
1.2.5.1.	Eksperimentalni i teorijski deskriptori .....	13
1.2.5.2.	Tipovi molekulskih deskriptora.....	14
<b>1.3.</b>	<b>Lipofilnost .....</b>	<b>15</b>
1.3.1.	Podeoni koeficijent P.....	15
1.3.2.	Distribicioni koeficijent D .....	16
1.3.3.	Određivanje Log P.....	17
1.3.3.1.	Određivanje lipofilnosti metodom mućkanja ( <i>shake-flask</i> ) .....	17
1.3.3.2.	Određivanje Log P indirektnim metodama .....	19
1.3.3.3.	Određivanje Log P računskim putem .....	22
<b>1.3.3.4.</b>	<b>Primena <i>QSRR</i> u proceni lipofilnosti molekula.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.</b>	<b>Molekulsko modeliranje ciljnog makromolekula.....</b>	<b>23</b>
1.4.1.	Metoda molekulskog uklapanja.....	24
<b>1.5.</b>	<b>Razvoj rezistencije na antibiotike .....</b>	<b>25</b>
1.5.1.	MRSA (Meticilin-rezistentan <i>Staphylococcus aureus</i> ).....	26
1.5.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
<b>1.6.</b>	<b>Modulacija aktivnosti jonskih kanala .....</b>	<b>30</b>
1.6.1.	Jonski kanali, građa i funkcija.....	30
1.6.2.	Kanali u bakterijskoj ćeliji.....	35
1.6.3.	Bakterijski porini .....	44
1.6.3.1.	Porini <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
<b>1.7.</b>	<b><i>In vitro</i> ispitivanje permeabilnosti membrana.....</b>	<b>50</b>
1.7.1.	Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA).....	50

2.	<b>CILJ RADA .....</b>	<b>52</b>
3.	<b>EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>54</b>
3.1.	<b>Sinteza propiofenonskih derivata iz grupe halkona i njihova strukturna analiza .....</b>	<b>55</b>
3.1.1.	Reagensi i rastvarači.....	55
3.1.2.	Oprema i aparati .....	56
3.1.3.	Priprema rastvora korišćenih u sintezi .....	56
3.1.4.	Opšti postupak sinteze mono- i disupstituisanih 1-(2-hidroksifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona (halkona).....	56
3.1.5.	Strukturna analiza sintetisanih halkona.....	57
3.2.	<b>Fizičko - hemijska karakterizacija propiofenonskih derivata</b>	<b>58</b>
3.2.1.	Reagensi i jedinjenja korišćena u ispitivanju .....	58
3.2.2.	Oprema i aparati .....	59
3.2.3.	Kompjuterski programi .....	60
3.2.4.	Određivanje Log P vrednosti propiofenonskih derivata halkonske grupe .....	60
3.2.5.	Određivanje Log D vrednosti propiofenonskih derivata propafenonske grupe.....	61
3.3.	<b>Ispitivanje antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata</b>	<b>63</b>
3.3.1.	Oprema i aparati .....	63
3.3.2.	Reagensi i jedinjenja korišćena u ispitivanju .....	63
3.3.3.	Ispitivanje aktivnosti propiofenonskih derivata na rast ATCC sojeva bakterija.....	63
3.3.4.	QSAR analiza antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata iz grupe halkona .....	66
3.3.5.	Molekulske <i>docking</i> studije antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata propafenonske grupe .....	67
3.3.6.	Ispitivanje <i>in vitro</i> efekta propiofenonskih derivata na rast MRSA sojeva.....	68
3.3.7.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata na kliničkim izolatima <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	72
3.3.8.	Molekulske <i>docking</i> studije.....	74
3.3.9.	Ispitivanje uticaja orto fluoriranih propafenonskih derivata na produkciju biofilma <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sojeva.....	74
3.3.10.	Ispitivanje uticaja orto fluoriranih propafenonskih derivata na produkciju piocijanina kod <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sojeva.....	77



<b>3.4.</b>	<b>Ispitivanje permeabilnosti propiofenonskih derivata na veštačkim membranama (<i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>, PAMPA testovi).....</b>	<b>78</b>
3.4.1.	Aparati i oprema.....	78
3.4.2.	Reagensi .....	79
3.4.3.	Hromatografski uslovi.....	79
3.4.4.	Uslovi za masenu detekciju.....	79
3.4.5.	Kompjuterski programi .....	80
3.4.6.	Priprema rastvora.....	80
3.4.7.	Izvođenje PAMPA eksperimenata .....	81
3.4.8.	Simulacija permeabilnosti u računarskom programu <i>MembranePlus</i> .....	82
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1.</b>	<b>Sinteza šest propiofenonskih derivata iz grupe halkona.....</b>	<b>84</b>
<b>4.2.</b>	<b>Rezultati eksperimentalnog određivanja lipofilnosti .....</b>	<b>87</b>
4.2.1.	Rezultati određivanja lipofilnosti halkona.....	87
4.2.2.	Rezultati eksperimentalnog određivanja koeficijena distribucije za propafenonske analoge.....	97
<b>4.3.</b>	<b>Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata.....</b>	<b>102</b>
4.3.1.	Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti derivata halkona ...	102
4.3.1.1.	Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti derivata halkona prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama.....	103
4.3.1.2.	Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti halkona prema MRSA sojevima.....	106
4.3.1.3.	Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti novosintetisanih halkona na rast kliničkih izolata <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	111
4.3.1.4.	Analiza antimikrobne aktivnosti halkona.....	112
4.3.2.	Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata .....	118
4.3.2.1.	Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama .....	118
4.3.2.2.	Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata na rast MRSA sojeva .....	121
4.3.2.3.	Rezultati ispitivanja aktivnosti propafenonskih derivata na rast kliničkih izolata <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sojeva.....	123
4.3.2.4.	Propafenonski derivati kao modulatori jonskih kanala ( <i>docking</i> studije).....	126

4.3.2.5.	Interakcija propafenonskih derivata sa porinom <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>docking</i> studija) .....	130
4.3.2.6.	Rezultati ispitivanja aktivnosti <i>orto</i> fluoriranih derivata propafenona na produkciju biofilma kliničkih izolata <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	137
4.3.2.7.	Rezultati ispitivanja aktivnosti fluoriranih derivata propafenona na produkciju pigmenta piocijanina <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	140
<b>4.4.</b>	<b>Rezultati QSAR studija inhibicije rasta MRSA sojeva .....</b>	<b>143</b>
<b>4.5.</b>	<b>Rezultati PAMPA testova i ADMET Predictor-a .....</b>	<b>159</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>165</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>170</b>
<b>7.</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>191</b>

# **1. UVOD**

## 1.1. Opšti deo

Velika brzina razvoja rezistencije mikroorganizama na nove antimikrobne agense i interhumano širenje rezistentnih sojeva danas predstavljaju globalni kliničko-terapijski problem. Razvoj rezistencije mikroorganizama na postojeće antimikrobne lekove zahteva sintezu novih jedinjenja koja će imati ulogu u prevenciji ili lečenju infekcija, bilo kao samostalni antimikrobni agensi ili kao adjuvantna terapija konvencionalnim antibioticima.

Razvoj rezistencije na antibiotike podrazumeva gubitak sposobnosti leka da ubije ili spreči rast i razmnožavanje bakterija. Neke bakterijske vrste poseduju prirodnu rezistenciju na određene antibiotike (urođena rezistencija), dok je kod drugih rezistencija rezultat genetskih promena (stečena rezistencija). Rezistencija bakterija na antibiotike je pojava koja predstavlja evolutivnu prednost i način za preživljavanje, a nastaje kao rezultat mutacija bakterijskih gena ili sticanja novih gena (najčešće u formi R plazmida). Infekcije prouzrokovane rezistentnim sojevima bakterija predstavljaju terapijski problem i izazov, jer uobičajeno korišćeni lekovi nisu efikasni.

Zbog brzog razvoja rezistencije i sve učestalije pojave multirezistentnih sojeva, sve veći je interes istraživača za otkrićem novog ciljnog mesta delovanja antimikrobnih lekova kao i jedinjenja na koje mikroorganizmi nisu razvili rezistenciju (1). Jedno od mogućih ciljnih mesta delovanja lekova su jonski kanali.

Danas je poznat veliki broj lekovitih supstanci koje ostvaruju svoje efekte menjajući ponašanje jonskih kanala. Modulacija jonskih kanala predstavlja moderan pristup eksperimentalnih i kliničkih istraživanja u neprekidnom traganju za efikasnijim lekovima (2-10). Modulatori jonskih kanala poslednjih decenija postaju sve važniji ciljni molekuli u medicinskoj hemiji jer jonski kanali, kao sastavni deo svake žive ćelije, igraju ključnu ulogu u njenoj deobi, proliferaciji, ekscitaciji i apoptozi (11). Jedinjenja koja moduliraju aktivnost jonskih kanala koriste se u lečenju različitih oboljenja: aritmija, hipertenzije, epilepsije, ataksije, migrene, hroničnog bola, dijabetesa, a u novije vreme sve više imaju značaj i u lečenju bakterijskih, gljivičnih,

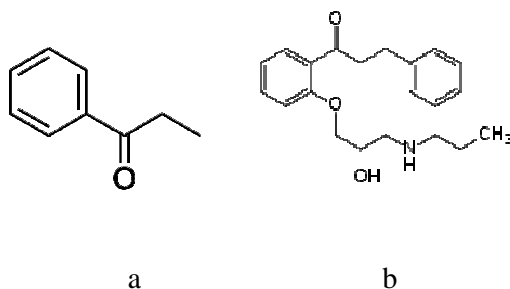
parazitskih, virusnih kao i malignih i autoimunih oboljenja (12, 13). Ispitivanja su pokazala da aktivnost modulatora jonskih kanala, između ostalih, imaju i jedinjenja propiofenonske strukture.

Propiofenon je jedinjenje relativno jednostavne strukture koje se komercijalno dobija reakcijom benzoeve i propionske kiseline. Koristi se u sintezi efedrina, arilalkena ali je i polazno jedinjenje u sintezi brojnih derivata koji pokazuju različit farmakodinamski i farmakokinetički profil (2, 14,15).

Propiofenonski derivati koji su bili predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su podeljeni u dve grupe: propafenonsku i halkonsku.

### 1.1.1. Propafenonski derivati

Prvi propiofenonski derivat za koji je ustanovljeno da modulira aktivnost jonskih kanala i P-glikoproteina je propafenon (16). Tokom višegodišnjih istraživanja sintetisano je preko 250 derivata propafenona sa strukturnim modifikacijama u aminskom i oksifenonskom delu molekule.



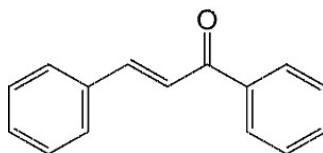
**Slika 1:** a) Propiofenon (1-Fenilpropan-1-on); b) Propafenon

Propafenon (Sl.1.B) je *INN* naziv za derivat fenilpropiofenona, po strukturi 2-[2'-hidroksi-3-(propilamino)propoksi]-3-fenilpropiofenon koji je sintetisan osamdesetih godina prošlog veka (16). Kada se primenjuje u terapijskim dozama propafenon deluje kao blokator natrijumovih (antiaritmik I grupe) i kalijumovih kanala. Aktivnost na  $\beta_1$  receptorima koja je prisutna kod propafenona, ali slabije izražena, objašnjava se strukturnom sličnošću sa beta-blokatorima.

Mehanizam delovanja propafenona se zasniva na modulaciji aktivnosti jonskih kanala i modulaciji aktivnosti P-glikoproteina. Molekul propafenona se od devedesetih godina dvadesetog veka koristi kao model molekul u studijama koje proučavaju razvijanje rezistencije na lekove (*multidrug-resistant study*) (17). Tokom višegodišnjeg rada Chiba i Ecker sa saradnicima su sintetisali i odredili strukturu i osobine za preko 200 derivata propafenona, koristeći *QSAR* modele. Kao model molekul propafenon je poslužio i za sintezu potencijalnih antimalarijskih lekova (18-20), kao i jedinjenja koja pokazuju aktivnost protiv kancera (2). Tokom ranijih istraživanja utvrđeno je da je histidinom bogat protein 2 (HRP2) ključan u životnom ciklusu *Plasmodium falciparum*, pa su izdvojeni propafenonski derivati koji pokazuju afinitet za proteine bogate alaninom i histidinom.

U literaturi nije nađen veliki broj radova koji opisuju interakciju do sada sintetisanih propafenonskih derivata sa jonskim kanalima (21,22). Podaci dobijeni pomoću *in silico* ispitivanja pokazuju da važnu ulogu u vezivanju propafenona za receptor, pored polarnih interakcija, imaju nepolarne  $\pi$ - $\pi$  i  $\pi$ -katjon interakcije. Smatra se da promena u strukturi benzilnog ostatka molekula propafenona (Slika 1b) dovodi do promene njegove aktivnosti kao modulatora jonskih kanala.

### 1.1.2. Halkoni

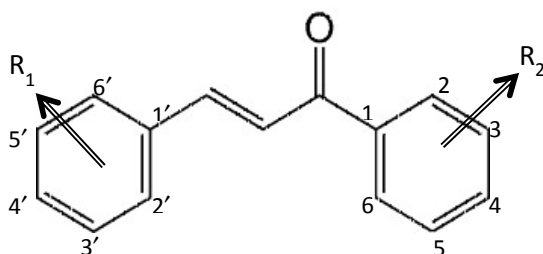


**Slika 2.** Opšta struktura halkona (1,3-Difenil- 2-propen- 1-on: Benzilidenacetofenon)

Halkon je propiofenonski derivat, aromatični keton, *enon*, koji čini deo strukture velikog broja prirodnih jedinjenja poznatih pod nazivom halkoni. Osnovno jedinjenje koje ulazi u sastav halkona je benzilidenacetofenon (Slika 2). Po strukturi, halkoni su  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićeni ketoni, derivati 1,3-diaril-2-propen-1-ona. Halkoni su podložni oksidaciji, nestabilni u prisustvu vlage, svetlosti i kiseonika.

Halkoni se u biljkama javljaju kao intermedijeri u sintezi flavonoida; nastaju dejstvom enzima halkon sintaze ali se mogu dobiti i polusintetski ili totalnom sintezom. Danas se najčešće sintetišu u reakciji aldolne kondenzacije (*Claisen-Schmidt*-ova reakcija). Halkoni pokazuju različitu biološku aktivnost: antiinflamatornu (14, 23), antibakterijsku (14, 24), fungicidnu (14, 25), antiproliferativnu (14, 26, 27), tuberkulostatsku (14, 28). Međutim, zbog niske selektivnosti imaju ograničenu kliničku primenu (14, 29).

Slično alkilirajućim agensima, halkoni se vezuju za nukleinske kiseline i ispoljavaju antikancerogeno, citotoksično i mutageno dejstvo (26). Iako se vezuju za DNK mikroorganizama, glavna intracelularna meta njihovog delovanja nije molekul DNK (30). Način na koji halkoni ispoljavaju svoje antibakterijsko i antifungalno delovanje nije potpuno razjašnjen. Poznato je da se halkoni vezuju za ćelijsku membranu mikroorganizama, kompromitujući njenu funkciju. Različiti afinitet i mehanizam vezivanja za ćelijsku membranu, dovodi do nejednake osetljivosti različitih vrsta mikroorganizama (30). *QSAR* studije ukazuju da enonski deo molekule (31), ima ulogu akceptora elektrona i vezuje se za sulfidrilne grupe enzima (*Michael*-ova reakcija) blokirajući njihovu funkciju (25), kao i da uvođenje hidroksilnih grupa u strukturu molekula halkona povećava antimikrobno delovanje. Halkoni se mogu izolovati iz prirodnih izvora kao što su biljke, voće i povrće ali se i brojna jedinjenja ove grupe mogu dobiti u laboratorijskim uslovima, metodama klasične i kombinatorne sinteze (30).



**Slika 3.** Opšta strukturna formula derivata halkona

## 1.2. Dizajn molekula leka

Osamdesetih godina prošlog veka javlja se značajan napredak u molekularnoj biologiji (32-35), teorijskoj i eksperimentalnoj hemiji i kompjuterskoj tehnologiji što je omogućilo sintezu i ispitivanje biološke aktivnosti novih lekova. Ispitivanje i postavljanje korelacije između molekulskih parametara koji se odnose na hemijsku strukturu i fizičko-hemijske osobine molekula i njihove biološke i farmakološke uloge omogućile su:

- metode koje se bave proučavanjem strukture liganda (studije kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (*Quantitative Structure-activity relationships, QSAR*), *QSAR* i mapiranje farmakofora) i
- metode koje se bave strukturom *target* molekula (*structure/target-based drug design*) i obuhvataju konformacionu analizu, molekulsko modeliranje ciljnog molekula i *docking* studije).

Ispitivanje korelacije molekulskih parametara koji se odnose na hemijsku strukturu i fizičko-hemijske osobine molekula i njihove biološke i farmakološke aktivnosti daje mogućnost predviđanja strukturnih promena molekula sa boljim farmakodinamskim i farmakokinetičkim osobinama u lečenju određenog oboljenja (36). Najznačajniji pomak u brzom predviđanju uticaja promena strukture dala je upotreba kompjuterskih metoda u dizajniranju lekova (*Computer-Aided Drug Design, CADD*) i mogućnost optimizacije osobina (35).

### 1.2.1. Vodeći molekul (*Lead*) i farmakofora

Jedinjenja koja predstavljaju polazne osnove za sintezu i razvoj novih molekula se označavaju kao osnovna jedinjenja (*lead compounds*), a promenama u njihovoj strukturi se izvode jedinjenja koja se nazivaju *analizi*.

*Lead* molekul poseduje određenu farmakološku aktivnost, a promenama u strukturi je moguće poboljšati aktivnost, povećati selektivnost, smanjiti toksičnost i izvršiti druge željene promene (37). *Lead* molekuli mogu biti jedinjenja prirodnog ili sintetskog



porekla, a za njihov odabir se koriste metode visoko-propusnog (*High-Throughput Screening-HITS*) ili virtuelnog skrininga (*virtual screening*). *Lead* molekul može da se otkrije i u toku kliničkih studija (38).

Pod pojmom *farmakofora* podrazumeva se deo molekulske strukture koji je odgovoran za farmakološko dejstvo, sa specifičnom građom, vezama i prostornom orijentacijom. Mapiranje farmakofore je proces u kome se *farmakofora* determiniše (39). Uglavnom se pre mapiranja farmakofora definiše veza između strukture i dejstva (*Structure Activity Relationships, SAR*).

### **1.2.2. Odnos strukture i dejstva (*Structure Activity Relationships; SAR studije*)**

Još 1863. godine je Cros uočio da postoji veza između toksičnosti primarnih alkohola i njihove rastvorljivosti u vodi (40). Kako se aktivnost molekula ogleda u njihovoj hemijskoj strukturi (slični molekuli pokazuju sličnu aktivnost) pretpostavljeno je da u strukturi postoje delovi koji su odgovorni za fizičke, hemijske i biološke osobine. Kasnije je razvijen koncept koji povezuje hemijsku strukturu, osobine i farmakološku aktivnost jednog molekula.

Odnos između strukture i dejstva (*Structure-Activity Relationship, SAR*) je pristup koji se bazira na pronalaženju veze između hemijske strukture i biološke aktivnosti ispitivanog jedinjenja. *SAR* obuhvata sistematične modifikacije hemijske strukture i praćenje njihovih efekata na merenu biološku aktivnost. Variranje hemijske strukture u *SAR* studijama obuhvata varijacije supstituenata, ekstenziju strukture, varijacije prstena, uvođenje izosternih grupa, pojednostavljenje ili rigidifikaciju strukture (37). Osobine jedinjenja koje se u *SAR* studijama često koriste su hemijska reaktivnost, elektronski i induktivni efekti i rezonantna stabilizacija.

### 1.2.3. Kvantitativni odnos strukture i biološke aktivnosti (QSAR)

Kvantitativan odnos struktura/osobine (*Quantitative Structure Property Relationship; QSPR*) i kvantitativan odnos struktura/aktivnost (*Quantitative Structure Activity Relationships; QSAR*) (41-43) su matematički modeli koji pokazuju zavisnost fizičko-hemijskih osobina/biološke aktivnosti od strukture jedinjenja (44). *QSAR/QSPR* su *in silico* metode od ogromnog značaja za razvoj medicinske hemije i biohemije. Iako nije uvek lako naći korelaciju struktura/aktivnost/osobine, eksponencijalni rast broja radova koji se bave *QSAR/QSPR* studijama jasno pokazuje napredak u ovoj oblasti.

Kvantitativni odnos struktura/toksičnost (*Quantitative Structure-Toxicity Relationship; QSTR*) ili kvantitativni odnos struktura/farmakokinetika (*Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship; QSPkR*) su slični modeli koji korelišu toksičnost/farmakokinetičke osobine jedinjenja i hemijsku strukturu. Bez obzira na razliku u terminologiji svi modeli su zasnovani na istom principu koji podrazumeva da je biološka aktivnost/osobine jedinjenja funkcija strukture i da se karakteristike molekula mogu opisati različitim molekulskim deskriptorima.

$$\text{Biološka aktivnost} = f(\text{Fizičko-hemijske osobine})$$

Značaj primene *QSAR/QSPR* je u tome što:

- eksperimenti potrebni za razumevanje fizičkih, hemijskih i bioloških osobina jedinjenja su veoma skupi;
- *In silico* modeli omogućavaju bolje razumevanje interakcije ili reakcije između molekula i njihove aktivnosti;
- Pružaju korisne informacije o biološkoj aktivnosti koje se mogu iskoristiti za istraživanje lekova i predviđanje *ADMET*-a;
- Omogućavaju predviđanje osobina/aktivnosti jedinjenja pre njihove sinteze.

Matematički *QSAR/QSPR* modeli se zasnivaju na informacijama dobijenim na osnovu hemijske strukture a ne na osnovu eksperimentalnih vrednosti. Kvalitet modela zavisi od različitih faktora kao što su kvalitet podataka, analiza deskriptora, statističke metode i validacija.

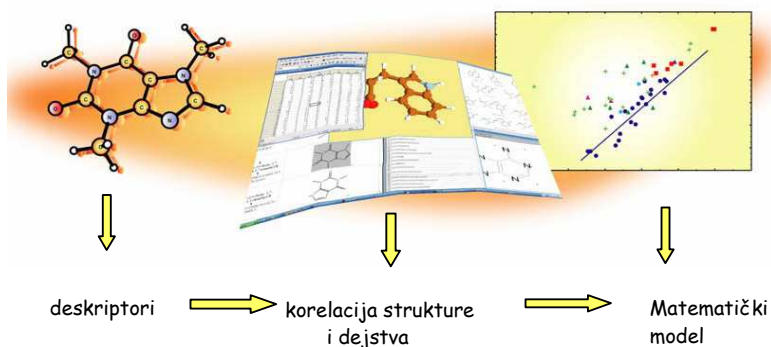
*QSAR/QSPR* metodologija se sastoji od tri koraka: prikaz molekulske strukture, analiza deskriptora i izgradnja modela. Prvi korak obuhvata crtanje strukture jedinjenja u odgovarajućem kompjuterskom programu. *2D* struktura jedinjenja se koristi za dobijanje konformera najniže energije, dok *3D* molekularni model je neophodan za izračunavanje geometrijskih deskriptora.

Drugi korak u *QSAR/QSPR* studijama je generisanje molekularnih deskriptora. Molekularni deskriptori su numeričke vrednosti koje predstavljaju određene molekulske osobine (45-48). U početku su kao deskriptori korišćena samo jednostavna svojstva molekule: rastvorljivost, Log P, jonizaciona konstanta, da bi se vremenom njihov broj povećao na više hiljada danas poznatih. Veoma je važan pravilan odabir molekularnih deskriptora koji će biti korišćeni u *QSAR* analizi. Često su deskriptori korelisani tako da sadrže redundantnu informaciju, pa je poželjno odabrati skup deskriptora koji daje robustan model lak za interpretaciju (49).

Treći korak (Slika 4) predstavlja formiranje modela primenom odgovarajućih statističkih metoda sa ciljem da se uspostavi korelacija između odabranih molekularnih deskriptora i određene osobine jedinjenja (npr. biološka aktivnost, hromatografska retencija...). Kao statističke metode koriste se: multipla linearna regresija (*Multiple Linear Regression, MLR*), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Square Regression, PLS*), veštačke neuronske mreže (*Artificial Neural Networks, ANN*) ili klasifikaciona i regresiona stabla (*classification and regression trees*).

Svaki *QSAR/QSPR* model se na kraju mora validirati čime se potvrđuje mogućnost primene u predviđanju analizirane osobine jedinjenja.

Validacija *QSAR/QSPR* modela predstavlja proces kojim se proverava kvalitet i sposobnost predviđanja formiranih modela. Statistički parametri koji se izračunavaju u cilju validacije formiranih modela su *RMSEE* (*Root Mean Square Error of Estimation*), *RMSEP* (*Root Mean Square Error of Prediction*),  $R^2$  (koeficijent determinacije formiranog modela), F-odnos, p-vrednost, interni validacioni parametar  $Q^2$ ,  $r$  (koeficijent korelacije između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti) i eksterni validacioni parametar  $R^2_{obs\ vs\ pred}$ . *RMSEE* i *RMSEP* predstavljaju greške predviđanja modela.  $Q^2$  je interni validacioni parametar koji omogućava procenu sposobnosti predviđanja predloženog modela za jedinjenja koja su slična jedinjenjima *training* seta. Visoke vrednosti  $Q^2$  se ne smatraju dovoljnim kriterijumom u proceni kvaliteta formiranog modela. Za procenu sposobnosti predviđanja modela za jedinjenja koja se strukturno razlikuju od jedinjenja *training* seta, koristi se parametar  $R^2_{obs\ vs\ pred}$  (eksterni validacioni parametar). Smatra se da modeli čija je vrednost  $R^2_{obs\ vs\ pred}$  veća od 0,5 imaju dobru sposobnost predviđanja. Dobar model se odlikuje i visokom vrednostima koeficijenta korelacije ( $r$ ) predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti. F-odnos služi za procenu statističke značajnosti formiranih modela, dok p-vrednost predstavlja nivo važnosti F-odnosa. Modeli čija je p-vrednost niža od 0,05 se smatraju statistički značajnim.



**Slika 4.** Shematski prikaz *QSAR* ispitivanja

(izvor slike: [www.farmacy.untz.ba/slatkis/file.php?file=Zorica\\_Vujic\\_QSAR.pdf](http://www.farmacy.untz.ba/slatkis/file.php?file=Zorica_Vujic_QSAR.pdf))

Tokom istraživanja *QSAR* studija, došlo je do razvoja *QSRR* studija (*Quantitative Structure Retention Relationships*) koje za određivanje odnosa između strukture i osobina jedinjenja koriste hromatografske parametre.

#### **1.2.4. Kvantitativni odnos strukture i retencije (*QSRR*)**

*QSRR* se zasniva na uspostavljanju matematičkog modela koji koreliše hromatografske retencione parametre i odgovarajuće karakteristike jedinjenja (50). Hromatografske tehnike su pogodne jer se odlikuju visokom preciznošću i reproduktivnošću i omogućavaju dobijanje velikog broja podataka pod istim eksperimentalnim uslovima, koji se mogu međusobno korelisati.

*QSRR* analiza uspostavlja korelaciju između retencionih parametara (dobijenih metodom gasne hromatografije, visoko-efikasne tečne hromatografije ili tankoslojne hromatografije) i deskriptora koji su izvedeni iz molekulske strukture odgovarajućih jedinjenja. Veoma je poželjno da *QSRR* model koristi jedinjenja koja su deo homologe serije, zbog postojanja dobre korelacije između retencije i deskriptora koji opisuju strukturu molekule (51). Ukoliko je broj dostupnih deskriptora veliki, najčešće primenjivana statistička metoda je višestruka linearna regresija, često u kombinaciji sa prethodnom selekcijom varijabli (npr. genetski algoritam) (52-55).

Međusobna povezanost retencionih i fizičko-hemijskih parametara i biološke aktivnosti omogućava predviđanje osobina molekula kao što su su particioni koeficijent (Log P) (56-59), tačka ključanja (60), napon pare (61), toplota isparavanja (62), Gibbs-ova slobodna energija (63) ili hiralna selektivnost (64).

Značaj *QSRR* modela je u tome što:

- omogućava ekonomičnost i ekspeditivnost u procesu razvoja novih molekula (65, 66);
- omogućava određivanje fizičko-hemijskih i bioloških parametara za supstance koje još uvek nisu ispitane u eksperimentalnim uslovima;

- određivanje retencionih mehanizama na različitim stacionarnim fazama, što omogućava dizajniranje novih stacionarnih faza koje će imati željene karakteristike (67-72);
- na osnovu retencionih podataka mogu se predvideti fizičko-hemijski osobine (51).

Iako preciznost i tačnost *QSRR* modela nije uvek dovoljno dobra za predviđanje retencije, ovi modeli se mogu koristiti za razumevanje retencionih mehanizama, optimizaciju razdvajanja jedinjenja u smeši, selekciju najznačajnijih deskriptora, određivanje složenih fizičko-hemijskih osobina ili procenu potencijalne biološke aktivnosti (73).

Za svaki *QSRR* model neophodna je validacija. Statistički parametri koji se najčešće koriste za validaciju *QSRR* modela su: kvadrat koeficijenta korelacije  $R^2$ , korigovani koeficijent korelacije  $R^2$  (*adjusted R<sup>2</sup>*), standardna greška (*standard error, SE*) i koeficijent determinacije koji je dobijen unakrsnom validacijom ( $Rcv^2$ ).

### 1.2.5. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptor je konačni rezultat logičkog i matematičkog postupka koji hemijsku informaciju o molekulu prevodi u numeričku vrednost (41). Molekulski deskriptori su numeričke vrednosti koje predstavljaju određene osobine ispitivanih hemijskih struktura i mogu se odnositi na ceo molekul ili deo molekula. Geometrijske, sterne i elektronske osobine jedinjenja koje su odgovorne za biološka, fizička i hemijska svojstva mogu se predstaviti pomoću jednog ili više numeričkih deskriptora.

U medicinskoj hemiji molekulski deskriptori se koriste za definisanje veze između hemijske strukture i biološke aktivnosti, ali se mogu koristiti i za predviđanje i procenu određenih karakteristika molekula (41). Vrednost molekulskog deskriptora se može odrediti računski (primenom matematičkog algoritma) ili eksperimentalnim putem (41).

Dobro odabran molekularni deskriptor adekvatno predstavlja strukturu, koreliše sa barem jednom osobinom molekula, može da razlikuje izomere, primenljiv je na delove strukture, nije u korelaciji sa drugim deskriptorima, nezavisan je i lako se izračunava, može se primeniti i na strukturno slična jedinjenja, a sa promenama u strukturi i sam pokazuje promene, i stoga može da se primeni u *QSAR/QSPR/QSRR* analizi (48).

Najčešće korišćeni deskriptori u *QSAR/QSPR/QSRR* analizi su:

- Deskriptori koji opisuju topološke osobine molekula (atomske veze u molekulu, veličina, simetrija, račvanje, oblik molekula);
- Konstiticioni deskriptori (molekulska težina, broj i tip atoma u molekulu);
- Geometrijski deskriptori (izvedeni iz trodimenzionalne strukture molekula, molekularni volumen, sterne osobine molekula);
- Deskriptori koji opisuju elektronske osobine molekula (lipofilnost, sposobnost građenja vodoničnih veza, naelektrisanje, polarizabilnost, dipolni moment, različite vrste energije).

U *QSAR*, *QSRR* i *QSPR* modelima se koristi veliki broj deskriptora. Pomoću odgovarajućih softvera definisano je i izračunato preko 5000 deskriptora (45). Za postavljanje *QSAR*, *QSRR* i *QSPR* modela i dalje predviđanje biološke aktivnosti molekula i njegovog ponašanja u fiziološkom sistemu važno je odabrati deskriptore koji na adekvatan način prezentuju strukturu molekula.

#### **1.2.5.1. Eksperimentalni i teorijski deskriptori**

Molekularni deskriptori mogu biti određeni eksperimentalno i najčešće se odnose na fizičko-hemijske osobine molekula (dipolni momenat, Log P, polarizabilnost) ili se mogu izračunati teorijski, korišćenjem različitih kompjuterskih programa. Kod eksperimentalno određenih deskriptora može se javiti statistička greška koja potiče od merenja, a koju ne sadrže teorijski deskriptori, dok se kod teorijskih deskriptora javljaju greške koje potiču od potrebe da se primene određene aproksimacije kako bi se pojednostavilo izračunavanje.

Prednost teorijskih deskriptora je njihova dostupnost i mogućnost smanjenja troškova i vremena ispitivanja (74) za razliku od eksperimentalnih do kojih se često teško može doći. Velika prednost eksperimentalnih deskriptora je direktna korelacija između deskriptora i neke osobine molekula.

### 1.2.5.2. Tipovi molekulskih deskriptora

Molekulski deskriptori, koji pripadaju grupi teorijskih deskriptora, se prema složenosti (41, 42) i prema vrsti algoritma koji se koristi za njihovo izračunavanje mogu podeliti na *0D*-, *1D*-, *2D*-, *3D*- i *4D*- molekulski deskriptore (42).

- **nulti deskriptori (*0D*)** – su najjednostavniji, bezdimenzionalni deskriptori koji se dobijaju iz molekulske formule i ne zavise od molekulske strukture (vrsta i broj atoma);
- **jednodimenzionalni deskriptori (*1D*)** – odnose se na funkcionalne grupe i segmente koji su značajni za molekul (broj primarnih, sekundarnih i tercijarnih ugljenikovih atoma);
- **dvodimenzionalni deskriptori (*2D*)** – nazivaju se i topološki deskriptori, odnose se na veličinu, fleksibilnost i lipofilnost molekule (način povezivanja atoma i priroda hemijskih veza);
- **trodimenzionalni deskriptori (*3D*)** – nazivaju se i geometrijski deskriptori jer daju informaciju o prostornoj orijentaciji i konformaciji molekula (Van der Valsove zapremine, energije interakcije) (41-43);
- **četvorodimenzionalni deskriptori (*4D*)** – odnose se na sterna svojstva molekule i daju informacije o elektronskoj raspodeli i interakciji polja datog molekula i okruženja.

Prednost *0D* i *1D* deskriptora je lako izračunavanje i tumačenje, a nedostatak je veliki broj molekula sa istim vrednostima ovih deskriptora. Premda *3D* i *4D* deskriptori nose više informacija nego jednostavni deskriptori, nedostatak je što njihovo korišćenje često rezultira nereproduktivnim modelima.

U *QSRR* modelima često korišćen parametar je Log P koji se primenjuje za određivanje parametara lipofilnosti i za predviđanje lipofilnosti jedinjenja (56,57).



## 1.3. Lipofilnost

Berthelot i Jungfleisch su 1872.godine definisali particioni koeficijent (koeficijent raspodele, podeoni koeficijent) kao ravnotežnu raspodelu supstance između dva rastvarača koja se ne mešaju, na konstantnoj temperaturi (75). Meyer (76) i Overton (77) su proučavali postojanje veze između rastvorljivosti u lipidima i biološke aktivnosti jedinjenja.

Lipofilnost jedinjenja u velikoj meri određuje biološku aktivnost. Najveći broj ćelijskih membrana u organizmu se sastoji od dvostrukog lipoproteinskog sloja koji zbog svoje hidrofobnosti omogućava transport lipofilnih supstanci, dok je slobodna difuzija polarnih molekula kroz membranu otežana ili onemogućena. Takođe, lipofilnost značajno određuje ligand-receptor interakcije i druge ligand-makromolekul interakcije (npr. vezivanje neurotransmitera, hormona i lekova za receptore, kao i enzim-supstrat i antigen-antitelo interakcije).

Za eksperimentalno određivanje lipofilnosti najčešće se koriste dva rastvarača koja se ne mešaju, pri čemu je jedan rastvarač voda (ili vodeni pufer) a drugi organski rastvarač. Ovakva smeša rastvarača oponaša biološku membranu: voda (ili vodeni pufer) simulira unutrašnjost kompartmenta (ćelije, membrane...) koja je relativno hidrofilna, dok organski rastvarač simulira hidrofobni (lipidni) deo membrane.

### 1.3.1. Podeoni koeficijent P

Lipofilnost se izražava preko podeonog koeficijenta P i predstavlja odnos koncentracije rastvorka u vodenoj i organskoj fazi (78). Zbog velikog opsega vrednosti podeonog koeficijenta, u *QSAR* i *QSRR* modelima koristi se logaritamska vrednost, odnosno Log P.

$$\text{Log P} = \text{Log} \frac{C_o}{C_w}$$

gde je  $C_w$  koncentracija rastvorka u vodenoj fazi, a  $C_o$  koncentracija rastvorka u nepolarnom organskom rastvaraču, npr. n-oktanolu. Visoka vrednost podeonog

koeficijenta ukazuje da je molekul lipofilan i obrnuto, kada je vrednost podeonog koeficijenta niska, molekul je hidrofilan (79). Log P opisuje lipofilnost neutralnog oblika molekula i ne uključuje disocijaciju ili jonizaciju.

### 1.3.2. Distribicioni koeficijent D

Parametar lipofilnosti molekula koji uzima u obzir i stepen jonizacije jedinjenja (definiše je  $pK_a$ ) je koeficijent distribucije D. Koeficijent distibucije predstavlja odnos koncentracija jonizovanog i nejonizovanog oblika jedinjenja u organskoj i vodenoj fazi, odnosno definiše lipofilnost pri određenoj pH vrednosti. Iako koeficijent distribucije bolje opisuje lipofilnost jedinjenja, izračunavanje je veoma kompleksno zbog čega se u *QSAR/QSRR* ispitivanjima više koristi Log P.

Vrednost Log P, kao mera lipofilnosti, trenutno se najviše koristi u medicinskoj hemiji i molekularnoj farmakologiji, gde je formirana baza podataka Log P vrednosti na osnovu podataka koji su dobijeni eksperimentalnim putem i teorijskim izračunavanjima (80-82). Značaj određivanja Log P i Log D:

Predviđanje **apsorpcije**:

- ❖ Optimalna penetracija u **CNS** (Log P =  $2 \pm 0,7$ )
- ❖ Optimalna **oralna apsorpcija** ( $-\text{Log P} = 1,8$ )
- ❖ Optimalna **intestinalna apsorpcija** (Log P = 1,35)
- ❖ Optimalna **apsorpcija u debelom crevu** (Log P = 1,32)
- ❖ Optimalna **sublingvalna apsorpcija** (Log P = 5,5)
- ❖ Optimalna **perkutana apsorpcija** (Log P = 2,6, mala MW)

Predviđanje **farmakokinetičkih osobina i toksičnosti**:

- ❖ Visoka vrednost Log P (**toksični lekovi**)-deponovanje u masnom tkivu
- ❖ **Metabolizam u funkcijiji Log D** (renalni i metabolički klirens, P450)

Predviđanje **aktivnosti leka sa receptorom**

- ❖ Hidrofobne reakcije sa receptorom

Izbor **doziranog oblika**

- ❖ Niska vrednost Log P ( $< 0$ ) **injekcioni rastvori**
- ❖ Srednja vrednost Log P (0-3) **oralni preparati**
- ❖ Visoka vrednost Log P (3-4) **transdermalni preparati**

### 1.3.3. Određivanje Log P

Upotreba Log P vrednosti kao parametra lipofilnosti počinje 1964.godine sa Hasch-ovim istraživanjima. Prvi pregled particionih koeficijenata objavili su Leo, Hansch i Elkins 1971. godine, a sadržao je blizu 6000 vrednosti, uključujući i vrednosti za 800 jedinjenja koje su autori eksperimentalno odredili (83).

Određivanje vrednosti Log P moguće je eksperimenatalnim i računskim putem. Eksperimenatalne metode određivanja Log P mogu biti direktne i indirektne. Klasičan način eksperimentalnog određivanja Log P je metoda mućkanja (84-85) i izvodi se sistemu oktanol/voda.

Nakon razvoja UV spektroskopskih metoda, određivanje particionog koeficijenta predstavlja rutinski postupak za jedinjenja koja imaju dovoljnu rastvorljivost u vodi i dovoljnu apsorpciju u UV oblasti.

#### 1.3.3.1. Određivanje lipofilnosti metodom mućkanja (*shake-flask*)

Metoda mućkanja se izvodi tako što se određena količina ispitivane supstance mućka u sistemu dva rastvarača, koji se slabo mešaju. Po uspostavljanju dinamičke ravnoteže, kada se slojevi razdvoje, u svakoj od faza se odredi koncentracija ispitivane supstance.

Iako izvođenje metode mućkanja izgleda jednostavno, prilikom praktičnog rada mogu se javiti brojni problemi kao što su: kontrola temperature, utvrđivanje vremena koje je potrebno da se uspostavi ravnoteža faza, procena minimalne zapremine svake od faza podeonog sistema u kojima je moguće detektovati supstancu i izmeriti njenu koncentraciju (86).

Klasična metoda mućkanja se najčešće izvodi u sistemu oktanol/voda mada se mogu koristiti i drugi rastvarači. Najčešće se koristi 1-oktanol (strukturu čini osam hidrofobnih ugljenikovih atoma i jedna hidrofilna primarna alkoholna grupa) jer daje podatke koji su najbliži onima koji se dobijaju u *in vivo* uslovima. Zahvaljujući

hidroksilnoj funkcionalnoj grupi n-oktanol pripada grupi amfiprotinskih rastvarača, jer u vodoničnoj vezi može da bude i donor i akceptor elektrona (87). Zajednička osobina bioloških membrana i n-oktanola da sadrže polarne funkcionalne grupe koje mogu imati ulogu i donora i akceptora vodonika (što se naročito odnosi na *OH-funkcionalne grupe*) čini da je n-oktanol izrazito pogodan za modelovanje procesa raspodele kroz biološku membranu (88).

Kod drugih tipova bioloških membrana drugi sistemi rastvarača mogu biti pogodniji. Leahy i saradnici su 1989.godine u svojim istraživanjima sugerisali da membrane (ili receptori) mogu imati drugačije karakteristike u pogledu mogućnosti ostvarivanja vodoničnih veza u odnosu na oktanol (89), odnosno da postoje membrane koje ne sadrže ni proton-donorske ni proton-akceptorske grupe. Za membrane koje nemaju ni proton-donorske ni proton-akceptorske karakteristike modelovanje se vrši inertnim rastvaračima (alkani/voda podeoni sistem). Kada membrane u svojoj strukturi sadrže proton-donorske funkcionalne grupe, kao referentni podeoni sistem koristi se hloroform/voda, a kada su u membrani dominantne proton-akceptorske funkcionalne grupe (fosfolipidna membrana) kao referentni sistem rastvarača koristi se smeša propilen-glikol-dipelargonat (PGDP)/voda (90). Leahy je odredio particione koeficijente za mnoga jedinjenja za sistem PGDP/voda.

Nedostatak metode mućkanja je dugo vreme izvođenja eksperimenta i potrebna relativno velika količina supstance koja se ispituje. Takođe, u podeonom sistemu oktanol/voda može doći do stvaranje emulzije između rastvarača prilikom određivanja Log P jedinjenja koja imaju veliku lipofilnost ( $\text{Log P} > 6$ ). Metoda nije pogodna za jedinjenja čija disocijacija zavisi od koncentracije i može se primeniti samo kod nejonizovanog oblika molekula koji disosuje uz upotrebu odgovarajućeg pufera. Za određivanje lipofilnosti jedinjenja koja jonizuju, pokazuju slabu rastvorljivost ili slabu apsorpciju u UV oblasti koriste se alternativne metode.

Postoje jedinjenja za koja nije moguće odrediti particioni koeficijent primenom tradicionalnog načina mućkanjem (91). U ovakvim slučajevima koristi se modifikovana metoda mućkanja.

Metoda sporog mešanja predstavlja modifikaciju metode mućkanja. Princip izvođenja obe metode je isti, samo što se metodom sporog mešanja izbegava formiranje emulzije tako što se rastvarači sporo mešaju do uspostavljanja ravnoteže. Iako obe metode dugo traju, relativno su pouzdane kod određivanja lipofilnosti neutralnih molekula kao i jonizovanih molekula u njihovom neutralnom obliku (92).

### 1.3.3.2. Određivanje Log P indirektnim metodama

Lipofilnost molekula se, osim direktnog određivanja metodom mućkanja, može odrediti indirektnim metodama. U indirektno metode određivanja lipofilnosti jedinjenja spadaju: hromatografija na obrnutim fazama, micelarna/mikroemulziona elektrokinetička hromatografija, pH-metrijska metoda, metoda filter probe i druge metode.

*a) Hromatografija na obrnutim fazama* predstavlja brz i jednostavan način da se eksperimentalno odredi Log P s obzirom na činjenicu da ne zahteva bilo kakva kvantitativna određivanja. Međutim, budući da se hromatografski sistemi razlikuju od klasičnih podeonih sistema (metode mućkanja), posebno ukoliko se ispitivane supstance u velikoj meri razlikuju od referentnih, nekad je potrebno primeniti multivarijantne tehnike izračunavanja u kombinaciji sa molekulskim deskriptorima. Ova metoda se nije pokazala efikasnom za određivanje lipofilnosti hlorovanih ugljovodonika i, uopšte gledano, supstanci sa niskim vrednostima Log P. Pored toga, radni opseg pH-vrednosti na silikagelu je ograničen na pH 2-7,5.

Primenu reverzno-fazne tankoslojne hromatografije su opisali Martin i Syngle još 1941.godine. Oni su otkrili da  $RF$  vrednost dobijena metodom tankoslojne hromatografije, gde je hidrofilna, polarna stacionarna faza, zamenjena hidrofobnom, nepolarnom stacionarnom fazom, može da se dovede u vezu sa particionim koeficijentom (93). Ispitivanje lipofilnosti korišćenjem hromatografskih tehnika se nastavilo istraživanjima Conseden-a (94) koji je utvrdio odnos između retardacionog faktora dobijenog u uslovima particione hromatografije i particionog koeficijenta. Bate-Smith i Westall (95) su uveli  $R_M$  vrednost i utvrdili linearnu zavisnost između hemijske strukture jedinjenja i ponašanja u hromatografskom sistemu.

$$R_M = \log \frac{1 - RF}{RF}$$

Retardacioni faktor jedinjenja se definiše kao odnos puta koji je prešla supstanca (*a*) i puta koji je prešao rastvarač (*b*), što se može predstaviti na sledeći način:

$$R_M = \log \frac{b - a}{a}$$

Vrednost  $R_M$  je jednaka logaritmu odnosa rastojanja između zone supstance i fronta rastvarača (što je mera interakcije supstance sa lipofilnom stacionarnom fazom) i puta koji je prešla ispitivana supstanca (što je mera puta koji prelazi supstanca sa hidrofilnom mobilnom fazom). Nepolarne supstance jače reaguju sa stacionarnom fazom, imaju niže  $RF$  i više  $R_M$  vrednosti.

$R_M$  vrednosti su u direktnoj korelaciji sa lipofilnošću jedinjenja. 1965.godine je prvi put objavljen rad gde je biološka aktivnost leka korelisana sa  $R_M$  vrednošću, kao parametrom lipofilnosti (96). Do danas je publikovan veliki broj radova u kojima je opisana dobra korelacija između  $R_M$  i Log P vrednosti (97, 98).

#### *Reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (RP TLC)*

Primenom RP TLC analize može se postaviti zavisnost između  $R_M$  vrednosti i zapreminskog udela organske komponente ( $\varphi$ ) (uz ekstrapolaciju  $R_M$  vrednosti na nultu koncentraciju organske komponente ( $R_M^0$ ), odnosno na čistu vodu):

$$R_M = R_M^0 + m \cdot \varphi$$

gde je  $m$  nagib prave, a  $R_M^0$  vrednost odsečka.

Vrednosti  $R_M^0$ , i  $m$  predstavljaju parametre lipofilnosti jedinjenja ( $m$  vrednost je povezana sa specifičnom hidrofobnom površinom rastvarača) (99).

U poređenju sa klasičnom metodom mućkanja, prednosti RP TLC tehnike su: mala potrebna količina ispitivanog jedinjenja, ispitivana supstanca ne mora da bude čista, mogućnost određivanja lipofilnosti širokog raspona, nije neophodno određivanje koncentracije jedinjenja.

#### *Reverzno-fazna visoko-efikasna tečna hromatografija (RP HPLC)*

U HPLC metodi kao stacionarna faza najčešće se koriste alkil modifikovani silikagel (npr. RP-2, RP-8 i RP-18) ali i druge vrste hemijski modifikovanih silika (npr. CN- i

NH<sub>2</sub>-modifikovan silikagel), dok se kao mobilna faza najčešće koristi smeša vode (ili pufera) i organskog rastvarača (tzv. *modifikatora*), koji mogu biti u različitim odnosima. Organski modifikatori su najčešće metanol, acetonitril i aceton, nešto ređe dioksan i tetrahidrofuran. U najvećem broju slučajeva koristi se metanol jer u pogledu fizičko-hemijskih osobina pokazuje najveću sličnost sa vodom (100).

Određivanje lipofilnosti molekula primenom HPLC hromatografske metode je opisano u brojnim radovima. Bez obzira na često dobru korelaciju između hromatografskih retencionih parametara i Log P jasno je da hromatografski procesi ne mogu u potpunosti zameniti klasični pristup određivanja Log P vrednosti. Važno je napomenuti da u hromatografskim metodama eventualna ravnoteža između dve faze povlači sa sobom različite međumolekulske interakcije: rastvorena supstanca-stacionarna faza, rastvorena supstanca-mobilna faza, mobilna faza-stacionarna faza, mobilna faza-mobilna faza i međusobne interakcije fleksibilnih fragmenata stacionarne faze (101) što može da bude razlog što se ponekad dobijaju prilično umerene zavisnosti između retencionih parametara i Log P vrednosti.

**b) Micelarna/mikroemulziona elektrokinetička hromatografija** koristi površinski aktivne supstance, u koncentraciji blizu njihove kritične micelarne koncentracije. Precizna je za merenje Log P neutralnih molekula, dok kod molekula koji disosuju ne daje tačne Log P vrednosti (98).

**c) pH-metrijska metoda** podrazumeva izvođenje dve uzastopne titracije. Prva titracija se izvodi sa 0,5mol/dm<sup>3</sup> KOH do postizanja visoke pH-vrednosti, potom se dodaje n-oktanol i dvokomponentna smeša ponovo titrira sa 0,5mol/dm<sup>3</sup> HCl do početne pH vrednosti. Lipofilne supstance pokazuju razliku između prve i druge titracione krive, a iz titracione krive mogu se očitati dve konstante: pK<sub>a</sub> iz prve, i p<sub>o</sub>K<sub>a</sub> iz druge titracione krive. Velika razlika u vrednosti konstanti ukazuje na visoku lipofilnost. pH-metrijska metoda je sporija od HPLC metode ali se može koristiti kao zamena za metodu mućkanja u ispitivanju jonizovanih molekula (molekul mora biti jonizovan i imati pK<sub>a</sub> u odgovarajućem pH-opsegu) (102).

*d) Metoda filter probe* je slična potenciometrijskoj metodi, razlika je u tome što se ispitivane supstance detektuju spektrofotometrijski. Metoda je vrlo brza i tačna, a nedostatak je što se ne može primeniti kod molekula sa vrednostima Log P manjim od 0,2.

#### **1.3.3.3. Određivanje Log P računskim putem**

Pored eksperimentalnih metoda za određivanje Log P često se koriste računске metode. Danas postoji najmanje dvadeset softverskih programa koji se koriste za izračunavanje lipofilnosti molekula, a metode na kojima se zasnivaju podeljene su na: fragmentacione metode (*CLOG P*, *KLOG P*, *ACD/Log P*, *AB/LOG P*) koje uzimaju u obzir doprinos pojedinih fragmenata u molekulu i korekcionni faktor usled intramolekulskih interakcija (103, 104); atomske metode (*SMILOG P*, *TSAR*, *CHEMICALC*, *Prolog P*, *Dragon*) koje podrazumevaju doprinos pojedinačnih atoma (105) i metode koje se zasnivaju na molekulskim svojstvima (*ASClog P*, *A log Ps*) kod kojih se izračunavanje bazira na 3D strukturi molekule ili na empirijskim zavisnostima.

Metoda kompjuterskog izračunavanja Log P ima veliku prednost u odnosu na eksperimentalna određivanja kada je potrebno brzo odrediti parametar lipofilnosti za veliki broj jedinjenja i kada je potrebno izračunati Log P za molekule velike lipofilnosti. Nedostatak ove metode je pojava greške kada se radi o molekulima složene strukture, čiji se pojedini fragmenti ne mogu naći u bazi podataka, kao i nepreciznost merenja za cviter-jonske, tautomerne, naelektrisane molekulske strukture (jer je metoda predviđena za merenja koja se odnose na neutralne molekule) i molekule koji grade jake vodonične veze.

#### **1.3.3.4. Primena QSRR u proceni lipofilnosti molekula**

Raspodela molekula između dve tečne faze koje se ne mešaju (koja je prisutna u reverzno-faznom hromatografskom sistemu) u svojoj suštini ima proces raspodele, na sličan način kao što i dinamički procesi apsorpcije, distribucije, izlučivanja lekova kao i njihove interakcije sa receptorima, u svojoj osnovi imaju proces raspodele (106, 107). Upravo ta činjenica daje mogućnost korišćenja *QSRR* modela u brzom i efikasnoj proceni lipofilnosti (hidrofobnosti) ksenobiotika (108).



U HPLC i TLC sistemu retencija se određuje u dvokomponentnoj mobilnoj fazi čiji sastav može da varira, pa je ekstrapolacija uobičajeni postupak standardizacije hromatografskih parametara (oba retencionna parametra ( $\text{Log } k_w$  i  $R_M^0$ ) se dobijaju ekstrapolacijom).  $\text{Log } k_w$  i  $R_M^0$  predstavljaju retenciju supstance u čistoj vodi čime se uticaj organskog rastvarača svodi na minimum. U upotrebi su dva modela koji prikazuju međusobnu zavisnost retencionih parametara i sastava mobilne faze: linearni i kvadratni. U slučaju da mobilnu fazu čini smeša metanol/voda, oba modela (i linearni i kvadratni) daju slične rezultate i ekstrapolisane vrednosti ne pokazuju statistički značajnu razliku. Nasuprot tome, kada se mobilna faza sastoji od acetonitrila i vode, između izračunatih vrednosti dobijenih primenom kvadratnog i linearnog modela se javlja statistički značajna razlika (109). Imajući u vidu da se u većini slučajeva najbolje korelacije između  $\text{Log } P$  i  $\text{Log } k_w$  postižu primenom linearnog modela, sa mobilnom fazom metanol-voda, za određivanje lipofilnosti molekula kao mobilna faza najčešće se koristi smeša ova dva rastvarača gde udeo organske komponente varira između 30% i 80%.

## 1.4. Molekulsko modeliranje ciljnog makromolekula

Precizno definisanje strukture proteina (koje uključuje poznavanje trodimenzionalne strukture) je otežano usled složenosti u postupcima izolovanja, prečišćavanja, solubilizacije i kristalizacije proteina. Zbog toga je kristalografska struktura proteinskih molekula dostupna za relativno mali broj proteina koji ulaze u sastav ćelijske membrane, uključujući jonske kanale (110). Poznate su kristalografske strukture dva bakterijska jonska kanala za kalijum, i jednog kalijumovog kanala kod sisara (32, 33, 111).

Postojanje kanala sa istim evolutivnim poreklom omogućava modeliranje koje se zasniva na homologiji (*homologi modeli*) jer većina kanala iste familije ima očuvanu topologiju. Homologija podrazumeva kvalitativno opisivanje odnosa dva ili više proteinskih kanala, pri čemu je česta sličnost u trodimenzionalnoj strukturi, a tokom

evolucije među homologim proteinima se više zadržala prostorna struktura od sekvence (112, 113).

U homologom modelovanju identične aminokiselinske sekvence se preklapaju, što je jednostavan postupak kada je stepen homologije visok (preko 30%), ali kada je stepen homologije nizak procedura je složenija i često se javlja greška u konstrukciji modela (113).

### **1.4.1. Metoda molekuskog uklapanja**

Metoda uklapanja (molekulski *docking*) predstavlja kompjutersku simulaciju interakcije između receptora ili neke proteinske makromolekule (čija je kristalografska struktura poznata) i ispitivanog liganda. *Docking* se izvodi “vezivanjem” molekula koji se ispituje u različitim položajima, odnosno prostornim orijentacijama, za različite regione u ciljnom molekulu, i traži se najbolje molekulsko prepoznavanje. Cilj je naći ravnotežno stanje, odnosno geometrijsku konformaciju u kojoj je energija vezivanja minimalna. Ispitivanje interakcija ciljnog molekula i proučavane strukture može da podrazumeva rigidni *docking* i fleksibilni *docking*, sa tri moguća slučaja: rigidni ligand/rigidni receptor, fleksibilni ligand/rigidni receptor, fleksibilni ligand/fleksibilni receptor (114).

Broj stepeni slobode u rigidnom *dockingu* je šest međutim, u fleksibilnom *dockingu* taj broj se povećava. Veći broj stepeni slobode ima za posledicu povećanje broja potrebnih kompjuterskih proračuna zbog čega se primenjuju algoritmi (*search algorithms*) koji na osnovu procene energijske povoljnosti, za datu orijentaciju liganda (115) pomažu u definisanju optimalne interakcije. Molekulski *docking* treba da odgovori na pitanja kakva je struktura kompleksa vezanog liganda i makromolekula, kakva je energija vezivanja kompleksa, koji je kompleks najstabilniji i koje promene u strukturi proteinske komponente doprinose boljoj interakciji. Tačnost dobijenih podataka zavisi od metodologije primenjenog *dockinga* (115, 116).

Kompjuterski programi koji se najčešće koriste za molekulski docking su: *Dock* i *AutoDock* za molekulsko uklapanje, *Pentacle* za određivanje povoljnosti interakcija

između receptora i molekula, *Namd* za MonteCarlo metodu (MC) i metodu molekulske dinamike (MD), kao i *FRED*, *Glide*, *Molegro*, *e-Hits*, *Surfleks*, *PLANTS*, *GRAMM*, *FlexX*.

## 1.5. Razvoj rezistencije na antibiotike

Razvoj i uvođenje novih generacija antibiotika prati pojava rezistentnih bakterijskih sojeva koji danas predstavljaju značajan kliničko-terapijski problem. Bakterije se vrlo brzo razmnožavaju i efikasno prilagođavaju novom okruženju razvijajući odbrambene mehanizme protiv materija koje su za njih štetne. Učestale genetičke promene im omogućavaju stvaranje novih, za njih korisnih proteina, koji mogu dovesti do enzimske razgradnje ili modifikacije antibiotika ili uticati na propustljivost bakterijskih membrana.

Bakterijska rezistencija se vrlo brzo prenosi sa rezistentnih na osetljive sojeve zahvaljujući razmeni genetičkih elemenata u bakterijskoj populaciji koja se odvija različitim mehanizmima (konjugacija, transdukcija, transformacija i transpozicija). Ovaj vid širenja rezistencije se označava kao horizontalno prenošenje, dok vertikalni prenos rezistencije predstavlja prenos gena rezistencije na bakterijsko potomstvo (117).

Kako antibakterijski lekovi ne mogu razlikovati patogene bakterije od nepatogenih bakterija (koje pripadaju normalnoj flori) rezistencija se razvija i u normalnoj bakterijskoj flori, čime se stvaraju rezervoari gena rezistencije u prirodi.

Mehanizmi rezistencije na antibiotike su kompleksni, različiti i još uvek nedovoljno proučeni. Za bolje razumevanje mehanizama razvoja rezistencije potrebno je poznavanje fiziologije bakterijske ćelije kao i farmakološkog dejstva antimikrobnih lekova.

Bakterija može razviti rezistenciju na nekoliko načina. Prema poreklu rezistencija može biti urođena i stečena (negenetička i genetička). Geni odgovorni za rezistenciju mogu biti smešteni na hromozomu, ili izvan hromozoma, na plazmidu i na transpozonu.

Plazmidi nose ekstrahromozomsku DNK, a njihovo postojanje i replikacija se dešava nezavisno od hromozoma. Rezistencija koja se prenosi putem plazmida je često multipla, jer se plazmidi lako prenose sa jednog soja na drugi, sa vrste na drugu vrstu, čak i sa jednog roda na drugi. Transpozoni su segmenti DNK koji se lako prenose sa jednog plazmida na drugi, kao i sa plazmida na hromozom i obratno. Integroni su genetski elementi koji nose kasete gena rezistencije, zastupljeni su naročito kod multi-rezistentnih sojeva bakterija.

Mehanizmi rezistencije obuhvataju: enzimsku razgradnju i modifikaciju leka, izmenu ciljnog enzima, promenu propustljivosti omotača bakterijske ćelije, izmenu strukture ribozoma, izmenu uobičajenih metaboličkih puteva. Smanjena intracelularna koncentracija antibiotika je posledica smanjene permeabilnosti ćelijske membrane, porinske rezistencije koja se ogleda u izmeni propustljivosti porinskih kanala ili smanjenju njihovog broja (kod Gram negativnih bakterija) i aktivnog efluksa (najčešće uz pomoć specifičnih transportnih proteina). Inaktivacija antibiotika se javlja kao posledica sposobnosti mikroorganizama da produkuju enzime koji razaraju strukturu antibiotika. Na primer, beta-laktamaze razgrađuju većinu beta-laktamskih antibiotika, peniciline, cefalosporine, aztreonam; Gram-negativne bakterije produkuju enzime koji vrše acetilovanje, adenilaciju i fosforilaciju aminoglikozida, ili hloramfenikol acetil-transferazu koja inaktivira hloramfenikol. Izmena ciljnog proteina obuhvata izmenu penicilin vezujućeg proteina (PVP proteina)-smanjenje afiniteta ili broja, izmenu DNK giraze, ribozoma (najčešće izmenom na 30S ili 50S subjednici ribozoma), RNK polimeraze. Izmena metaboličkog puta se događa usled promene na metaboličkim enzimima kao što su sintetaze, giraze, reduktaze.

### **1.5.1. MRSA (Meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*)**

*Staphylococcus aureus* je jedan od najzastupljenijih mikroorganizama kod čoveka i najčešćih patogeni koji dovodi do infekcije kože i mekih tkiva. *S. aureus* može uzrokovati i sistemske infekcije kao što su pneumonija, osteomijelitis, sepsa, endokarditis i meningitis.

Početak kliničke primene penicilina čak 94% sojeva *S. aureus* je pokazivalo osetljivost na ovaj antibiotik, ali je već posle nekoliko godina razvijena rezistencija kod polovine sojeva (118). Rezistencija sojeva *S. aureus* je posledica sposobnosti bakterija da proizvode enzim beta-laktamazu, koja inaktivira antibiotik razlažući beta-laktamski prsten koji je neophodan za ispoljavanje antibakterijskog dejstva. Meticilin je antibiotik koji je u početku kliničke primene pokazivao aktivnost na rezistentne sojeve *S. aureus*. Vremenom su nastali novi sojevi *S. aureus* koji su rezistentni na meticilin tj. meticilin-rezistentni *S. aureus*-MRSA (119). Danas je MRSA jedan od najvažnijih izazivača intrahospitalnih infekcija (*hospital-acquired MRSA, HA-MRSA*), ali su MRSA sojevi izolovani i kod pacijenata koji dolaze iz vanbolničke sredine (*community-acquired MRSA* ili *community-associated MRSA, CA-MRSA*). Multirezistentni sojevi MRSA poseduju gene koji kodiraju rezistenciju i na druge antibiotike i danas predstavljaju značajan klinički problem. Veliki terapijski izazov predstavlja pojava vankomicin-intermedijarno osetljivog *S. aureus* (VISA) (120) i vankomicin-rezistentnog *S. aureus* (VRSA) (121). Rezistentni sojevi se odlikuju sposobnošću sinteze novog penicilin vezujućeg proteina-PVP2a, koji ima nizak afinitet za beta-laktamske antibiotike (122-125). Sinteza PVP2a je kodirana *mecA* genom, koji se nalazi na hromozomu *S. aureus* u *mec* regionu poznatom i kao stafilokokna hromozomska kasetna *mec* (*SCCmec*) (126).

*S. aureus* poseduje veliki broj faktora virulencije koji dovode do inhibicije komponenti komplementa i antimikrobnih molekula (127, 128), imaju uticaj na migraciju i funkciju leukocita (127, 129), izazivaju destrukciju leukocita (129) i imaju ulogu u kolonizaciji ćelija i tkiva domaćina.

U lečenju infekcija uzrokovanih MRSA sojevima najčešće se upotrebljavaju antibiotici iz grupe glikopeptida, kao što su vankomicin i teikoplanin. Međutim, pojavili su se glikopeptid-intermedijarno osetljivi sojevi *S. aureus* (GISA) (120, 130, 131). Većina CA-MRSA pokazuje osetljivost na vankomicin, teikoplanin, gentamicin, klindamicin, trimetoprim-sufametoksazol, doksiciklin, minociklin, hloramfenikol, fluorohinolone, rifampin i linezolid (132). Izbor antibiotika u lečenju infekcije zavisi od težine i lokalizacije infekcije. Najotporniji na antibiotike su HA-MRSA sojevi koji pokazuju

multirezistentan fenotip. Infekcije izazvane ovim sojevima *S. aureus* leče se primenom kombinovane antibiotske terapije.

### **1.5.2. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je jedan od najčešćih izazivača infekcija koje se javljaju u bolnicama. Ovaj mikroorganizam se odlikuje urođenom rezistencijom na mnoge antibiotike i ima veliku sposobnost razvoja multirezistentnih sojeva. *Pseudomonas aeruginosa* razvija rezistenciju različitim mehanizmima: smanjenjem propustljivosti ćelijske membrane, aktivnim izbacivanjem antibiotika iz ćelije (efluks), sintezom enzima koji narušavaju strukturu antibiotika i izmenom ciljnog mesta delovanja, čime se smanjuje efikasnost antibiotika. *P.aeruginosa* ima izuzetno malu propustljivost spoljašnje membrane, svega 8% propustljivosti membrane *Escherichia coli* čime je sprečen ulazak antimikrobnih lekova u ćeliju (133).

Pod pojmom "efluks" podrazumeva se aktivno izbacivanje molekula iz ćelije (134). Izbacivanje se dešava uz pomoć pumpe koju čine kompleksni transmembranski sistemi sastavljeni od tri dela: transportni protein smešten u ćelijskoj membrani, porin smešten u spoljašnjoj membrani i protein smešten u periplazmatskom prostoru koji povezuje porin i transportni protein. Ovakva građa obrazuje kanal koji se pruža kroz čitavu debljinu membrane bakterijske ćelije, omogućavajući izbacivanje lipofilnih i amfifatičnih lekova iz periplazmatskog prostora i citoplazme u spoljašnju sredinu. Aktivnim efluksom se smanjuje koncentracija antibiotika, što za posledicu ima često istovremenu rezistenciju na različite grupe antibiotika i pojavu multirezistentnih sojeva (135).

Rezistencija *P. aeruginosa* na fluorohinolone nastaje zbog promene na ciljnom mestu delovanja antibiotika, odnosno zbog izmene na DNK girazi i topoizomerazi IV, dok mehanizam rezistencije na aminoglikozide (gentamicin, tobramicin, amikacin) uključuje promene unutar 30S subjedinice ribozoma (136, 137).

Pod pojmom multirezistentnih sojeva *P.aeruginosa* se podrazumeva rezistencija na barem jedan antibiotik iz tri ili više grupa antipseudomonasnih antibiotika. Razvoj

multirezistentnih sojeva najčešće nastaje usled akumulacije mutacija koje dovode do aktivnog efluksa, promene permeabilnosti ćelijske membrane i sinteze beta-laktamaza (138, 139).

Važne karakteristike *P. aeruginosa* su velika metabolička prilagodljivost koja omogućava preživljavanje u različitim sredinama i sposobnost stvaranja biofilma koji je u velikoj meri zaslužan za razvoj rezistencije. *Pseudomonas aeruginosa* stvara dva pigmenta: plavičasti pigment, piocijanin koji je po strukturi derivat fenazina i žutozeleni pigment, pioverdin, koji se sastoji od dihidroksihinolinskih derivata i specifičnih peptida. Sposobnost *P. aeruginosa* da stvara egzopigmente je jedna od najznačajnijih osobnosti ovog patogena. Pigmenti *P. aeruginosa* na različite načine učestvuju u nastanku i održavanju lezija u inflamiranom tkivu (140). Piocijanin ometa cilijarnu funkciju epitela i katalizuje nastanak toksičnih radikala (vodonik-peroksid, hidroksilni radikali, superoksid). Piocijanin ima snažno inhibitorno dejstvo na proliferaciju limfocita, a vezujući se za jone gvožđa omogućava opstanak patogena. Stvaranje pigmenta je fenotipska karakteristika i ukazuje na nivo patogenosti pojedinog soja.

Infekcije izazvane *P. aeruginosa* se javljaju najčešće kod pacijenata sa neutropenijom, imunokompromitovanim pacijentima sa lokalnim infekcijama, hirurškim ranama i opekotinama. Pacijenti na mehaničkoj ventilaciji su najugroženiji, dok se kod osoba sa normalnim imunološkim odgovorom teške infekcije izazvane ovom bakterijom retko razvijaju (141). Visoka stopa smrtnosti (10–60%) u slučaju teških infekcija nastaje kao posledica oslabljenog imunološkog sistema domaćina i mnogobrojnih faktora virulencije, kao i rezistencije patogena na dostupne antibiotike (141-144).

U terapiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa* koriste se penicilini (piperacilin, karbenicilin), cefalosporini III. i IV. generacije (ceftazidim, cefoperazon, cefepim), karbapenemi (imipenem, meropenem i doripenem), monobaktam-aztreonam i fluorohinoloni (ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin) (145, 146). Upotreba aminoglikozida (amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin) je ograničena na kombinovanu terapiju u lečenju ozbiljnih infekcija.

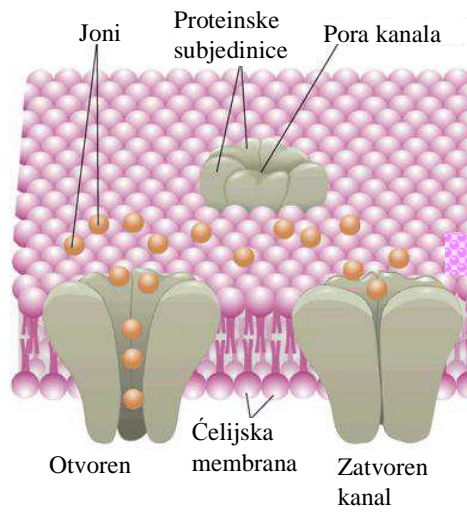
## 1.6. Modulacija aktivnosti jonskih kanala

Aktivnost velikog broja lekova i fizioloških transmitera se zasniva na promeni ponašanja jonskih kanala u ćeliji. Modulacija aktivnosti jonskih kanala je savremen pristup eksperimentalnih i kliničkih istraživanja u stalnom naporu za dizajniranje boljih lekova. Kao strukturne komponente svake žive ćelije jonski kanali imaju važnu ulogu u njenoj deobi, proliferaciji, ekscitaciji i apoptozi. Modulatori jonskih kanala sve više postaju ciljni molekuli u medicinskoj hemiji, i kao takvi se mogu koristiti u lečenju brojnih oboljenja: hroničnog bola, dijabetesa, migrene, ataksije, epilepsije, aritmija, hipertenzije, a sve veći značaj dobijaju i u lečenju bakterijskih, gljivičnih, parazitskih, virusnih kao i malignih i autoimunih oboljenja. Najveći broj modulatora jonskih kanala koji je danas u upotrebi razvijen je pre poznavanja molekulske strukture jonskih kanala, njihovih podtipova, ekspresije i funkcije, kao i uloge u samom patološkom procesu. Sa napredovanjem naučnih saznanja u ovoj oblasti, dalja sinteza modulatora jonskih kanala često podrazumeva usmerenost ka određenom podtipu kanala, uključujući njihovu direktnu blokadu ili promenu u njihovoj ekspresiji i funkciji.

### 1.6.1. Jonski kanali, građa i funkcija

Jonski kanali su integralni membranski proteini koji prolaze kroz lipidni sloj ćelijske membrane i grade pore kroz koje mogu proći joni. Imaju veliku ulogu u fiziologiji ćelijske membrane i nalaze se u svim organizmima, počev od virusa i bakterija, preko biljaka do sisara (Slika 5). Kroz jonske kanale prolaze joni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Cl}^-$  u pravcu električnog ili gradijenta koncentracija (11), uz veću ili manju selektivnost.





**Slika 5.** Prikaz strukture jonskog kanala

(izvor slike: <http://chsweb.lr.k12.nj.us/psidelsky/Chapter%204-5.htm>)

Zavisno od sposobnosti da reaguju na nadražaje iz spoljašnje sredine, jonski kanali se generalno mogu podeliti u dva tipa:

1. **Aktivni** (osetljivi, senzitivni) koje odlikuje selektivnost. Ovi jonski kanali mogu biti u otvorenom i zatvorenom stanju zavisno od membranskog potencijala, sinaptičkih transmitera, receptorskih agonista ili antagonista i različitih fizičkih podsticaja. Aktivni kanali mogu biti:

- **voltažno-zavisni** (napon - zavisni) jonski kanali koji su osetljivi na promene napona, odnosno, električnog signala;
- **ligand-zavisni jonski kanali**, koji su osetljivi na delovanje ekstracelularnih i intracelularnih liganda;
- **mehano-senzitivni jonski kanali** koji su osetljivi na mehaničke uticaje.

2. **Pasivni** (neosetljivi, nesenzitivni) koji ne reaguju na nadražaje iz spoljašnje sredine, neselektivni su, uvek otvoreni kad je ćelija u mirovanju i nazivaju se *membranske pore*.

Za funkcionisanje jonskih kanala veoma je važna različita distribucija jona sa jedne i druge strane ćelijske membrane. U unutrašnjosti ćelije dominiraju anjoni i kalijumovi

joni, dok se sa spoljašnje strane ćelijske membrane nalaze pretežno joni hlora i natrijuma. Razlika u naelektrisanjima sa dve strane membrane generiše membranski potencijal (MP). Ćelije u stanju mirovanja (kada na njih ne deluje draž) poseduju membranski potencijal mirovanja (MPM) a membrana ćelije je propustljivija za jone  $K^+$  nego za jone  $Na^+$ . Promena u propustljivosti membrane za određene jone (povećanje propustljivosti za jone  $Na^+$ ) dovodi do nastanka električnog signala koji se naziva akcioni potencijal (AP). Tehnika koja je omogućila razumevanje i detaljan uvid u promene u propustljivosti membrane, kao funkcije membranskog potencijala i vremena jeste *metod nametnute voltaže (voltage clamp)*. Modifikacija metode nametnute voltaže na deliću membrane (*patch clamp*) (149) je omogućila da se sagleda aktivnost pojedinačnih jonskih kanala i jonskih struja u njima. Istraživači koji su dali veliki doprinos na polju proučavanja akcionog potencijala koristeći tehniku nametnute voltaže i za svoj rad dobili Nobelovu nagradu su Alan Hodžkin i Endru Haksli. Oni su prvi testirali i potvrdili hipotezu da akcioni potencijal nastaje zbog voltažno-zavisne promene u propustljivosti ćelijske membrane za jone  $Na^+$  i  $K^+$ . Eksperiment je izvođen merenjem akcionog potencijala elektrodama za nametanje voltaže u džinovskom neuronu lignje (150).

Dalja istraživanja su pokazala da gen *Shark* mutanta vinske mušice kodira  $K^+$  kanal, kao i da kod kičmenjaka postoje ekvivalenti gena *Shal*, *Shaw* i *Shab* (koji kodiraju voltažno-zavisne  $K^+$  kanale) (151-153). Prvi prokariotski  $K^+$  kanal čija je struktura otkrivena zahvaljujući kristalografiji X-zracima (34) bio je kalijumov kanal bakterije *Streptomyces lividans* koji je označen kao KcsA (154). Kao pojednostavljen model voltažno-zavisnih kalijumovih kanala koji su odgovorni za prenos impulsa kroz nervne i mišićne ćelije eukariota, KcsA je objasnio način transporta jona kroz kanal, funkcionalne osobine kanala, selektivnog filtera, voltažnog senzora i *gate*-ing sistema koji determiniše otvoreno i zatvoreno stanje kanala (155,156).

Proces otvaranja i zatvaranja jonskog kanala podrazumeva konformacionu promenu, bilo u delu kanala ili generalizovanu promenu strukture kanala. U slučaju da alosterna promena aktivira kanal, dolazi do promene membranskog potencijala i koncentracije

jona u ćeliji. Različite konformacije kanala se odlikuju različitom propustljivošću za određene jone.

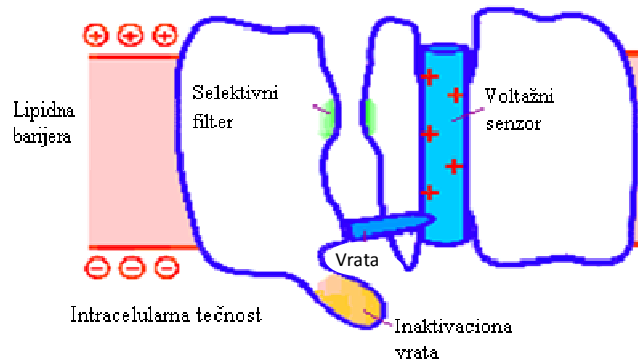
Klasifikacija jonskih kanala se može izvršiti na osnovu njihove uloge u organizmu (modulacija aktivnosti različitim ligandima i uloga u elektrofiziologiji) i na osnovu njihove strukture (tipovi protomera i sličnost aminokiselinskih sekvenci).

Osnovne fiziološke uloge jonskih kanala su:

- 1) uspostavljanje membranskog potencijala mirovanja (MPM) i sprovođenje AP-a u svim ćelijama;
- 2) regulacija intracelularnih procesa tj. signala za koje je odgovoran jon  $Ca^{2+}$  (mišićna kontrakcija, sekrecija hormona, oslobađanje neurotransmitera, promene u ekspresiji gena);
- 3) regulacija ćelijskog volumena (11).

Struktura jonskih kanala (Slika 6) uključuje četiri elementa koja su neophodna za ostvarivanje ovih funkcija:

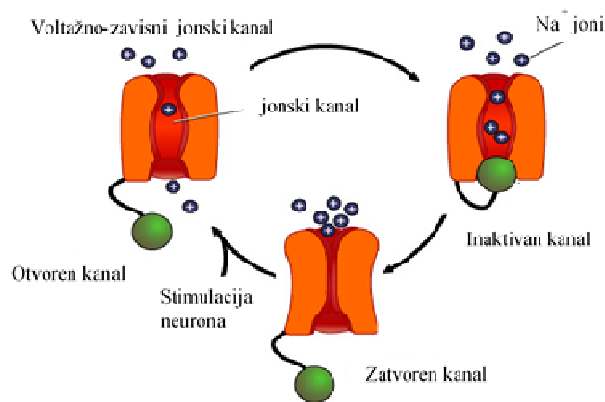
1. alosterno mesto vezivanja - ekstracelularni domen u strukturi sa mestom koje prima stimulus, što dovodi do konformacione promene;
2. jonsku poru kroz koju prolaze joni, što izaziva promenu MP i koncentracije jona u ćeliji;
3. deo kanala koji može da otvori ili zatvori poru kanala tzv. *vrata* ili *kapija* (*gate*). Jonski kanal ima najmanje jedno otvoreno i jedno ili dva zatvorena stanja. Promena kanala iz jednog u drugo stanje se naziva transformacija kanala (*channel gating*) pa postoji zatvoreno, otvoreno i inaktivisano stanje kanala;
4. *senzor* ili jonski filter koji detektuje promenu električnog potencijala ili hemijski signal.



**Slika 6.** Prikaz funkcionalne organizacije jonskog kanala.

(izvor slike: <https://courses.washington.edu/conj/membrane/nachan.htm>)

Kanali se sastoje od najčešće četiri zasebne subjedinice, od kojih svaka ima od dva do šest transmembranskih segmenata. Na preseku kanala se može uočiti u centru pora kroz koju cirkulišu joni i koja je ispunjena vodom. Kružni oblik pore obrazuju simetrično raspoređene proteinske podjedinice (11). Konformacione promene koje prate prelazak kanala iz zatvorenog u otvoreno stanje šire otvor pore pomeranjem polarnijih aminokiselinskih ostataka ka spoljašnjem delu kanala i povećavaju protok jona kroz kanal. Jačinu jonske struje i tok određuju gradijent koncentracije jona i razlika u naelektrisanju (MP). Kombinacija ova dva efekta poznata je kao elektrohemijski gradijent. U mirovanju, voltažno-zavisani kanal je zatvoren i joni ne mogu prolaziti. Kao odgovor na neuronsku stimulaciju, membranski potencijal raste, što rezultira otvaranjem voltažno-zavisnog jonskog kanala. Inicijalna promena u membranskom potencijalu se detektuje pomoću voltažnog senzora, što dovodi do konformacione promene u kanalu, dozvoljavajući prolazak jona. Kanal ostaje otvoren kratko a zatim podleže daljoj konformacionoj promeni, pri čemu se inaktivira. Kanal će ostati inaktivan i otporan na promene membranskog potencijala kratko vreme, pre nego što se vrati u aktivno, ali zatvoreno stanje u mirovanju.



**Slika 7.** Prikaz tri moguća konformaciona stanja jonskih kanala.

(izvor slike: <https://wikispaces.psu.edu/display/230/Membrane+Potential,+Ion+Transport+and+Nerve+Impulse>)

Sprovodljivost svakog kanala može se izračunati Omovim zakonom: :

$$i = V/R$$

gde je  $i$  [pA] sprovodljivost kanala,  $V$  [mV] membranski potencijal, a  $R$  [ $\Omega$ ] otpor koji nastaje pri prolasku jona kroz kanal.

## 1.6.2. Kanali u bakterijskoj ćeliji

Molekulski mehanizmi u jonskim kanalima razjašnjeni su pomoću prikaza trodimenzionalnih struktura prokariotskih  $K^+$  kanala,  $Na^+$  kanala, glutamatnih receptora, premda njihove uloge kod različitih prokariotskih vrsta u velikim delom su ostale nepoznate.

### A. $K^+$ kanali

Jonski kanali za kalijum su velika porodica jonskih kanala koji imaju zajedničku osobinu da propuštaju jone kalijuma i ne dozvoljavaju prolaz drugih jona, naročito natrijuma.

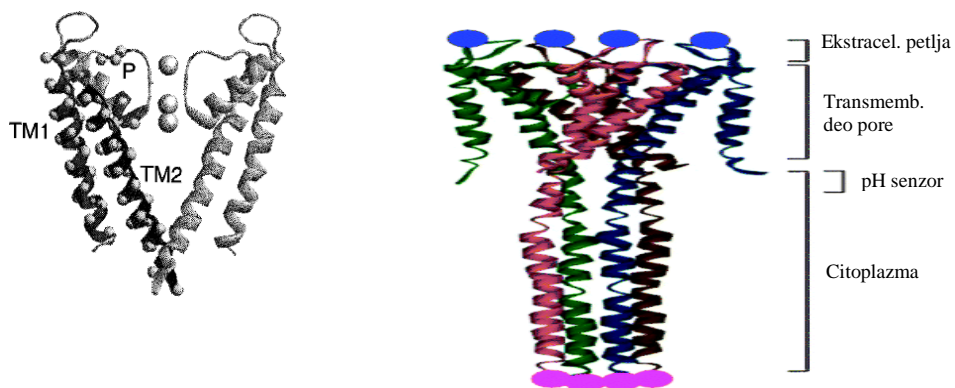
Jonski kanali za kalijum su uključeni u gotovo sve aktivnosti u organizmu. Nalaze se u membranama ćelija glatkih mišića, miocita, skeletnih mišića, endokrinog pankreasa, hipofize, bubrega, jetre, nervnim ćelijama gde učestvuju u kontroli membranskog potencijala, ekscitaciji ćelije, sekreciji insulina, oslobađanju transmitera itd. Kalijumovi

kanali pokazuju sličnost kod svih vrsta, posebno u oblasti pore kanala. Takođe, kalijumovi kanali pokazuju sličnost sa drugim katjonskim kanalima ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ )-i ekstracelularni i intracelularni ulaz u kanal okružuju bazne aminokiseline (negativno nalektrisane) koje privlače katjone.

### **KcsA kanal**

Sve do 1998. model jonskih kanala se zasnivao na hipotezama koje su se oslanjale na biofizičke i biohemijske analize. Roderick MacKinnon i saradnici su objavili 1998.godine rezultate kristalografske analize prokariotskih  $\text{K}^+$  kanala *Streptomyces lividans* (KcsA). Sličnost KcsA proteina i kanala eukariotskih ćelija, posebno ekscitabilnih ćelija, omogućila je korišćenje ove strukture za proučavanje i razumevanje aktivnosti jonskih kanala na molekulskom nivou. Za svoj pionirski rad u oblasti istraživanja jonskih kanala za kalijum Roderick MacKinnon je 2003.godine dobio Nobelovu nagradu. Danas, znanja o strukturi  $\text{K}^+$  kanala potiču uglavnom iz studija ovog jednostavnog bakterijskog kanala. Velika misterija jonskih kanala za kalijum je da su istovremeno visoko efikasni i diskriminatoriski jonski kanali; propuštaju  $10^8$  jona u sekundi zadržavajući visoku selektivnost (157). Važne osobine KcsA kanala su: a) selektivnost za kalijumove jone; b) pH osetljivost kapije i c) voltažno-zavisna inaktivacija kanala.

Strukturno, KcsA kanal je homotetramer koga čine 4 identične subjedinice simetrično raspoređene oko pore kanala. Kanal ima izgled obrnute kupe, sa širim delom okrenutim prema ekstracelularnom prostoru i užim delom u citoplazmi. Centralnu poru kanala čine dva transmembranska heliksa (TM1, TM2; 1-52 i 85-119 aminokiseline, sledstveno) pri čemu je unutrašnji (TM2) heliks okrenut ka centralnoj pori dok je spoljašnji (TM1) okrenut ka fosfolipidnoj membrani. Ova dva TM heliksa su povezani ulaznom petljom i simetrično su raspoređeni oko centralne pore.

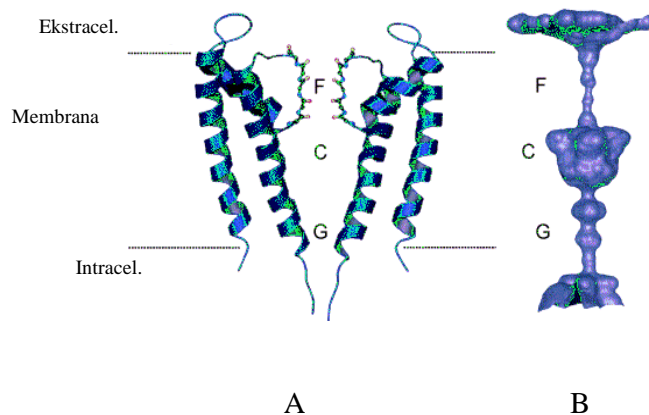


**Slika 8.** (A) Transmembranske subjedinice i (B) Prikaz strukture KcsA kanala

(izvor slike (A): <http://slideplayer.com/slide/8998698/>)

(izvor slike (B): <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/cp/c5cp02681d?page=search>)

Region pore kanala čini 30 aminokiselina koje se mogu podeliti u tri dela (Slika 9): selektivni filter koji se nalazi blizu ekstracelularnog prostora (F), šupljina koja je u centru pore (*cavity*, C) i kapija (*gate*, G) koja se nalazi na “citoplazmatičnom” kraju kanala. Ekstracelularna polovina receptora je odgovorna za selektivnost jonskog kanala dok citoplazmatični deo predstavlja “ulazna vrata”. Ovakva organizacija jonskog kanala je nađena i kod prokariota i kod eukariota.

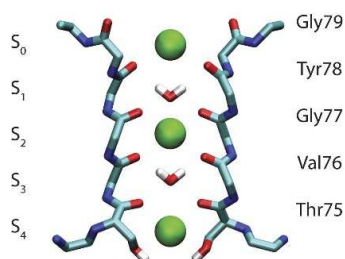


**Slika 9.** Struktura KcsA kanala i pore: (A) dve od četiri subjedinice KcsA kanala; (B) pora kanala na kojoj se vide filter (F), šupljina (C) i kapija (G) (158)

Dužina pore kanala je 45 Å dok se dijametar menja sa dužinom. Sa intracelularne strane ćelijske membrane pora počinje kapijom (G) koja se u sredini ćelijske membrane završava šupljinom (C). I kapija i šupljina su dovoljno široki prostori kroz koje mogu da prođu hidratizani  $K^+$  joni. Unutar šupljine nalazi se voda koja omogućava energetski povoljno okruženje za  $K^+$  jone uprkos hidrofobnoj unutrašnjosti membrane (prisustvo vode smanjuje elektrostatičko odbijanje dva katjona unutar pore). U ekstracelularnom prostoru šupljina se “sužava” u selektivni filter čiji je dijametar toliko mali da mogu proći samo dehidratizani  $K^+$  joni. Unutrašnjost pore i šupljine su hidrofobni regioni dok je selektivni filter okružen atomima koji su odgovorni za selektivnost kanala za kalijumove jone.

### Selektivni filter

Selektivni filter ima prečnik od 3 Å i nalazi se ispod ekstracelularnog, šireg dela jonskog kanala. Selektivni filter sadrži sekvencu aminokiselina: treonin (Thr<sup>75</sup>), valin (Val<sup>76</sup>), glicin (Gly<sup>77</sup>), tirozin (Tyr<sup>78</sup>) i glicin (Gly<sup>79</sup>) koja je karakteristična za  $K^+$  kanale.



**Slika 10.** Struktura selektivnog filtera KcsA  $K^+$  kanala (159)

(izvor slike: <http://jgp.rupress.org/content/142/4/451/F1.expansion.html>)

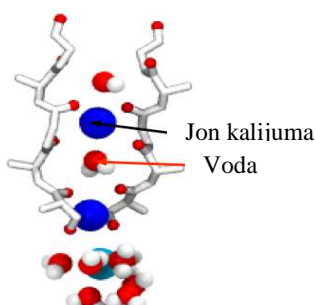
Prolaz kalijumovih jona kroz selektivni filter započinje kada se protonuje transmembranski T2 heliks na intracelularnom kraju pore što dovodi do konformacionih promena i otvaranja kanala. Inaktivacija kanala nastaje interakcijom aminokiselina u selektivnom filteru što destabilizuje konformaciju koja odgovara otvorenom kanalu. Ovaj način zatvaranja kanala podseća na inaktivaciju voltažno-zavisnih kanala.

Građa selektivnog filtera obezbeđuje selektivnost kanala za kalijum. Selektivni filteri svih kalijumovih kanala sadrže sekvencu Thr-Val-Gly-Tir-Gly, koja je obavezna. Kako



je kalijumov kanal tetramer, četiri ovakve sekvence grade poru kanala. Kiseonikovi atomi karbonilnih grupa pomenutih aminokiselina okrenuti su ka unutrašnjosti filtera. Zbog razlike u elektronegativnosti, kiseonikovi atomi C=O grupa su parcijalno negativno naelektrisani, slično kiseonikovim atomima u molekulu vode. Poslednji kiseonikov atom na kraju pore potiče od deprotonovane hidroksilne grupe bočnog lanca treonina (Thr).

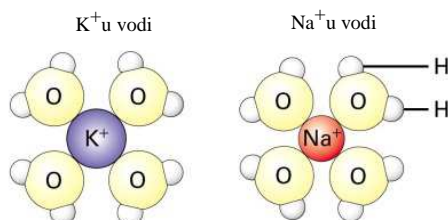
Selektivni filter ima 4 mesta vezivanja  $K^+$  jona koji se označavaju od S1 do S4, počev od ekstracelularne strane kanala. Svako mesto vezivanja je *kavez* koga čine 8 atoma kiseonika raspoređenih u obliku temena kocke. Unutar filtera, za svako drugo mesto vezuju se joni kalijuma dok se za druga dva mesta vezuju molekuli vode. Molekuli vode se nalaze između jona  $K^+$  u selektivnom filteru ali joni ostaju dehidratirani na svom putu kroz kanal.



**Slika 11.** Selektivni filter jonskih kanala za kalijum

(Izvor slike: <http://philipwfowler.me/2013/10/>)

U ćelijskim tečnostima joni su okruženi molekulima vode koji čine tzv. hidratacionu sferu (vodeni omotač). Veličina hidratacione sfere zavisi od energije solvatacije kao i koordinacionog broja jona.

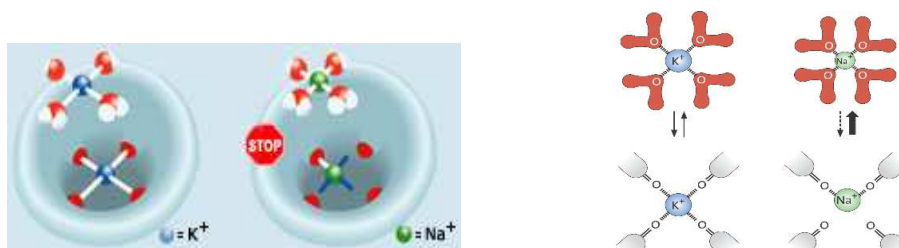


**Slika 12.** Hidratirani joni  $K^+$  i  $Na^+$  u ekstracelularnom prostoru

(izvor slike: [http://www.zoology.ubc.ca/~gardner/action\\_potential.htm](http://www.zoology.ubc.ca/~gardner/action_potential.htm))

Da bi prošli kroz jonski kanal joni moraju biti dehidratirani. Dehidratacija je energetski zavisna proces i zbog toga se prolaz kalijuma kroz kanal dešava mehanizmom koji smanjuje potrebu za energijom. Sposobnost filtera da ukloni molekule vode oko kalijumovog jona bez utroška energije predstavlja selektivno katalizovan transport jona. Dehidratacija jona kalijuma se dešava na ulazu u selektivni filter, na mestu koje je označeno kao S0.

Selektivnost filtera za jone kalijuma se objašnjava činjenicom da prečnik filtera (oko 6 Å) i rastojanje između atoma kiseonika (oko 3 Å) odgovaraju veličini  $K^+$  jona i  $K^+$ -O rastojanju. Sa druge strane, jon  $Na^+$  je manji a rastojanje  $Na^+$ -O je kraće što znači da prolaz hidratiranog jona natrijuma zahteva drugačiju geometriju i koordinacioni broj. Drugim rečima, rastojanje između kalijuma i kiseonika u filteru odgovara rastojanju kalijuma i kiseonika iz molekula vode kojima je jon okružen pre ulaska u filter, odnosno, kalijum prolazi kroz filter bez otpora. Jon natrijuma ne može proći kroz filter i zbog toga ostaje u vodenom rastvoru.



**Slika 13.** Hidratirani joni  $K^+$  i  $Na^+$  u delu selektivnog filtera  $K^+$  kanala

(izvor slike: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2003/popular.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/popular.html))

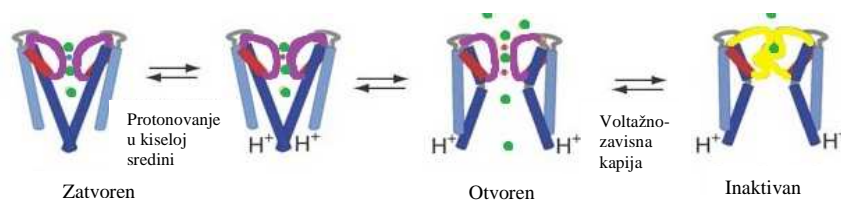
Kalijumov jon se “uklapa” u unutrašnjost selektivnog filtera tako precizno da je energija dehidratacije kompenzovana stabilizacionim efektom karbonilnih grupa, što omogućava brz protok kalijumovih jona.

U filteru se mogu nalaziti istovremeno najviše tri kalijumova jona. Kada je prisutan samo jedan jon interakcija je suviše jaka i onemogućen je brzi transport, što je u saglasnosti sa činjenicom da brzina provodljivosti kroz filter zavisi od koncentracije jona. Kada drugi jon kalijuma uđe u selektivni filter javljaju se odbojne sile između jona

u filteru i “novog” jona kalijuma. Odbijanje jona istog naelektrisanja sprečava da jedan od njih bude duže vremena vezan za karbonilne grupe (max 10-100 ns) čime se obezbeđuje konstantan tok jona kroz kanal u definisanom pravcu. Jačina sile odbijanja odgovora privlačnoj sili prvog jona i filtera što omogućava da prvi jon pređe u šupljinu gde se stabilizuje hidratacijom. Drugim rečima, kada se  $K^+$  veže za poziciju S0, kalijumov jon iz pozicije S4 prelazi u šupljinu gde se ponovo hidratiše sa molekulima vode. Hidratisan  $K^+$  jon u šupljini ima sličnu geometriju i koordinacioni broj kao  $K^+$  jon u filteru.

### pH osetljivost KcsA

pH zavisna provodljivost KcsA navodi na zaključak da do otvaranja kanala dolazi tek kada je protein izložen kiseljoj sredini. Postoje naučni dokazi da se pH senzor nalazi u citoplazmatičnom domenu kanala. NMR istraživanja pokazuju da je na promenu pH vrednosti osetljiv C-terminalni kraj TM2 kao i aminokiseline Tyr<sup>78</sup>, Gly<sup>79</sup>, Glu<sup>71</sup> i Asp<sup>80</sup> u selektivnom filteru. Na fiziološkom pH kapija kanala je zatvorena iako kanal pokazuje manje fluktuacije u strukturi. Kada se u kiseljoj sredini protonuje TM2 dolazi do “uvrtanja” spirala oko ose kanala čime se menja konformacija pore iz zatvorene u otvorenu. Kada joni prođu kroz kanal, voltažno-zavisnim mehanizmom dolazi do interakcije Glu<sup>71</sup> i Asp<sup>80</sup> u selektivnom filteru, promene provodljivosti i prelaza kanala u inaktivno stanje što podseća na inaktivaciju voltažno-zavisnih kanala (160).



**Slika 14.** Otvaranje KcsA kanala u kiseljoj sredini; inaktiviranje kanala voltažno-zavisnim mehanizmom

(izvor slike: [https://en.wikipedia.org/wiki/KcsA\\_potassium\\_channel#/media/File:Channel\\_Conformation.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/KcsA_potassium_channel#/media/File:Channel_Conformation.jpg))

Mehanizam voltažno-zavisnog zatvaranja kapije objašnjava se promenom orijentacije Glu<sup>71</sup> prema intracelularnom prostoru pore kanala što dovodi do raskidanja veze Glu<sup>71</sup>-Asp<sup>80</sup> koja je inicijalno odgovorna za stabilizaciju selektivnog filtera. Orijehtacija

aminokiselina u selektivnom filteru igra značajnu fiziološku ulogu u modulaciji transporta kalijuma u uslovima ravnotežnog stanja.

Određivanje kristalografske strukture KcsA kanala imala je veliki značaj u otkrivanju mehanizma transporta jona kroz kanal, razumevanju osnovnih funkcionalnih osobina pore kanala, selektivnog filtera, voltažnog senzora, vrata koja regulišu otvoreno i zatvoreno stanje kanala. Svi do danas poznati kanali za kalijum mogu se svrstati u četiri velike grupe:

- 1) Kalcijum-zavisni  $K^+$  kanali, koji se otvaraju u prisustvu jona kalcijuma;
- 2) Voltažno-zavisni, koje otvara depolarizacija ćeljske membrane;
- 3) Tandemski kalijumovi kanali;
- 4) Ulazno-ispravljački  $K^+$  kanali (Kir).

#### 1) Kalcijum-zavisni $K^+$ kanali

Sastoje se od dve različite subjedinice, alfa i beta. Alfa podjedinica je tetramer koji gradi poru kanala, senzor napona, kao i region osetljiv na koncentraciju jona kalcijuma. Voltažni senzor se nalazi na S4 transmembranskom regionu koji sadrži aminokiselinu Arg osetljivu na promenu naelektrisanja zbog čega ovaj region reaguje slično kao i drugi voltažno-zavisni kalijumovi kanali. Osim depolarizacije, za otvaranje kanala neophodna je povećana koncentracija  $Ca^{2+}$  jona u citoplazmi. Beta subjedinica kanala ima regulatornu ulogu. Postoje 4 vrste beta subjedinica: 1, 2, 3 i 4. Beta 1 i beta 3 su inhibitorne, dok su beta 2 i beta 4 ekscitatorne tj. one regulišu otvaranje i zatvaranje kanala.

#### 2) Voltažno-zavisni $K^+$ kanali

Voltažno zavisni  $K^+$  kanali (Kv) se sastoje od četiri identične alfa subjedinice i beta subjedinice koje se nalaze na citoplazmatičnoj strani membrane. Svaka subjedinica se sastoji od 6 transmembranskih proteina koji se označavaju od S1 do S6. Selektivni filter na svakoj subjedinici čini petlja između S5 i S6, dok je S4 region verovatno voltažni senzor. Osnovna razlika u odnosu na KcsA kanale je u načinu otvaranja kapije: KcsA kanale otvara sniženje pH (kisela sredina), dok se Kv kanali aktiviraju depolarizacijom

membrane. Do danas je poznato 40 humanih alfa subjedinica voltažno-zavisnih kalijumovih kanala koje su grupisane prema funkciji.

### 3) Kalijumovi kanali sa dve pore

Dobili su naziv zbog toga što se alfa subjedinica sastoji od 4 transmembranska proteina pri čemu svaka sadrži dve pore. Rad kanala reguliše koncentracija kiseonika u krvi, pH, mehaničko istezanje i G-proteini. Ovo su konstitutivno otvoreni kanali koji imaju veliku bazalnu aktivaciju. Odgovorni su za potencijal ćelija u stanju mirovanja.

### 4) Ulazno-ispravljački $K^+$ kanali (Kir)

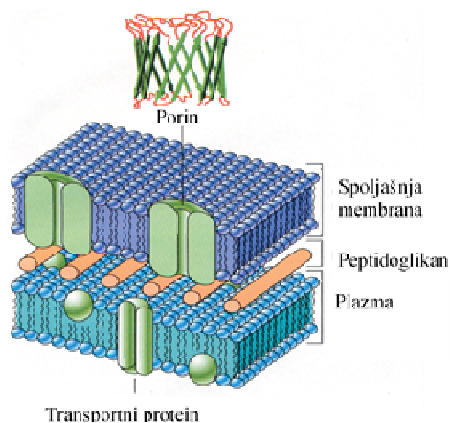
Osnovna karakteristika ulazno-ispravljačkih  $K^+$  kanala je da imaju veću provodljivost za kalijumove jone koji ulaze u ćeliju u odnosu na one koji izlaze iz ćelije. Kir kanali se nalaze u više tipova ćelija, uključujući makrofage, srce, bubrege, leukocite, neurone, endotelne ćelija. U miocitima Kir kanali se zatvaraju posle depolarizacije usporavajući repolarizaciju membrane i produžavajući akcioni potencijal. U endotelnim ćelijama ovi kanali su uključeni u sintezu NO, dok u bubrezima učestvuju u sekreciji kalijuma ili, alternativno, u ponovnom preuzimanju.

I pored značajnih otkrića koja su doprinela razumevanju strukture, funkcije i selektivnosti jonskih kanala za kalijum treba istaći da su ova proučavanja zasnovana na ispitivanju kristalne strukture zatvorenog KcsA (što je i razumljivo jer je zatvoreno stanje kanala favorizovano na fiziološkom pH). Međutim, dinamičko ponašanje KcsA kanala je otežano s obzirom da je kristalna struktura statična, prostorno i vremenski drugačija od dinamičkog stanja. Da bi se razumela veza između molekulske strukture i fiziološkog ponašanja potrebno je bolje razumevanje dinamike kalijumovih kanala.

### 1.6.3. Bakterijski porini

Porini su familija proteina koji se nalaze na spoljašnjoj membrani Gram-negativnih bakterija. Porini obrazuju kanale ispunjene vodom i omogućavaju difuziju hidrofilnih jedinjenja u periplazmatični prostor tj. deluju kao molekulski filteri za hidrofilna jedinjenja. Neki porini omogućavaju prolaz različitih jedinjenja (određene veličine molekula) mehanizmom pasivne difuzije, dok su drugi specifični za supstrat i sadrže mesto vezivanja unutar pore (selektivni porini). Najviše proučavani “supstrat specifični” porin je LamB koji je odgovoran za difuziju maltoze i maltodekstrina u unutrašnjost *E.coli*. Kako su porini spoljašnji membranski proteini, oni služe i kao receptorsko mesto za fage. Maltoporin je jedan od mnogih porina koji sadrži sekvencu za prepoznavanje bakteriofaga.

Izrazita karakteristika porina je visok nivo ekspresije. Sinteza porina zavisi od bakterijske vrste i uslova sredine i kod nekih bakterija može dostići vrednost od  $10^4$  do  $10^6$  kopija po ćeliji. Regulacija može biti ushodna i nishodna i javlja se kao odgovor na prisustvo ili odsustvo različitih molekula u medijumu kao što su maltoza, dekstrini, saharoza, fruktoza, antibiotici, teški metali, deterdženti, žučne soli, aromatična jedinjenja ili kao odgovor na različite uslove sredine, kao što je uticaj pH, jonske jačine i temperature. Kako bi preživele, bakterije su razvile različite mehanizme izbegavanja ili prevazilaženja antibakterijske aktivnosti, konstantno prateći svoje okruženje putem fenotipskih modifikacija koje su odgovor na adaptaciju. Porini imaju sposobnost da utiču na više bioloških funkcija, što omogućava brzu adaptaciju i preživljavanje bakterijskih ćelija. Kada postoji ograničenje u hranljivim materijama i promena u osmolarnosti medijuma, promenom u ekspresiji porina Gram-negativne bakterije prilagođavaju propustljivost svoje spoljašnje membrane.

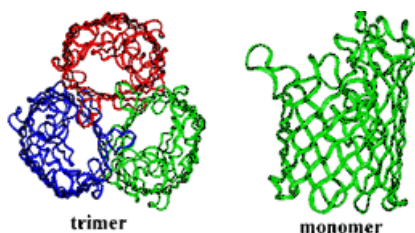


**Slika 15.** Struktura ćelijske membrane Gram-negativnih bakterija

(izvor slike: [http://eidiparra.blogspot.rs/2013\\_02\\_01\\_archive.html](http://eidiparra.blogspot.rs/2013_02_01_archive.html))

Porine je prvi put okarakterisao Nake 1976.godine. Prvi otkriveni porini OmpC i OmpF identifikovani su kod Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (161) ali je nekoliko godina kasnije utvrđeno postojanje porina i kod Gram-pozitivnih bakterija. Danas je poznato da specifični i nespecifični porini postoje u ćelijama i prokariota i eukariota (162).

Uopšteno govoreći, porini imaju sličnu strukturu. U zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina i konformacionih karakteristika bakterijski porini mogu biti monomeri ili trimeri. Primeri monomera su OmpA *E.coli* i OprF *Pseudomonas aeruginosa*, dok je OmpF *E.coli* primer trimera (Slika 16). Trimeri nastaju povezivanjem monomera u kompaktnu i stabilnu strukturu koja disosuje samo pod drastičnim uslovima (temperature iznad 70°C, natrijum dodecil sulfat) (163).

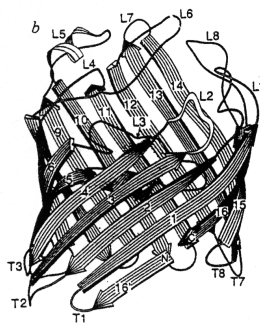


**Slika 16.** Kristalna struktura OmpF porina *E.coli*

(izvor slike: [http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/OPFU/yama/public\\_html/study/folding/md/porin/porin.htm](http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/OPFU/yama/public_html/study/folding/md/porin/porin.htm))

OmpF (*Outer Membrane Protein F*) *E.coli* je tipičan opšti porin (trimer) koji se koristi za proučavanje i razumevanje strukture specifičnih porina. Monomer OmpF čini 16 transmembranskih, antiparalelnih beta lanaca koji grade  $\beta$ -cilindričnu strukturu.  $\beta$ -lanci su amfipatični, sadrže polarne i nepolarne aminokiseline, međulančane vodonične veze i grade unutrašnju poru-kanal ispunjen vodom. Kanal ima veliki prečnik od 0,8 do 1,1 nm i neselektivan je za male jone. Prečnik kanala ograničava prolaz molekula koji imaju masu veću od 600 Da. Kako najveći broj metabolita ima manju masu oni prolaze kroz porine, koji se zbog toga često nazivaju i difuzionim porama.

$\beta$ -lanci sadrže kratke, uvijene segmente (*Turns, T*) kojima su vezani za periplazmatični prostor dok dugi lanci na spoljašnjoj strani membrane grade petlje (*Loop, L*). Struktura  $\beta$ -cilindra se završava peptidnim mostom koji gradi amino Ala i Phe na C terminalnom kraju poslednjeg, 16 lanca. Struktura cilindra monomera je dodatno stabilizovana građenjem petlji i vodoničnih veza.



**Slika 17.** OmpF porin: strelice prikazuju  $\beta$ -lance i označene su brojevima od 1 do 16. Velike petlje (*Loop*) su označene od L1 do L8 dok su kraća uvijanja (*Turns*) označena od T1 do T8. L3 se nalazi unutar cilindra.

(izvor slike: <http://www.whatislife.com/reader/channels/channels.html>)

Stabilnost porina trimera se postiže interakcijom monomera i to građenjem vodoničnih veza, kao i hidrofobnim interakcijama. Za građenje trimera najznačajniji je C terminalni kraj i 16  $\beta$ -lanac. Povezivanje monomera se ostvaruje i preko L1 i L5 i dodatno stabilizuje interakcijama L2, L3 i L4.



Mnoge funkcije porina zavise od petlji. Neke petlje grade hidrofilni “kišobran” preko kanala i štite ga. Ili, petlja 3 (L3) koja se nalazi u kanalu gradi suženje na polovini visine kanala. Ovo suženje grade aminokiseline Pro, Glu, Phe, Gly kao i Asp<sup>113</sup> i Glu<sup>117</sup> i ima ulogu u ograničavanju veličine molekula koje prolaze kroz kanal.

Postoji 4 vrste porina: opšti (nespecifični), specifični (prema supstratu), *gated* porini i efluks porini.

#### **1.6.3.1. Porini *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je uslovno patogena, Gram-negativna bakterija koja je veoma raširena u prirodi. Lako se prilagođava promenama u spoljašnjoj sredini i predstavlja treći intrahospitalni patogeni mikroorganizam. *Pseudomonas aeruginosa* pokazuje veliku intrizičku rezistenciju prema brojnim antibioticima i antisepticima. Mehanizam rezistencije se može objasniti genetskim mogućnostima (autori koji su sekvencirali genom *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pokazali su da ovaj genom sadrži 6,3 miliona parova baza i kodira preko 5570 gena), malom propustljivošću spoljašnje membrane (oko 8 % u odnosu na *E. coli*) i postojanjem  $\beta$ -laktamaze u periplazmatičnom prostoru. Posledica male propustljivosti spoljašnje membrane zahteva specijalne puteve supstrata da bi prošli membranu. Novija istraživanja pokazuju da *P. aeruginosa* sadrži: OprF opšti porin, OprD familiju specifičnih porina (19 članova), OprM familiju efluks porina (18 članova) i familiju *gated* porina (35 članova).

##### Opšti porin-OprF

OprF je glavni spoljašnji membranski protein *P. aeruginosa* koji je dosta proučavan zbog uloge koju ima u rezistenciji na lekove. To je multifunkcionalan protein koji je neophodan za rast ćelije u uslovima malog osmolaliteta medijuma i koji je značajan za održavanje oblika bakterijske ćelije. Mnoge studije su pokazale da je u pogledu strukture i funkcije OprF sličan OmpA *E.coli*. OprF sadrži tri domena: (a) N-terminalni domen (prvih ~160 aminokiselina) koga čini 8 anti-paralelnih lanaca (niti) koji grade  $\beta$ -cilindričnu strukturu, (b) petlju (od 161 do 209 aminokiseline) koja sadrži poli-prolin-alanin region koji se ponavlja i (c) C-terminalni domen (od 210 do 326 aminokiseline)

koji gradi nekovalentne veze sa peptidoglikanom u periplazmi. OprF porini su nespecifični i pokazuju malu selektivnost prema katjonima.

#### Specifični porini-OprD

Najbolje opisani specifični porin je LamB *E. coli*, koji u strukturi sadrži specifično mesto za vezivanje maltoze i maltodekstrina. Kristalna struktura LamB pokazuje da je ovaj porin sličan nespecifičnom porinu OmpF sa malim razlikama:  $\beta$ -cilindar je 18-lančani (razlika u odnosu na 16-lančani) i sadrži oko 30 % više aminokiselina. Mesto za vezivanje supstrata čine petlje 4, 5 i 6 koje su nešto duže nego kod OmpF. *Pseudomonas* poseduje tri dobro opisana specifična porina: OprB, OprP i OprD.

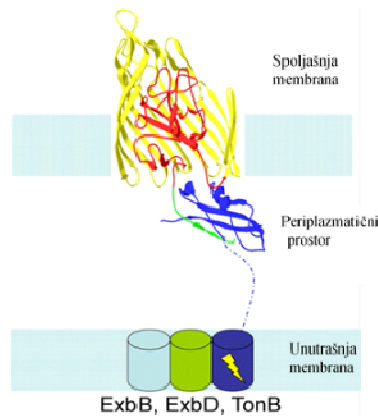
OprD je specifični porin koji vezuje bazne aminokiseline, dipeptide koji sadrže bazne aminokiseline, imipenem i odgovarajuće cviter jonske karbapeneme (uključujući i meropenem). Ispitivanja OprD porina kod kojih je uklonjena petlja 2 i 3 su pokazale osetljivost na imipenem dok uklanjanje petlji 5, 7 i 8 povećava osetljivost *Pseudomonasa* na veći broj antibiotika.

#### Familija *Gated* porina-FpvA

Za aerobni metabolizam mikroorganizama veliki značaj ima gvožđe. Zbog toga su bakterije razvile brojne mehanizme za obezbeđivanje dovoljnih količina gvožđa uključujući sintezu i sekreciju jedinjenja (siderofora) koja imaju veliki afinitet za gvožđe sa kojim grade kompleks. Početni korak u preuzimanju ovog jona je vezivanje siderofore za spoljašnji receptorski protein. Vezivanje jedinjenja bogata gvoždem za receptor i oslobađanje energije putem unutrašnjeg membranskog proteina TonB (zajedno sa ExbB i ExbD) izaziva konformacione promene, otvaranje kapije (*gate*) i prolaz jedinjenja bogata gvoždem kroz spoljašnju membranu.

*P. aeruginosa* proizvodi sideroforu, pioverdin, jedinjenje koje sadrži 6,7-dihidroksi hinolin vezan za delimično ciklični oktapeptid. Ovo jedinjenje ima visok afinitet za  $Fe^{3+}$  i predstavlja dominantnu sideroforu za vezivanje gvožđa iz transferina ili seruma. Postoji određena hemijska heterogenost i specifičnost koja se ogleda u tome što svaka

bakterija ima tendenciju da koriste svoje siderofore i ima specifične receptore/porine na površini membrane. Receptor za pioverdin *P. aeruginosa* PA01 je FpvA.

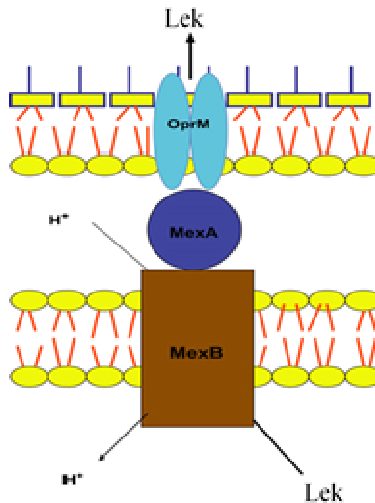


**Slika 18.** Prikaz TonB-receptor interakcije

(izvor slike: <http://www.bioc.aecom.yu.edu/labs/girvlab/MolBiophys/membranes.html>)

### Efluks porini

Ovi porini imaju najveći značaj za intrizičku antibiotsku rezistenciju *P. aeruginosa*. Najznačajniji efluks porini *Pseudomonasa* pripadaju familiji RND (*resistance-nodulation-division*). Ovaj efluks sistem se sastoji iz tri dela: transportera, linkera i spoljašnje membranske pore koja obezbeđuje da se “izbačena” jedinjenja ne vraćaju u citozol i ne zadržavaju u periplazmi. Postoji 12 tipova RND efluks sistema uključujući npr. MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexPQ-OpmE, MexMN-OprM i MexVW-OprM koji se razlikuju prema supstratima. MexAB-OprM je konstitutivno eksprimiran kod *Pseudomonas aeruginosa* i odgovoran je za intrizičku rezistenciju na fluorohinolone i patogenost *Pseudomonasa* (164).



**Slika 19.** Prikaz efluks pumpe MexAB-OprM *Pseudomonas aeruginosa* (165)

## 1.7. *In vitro* ispitivanje permeabilnosti membrana

Korišćenjem različitih *in vitro* metoda može se steći značajan uvid u uticaj fizičko-hemijskih parametara ispitivane supstance na procese apsorpcije, kao i na sistemsku apsorpciju posle lokalne aplikacije.

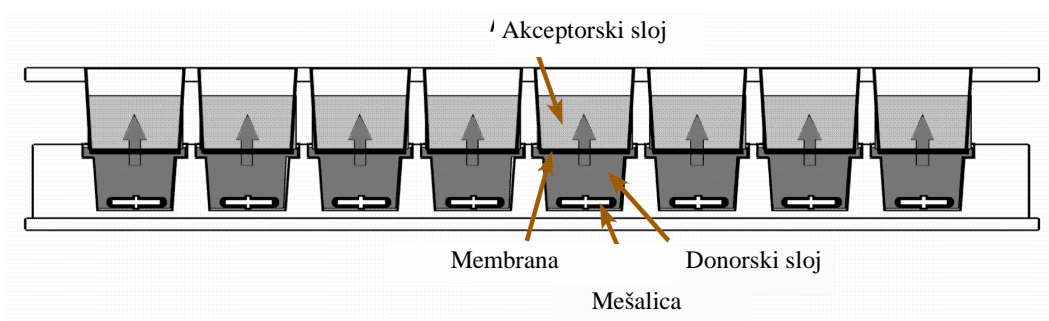
Jasno je da *in vitro* metodologija ne može simulirati procese metabolizma, distribucije i prokrvljenosti, što je nedostatak ali, s druge strane, obezbeđuje mogućnost kontrolisanja eksperimentalnih uslova, uz variranje membrane i jedinjenja koja se analiziraju.

Procesi difuzije kroz biološke membrane su determinisani fizičko-hemijskim osobinama ksenobiotika, kao što su rastvorljivost i molekulska masa, particioni i difuzioni koeficijenti.

### 1.7.1. Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA)

Paralelni test permeabilnosti na veštačkim membrana (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* – PAMPA) je metoda kojom se određuje permeabilnost supstance

putem pasivne difuzije iz donorskog u akceptorski sloj, kroz veštačku membranu (166, 167). PAMPA test se izvodi na mikrofilterskoj ploči koja se sastoji od 96 odeljaka i sadrži dva prostora (donorski i akceptorski) koji su razdvojeni veštačkom membranom. U donorski sloj se stavlja rastvor ispitivane supstance u puferu koji može, i ne mora, da uključi mešanje. Nakon perioda inkubacije meri se količina supstance u svakom od slojeva. Stepenn permeabilnosti supstance iz donorskog prostora u akceptorski prostor određuje se na osnovu izmerene količine leka u oba sloja, najčešće primenom UV-VIS, HPLC i MS-HPLC metode (168).



**Slika 20.** Poprečni presek mikrofiltracione ploče koja se koristi u PAMPA ispitivanju

( izvor slike: <http://www.pion-inc.com/Services/Permeability>)

PAMPA metoda za brzo skeniranje kao veštačku membranu koristi silikon i izopropilmiristat (169, 170). Veštačke membrane impregnirane rastvorom fosfolipida ili heksadekana omogućavaju da PAMPA test daje podatke koji uspostavljaju značajnu korelaciju sa gastrointestinalnom apsorpcijom jedinjenja u humanom organizmu (171). U cilju povećanja korelacije *in vitro* i *in vivo* rezultata, modifikuje se sastav lipida membrane i pH vrednost, a podaci dobijeni u PAMPA testovima ukazuju na dobru reproduktivnost sa podacima koji se odnose na gastrointestinalnu resorpciju (171), prolaz kroz krvno-moždanu barijeru (172) i kožu, zbog čega PAMPA ima značaj i u ADME skriningu.

## **2. CILJ RADA**

### **Ciljevi ove doktorske disertacije su:**

1. Sintetisati derivate *orto-* ili *para-*monoalkilsubstituisane ili monohalogenovane derivate 1-(2-hidroksifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona, prečistiti jedinjenja i odrediti strukturu;
2. Odrediti parametre lipofilnosti (Log P, Log D) sintetisanih halkona i fizičko-hemijsku karakterizaciju ranije sintetisanih propiofenonskih derivata (6 derivata propafenona i 6 derivata halkona);
3. Ispitati antimikrobnu aktivnost propiofenonskih derivata bujon-mikrodilucionom metodom na standardnim laboratorijskim sojevima Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija;
4. Ispitati *in vitro* antimikrobnu aktivnost sintetisanih jedinjenja prema odabranim kliničkim izolatima MRSA sojeva i rezistentnim sojevima *Pseudomonas aeruginosa*;
5. Izvesti *QSAR* analizu antimikrobne aktivnosti derivata halkona i odrediti korelaciju sa deskriptorima koji opisuju vodonik donorske osobine funkcionalnih grupa i deskriptorima koji definišu kiselost fenolske grupe;
6. Molekulskim *docking* studijama antimikrobne aktivnosti identifikovati ključne interakcije derivata propafenona i kristalografske strukture zatvorenog i otvorenog K<sup>+</sup> kanala;
7. *Docking* studijama ispitati interakciju propafenonskih derivata sa OccK4 porinom *Pseudomonas aeruginosa*;
8. Ispitati uticaj *orto* fluoriranih propafenonskih derivata na produkciju biofilma *Pseudomonas aeruginosa* ;
9. Ispitati uticaj *orto* fluoriranih propafenonskih derivata na produkciju pigmenta piocijanina *Pseudomonas aeruginosa* ;
10. *QSAR* studijama identifikovati deskriptore propiofenonskih derivata značajne za inhibiciju rasta MRSA sojeva;
11. Ispitati permeabilnosti propiofenonskih derivata na veštačkim membranama;
12. Proceniti farmakokinetički i toksikološki profil jedinjenja koja pokazuju najbolju antimikrobnu aktivnost primenom paketa *ADMET Predictor*.

### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**



## **3.1. Sinteza propiofenonskih derivata iz grupe halkona i njihova strukturna analiza**

### **3.1.1. Reagensi i rastvarači**

2-hidroksiacetofenon, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
2-metoksibenzaldehid, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
2,6-dimetoksibenzaldehid, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
4-fluoro-2-metilbenzaldehyd, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
4-trifluorometilbenzaldehyd, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
hlorovodonična kiselina 35% p.a., natrijum-hidroksid p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka);  
metanol Chromasolv HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
metanol p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka);  
mravlja kiselina 98% (Lach-Ner, Neratovice, Češka);  
dejonizovana voda HPLC čistoće (Niederelbert, Nemačka);  
etanol 96% (Merck, Darmstadt, Nemačka);  
acetonitril (Sigma-Aldrich Chemie GmbH );  
destilovana voda (Farmaceutski fakultet, Beograd);  
toluen p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka);  
deuterisani hlороform (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
tetrametilsilan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
silikagel 60 za hromatografiju na tankom sloju, veličina pore 100 Å (Merck, Darmstadt, Nemačka);  
whatman® indikatorski papir, pH opseg 0-14 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
filter papir (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);  
dimetilsulfoksid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

### 3.1.2. Oprema i aparati

FT-IR spektrofotometar Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD);

NMR BRUKER 400 (Bruker, Nemačka);

UHPLC-MS-MS aparat, tečni hromatograf spregnut sa triplkvadripolskim masenim detektorom (Thermo Fisher Scientific Inc. SAD);

Analitička vaga, Adventurer™ -Pro (Ohaus Corporation, SAD);

Magnetna mešalica, Tehtnica Rotamix SHP-10 (Zeelniki, Slovenia);

Rotacioni vakuum uparivač, ROTAVAPOR-R (Büchi, Švajcarska);

Vakuum pumpa, KifLab, Laboport (KNF NeubergerGmb, Nemačka);

UV lampa, UV-CABINET II (Camag, Švajcarska);

TLC ploče silikagel GF<sub>254</sub> 20x20 (Merck, Darmstadt, Nemačka);

Hromatografska kada (Camag, Švajcarska).

### 3.1.3. Priprema rastvora korišćenih u sintezi

*60% rastvor natrijum- hidroksida u vodi*

Odmeri se 120 g natrijum-hidroksida *p.a.* i prenese u suv erlenmejer zapremine 250 mL.

Postepeno se dodaje 180 mL destilovane vode uz hlađenje, meša staklenim štapićem do rastvaranja i zatim doda preostalih 20 mL vode. Reagens se priprema *ex tempore*.

*1M rastvor hlorovodonične kiseline*

U odmerni sud od 100 mL prenese se oko 50 mL vode, doda 0,85 mL 35 % HCl i vodom dopuni do oznake.

### 3.1.4. Opšti postupak sinteze mono- i disupstituisanih 1-(2-hidroksifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona (halkona)

U suv balon sa okruglim dnom zapremine 100 mL prenese se 10 mL 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, uz neprekidno mešanje doda se 1,40 g (0,012 mol) 2-hidroksiacetofenona i ona količina mono- ili disupstituisanog benzaldehida koja odgovara 0,01 molu istog. U reakcionu

smešu se, uz neprekidno mešanje, u malim porcijama doda 20 g 60 % rastvora NaOH. Tokom dodavanja rastvora NaOH u početku bezbojna reakciona smeša postaje nepostojano žuto obojena, a zatim prelazi u narandžastu, da bi po dodatku celokupne količine rastvora NaOH dobila postojanu krv-crvenu boju. Homogena smeša se meša na sobnoj temperaturi tokom noći. U reakciji nastaje natrijumova so mono- ili disupstituisanog 2-hidroksi halkona u vidu narandžastog taloga ili suspenzije. Smeša se razblaži dodatkom ledene vode i zakiseli hladnom 1M HCl do postizanja pH smeše oko 3, što se proverava univerzalnom lakmus hartijom. Izdvaja se talog žute boje koji se procedi preko filter papira na vakuumu i ispira ledenom vodom do neutralne reakcije (na lakmusu). *Sirovi* halkon se ostavi da se suši na vazduhu, na tamnom mestu. Prečišćava se preparativnom tankoslojnom hromatografijom na silikagelu, sa toluenom kao mobilnom fazom. Izdvojene zone halkona na hromatografskoj ploči se ekstrahuju acetonom, filtriraju preko filter papira, a aceton uklanja uparavanjem pod sniženim pritiskom. Dobija se čist *trans* izomer halkona u obliku žutog kristalnog praška (potvrđeno  $^1\text{H}$  NMR;  $J_{\text{vinil H}} = 15\text{-}16$  Hz).

### 3.1.5. Strukturna analiza sintetisanih halkona

IR spektri sintetisanih halkona snimljeni su na FT-IR aparatu Nicolet iS10. Spektri su snimljeni metodom prigušene refleksije uz primenu ATR modula SMART iTR opremljenog dijamantskim kristalom. Spektri su obrađivani primenom računarskog programa OMNIC 8.0.

NMR spektri ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) su snimljeni na aparatu NMR BRUKER 400. Uzorci sintetisanih supstanci rastvoreni su u  $\text{CDCl}_3$ , a hemijska pomeranja određena su u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao interni standard.

MS-MS fragmentacija izvršena je na UHPLC-MS-MS sistemu opremljenim UHPLC tečnim hromatografom ACCELA i triplkvadripolskim MS-MS detektorom. Kao mobilna faza korišćena je smeša metanol : 0,1% mravlja kiselina (90:10 v/v). Masena spektrometrija izvedena je primenom elektron sprej jonizacije u pozitivnom ili negativnom modu. Nakon optimizacije metode napon u detektoru je podešen na 5000 V,

temperatura u izvoru na 378 °C, temperatura kapilare na 152 °C. Pritisak azota (gas nosač) podešen je na 30 bara. Kolizijska energija je povećavana od 0 do 60 eV u 10 koraka.

## 3.2. Fizičko - hemijska karakterizacija propiofenonskih derivata

### 3.2.1. Reagensi i jedinjenja korišćena u ispitivanju

Oktanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);

Metanol, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Chemie GmbH);

Natrijum-dihidrogenfosfat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Nemačka);

Natrijum-hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Nemačka);

4-hidroksibenzaldehid (Merck, Darmstadt, Nemačka);

Salicilaldehid (Merck, Darmstadt, Nemačka);

Eugenol, 2-metoksi-4-alilfenol (Merck, Darmstadt, Nemačka);

mentol (Merck, Darmstadt, Nemačka);

2,3,4,5,6 pentahlorofenol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);

1PF ((*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

1MF ((*E*)-3-(3-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil) prop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

1OF ((*E*)-3-(2-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil) prop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd

1POH ((*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-hidroksifenil)prop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

1MOH ((*E*)-1-(2-hidroksi-fenil)-3-(3-hidroksi-fenil)-prop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

1OOH ((*E*)- 1,3-*Bis*-(2-hidroksi-fenil)-prop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

1PCH3 ((*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-*p*-tolilprop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

1MCH3 ((E)-1-(2-hidroksifenil)-3-*m*-tolilprop-2-en-1-on)Farmaceutskifakultet, Beograd;

1OCH 3((E)-1-(2-hidroksifenil)-3-*o*-tolilprop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

1OOCH3 ((E)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-metoksifenil)prop-2-en-1-on) Farmaceutski fakultet, Beograd;

5CF3 (3-(2-trifluorometilfenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on-hidrohlorid), Farmaceutski fakultet, Beograd;

5OF (3-(2-fluoro-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on-hidrohlorid), Farmaceutski fakultet, Beograd;

5PF (3-(4-fluoro-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on-hidrohlorid) Farmaceutski fakultet, Beograd;

5PCH3 (3-(4-metil-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on-hidrohlorid) Farmaceutski fakultet, Beograd;

5OCH3 (3-(2-metil-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on-hidrohlorid) Farmaceutski fakultet, Beograd;

5Ocl (3-(4-metil-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on hidrohlorid) Farmaceutski fakultet, Beograd.

### 3.2.2. Oprema i aparati

Hromatografska kolona: *Zorbax Eclipse XDB-C18*, 4,6 x 150mm, 5 $\mu$ m kolona (Agilent Technologies, SAD);

Tečni hromatograf: HP 1200 Hewlett Packard;

Detektor: Diode-array SL G1315C;

Binarna pumpa: HP 1100, model G 1312 A;

Injektor: Rheodyne, Rheodyne USA sa petljom od 20 $\mu$ l;

Termostat za kolonu: HP 1100, model G 1316 A;

pH metar sa kombinovanom staklenom elektrodom, MeterLab PHM220, Radiometer;

Ultrazvučno kupatilo: Sineks Laboratory N° 25860 Mod UCI-75;

Sistem za filtriranje: Whatman 47mm Glass-nech;

Membranski nosač filtri: 0,45 $\mu$ m Whatman international Ltd Maid Stone, England;

Mikrošpric: Hamilton, Australia zapremine 100 $\mu$ l;

Membranski filtri za uzorak: Machrey-Nagel GmbH&Co Kb.Germany 640  $\mu$ 125mm;

TKA sistem za prečišćavanje vode (Niederelbert, Nemačka).

### **3.2.3. Kompjuterski programi**

*ChemStation Origin 7 (<https://www.agilent.com>)*

*Chem Office Ultra 7.0. (<http://www.cambridgesoft.com>)*

*Excel (Microsoft Office 2003, Cambridge Soft, SAD)*

### **3.2.4. Određivanje Log P vrednosti propiofenonskih derivata halkonske grupe**

*Priprema rastvora ispitivanih jedinjenja*

Ispitivani halkoni i standardna jedinjenja pripremani su kao metanolni rastvori u koncentraciji od 0,1 mg/mL i injektovani u kondicioniran HPLC sistem u triplikatu.

*Priprema mobilnih faza*

Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača voda-metanol u odnosima 75:25; 70:30; 65:35; 60:40 i 55:45 (v/v).

*Hromatografski uslovi*

Kolona: Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150mm, 5 $\mu$ m

Temperatura kolone: 30 °C

Brzina protoka: 1,2 mL/min.

Injektovana zapremina: 20 $\mu$ L

UV detekcija: 210 nm i 300 nm

### *Određivanje lipofilnosti*

Za određivanje lipofilnosti izvedena je izokratska hromatografska analiza ispitivanih jedinjenja i standardne supstance u svih pet definisanih hromatografskih sistema. Za svako ispitivano jedinjenje zabeležena su retenciona vremena ( $t_R$ ), kao i retenciono vreme mobilne faze,  $t_0$  (za svaki hromatografski sistem) i izračunati retencioni faktori ( $k$ ) kao i logaritamske vrednosti retencionih faktora ( $\text{Log } k$ ). Dobijene vrednosti su korelisane sa udelom organskog rastvarača u mobilnoj fazi ( $\phi$ ) korišćenjem linearne regresije. Ekstrapolacijom dobijene prave na 0% udela metanola dobijena je vrednost retencionog faktora za hromatografski sistem u kom bi mobilnu fazu predstavljala voda ( $\text{Log } k_w$ ). Dobijene  $\text{Log } k_w$  vrednosti standardnih supstanci korelisane su sa literaturnim vrednostima za  $\text{Log } P$  (78). Linearnom regresijom konstruisana je standardna kriva zavisnosti  $\text{Log } P$  od  $\text{Log } k_w$ . Iz standardne krive, izračunate su  $\text{Log } P$  vrednosti ispitivanih halkona na osnovu prethodno dobijenih  $\text{Log } k_w$  vrednosti .

### **3.2.5. Određivanje $\text{Log } D$ vrednosti propiofenonskih derivata propafenonske grupe**

#### *Rastvor fosfatnog pufera pH 7,4*

Odmeri se 0,6 g kalijum-dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 6,4 g natrijum-hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 5,85 g natrijum-hlorida ( $\text{NaCl}$ ), prenese u odmerni sud od 1000 mL i rastvori u 300 mL vode. Nakon rastvaranja, odmerni sud se dopuni vodom do oznake.

#### *Priprema rastvora ispitivanih jedinjenja*

Odmeri se 2,5 mg ispitivanog jedinjenja, prenese u odmerni sud od 25 mL, doda 17 mL fosfatnog pufera pH 7,4, mućka u ultrazvučnom kupatilu tokom 15 min i sud istim rastvaračem dopuni do oznake ( $c = 0,1 \text{ mg/mL}$ ).

### *Priprema mobilnih faza*

Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača:

1. voda-metanol u odnosu 80:20 (v/v);
2. voda-acetonitril u odnosu 80:20 (v/v).

### *Hromatografski uslovi*

Kolona: Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150mm, 5 $\mu$ m

Temperatura kolone: 30 °C

Brzina protoka: 1,2 mL/min.

Injektovana zapremina: 20 $\mu$ L

UV detekcija: 254 nm

### *Postupak određivanje distribucionog koeficijenta*

Distribicioni koeficijent je određen primenom modifikovane metode mućkanja (*shake-flask*). Graduisanom pipetom se odmeri i u balon sa okruglim dnom prenese 10 mL puferovanog rastvora ispitivanog jedinjenja i 10 mL oktanol. Sadržaj u balonu se meša na magnetnoj mešalici tokom 12 h, a zatim se ostavi 12 h da se slojevi odvoje.

Primenom HPLC metode (poglavlje 3.4.3.) određuju se koncentracije ispitivanih jedinjenja u polaznim puferizovanim rastvorima (A1) i vodenom sloju nakon mešanja (A2), a zatim izračuna razlika dobijenih vrednosti (A1-A2) koja je proporcionalna koncentraciji leka zaostalog u organskom rastvaraču.



### **3.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata**

#### **3.3.1. Oprema i aparati**

Inkubator MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, CO<sub>2</sub> CELL 48, Nemačka;  
Mikrotitraciona ploča (sterilna) sa 96 mesta sa ravnim dnom (Starstedt, SAD);  
UV/VIS spektrofotometar Cintra 20 (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Dandenong, Australija), program *Spectral Ver. 1.70*;  
Analitička vaga Adventurer<sup>TM</sup>-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD).

#### **3.3.2. Reagensi i jedinjenja korišćena u ispitivanju**

Jedinjenja korišćena u ispitivanju antimikrobne aktivnosti navedena su u poglavlju 4.2 i 4.3.;

Dimetilsulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Company Inc, SAD);  
Hloroform p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka).

#### **3.3.3. Ispitivanje aktivnosti propiofenonskih derivata na rast ATCC sojeva bakterija**

##### *Sojevi mikroorganizama*

U ispitivanju antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata korišćeno je devet standardnih sojeva bakterija:

- a) Gram-pozitivne bakterije: *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633);
- b) Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (NCIMB 9111), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

### *Hranljive podloge*

Müller-Hinton bujon za bakterije, Torlak, Srbija

### *Računarski programi*

*Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, SAD);*

*ChemOffice Ultra 7.0.0 (Cambridgesoft, Kembriđ, MA, SAD);*

*Accelrys Draw 4.2 (173);*

*AutoDock v 4.0.1. (174);*

*Avogadro 1.1.1 (175);*

*Autodock Vina 1.1.2. (176);*

*Autodock Tools 1.5.6.(177);*

*Statistical analysis software package - SPSS Statistics (178);*

*RapidMiner 5.2 (179) i RapidMiner version 5.2. (180);*

*MOPAC 2012 (181, 182).*

### *Priprema kultura mikroorganizama*

Aktivne kulture mikroorganizama korišćenih u ispitivanju pripremane su u 10 mL Müller-Hinton bujona. Nakon inkubacije tokom 24 h na 37°C, kulture su razblažene odgovarajućim svežim medijumom, tako da su dobijene suspenzije optičke gustine od  $2 \times 10^6$  CFU/mL. Ovako dobijene kulture korišćene su za inokulaciju. Finalna koncentracija bakterija iznosila je  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL.

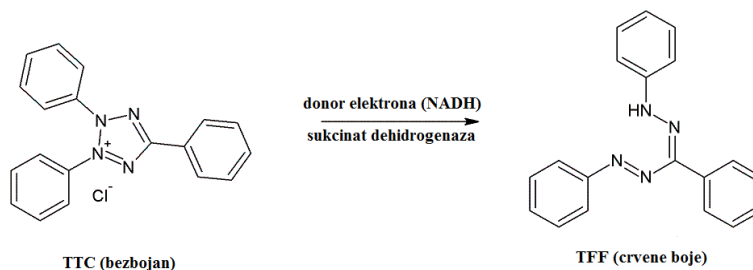
### *Priprema rastvora ispitivanih propiofenonskih derivata*

Osnovni rastvori ispitivanih jedinjenja pripremani su u DMSO u koncentraciji od 1 mg/mL. Radna razblaženja pripremljena su sa Mueller-Hinton bujonom u opsegu koncentracija od 6,25-100 µg/mL za dihidroksi halkone (1OOH, 1POH i 1MOH) i 31,25-500 µg/mL za halogenovane i alkilovane halkone i derivate propafenona.

## Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost propiofenonskih derivata ispitana je bujon-mikrodilucionom metodom prema preporukama CLSI (183).

U mikrotitracionu ploču sa 96 mesta dodato je po 100  $\mu\text{L}$  razblaženja ispitivanog jedinjenja (u triplikatima) i po 100  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije. Kao pozitivna kontrola postavljena su dva triplikata bakterija u medijumu bez dodatka propiofenonskih derivata. Bakterijskim suspenzijama je dodat indikator rasta 2,3,5-trifenil-tetrazolijum hlorid (TTC) (0,05%). TTC je redoks indikator, koji se koristi za detekciju ćelijske respiracije a time i za diferenciranje metabolički aktivnih od metabolički neaktivnih ćelija. Pod uticajem ćelijskih dehidrogenaza dolazi do enzimske redukcije TTC (koji je bezbojan) do 1,3,5 trifenilformazana (TFF) koji je crvene boje. Enzimska redukcija TTC je predstavljena na Slici 21.



**Slika 21.** Enzimska redukcija trifenil-tetrazolijum hlorida pod uticajem ćelijskih dehidrogenaza

Nakon 24 h kultivacije u termostatu na  $35^{\circ}\text{C}$ , u aerobnim uslovima, očitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Minimalna inhibitorna koncentracija predstavlja najnižu koncentraciju propiofenonskog derivata pri kojoj nije uočen vidljiv rast mikroorganizma. Svaki eksperiment je ponovljen tri puta.

### 3.3.4. *QSAR* analiza antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata iz grupe halkona

#### *Priprema struktura i računanje molekulskih deskriptora*

Pre izvođenja *QSAR* studije sve strukture su nacrtane u programu *ChemDraw X.X* i u obliku MOL fajlova prenete u program *VegaZZ (ver. 2.4.0)* (206) gde su strukturama pridodati vodonikovi atomi. Korišćenjem SP4 polja sila određeni su Gasteiger naelektrisanja i vrste atoma. U 3000 koraka, primenom molekulske mehaničke metode zasnovane na AMMP konjugovanom gradijentnom algoritmu izvršena je optimizacija svih struktura molekula. Najoptimalnije konformacije odabrane su primenom semi empirijske AM1 metode koja je implementirana u *MOPAC 7.1* programu. Optimizovane strukture su spakovane u jedan SDF fajl kao ulazni fajl za izračunavanje velikog broja 2D i 3D molekulskih deskriptora u program *PaDEL-Descriptor suite (ver. 2.12)* (184).

#### *QSAR analiza*

Početna statistička analiza izračunatih deskriptora i antimikrobne aktivnosti halkona obavljena je u programu *SPSS*, a dalja analiza izvedena je u programu *RapidMiner 5.2*.

Izbor statistički najznačajnijih *PaDEL* deskriptora kojima se može opisati aktivnost izvršena je u nekoliko koraka: odabrani deskriptori su u obliku fajla .csv ekstenzije preneti i analizirani u programu *RapidMiner* u kome su deskriptori sa nultom vrednošću i velikom standardnom greškom uklonjeni, a ostatak deskriptora za koje je vrednost SD bila manja od 5% uzeti u dalju analizu veze strukture i antimikrobne aktivnosti. Deskriptori koji su među sobom pokazali veliki stepen slaganja tj. za koje je vrednost korelacionog koeficijenta bila veća od 0,95 uklonjeni su iz bazičnog seta tako da je konačan broj deskriptora primenom genetskog algoritma (GA) sveden na dva. Veličina populacije je bila 100, a maksimalan broj pokušaja u okviru generacije bio je 200. Kvalitet i sposobnost predviđanja formiranih *QSAR* modela analizirana je metodama višestruke regresione analize (MLR) kao i metodom unakrsne validacije.

### 3.3.5. Molekulske *docking* studije antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata propafenonske grupe

*Priprema ispitivanih jedinjenja za docking simulaciju kanal-ligand interakcija*

Strukture ispitivanih jedinjenja pripremljene su korišćenjem programskog paketa *Accelrys Draw 4.2* i *Avogadro 1.1.1* i optimizovane mehaničko molekulskom (MM/MMFF94) metodom (185, 186, 187). Ovako dobijene strukture su dalje optimizovane semiempirijskom metodom PM7 (188) koja je inkorporirana u programskom paketu *MOPAC 2012*. Na osnovu poznavanja vrednosti pKa propafenona (pKa=9,63) i ponašanja na fiziološkom pH, azotovi atomi propafenona i njegovih derivata su pre optimizacije protonovani. Optimizovane strukture jedinjenja, zajedno sa strukturom proteina su pripremljene za analizu u programu *Autodock Tools 1.5.6*.

*Modelovanje KcsA kanala*

U modelovanju ligand-kanal interakcije korišćena je kristalografska struktura zatvorenog i otvorenog K<sup>+</sup> kanala deponovana u bazi *Protein Data Bank* (189) pod šiframa 1J95 (zatvoreni) i 3FB7 (otvoreni) (190). K<sup>+</sup> kanal je kokristalisao sa tetrabutilamonijumom (TBA) i 4 K<sup>+</sup> jona u centralnoj pori, kao ligandima. Korišćenjem programa Chimera ligandi molekuli vode su izdvojeni iz kanala kako bi se dobio slobodan kanal.

*Docking simulacija interakcija propafenona i derivata sa zatvorenom i otvorenom konformacijom KcsA kanala*

Ispitivane strukture jedinjenja su zajedno sa strukturom proteina pripremljene za analizu u programu *Autodock Tools 1.5.6*. (177, 191). *Docking* je izveden u *Autodock Vina 1.1.2*. programu (176) istraživanjem celokupnog konformacionog prostora sa citoplazmatske strane centralne šupljine u pori kanala. U okviru definisanog prostora centrirana je trodimenzionalna rešetka veličine 24 × 24 × 24 Å. Verodostojnost lokacije definisane aminokiselinske sekvence, kao mesta vezivanja, testirana je sa

optimizovanom strukturom liganda TBA sa kojim je kanal kokristalisao. Nakon toga se pristupilo izvođenju *docking* eksperimenata. Kao odgovarajući vezivni model ispitane su konformacije liganada najveće populacije sa najmanjom energijom vezivanja. Izračunavanja su izvedena pomoću PARADOX softvera (*Scientific Computing Laboratory of the Institute of Physics, Belgrade, Srbija*).

Veličina populacije je bila 200, a maksimalan broj energetskih provera  $2,5 \times 10^6$ . Na osnovu 50 slučajnih pokušaja u *docking* eksperimentima dobijena je najverovatnija konformacija i orijentacija ispitivanog jedinjenja u vezivnom mestu pore kanala.

### **3.3.6. Ispitivanje *in vitro* efekta propiofenonskih derivata na rast MRSA sojeva**

#### *Poreklo i izolacija MRSA sojeva*

Klinički izolati MRSA sojeva su prikupljeni u periodu od januara do juna 2015. godine u mikrobiološkim laboratorijama u Srbiji. Sakupljan je jedan MRSA soj po pacijentu. Za svaki prikupljen soj evidentirani su osnovni podaci o pacijentu, zdravstvenoj ustanovi u kojoj je pacijent lečen i mikrobiološkoj laboratoriji koja vrši analizu uzorka. Za svaki uzorak iz koga je izolovan MRSA soj definisan je način identifikacije soja i ispitivanja osetljivosti na antimikrobne agense. Nakon izolacije, sojevi su poslani Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi sojevi MRSA su čuvani na  $-70^{\circ}\text{C}$  u triptikaza-soja bujonu (TSB, LabM ltd., Velika Britanija) sa dodatkom 12,5% sterilnog glicerola. Pre eksperimenata sojevi su odmrznuti i presejani na triptikaza-soja agar (TSA, LabM ltd.) i kultivisani u aerobnim uslovima tokom 18-24 h na  $35^{\circ}\text{C}$ . Kao pozitivna kontrola rezistencije na meticilin u eksperimentima je korišćen kontrolni soj meticilin-rezistentnog *S. aureus* ATCC 43300 (KWIK-STIK<sup>TM</sup>, Microbiologics, SAD).

**Tabela1.** Poreklo izolovanih bolničkih i vanbolničkih MRSA sojeva

Broj soja	Uzorak	poreklo sojeva
3	sputum	van bolnički
5	hemokultura	bolnički
6	trahealni aspirat	van bolnički
8	bris rane	van bolnički
10	bris uretre	bolnički
12	bris rane	bolnički
13	urinokultura	bolnički
ATCC 43300	standardni soj	

Klinički izolati MRSA su identifikovani PCR metodom detekcijom *nuc* i *mecA* gena. Ispitivanje je izvršeno da bi se potvrdila fenotipska identifikacija izolata kao MRSA. Prisustvo *nuc* gena (gena za termonukleazu) koji je specifičan za vrstu *S. aureus* ispitano je PCR metodom prema protokolu Brakstad i sar. (192). Kao pozitivna kontrola je korišćen *S. aureus* NCTC 8325, a kao negativna kontrola *S. sciuri* NCTC 12103. Prisustvo *mecA* gena je ispitano PCR metodom u skladu sa protokolom Bignardi i sar. (193). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *S. aureus* C1 a kao negativna soj *S. aureus* NCTC 8325.

#### *Hranljive podloge*

Moždano-srčani infuzioni bujon (*Brain heart infusion broth*, BHI, Lab M Limited, Velika Britanija).

#### *Računarski programi*

*Marvin Sketch 5.5.1.0* programa ([www.chemaxon.com/products.html](http://www.chemaxon.com/products.html));

*Chem3DUltra7.0.0* programa;

([http://www.cambridgesoft.com/Ensemble\\_for\\_Chemistry/ChemDraw/](http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemDraw/));

CS Gaussian 98 (Gaussian 98 (Revision A.7)), (194);

*Pentacle 1.0.7* ([http://www.moldiscovery.com/soft\\_pentacle.php](http://www.moldiscovery.com/soft_pentacle.php)).

### *Priprema rastvora propiofenonskih derivata*

Osnovni rastvori ispitivanih jedinjenja pripremljeni su u koncentraciji od 1 mg/mL u sterilnom DMSO kao rastvaraču. Radna razblaženja ispitivanih jedinjenja pripremana su razblaživanjem osnovnog rastvora sa moždano-srčanim infuzionim bujonom do koncentracija koje su za propafenonsku grupu bile u opsegu od 1 do 64 µg/mL, a za halkonsku grupu jedinjenja od 1 do 500 µg/mL.

### *Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na propiofenonske derivate*

Osetljivost MRSA sojeva na propiofenonske derivate određena je bujon-mikrodilucionim testom.

U mikrotitracionu ploču sa 96 mesta sa ravnim dnom dodato je po 180 µL razblaženja halkona u triplikatima i po 20 µL bakterijske suspenzije gustine 0,5 po McFarland standardu. Kao pozitivna kontrola su postavljena dva triplikata bakterija u BHI bujonu bez dodatka ispitivanih jedinjenja. Svakom razblaženju je dodato 10 µL/mL TTC. Pod uticajem ćelijskih dehidrogenaza dolazi do enzimske redukcije TTC (koji je bezbojan) do TFF (koji je crvene boje). Enzimska redukcija TTC je predstavljena na Slici 21 (poglavlje 3.3.3.). Nakon kultivacije u trajanju od 24 h, u termostatu na 35°C i u aerobnim uslovima očitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Kao vrednost MIK je uzeta najmanja koncentracija ispitivanog jedinjenja u kojoj je boja medijuma ostala nepromenjena (žuta). Svaki eksperiment je ponovljen tri puta.

### *3D QSAR analiza inhibicije rasta MRSA sojeva*

3D QSAR studije ispitivanih jedinjenja izvedene su u programu *Pentacle 1.0.6*.

Set podataka činilo je 16 propiofenonskih derivata za koje su eksperimentalno određene MIK vrednosti i iz kojih su izračunate pMIK vrednosti ( $pMIK = \log(1/MIK \text{ [mol/dm}^3\text{]})$ ) za svih osam MRSA sojeva koji su korišćeni u formiranju 3D QSAR modela.

pKa vrednosti ispitivanih jedinjenja za dominantne oblike pri fiziološkom pH=7,4 izračunate su primenom *MarvinSketch 5.5.1.0* programa. Najstabilnije konformacije



ispitivanih jedinjenja izvedene su primenom programa Gaussian PM3 semiempirijskom metodom inkorporiranom u Chem3D program. Grupa od 13 ispitivanih jedinjenja upotrebljena je za formiranje *training* set, a preostala 3 jedinjenja korišćena su kao test set jedinjenja za validaciju 3D QSAR modela.

3D QSAR analiza je izvedena polazeći od izračunavanja trodimenzionalnih mapa energija (*GRID based Molecular Interaction Fields-MIFs*) koje kvantifikuju četiri moguća tipa interakcija ciljnog mesta dejstva i ispitivanog molekula: DRY (hidrofobne interakcije), O ( $sp^2$  karbonilni kiseonikov atom, kao akceptor vodonične veze), N1 (neutralni planarni NH, kao u amidima, donor vodonične veze) i TIP interakcija (deskriptor koji definiše oblik molekula). Jedinično rastojanje u mreži je podešeno na 0,5 Å, a CLAC korekcija geometrije na 0,8 Å.

Energija pomenutih interakcija sa ciljnim molekulom je računata u svakoj tački mreže kao zbir Lennard-Jones energije ( $E_{lj}$ ), energije vodoničnih veza ( $E_{hb}$ ), energije elektrostatičkih interakcija ( $E_{el}$ ), i entropije (S):

$$\sum xyz = \sum E_{lj} + \sum E_{el} + \sum E_{hb} + S$$

Program *Pentacle* automatski prevodi mape interakcija u deskriptore nezavisne od preklapanja mapa ispitivanih jedinjenja (*GRid INdependent Descriptors, GRIND i GRIND2*). *GRIND* pristup ima za cilj da iskoristi podatke sadržane u *MIF* prevodeći ih u novi tip promenljive čije vrednosti ne zavise od orijentacije molekule. Ovaj cilj se postiže primenom algoritma za optimizaciju koji kao funkciju procene (*scoring function*) koristi intenzitet polja i uzajamna rastojanja između izabranih čvorova. Dobijene vrednosti promenljive predstavljaju matricu deskriptora koja se može analizirati primenom *PCA* i *PLS* regresione analize. U ovoj studiji, *PCA* je upotrebljena za analizu sličnosti i razlika između ispitivanih jedinjenja, dok je *PLS* korišćena za formiranje 3D QSAR modela (195).

Procena kvaliteta 3D QSAR modela i njegova sposobnost predviđanja izvršena je jednostavnim metodom unakrsne validacije (*leave-one-out cross-validation LOO*) koja se bazira na isključivanju jedne Y vrednosti iz skupa podataka ( $x_i, y_i$ ) i formiranju nove

regresione funkcije sa preostalih n-1 podataka. Izračunava se  $e_{(i)}$  -odstupanje isključenog podatka, prema jednačini:

$$e_{(i)} = y_{\text{data},i} - \hat{y}_{\text{model}(i)}$$

Ponavljanjem ovog postupka za svaku Y vrednost iz skupa dolazi se do unakrsno validirane vrednosti  $R^2$  koja se označava kao  $Q^2$  i predstavlja izrazom:

$$Q^2(Y) = 1 - \frac{PRESS}{SSTo}$$

gde je *PRESS* (*Predicted Sum of Squares*) suma kvadrata predviđenih koeficijenata korelacije:

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

a *SSTo* (*Sum of Squares Total*) ukupna suma kvadrata:

$$SSTo = \sum_{i=1}^n (y_{\text{data},i} - \bar{y}_{\text{data},i})^2$$

Pored vrednosti  $Q^2(Y)$  i *PRESS* za procenu validnosti seta koristi se i vrednosti grešaka *RMSEE* (*Root Mean Squared Error of Estimation*) i *RMSEP* (*Root Mean Squared Error of Prediction*):

$$RMSEE = RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}}$$

*PLS* modeli sa vrednostima  $Q^2_{\text{pre}} \geq 0,5$  smatraju se dovoljno pouzdanim za predviđanje i preračunavanje zavisno promenljivih.

### **3.3.7. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata na kliničkim izolatima *Pseudomonas aeruginosa***

*Poreklo kliničkih izolata Pseudomonas aeruginosa*

Ispitivanje aktivnosti propiofenonskih derivata izvršeno je sa jedanaest kliničkih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Poreklo kliničkih sojeva *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Broj soja</b>	<b>poreklo</b>
1	urinokultura
2	urinokultura
3	bris uha
4	sputum
5	urinokultura
6	bris uha
7	bris uha
8	urinokultura
9	bris uha
10	bris uha
11	sputum

#### *Hranljive podloge*

Moždano-srčani infuzioni bujon (*eng. Brain heart infusion broth*, BHI, Lab M Limited, Velika Britanija).

#### *Računarski programi*

U ispitivanju su korišćeni računarski programi navedeni u poglavlju 3.3.5 (Molekulske *docking* studije antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata propafenonske grupe).

#### *Priprema osnovnih rastvora propiofenonskih derivata*

Postupak pripreme rastvora opisan je u poglavlju 3.3.6 Ispitivanje aktivnosti propiofenonskih derivata na rast MRSA sojeva.

#### *Ispitivanje osetljivosti *Pseudomonas aeruginosa**

Osetljivost sojeva *Pseudomonas aeruginosa* na propiofenonske derivate je ispitana bujon-mikrodilucionim testom. Postupak je opisan u poglavlju 3.3.6 (Ispitivanje aktivnosti propiofenonskih derivata na rast MRSA sojeva).

### 3.3.8. Molekulske *docking* studije

*Priprema ispitivanih jedinjenja za docking simulaciju kanal-ligand interakcija*

Postupak pripreme identičan je postuku pripreme opisanom u poglavlju 3.3.5 (Molekulske *docking* studije antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata propafenonske grupe).

*Modelovanje OccK4 (ranije OpdL) transportnog porina Pseudomonas aeruginosa*

U modelovanju ligand-kanal interakcije korišćena je kristalografska struktura porina *Pseudomonas aeruginosa* Opdl PDB ID: 2Y0H (196) koja je dobijena iz baze *Protein Data Bank* (189).

*Docking simulacija interakcija propiofenonskih derivata propafenonske grupe sa OccK4 (ranije OpdL) porinom Pseudomonas aeruginosa*

Postupak simulacije identičan je postupku simulacije opisanom u poglavlju 3.3.5 (Molekulske *docking* studije antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata propafenonske grupe).

### 3.3.9. Ispitivanje uticaja *orto* fluoriranih propafenonskih derivata na produkciju biofilma *Pseudomonas aeruginosa* sojeva

*Ispitivana jedinjenja*

5OF:3-(2-fluoro-fenil)-1-(2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil)-propan-1-on hidrohlorid;

5CF3: 3-(2-trifluorometil-fenil)-1-(2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil)-propan-1-on hidrohlorid.

#### *Poreklo kliničkih sojeva Pseudomonas aeruginosa*

Podaci su navedeni u poglavlju 3.3.7 (Ispitivanje aktivnosti propiofenonskih derivata na kliničkim izolatima *Pseudomonas aeruginosa*).

#### *Hranljive podloge*

Triptikaza-soja bujon (TSB, LabM ltd., Velika Britanija) sa dodatkom 1% glukoze;  
Moždano-srčani infuzioni bujon (*eng. Brain heart infusion broth*, BHI, Lab M Limited, Velika Britanija);  
Triptikaza-soja agar (TSA, LabM ltd., Velika Britanija).

#### *Priprema rastvora orto fluoriranih propafenonskih derivata*

Osnovni rastvori ispitivanih *orto* fluoriranih propafenonskih derivata pripremljeni su u DMSO u koncentraciji od 1 mg/mL. Od osnovnih rastvora pripremljeno je 5 radnih razblaženja u opsegu koncentracija od 31,2 do 500 µg/mL koristeći TSB bujon (sa dodatkom 1% glukoze) prema Knobloch-u i saradnicima (197).

#### *Postupak ispitivanja produkcije biofilma u prisustvu orto fluoriranih derivata propafenona*

Sposobnost produkcije biofilma je ispitana u mikrotitracionim pločama sa 96 mesta prema protokolu Stepanovića i saradnika (198). Jedna kolonija prekonoćne kulture *Pseudomonas aeruginosa* sojeva je resuspendovana u fiziološkom rastvoru radi dobijanja bakterijske suspenzije koja odgovara McFarland standardu 0,5 ( $\approx 10^8$  CFU/mL).

U mikrotitracionu ploču je dodato po 180  $\mu\text{L}$  svakog razblaženja, u triplikatima. U svako polje ploče je dodato po 20  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene bakterijske suspenzije. Pozitivna kontrola svakog soja su bakterije kultivisane samo u medijumu bez prisustva ispitivanih jedinjenja. Dva triplikata samog medijuma su predstavljala negativnu kontrolu svake ploče.

Nakon 24 h ili 48 h kultivacije na 35°C u aerobnim uslovima, ploče su odlivene, tri puta isprane sa 300  $\mu\text{L}$  temperiranog fosfatnog pufera ( *phosphate-buffered saline, PBS*; pH 7,2) i osušene na vazduhu. Ploče su fiksirane tokom 20 minuta sa 150  $\mu\text{L}$  metanola po polju ploče, osušene i obojene sa 150  $\mu\text{L}$  rastvora 2% kristal violeta (Himedia) tokom 15 min. Višak nevezane boje je ispran tekućom vodom a boja vezana za adherentne bakterije je oslobođena sa 150  $\mu\text{L}$  96 % etanola tokom 20 minuta. Optička gustina je pročitana na 570 nm (*ICN Flow Titertek Multiscan Plus*) nakon čega su izračunate srednje vrednosti triplikata za sve testirane sojeve i negativne kontrole. Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, za svaku mikrotitracionu ploču je definisana „cut off“ vrednost (ODc) kao srednja vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećana za vrednost 3 SD (srednja vrednost OD negativne kontrole +3SD). Nakon dobijanja vrednosti ODc rezultati su preračunati prema sledećoj šemi (199):

$OD \leq ODc$  - nema produkcije biofilma (kategorija 0)

$ODc < OD \leq 2 \times ODc$  – slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +)

$2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$  – umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++)

$4 \times ODc < OD$  – izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++)

Svaki eksperiment je ponovljen tri puta tokom tri uzastopna dana.

Da bi se ispitalo da li je inhibicija formiranja biofilma pod uticajem *orto* fluoriranih derivata trajni efekat, MRSA sojevi su nakon 24 h kultivacije u medijumu sa ispitivanim jedinjenjima presejani na TSA i nakon 24 h je ponovo ispitana sposobnost formiranja biofilma (kao što je prethodno opisano). Svaki eksperiment je ponovljen tri puta.

### **3.3.10. Ispitivanje uticaja orto fluoriranih propafenonskih derivata na produkciju piocijanina kod *Pseudomonas aeruginosa* sojeva**

*Ispitivana jedinjenja*

5OF

5CF3

*Poreklo kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa**

Poreklo kliničkih izolata je navedeno u poglavlju 3.3.7 (Ispitivanje aktivnosti propiofenonskih derivata na kliničkim izolatima *Pseudomonas aeruginosa*).

Aktivne kulture mikroorganizama korišćene u ispitivanju pripremane su u 10 mL Müller-Hinton bujona. Nakon inkubacije tokom 24 h na 37°C, kulture su razblažene odgovarajućim svežim medijumom tako da su dobijene suspenzije optičke gustine od  $2 \times 10^6$  CFU/mL. Ovako dobijene kulture korišćene su za inokulaciju.

*Hranljive podloge*

Müller-Hinton bujon za bakterije, Torlak, Srbija

*Priprema rastvora orto fluoriranih propafenonskih derivata*

Osnovni rastvori ispitivanih orto fluoriranih derivata pripremljeni su u 5% DMSO u koncentraciji od 1 mg/mL. Od osnovnih rastvora pripremljena su dva radna razblaženja u koncentracijama od 500 i 250 µg/mL u 5% DMSO.

*Postupak ispitivanja fluoriranih derivata na produkciju piocijanina (200)*

Pripremljena radna razblaženja dodata su u 5 mL aktivirane bakterijske kulture i inokulati inkubirani na 37 °C tokom 24 h. Tretirane kulture se mešaju sa hloroformom

(3 mL) a zatim se izdvojeni hloroformski sloj tretira sa 0,2 M HCl (1 mL). Absorbancija hloroformskog sloja se meri na 520 nm (201). Eksperiment se izvodi u triplikatu i ponavlja dva puta. Vrednosti se izražavaju kao odnos  $(OD_{520}/OD_{600}) \times 100$ .

### **3.4. Ispitivanje permeabilnosti propiofenonskih derivata na veštačkim membranama (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA testovi)**

#### **3.4.1. Aparati i oprema**

HPLC instrument ACCELA 1000, Thermo Scientific, SAD;

Tripl-kvadrupolski maseni analizator TSQ QUANTUM ACCESS MAX, Thermo Scientific, SAD;

Mikrofiltracione ploče MultiScreen<sup>TM</sup> HTS sa hidrofobnom polivinilidenfluoridnom PVDF membranom sa porama dimenzija 0,45 µm (Millipore Corporation, Molsheim, Francuska);

Varijabilna automatska pipeta Labopette 100-1000 µL (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Nemačka);

Varijabilna automatska pipeta Labopette 2-20 µL (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Nemačka);

Analitička vaga METLLER (Cirih, Švajcarska);

Analitička vaga Adventurer<sup>TM</sup>-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD);

pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska);

Kolona Zorbax Extend-C<sub>18</sub> kolona 150 mm x 4,6 mm, dijametar čestica 3,5 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD);

TKA sistem za prečišćavanje vode (Niederelbert, Nemačka).



### 3.4.2. Reagensi

Natrijum-hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka;

Kalijum-dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka;

Dimetilsulfoksid ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ) p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka;

Destilovana voda ( $\text{H}_2\text{O}$ );

Lecitin 99%, Sigma Aldrich, Nemačka;

Dodekan 99% ( $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ ), Acros Organics, SAD;

Metanol HPLC grade ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), J.T. Baker, Holandija.

### 3.4.3. Hromatografski uslovi

Mobilna faza: metanol : 0,1% mravlja kiselina u vodi (v/v);

Protok mobilne faze: 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;

Temperatura kolone: 50  $^\circ\text{C}$ ;

Temperatura uzorka: 10  $^\circ\text{C}$ ;

Injektovana zapremina 10  $\mu\text{L}$ .

### 3.4.4. Uslovi za masenu detekciju

Napon na jonskom izvoru 4000 V;

Temperatura isparivača 300  $^\circ\text{C}$ ;

Temperatura kapilare 300  $^\circ\text{C}$ ;

Pritisak linearnog gasa nosača 50 jedinica (*units*);

Pritisak kružnog gasa nosača 10 jedinica (*units*);

Primenjena je HESI jonizacija (*Heated electron spray ionization*) u pozitivnom modu, a detekcija analita je vršena praćenjem molekulskih  $[\text{M}+\text{H}]^+$  jona u SIM modu (*Singl ion monitoring*).

### 3.4.5. Kompjuterski programi

*MembranePlus;*

*MarvinSketch 4.1 (ChemAxon, Mađarska).*

### 3.4.6. Priprema rastvora

*Rastvor fosfatnog pufera pH 7 (20mM)*

Odmeri se 1,167 g natrijum-dihidrogenfosfata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) i 3,093 g natrijum-hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) i rastvori u odmernom sudu od 1000 mL u vodi. Nakon rastvaranja odmerni sud se dopuni do crte vodom.

*Rastvor DMSO (5%)*

50 g DMSO rastvori se u odmernom sudu od 1000 mL u rastvoru fosfatnog pufera pH 7. Odmerni sud se dopuni do crte rastvorom fosfatnog pufera pH 7.

*Rastvor lecitina (1%)*

100 mg lecitina se prenese u odmerni sud od 10 mL i rastvori u dodekanu. Odmerni sud se dopuni do crte.

*Osnovni rastvori ispitivanih jedinjenja (1000 $\mu\text{M}$ )*

Odmeri se tačno masa koja odgovara 10 mM ispitivanog jedinjenja, prenese u odmerni sud od 10 mL i rastvori u 7 mL DMSO. Odmerni sud se dopuni do crte 5% rastvorom DMSO.

*Radna razblaženja ispitivanih jedinjenja (100 $\mu\text{M}$ )*

U odmerni sud od 10 mL prenese se po 1 mL *Osnovnog rastvora ispitivanih jedinjenja (1000 $\mu\text{M}$ )* i sud dopuni 5% rastvorom DMSO u fosfatnom puferu pH 7,4 do oznake.

### 3.4.7. Izvođenje PAMPA eksperimenata

Ispitivanje permeabilnosti izvedeno je na mikrofiltracionim pločama sa 96 odeljaka MultiScreen™ HTS izrađenih od hidrofobne polivinilidenfluoridne (PVDF) membrane sa porama dijametra 0,45 μm. Svaki odeljak donorske ploče impregnira se sa 5 μL rastvora lecitina u dodekanu i ostavi 60 min do potpunog isparavanja rastvarača. U svaki odeljak akceptorske ploče, automatskom pipetom se prenese po 300 μl 5% rastvora DMSO i poklopi donorskom pločom, čime se stvara PAMPA sendvič. U odeljke donorske ploče automatskom pipetom se prenese 300 μL radnog razblaženja ispitivanih jedinjenja (100 μM). Ispitivanje permeabilnosti za svaku supstancu izvršeno je u triplikatu.

Da bi se sprečilo isparavanje PAMPA donorska mikrotitraciona ploča se prekriva odgovarajućim poklopcem. Inkubacija traje 20 sati na sobnoj temperaturi, bez mešanja. Po završetku eksperimenta mikrotitracione ploče se razdvajaju, a koncentracije ispitivanih jedinjenja u donorskim i akceptorskim odeljcima se određuju primenom LC-MS-MS metode, poređenjem dobijenih površina pikova posle 20 h sa površinama pikova u nultom vremenu,  $t_0$ , za svako ispitivano jedinjenje.

Dobijene vrednosti se koriste za izračunavanje retencije propiofenonskih derivata u membrani (%R), parametara permeabilnosti kroz membranu ( $C_A(t)/C_D(0)$  %) i koeficijenta permeabilnosti ( $P_e$ ) primenom jednačina:

$$R = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A}{V_D} \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)}$$
$$P_e = -\frac{2.303 V_D}{A(t - \tau_{LAG})} \left( \frac{V_A}{V_A + V_D} \right) \cdot \log \left[ 1 - \left( \frac{V_A + V_D}{V_D(1 - R)} \right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right]$$

gde su:  $V_A$  – zapremina akceptorske ćelije,  $V_D$  – zapremina donorske ćelije,  $A$  – površina membrane  $t$  – vreme inkubacije,  $\tau_{LAG}$  – vreme postizanja ravnotežnih uslova. Vreme za koje se postignu ravnotežni uslovi, odnosno stabilizacija uspostavljenog gradijenta jedinjenja između donorske i akceptorske ćelije je kratko u odnosu na vreme inkubacije i iznosi oko 20 minuta (202).

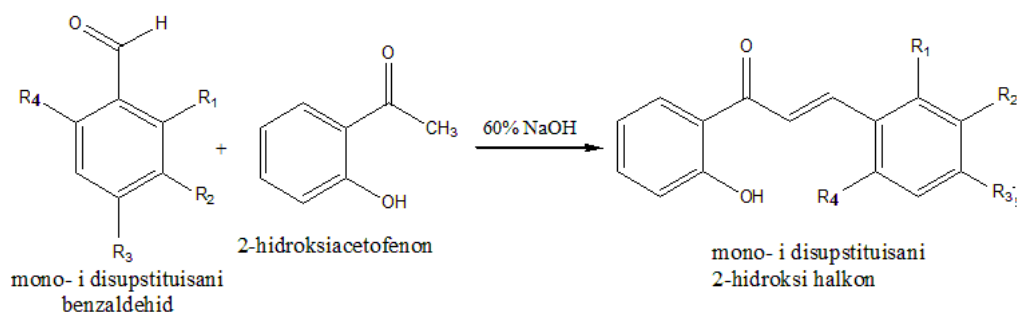
### **3.4.8. Simulacija permeabilnosti u računarskom programu *MembranePlus***

Hemijske strukture pripremljene su u programu *MarvinSketch 4.1*, snimljene pod ekstenzijom sdf i kopirane u program *MembranePlus*. Za izvođenje simulacija korišćeni su proračuni za osnovne fizičko-hemijske parametre izračunate pomoću *ADMET Predictor* modula koji je sastavni deo *MembranePlus* programa.

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4.1. Sinteza šest propiofenonskih derivata iz grupe halkona

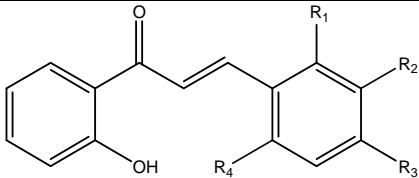
U prvoj fazi sinteze, aldolnom kondenzacijom (Claisen-Schmidtovom kondenzacijom) u prisustvu relativno jake baze (60% NaOH) iz 2-hidroksiacetofenona i mono- ili disupstituisanih benzaldehida dobijaju se mono- ili disupstituisani 2'-hidroksi-1,3-difenil-2-propenoni (Slika 22).



Slika 22. Sinteza mono- i disupstituisanih halkona

Hemijska struktura novosintetisanih halkona predstavljena je u Tabeli 3.

**Tabela 3 .** Strukturne formule sintetisanih mono- i disupstituisanih 1-(2-hidroksifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona

				
<i>Jedinjenje</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>
<b>1MF</b>	-H	-F	-H	-H
<b>1MCH<sub>3</sub></b>	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
<b>1OCH<sub>3</sub></b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H
<b>1PCF<sub>3</sub></b>	-H	-H	-CF <sub>3</sub>	-H
<b>H2,6OCH<sub>3</sub></b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>
<b>H4F2CH<sub>3</sub></b>	-CH <sub>3</sub>	-H	-F	-H

Bazno katalizovana aldolna kondenzacija koja se odvija na sobnoj temperaturi (25 °C) u vodeno-etanolnom rastvoru kao proizvod daje samo *trans* izomer  $\alpha,\beta$ -nezasićenog ketona, što je potvrđeno NMR spektroskopijom ( $^1\text{H}$  NMR  $J_{\text{vinil H}} = 15\text{-}16$ ). Enonska struktura u molekulu halkona (Tabela 3) koja povezuje dva benzenova prstena predstavlja kombinovanu hromoforu koja uslovljava batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma benzena prema vidljivoj oblasti spektra te su dobijeni halkonski proizvodi žuto obojeni. Enonska struktura u molekulu halkona čini ova jedinjenja hemijski nestabilnim i zato se nakon sinteze i prečišćavanja moraju čuvati zaštićeni od svetlosti i kiseonika.

Struktura sintetisanih jedinjenja je potvrđena snimanjem NMR spektara (Prilog). Spektralni podaci za sintetisane halkone su:

**1MF** (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>FO<sub>2</sub>): (*E*)-3-(3-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)2-propen-1-on, Žut kristalan prašak; prinos: %, **IR (ATR) (cm<sup>-1</sup>):**  $\bar{\nu} = 1644,8; 1583,5; 1486,3; 1449,4; 1439,4; 1367; 1346,7; 1319; 1288; 1221,4; 1147,8; 1023,6; 1001; 968,8; 860,9; 847; 801,5; 750,9; 663,3$ ;  **$^1\text{H}$  NMR data ( $\delta$ , ppm):**12,72 (s, 1H), 7,93 (dd, 1H,  $J_1=8,20$ ,  $J_2=1,60$ ), 7,90 (d, 1H,  $J=15,40$ ), 7,67 (d, 1H,  $J=15,44$ ), 7,56-7,26 (m, 4H, ArH), 7,18-6,91 (m, 3H, ArH);  **$^{13}\text{C}$  NMR data ( $\delta$ , ppm):**193,45; 165,52; 163,63; 160,61; 143,91;

143,86; 136,90; 136,63; 130,68; 130,51; 129,66; 124,79; 124,74; 121,37; 119,88; 118,93; 118,68; 117,93; 117,51; 114,84; 114,40; **ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup> m/z** 241,067.

**1MCH<sub>3</sub>** (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-*m*-tolil-2-propen-1-on, žut kristalan prašak; prinos: %. **IR (ATR) (cm<sup>-1</sup>):** 3015,3; 2919,4; 1641,6; 1573,8; 1485,7; 1439,8; 1362,8; 1234,2; 1200; 1154; 1026; 973,6; 858,4; 819; 759,1; 665,1; **<sup>1</sup>H NMR data (δ, ppm):** 12,85 (s, 1H), 7,94 (d, 1H, J=15,80), 7,96 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=7,86, J<sub>2</sub>=1,68), 7,68 (d, 1H, J=15,20), 7,54-7,46 (m, 1H, ArH), 7,37-6,91 (m, 6H, ArH), 2,41 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR data (δ, ppm):**193,80; 163,61; 145,71; 138,74; 136,36; 134,54; 131,82; 129,67; 129,22; 128,93; 125,98; 120,02; 119,84; 118,82; 118,60; 21,30; **ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup> m/z** 237,093.

**1OCH<sub>3</sub>**(C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-metoksifenil) 2-propen-1-on, žut kristalan prašak; prinos: %, **IR (ATR) (cm<sup>-1</sup>):** 1637,1; 1599,4; 1570,5; 1487,2; 1463,2; 1338,9; 1301,8; 1250,1; 1161,4; 1107,8; 1022,7; 865,5; 804,2; 726,7; 662,8; **<sup>1</sup>H NMR data (δ, ppm):** 12,97 (s, 1H), 8,27 (d, 1H, J=15,80), 7,95 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=8,00, J<sub>2</sub>=1,80), 7,82 (d, 1H, J=15,60), 7,65 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=7,40, J<sub>2</sub>=1,80), 7,50-7,36 (m, 2H, ArH), 7,04-6,90 (m, 4H, ArH), 3,94 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR data (δ, ppm):**194,29; 163,56; 159,01; 141,13; 136,16; 132,22; 129,69; 129,62; 123,54; 120,77; 120,68; 120,15; 118,75; 118,51; 111,27; 55,53; **ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup> m/z** 253,088.

**1PCF<sub>3</sub>**(C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>O<sub>2</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-(trifluorometil)fenil)-2-propen-1-on, žut kristalan prašak; prinos: 25,58%., **IR (ATR) (cm<sup>-1</sup>):** 3438,9; 1645,1; 1586,1; 1205,6; 1154,7; 1487,1; 1443,4; 1341,9; 1315,5; 1287; 1119,2; 1037,1; 971,7; 864,8; 757,4; 648,3; **<sup>1</sup>H NMR (δ, ppm):** 12,65 (s, 1H, -OH), 7,94 (m, 2H, ArH=6, b), 7,78-7,67 (m, 5H, ArH:2, 3, 5, 6, a), 7,55 (t, 1H, J=8, ArH: 4), 7,06 (d, 1H, J=8, ArH: 3), 6,99 (t, 1H, J=8, ArH: 5); **<sup>13</sup>C NMR (δ, ppm):** 193,34; 163,71; 143,31; 136,76; 129,67; 128,69; 126,02; 125,98; 122,58; 119,87; 118,99; 118,79; **ESI-MS: [M-H]<sup>-</sup> m/z** 290,095.

**H<sub>2</sub>,6OCH<sub>3</sub>** (C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2,6-dimeoksifenil)-2-propen-1-on. žut kristalan prašak; prinos: 86.72%, **IR (ATR) (cm<sup>-1</sup>):** 3015,3; 1636,5; 1575,5; 1258,2; 1481,6; 1320,8; 1195,9; 1155,2; 1016,2; 865,1; **<sup>1</sup>H NMR (δ, ppm):** 12,46 (s, 1H, -OH), 8,42 (d, 1H, J=16, b), 8,16 (d, 1H, J=16, a), 7,92 (d, 1H, J=8, ArH: 6), 7,49(t,



1H, J=8 ArH: 4), 7,34(t, 1H, J=8 ArH: 5), 7,02 (d, 1H, J=8, ArH: 3), 6,94(t, 1H, J=7,6, ArH: 4), 6,61(d, 2H, J=8, ArH:3 i5), 3,94 (s, 6H, 2-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>CNMR (δ, ppm): 195,44; 163,57; 160,63; 136,46; 135,78; 132,05; 129,79; 122,75; 120,54; 118,59; 118,43; 112,82; 103,82; 55,96; **ESI-MS**: [M-H]<sup>-</sup> m/z 282,900.

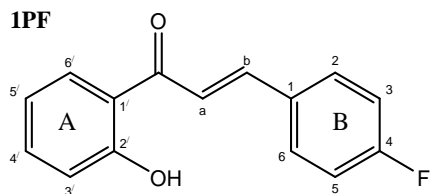
**H4F2CH<sub>3</sub>**(C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>2</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-fluoro-2-metilfenil)- 2-propen-1-on, žut kristalan prašak; prinos: 93,15%, **IR (ATR)** (cm<sup>-1</sup>): 3015,3; 1636,5; 1575,5; 1258,2; 1481,6; 1320,8; 1195,9; 1155,2; 1016,2; 865,1; **<sup>1</sup>HNMR** (δ, ppm): 12,79 (s, 1H, -OH), 7,92 (d, 1H, J=8, ArH: 6), 7,71 (d, 1H, J=8, ArH: 4), 7,54 (d, 1H, J=16, a), 7,26 (s, 1H, ArH: 3), 7,05 (d, 1H, J=8, ArH: 6), 6,98-6,93 (m, 4H,ArH:3, 3, 5', 5), 2,50(s, 3H, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>CNMR (δ, ppm): 193,60; 163,66; 141,85; 136,42; 129,90; 129,62; 128,64; 128,55; 120,93; 120,00; 118,87; 118,96; 117,94; 117,63; 113,78; 113,56; 19,96; **ESI-MS**: [M+H]<sup>+</sup> m/z 254,900.

## 4.2. Rezultati eksperimentalnog određivanja lipofilnosti

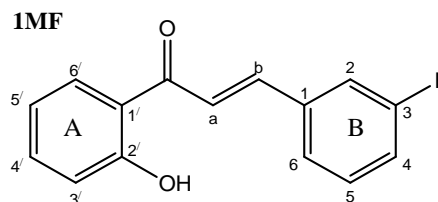
Lipofilnost je određena za 18 priopiofenonskih derivata koji su prema strukturnoj sličnosti podeljeni u dve grupe: halkonsku i propafenonsku. U okviru halkonske grupe određena je lipofilnost šest ranije sintetisanih i šest novosintetisanih halkona. U okviru propafenonske grupe određena je lipofilnost šest ranije sintetisanih derivata propafenona i sam propafenon kao *lead* molekul.

### 4.2.1. Rezultati određivanja lipofilnosti halkona

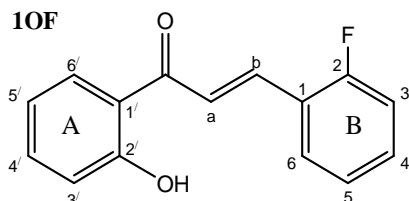
Lipofilnost halkona čije su strukturne formule prikazane na Slici 23 određivana je primenom RP HPLC metode pri čemu stacionarnu fazu predstavlja C18 modifikovani silikagel.



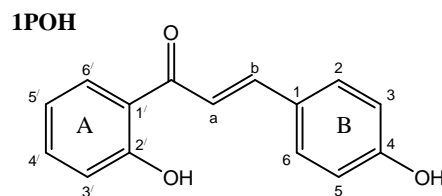
(*E*)-3-(4-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on



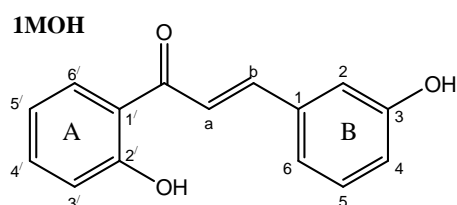
(*E*)-3-(3-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on



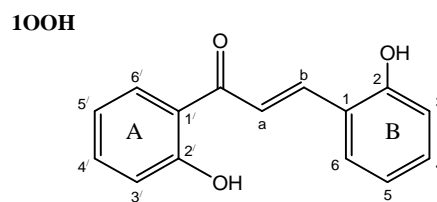
(*E*)-3-(2-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on



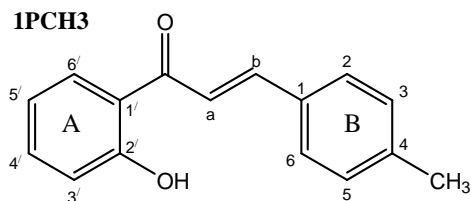
(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-hidroksifenil)-2-propen-1-on



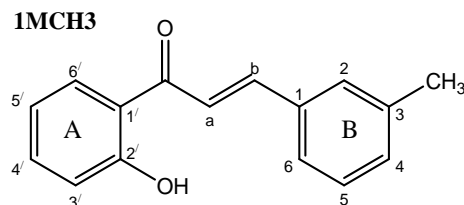
(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(3-hidroksifenil)-2-propen-1-on



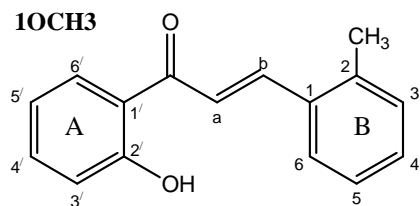
(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-hidroksifenil)-2-propen-1-on



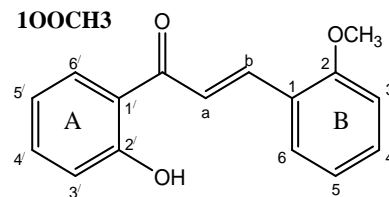
(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-*p*-tolil-2-propen-1-on



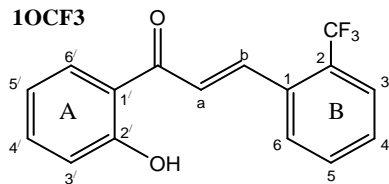
(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-*m*-tolil-2-propen-1-on



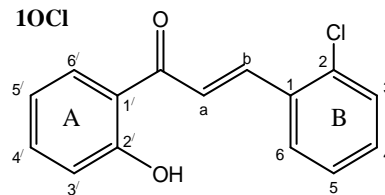
(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-*o*-tolil-2-propen-1-on



(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-metoksifenil)-2-propen-1-on



(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-trifluorometilfenil)-2-propen-1-on



(*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-hlorofenil)-2-propen-1-on

**Slika 23.** Strukturne formule ispitivanih halkona

Kod C-18 stacionarne faze na površini postoje nemodifikovane silanolne grupe koje interaguju sa molekulima organskih modifikatora iz mobilne faze (vodonične veze, dipol-dipol interakcije). Mogućnost uspostavljanja ovih interakcija zavisi od elektronskih svojstava i mogućnosti građenja vodoničnih veza upotrebljenog organskog modifikatora (203). U nizu organskih modifikatora koji se koriste u određivanju Log  $k_w$  pokazalo se da metanol ima najmanju elucionu moć na oktadecil-modifikovanom silikagelu, kao i najmanju moć sorpcije te je shodno tome i korišćen u radu. Da bi ispitali uticaj sastava mobilne faze na retenciju jedinjenja variran je zapreminski udeo metanola kao organskog modifikatora. Za svaki odnos metanol/voda (75:25; 70:30; 65:35; 60:40 i 55:45 (v/v)), HPLC sistem je prethodno kondicioniran u trajanju od 30 minuta, a zatim su injektovani pripremljeni metanolni rastvori ispitivanih halkona i standardnih jedinjenja. Za svako ispitivano jedinjenje zabeleženo je retenciono vreme ( $t_r$ ), i za svaki sastav mobilne faze retenciono vreme rastvarača,  $t_0$ .

**Tabela 4.** Retenciono vreme ispitivanih halkona

$\varphi$	0,75	0,70	0,65	0,60	0,555
$t_0$	0,791	0,812	0,829	0,823	0,842
	$t_R$				
1PF	5,511	7,797	13,125	23,810	45,623
1MF	6,107	8,780	14,986	27,333	51,243
1OF	6,626	9,797	16,975	31,287	59,437
1POH	6,643	10,498	19,755	40,286	84,043
1MOH	9,370	14,458	26,504	51,128	100,000
1OOH	2,817	3,861	6,099	10,336	18,300
1PCH3	8,575	13,317	24,089	45,408	87,089
1MCH3	2,575	3,448	5,286	8,650	14,683
1OCH3	9,443	14,881	27,330	52,630	103,092
1OOCH3	2,976	3,906	5,158	8,717	14,000
1OCF3	5,785	9,465	15,346	28,715	54,549
1OCl	8,137	14,192	23,452	45,259	94,713

Dobijeni rezultati (Tabela 4) pokazuju da retencija ispitivanih jedinjenja opada sa povećanjem udela organske komponente u mobilnoj fazi. Iz vrednosti  $t_r$  i  $t_0$  izračunate su vrednosti faktora kapaciteta  $k$ , kao i logaritamske vrednosti  $\text{Log } k$ , prema jednačinama:

$$k = (t_r - t_0) / t_0,$$

$$\text{Log } k = \log (t_r - t_0) / t_0$$

gde je  $t_r$  retenciono vreme ispitivane supstance, a  $t_0$  retenciono vreme rastvarača.

Primenom linearne regresije ispitana je zavisnost dobijenih  $\text{Log } k$  vrednosti od udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi ( $\varphi$ ).

$$\text{Log } k = \text{Log } k_w + b\varphi$$

gde je  $\text{Log } k_w$  odsečak prave,  $b$  nagib prave, a  $\varphi$  udeo organske komponente u mobilnoj fazi.

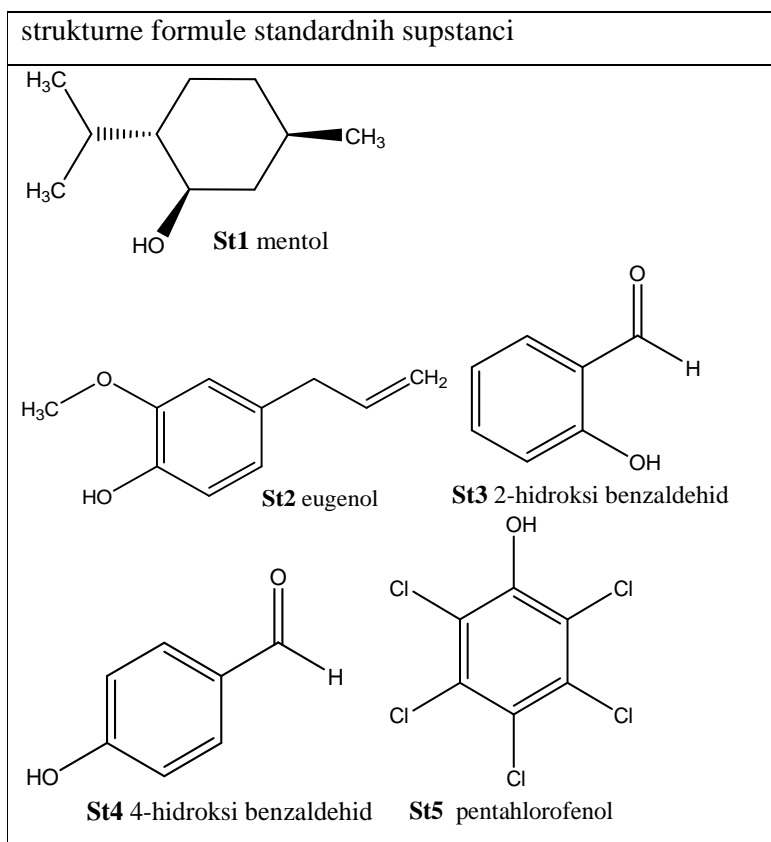
Parametar lipofilnosti  $\text{Log } k_w$  određen je ekstrapolacijom dobijenih zavisnosti na 0% zapreminskog udela metanola tj. dobijena je vrednost faktora kapaciteta za hromatografski sistem u kome bi mobilnu fazu predstavljala voda. U tabeli 5 prikazane su  $\text{Log } k_w$  vrednosti ispitivanih halkona.

**Tabela 5.** Vrednosti  $\text{Log } k_w$  ispitivanih halkona

<b>Jedinjenje</b>	<b>Log <math>k_w</math></b>	<b>Jedinjenje</b>	<b>Log <math>k_w</math></b>
1PF	4,365	1PCH3	4,849
1MF	4,427	1MCH3	3,628
1OF	4,455	1OCH3	4,999
1POH	5,127	1OOCH3	3,281
1MOH	4,963	1OCF3	4,565
1OOH	3,849	1OCl	4,976

$\text{Log } k_w$  vrednosti dobijene ekstrapolacijom ne zavise od prirode organske komponente, pošto one predstavljaju retenciju u čistoj vodi. Takođe, pored nespecifičnih interakcija ispitivanih supstanci sa funkcionalnim grupama na površini upotrebljene stacionarne faze, na retenciju u značajnoj meri utiču jake specifične interakcije između ispitivanih jedinjenja i komponenata mobilne faze (npr. mogućnost građenja vodoničnih veza povećava rastvorljivost jedinjenja u mobilnoj fazi i uslovljava slabiju retenciju). Različiti stepen interakcija ispitivanih jedinjenja sa stacionarnom, odnosno mobilnom fazom pri upotrebi različitih organskih rastvarača utiče na razlike u  $\text{Log } k$  vrednostima, a time i na  $\text{Log } k_w$  vrednosti. Da bi se odredile  $\text{Log } P$  vrednosti ispitivanih halkona, pod istim hromatografskim uslovima određene su  $\text{Log } k_w$  vrednosti pet standardnih supstanci koje su hemijski slične halkonima (Tabela 6). Vrednosti  $\text{Log } P$  odabranih standardnih jedinjenja su preuzete iz literature.

**Tabela 6.** Struktura standardnih jedinjenja hemijski sličnih halkanima



Log P odabranih standardnih jedinjenja je:

**St1** (2-izopropil-5-metilcikloheksanol; mentol); Log P = 3,31

**St2** (2-metoksi-4-alilfenol; eugenol); Log P = 2,99

**St3** (2-hidroksi benzaldehid; salicilaldehid); Log P = 2,07

**St4** (4-hidroksibenzaldehid); Log P = 0,94

**St5** (2,3,4,5,6 pentahlorofenol); Log P = 5,01 (203).

Eksperimentalno određene vrednosti retencije i Log  $k_w$  standardnih jedinjenja su prikazane u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Retenciono vreme i Log  $k_w$  standardnih jedinjenja

$\phi$	0,75	0,70	0,65	0,60	0,55
$t_0$	0,791	0,812	0,829	0,832	0,824
	$t_r$				
St1	2,459	3,360	4,884	7,413	11,812
St2	1,627	1,970	2,535	3,418	4,734
St3	1,803	2,046	2,493	2,898	3,586
St4	1,044	1,071	1,122	1,189	1,283
St5	3,720	5,086	7,392	11,220	17,879
	Log $k_w$				
	St1	St2	St3	St4	NT
	3,311	2,467	1,667	0,381	NT

NT-nije testirano

Određene Log  $k_w$  vrednosti za standardne supstance su korelisane sa vrednostima Log P. Linearnom regresijom konstruisana je standardna kriva:

$$\text{Log } P = 0,839 \text{ Log } k_w + 0,689; \quad r^2 = 0,9923, \quad \text{S.E.} = 0,154$$

Na osnovu dobijene linearne jednačine i određenih Log  $k_w$  vrednosti, izračunate su Log  $P_{\text{Exp}}$  vrednosti ispitivanih halkona (Tabela 8).

**Tabela 8.** Vrednosti Log P halkona dobijene eksperimentalnim putem i različitim računskim postupcima

jedinjenje	Log P <sub>Exp</sub>	CLog P	Log P <sub>Marvin</sub>	ALOGPs	ACLogP	AB/LOGP
1PF	4,30	4,10	4,43	3,94	3,27	3,76
1MF	4,35	4,10	4,43	3,95	3,27	3,76
1OF	4,47	4,10	4,43	4,02	3,27	3,76
1POH	3,44	3,29	4,01	3,23	2,91	3,09
1MOH	3,54	3,29	4,01	3,23	2,91	3,09
1OOH	3,62	3,29	4,01	3,23	2,91	3,09
1PCH3	4,85	4,46	4,76	4,00	3,52	4,12
1MCH3	4,88	4,46	4,76	3,98	3,52	4,12
1OCH3	4,75	4,46	4,76	4,00	3,52	4,12
1OOCH3	4,28	3,88	4,04	3,94	3,10	3,67
1OCF3	4,98	4,84	5,17	4,30	3,97	4,67
1OCI	4,89	4,67	4,81	4,24	3,82	4,28

jedinjenje	miLogP	ALOGP	MLOGP	KOWWIN	XLOGP2	XLOGP3
1PF	3,91	3,64	4,05	4,15	4,03	3,99
1MF	3,89	3,64	4,05	4,15	4,03	3,99
1OF	3,69	3,64	4,05	4,15	4,03	3,99
1POH	3,27	3,17	3,09	3,47	3,04	3,53
1MOH	3,25	3,17	3,09	3,47	3,04	3,53
1OOH	3,51	3,17	3,09	3,47	3,04	3,53
1PCH3	4,20	3,92	3,91	4,50	4,31	4,25
1MCH3	3,97	3,92	3,91	4,50	4,31	4,25
1OCH3	4,18	3,92	3,91	4,50	4,31	4,25
1OOCH3	3,58	3,42	3,34	4,04	3,79	3,86
1OCF3	4,42	4,38	4,54	4,92	4,80	4,77
1OCI	4,20	4,10	4,18	4,60	4,40	4,51



Eksperimentalno određene Log P vrednosti ispitivanih halkona nalaze se u opsegu od 3,44 (halkon **1POH**) do 4,98 (halkon **1OCF3**). Halkon **1OCF3** u *orto* položaju prstena B ima trifluorometil grupu koja je u nizu uvedenih alkil, oksialkil i halo grupa, najlipofilnija i najvoluminoznija grupa ( $\pi=0,847$  i  $V_v = 39,800 \text{ \AA}$ ) (203). Supstitucijom vodonikovih atoma metil grupe ( $V_v = 21,300 \text{ \AA}$ ) atomima fluora povećava se voluminoznost i sterna efekti, što utiče na geometriju molekula. Prisustvo hlora u *orto* položaju prstena B (halkon **1OCl**) ne menja geometriju molekule, ali utiče na lipofilnost i elektronsku gustinu. Doprinos hlora lipofilnosti halkona je manji u poređenju sa trifluorometil grupom, ali daleko veći u poređenju sa metil, metoksi i fluoro grupama (203), pa je halkon **1OCl** lipofilniji od svih ostalih halkona (osim **1OCF3**). Doprinos metil grupe lipofilnosti halkona (halkoni **1OCH3**, **1MCH3** i **1PCH3**) zavisi od njenog položaja u prstenu B i najviše je izražena kada je metil grupa u *meta* položaju prstena B (203). Supstitucija vodonika fluorom koji ima  $+\pi$ ,  $+\sigma$  (halkoni **1OF**, **1MF** i **1PF**) povećava lipofilnost (203). S obzirom na elektronegativnost F, moglo bi se očekivati da je C-F fragment molekula slične polarizabilnosti kao C-O ili C-N fragmenti i da je dobar akceptor vodonika (što utiče na građenje intra- ili inter molekulskih vodoničnih veza) ali, za razliku od C-heteroatom fragmenata, C-F fragment je loš akceptor vodonika, pa je njegov doprinos lipofilnosti halkona veći u poređenju sa metoksi grupom (halkon **1OOCH3**) (203).

Halkoni sa dve fenolne grupe u strukturi (halkoni **1OOH**, **1MOH** i **1POH**) imaju niže Log P vrednosti jer prisustvo fenolne grupe nepovoljno utiče na lipofilnost halkona. Lipofilnost halkona se smanjuje u zavisnosti od položaja fenolne grupe u prstenu B. Najmanje lipofilan je halkon **1POH** sa fenolnom grupom u *para* položaju prstena B. Prisustvo fenolne grupe u *para* položaju omogućava konjugaciju elektronskog para fenolne grupe sa fenopropenonskim sistemom, što povećava kiselost vodonikovog atoma *para* fenolne grupe koja lako gradi vodonične veze i doprinosi povećanju hidrofilitnosti halkona **1POH**. Fenolne grupe u *orto* i *meta* položajima ne stupaju u konjugaciju pa je time kiselost njihovih H atoma manja.

Brojna istraživanja su pokazala statistički značajnu vezu između retencionih parametara ( $\text{Log } k_w$ ) serije srodnih supstanci dobijenih primenom reverzno-fazne hromatografije i

kompjuterski izračunatih Log P vrednosti (203). Da bi se ustanovilo da li definisani hromatografski sistem može da se upotrebi za dobijanje parametara koji opisuju lipofilnost, Log P vrednosti dobijene eksperimentalnim putem su upoređene sa izračunatim Log P vrednostima, dobijenim primenom različitih teorijskih algoritama (zasnovanih na različitim metodama fragmentacije) koji su inkorporirani u komercijalne softvere (CLog P, Log P<sub>Marvin</sub>, ALOGPs, ALogP, AB/LogP, miLogP, ALogP, MLOGP, KOWWIN, XLOGP2 and XLOGP3) (203) (Tabela 9).

U Tabeli 9 date su jednačine koje opisuju zavisnost između eksperimentalno određenih i izračunatih Log P vrednosti i odgovarajući statistički parametri.

**Tabela 9.** Jednačine korelacije između eksperimentalne i teorijskih vrednosti za Log P ispitivanih halkona

$\text{Log P}_{\text{exp}} = a \text{Log P}_{\text{theoretical}} + b$						
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
CLogP	1,0060	0,2598	0,9845	0,9693	316,0742	0,2903
LogP <sub>Marvin</sub>	1,3040	-1,5005	0,9151	0,8374	50,7576	0,0992
ALOGPs	1,3728	-0,9069	0,9463	0,8954	85,6300	0,1440
ALogP	1,4658	-0,5222	0,9217	0,8495	56,4512	0,4427
AB/LogP	1,0649	0,3222	0,9689	0,9387	153,1044	0,3508
miLogP	1,3555	-0,8417	0,9298	0,8646	63,8428	0,2273
ALogP	1,3460	-0,5830	0,9471	0,8970	87,0991	0,2994
MLOGP	0,9984	0,6011	0,8755	0,7665	32,8181	0,3850
KOWWIN	1,1327	-0,3495	0,9807	0,9617	251,3155	0,2697
XLOGP2	0,9234	0,7358	0,9786	0,9576	225,9491	0,0129
XLOGP3	1,3322	-1,0161	0,9414	0,8863	77,9513	0,1278

Rezultati u Tabeli 9 ukazuju da Log P vrednosti izračunate upotrebom različitih algoritama u različitom stepenu korelišu sa eksperimentalno dobijenim vrednostima.

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je najbolja korelacija (r=koeficijent korelacije) postignuta sa ClogP vrednostima izračunatim pomoću programa ChemOffice (r= 0,9845), dok je najmanja korelacija postignuta sa vrednostima Log P dobijenim korišćenjem programa ChemAxon (r= 0,9151), što ukazuje da algoritam inkorporiran u

program ChemOffice može da se primeni za izračunavanje Log P vrednosti 2'-hidroksi halkona čiji je prsten B mono *orto*, *meta* ili *para* supstituisan.

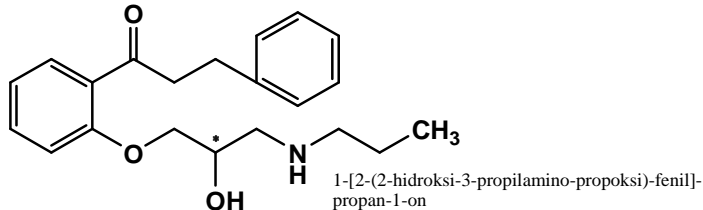
#### **4.2.2. Rezultati eksperimentalnog određivanja koeficijenata distribucije za propafenonske analoge**

Propafenonski analozi (Slika 24) su organske baze (sekundarni amini) koje su u vodenom rastvoru delimično jonizovane tj. za razliku od halkona oni se u fiziološkim uslovima (pH 7,4) pojavljuju u dva oblika: molekulskom i jonizovanom obliku.

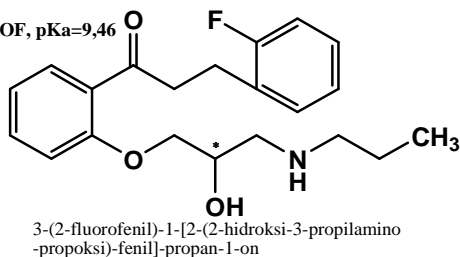
Jonizovani oblik je rastvorljiv u vodi, ne difunduje kroz dvoslojnu lipidnu membranu i preko jonske veze interaguje sa aminokiselinskim ostacima na receptorskom mestu. Molekulski, nejonizovan oblik je nerastvoran u vodi i odgovoran je za prolaz kroz membranu. U organizmu postoji ravnoteža jonizovanog oblika koji obezbeđuje rastvorljivost i vezivanje za receptorsko mesto i nejonizovanog koji je odgovoran za transport kroz biološke membrane.

U radu je opisno eksperimentalno određivanje distribucionog koeficijenta propafenona i 6 propafenonskih analoga. Ispitivani propafenonski analozi su prikazani na slici 24.

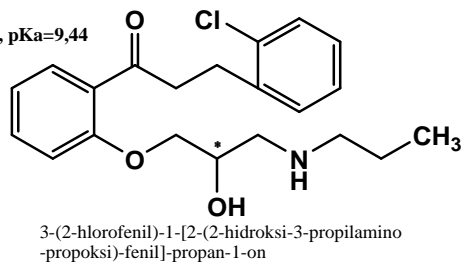
propafenon, pKa=9,47



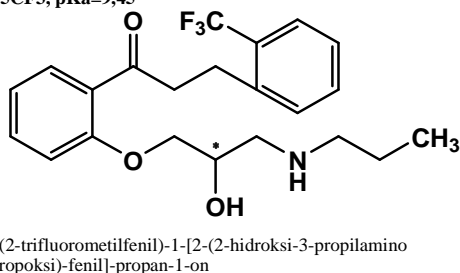
5OF, pKa=9,46



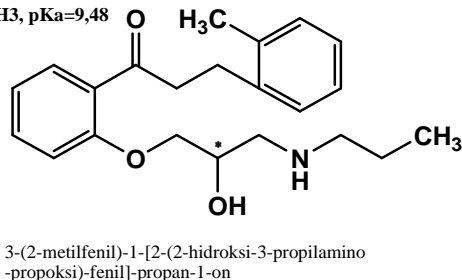
5OCl, pKa=9,44



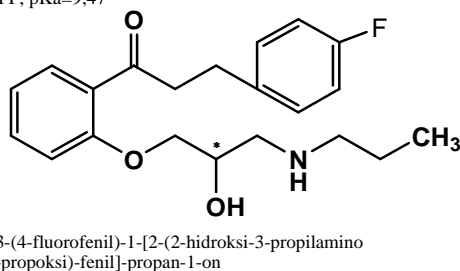
5CF3, pKa=9,45



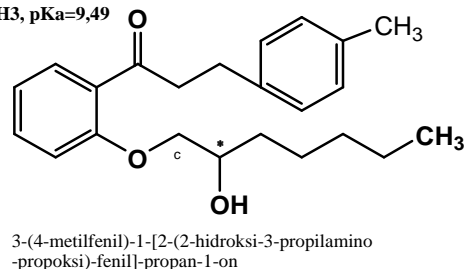
5OCH3, pKa=9,48



5PF, pKa=9,47



5PCH3, pKa=9,49



**Slika 24.** Strukturne formule ispitivanih propafenonskih analoga

Kako je reakcija disocijacije ravnotežan proces, zastupljenost određenog oblika propafenonskih analoga, a time i njihova raspodela (distribucioni koeficijent, D) između dva rastvarača zavisice od njihove pK<sub>a</sub> vrednosti i pH sredine.

$$D = \frac{[\text{nejonizovani oblik}]_{1\text{-oktanol}} + [\text{jonizovani oblik}]_{1\text{-oktanol}}}{[\text{nejonizovani oblik}]_{\text{voda}} + [\text{jonizovani oblik}]_{\text{voda}}}$$

Distribicioni koeficijenti su određeni primenom modifikovane metode mućkanja (*shake-flask*). Ispitivano jedinjenje se dodaje u balon, u kome se već nalaze određene zapremine dva rastvarača koji se ne mešaju: 1-oktanol i pufer pH = 7,4. Kao organski rastvarač korišćen je 1-oktanol koji ima osam hidrofobnih ugljenikovih atoma i jednu hidrofilnu primarnu alkoholnu grupu i dobro oponaša uslove koji vladaju u biološkim membranama (lipidni sloj membrane). Rezultati dobijeni sa ovim rastvaračem su najbliži onima koji se dobijaju u *in vivo* uslovima. Pufer pH = 7,4 odgovara uslovima koji vladaju u krvnoj plazmi.

Nakon izvođenja *shake-flask* metode određene su koncentracije propafenona i analoga RP HPLC metodom. Stacionarnu fazu u RP HPLC sistemu činio je silikagel modifikovan oktadecilsilil grupama, dok je kao mobilna faza korišćen dvokomponentni sistem: voda/ metanol i voda/acetoni-tril u zapreminskim odnosima 80/20 (v/v).

Dobijeni rezultati retencionih vremena i površina pikova za ispitivane rastvore prikazani su u tabelama 10 i 11.

**Tabela 10.** Retenciona vremena, površina pikova, D i Log D vrednosti za sistem metanol/voda 20/80 (v/v)

jedinjenje	retenciono vreme tr (min)	A1 (mAUS)	A2 (mAUS)	A1-A2 (mAUS)	D	Log D
propafenon	3,06	1073,9	67,70	1579,7	23,33	1,37
5PF	2,92	643,05	15,75	627,3	39,83	1,60
5OF	3,03	1478,85	38,50	1440,35	37,41	1,57
5CF3	3,42	1424,85	7,25	1417,6	195,53	2,29
5OCH3	3,56	1000,7	17,30	983,4	56,84	1,75
5PCH3	3,75	619,55	22,00	597,55	27,16	1,43
5OCl	3,61	1454,25	14,20	1440,05	101,41	2,01

A1-površina pika jedinjenja u polaznom puferovanom rastvoru

A2-površina pika jedinjenja zaostalog u vodenom sloju nakon mućkanja

A1-A2 -razlika proporcionalna površini pika jedinjenja zaostalog u 1-oktanolu

D-distribicioni koeficijent,  $D=(A1-A2)/A2$

**Tabela 11.** Retenciona vremena, površina pikova, D i Log D vrednosti za sistem acetonitril/voda 20/80 (v/v)

jedinjenje	retenciono vreme tr (min)	A1 (mAUS)	A2 (mAUS)	A1-A2 (mAUS)	D	Log D
propafenon	2,71	1400,6	56,7	1343,9	23,70	1,37
5PF	2,38	479,1	13,4	465,7	34,75	1,54
5OF	2,47	1192,2	37,9	1154,3	30,46	1,48
5CF3	2,67	1169,7	7,6	1162,1	152,91	2,18
5OCH3	2,78	867,5	11,4	856,1	75,10	1,88
5PCH3	2,86	561,8	8,3	553,5	66,69	1,82
5OCl	2,77	1169,7	11,4	1158,3	101,61	2,01

A1-površina pika jedinjenja u polaznom puferovanom rastvoru

A2-površina pika jedinjenja zaostalog u vodenom sloju nakon mućkanja

A1-A2 -razlika proporcionalna površini pika jedinjenja zaostalog u 1-oktanolu

D-distribicioni koeficijent,  $D=(A1-A2)/A2$

Odabrani organski modifikatori pripadaju različitim grupama Snyder-ovog trougla i odlikuju se različitim osobinama. Acetonitril je aprotični rastvarač koji ne ostvaruje vodonične veze, ima slabu solvatacionu, ali veću eluacionu moć ( $S = 3,1$ ) od metanola koji je protični rastvarač, gradi vodonične veze i dipol interakcije, ali mu je eluaciona moć slabija od acetonitrila ( $S = 3,0$ ) (eluacione moći odnose se na RP-C18 stacionarnu fazu). Navedene razlike organskih modifikatora uticale su na razlike u dobijenim vrednostima retencionih parametara ispitivanih jedinjenja, a time i na rezultate u određivanju vrednosti distribucionog koeficijenta D (Tabela 12).

**Tabela 12.** Vrednosti Log D propafenonskih analoga dobijene primenom programa MarvinSkech.

jedinjenje	Log D <sub>Exp1</sub>	Log D <sub>Exp2</sub>	Log D <sub>Marvin</sub>
propafenon	1,37	1,37	0,88
5PF	1,60	1,54	1,02
5OF	1,57	1,48	1,02
5CF3	2,29	2,18	1,77
5OCH3	1,75	1,88	1,35
5PCH3	1,43	1,82	1,35
5OCl	2,01	2,01	1,40

Korišćenjem programskog paketa *Marvin Sketch* (modifikovna metoda Viswanadhana i saradnika) (204) izačunate su Log D vrednosti za ispitivana jedinjenja (Tabela 12) i korelisane sa eksperimentalno određenim vrednostima za oba hromatografska sistema (Tabela 10 i 11). Razlika u vrednostima koeficijenta korelacije (Tabela 13) za sistem MeOH/voda ( $r=0,8493$ ) i ACN/voda ( $r=0,9781$ ) se može pripisati različitim osobinama organskih modifikatora koje uslovljavaju različite interakcije do kojih dolazi tokom hromatografskog procesa između rastvarača i ispitivanih jedinjenja, kao i između organske komponente mobilne faze i stacionarne faze.

**Tabela 13.** Jednačine korelacije između eksperimentalnih i teorijskih vrednosti za Log D ispitivanih propafenonskih derivata.

<b>Log D<sub>exp</sub> = a Log D<sub>Marvin</sub> + b</b>						
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>F</b>	<b>p-value</b>
Log D <sub>Exp</sub> <sup>1</sup>	0,7739	-0,0732	0,7046	0,8394	11,9235	0,8589
Log D <sub>Exp</sub> <sup>2</sup>	0,9673	-0,4468	0,9392	0,9791	77,2111	0,0718

Bez obzira na razlike u vrednostima korelacionih koeficijenata može se zaključiti da se modifikovana metoda Viswanadhana, koja je algoritam inkorporiran u program *Marvin Sketch* može primeniti za izračunavanje Log D vrednosti propafenona i njegovih analoga.

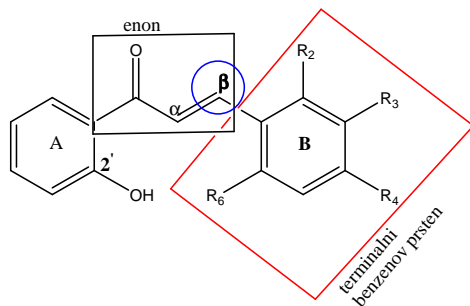
### **4.3. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata**

#### **4.3.1. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti derivata halkona**

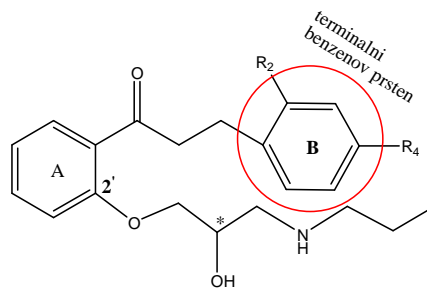
Antimikrobna aktivnost propiofenonskih derivata ispitana je bujon-mikrodilucionom metodom na osam standardnih laboratorijskih sojeva mikroorganizama: 6 sojeva Gram-pozitivnih bakterija (*Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)) i dva soja Gram-negativnih bakterija (*Klebsiella pneumoniae* (NCIMB 9111), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)). Radi jednostavnijeg upoređivanja antimikrobne aktivnosti, ispitivana jedinjenja su podeljena u dve grupe: propafenonsku i halkonsku (Slika 25).



OPŠTA FORMULA HALKONSKE GRUPE JEDINJENJA



OPŠTA FORMULA PROPAFENONSKE GRUPE JEDINJENJA



Slika 25. Opšte formule dve grupe ispitivanih jedinjenja

#### 4.3.1.1. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti derivata halkona prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama

Rezultati antibakterijske aktivnosti halkona prikazani su u tabeli 14 kao MIK vrednosti izražene u mM.

**Tabela 14.** Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ispitivanih halkona na standardnim sojevima Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija

MIK (mM)												
Halkoni/ sojevi bakterija	1PF	1MF	1OF	1POH	1MOH	1OOH	1PCH3	1MCH3	1OCH3	1OOCH3	1OCF3	1OCI
Gram pozitivne bakterije												
<i>S. aureus</i>	0,515	0,515	0,515	0,052	0,052	0,052	1,050	1,050	1,050	0,983	0,428	0,483
<i>S. epidermidis</i>	0,258	0,515	0,258	0,052	0,052	0,052	1,050	1,050	1,050	0,983	0,428	0,483
<i>B. subtilis</i>	0,515	0,515	0,515	0,052	0,052	0,052	1,050	1,050	1,050	0,983	0,855	0,483
<i>M. luteus</i>	0,515	0,515	0,515	0,104	0,104	0,104	1,050	1,050	1,050	0,983	0,855	0,966
<i>M. flavus</i>	0,515	0,515	0,515	0,104	0,104	0,104	1,050	1,050	1,050	0,983	0,855	0,483
<i>E. faecalis</i>	1,030	1,030	1,030	0,104	0,104	0,104	2,100	2,100	2,100	1,966	0,855	0,966
Gram negativne bakterije												
<i>K. pneumoniae</i>	1,030	1,030	1,030	0,104	0,104	0,104	1,050	1,050	1,050	0,983	0,855	0,966
<i>P. aeruginosa</i>	1,030	1,030	1,030	0,104	0,104	0,104	1,050	1,050	1,050	0,983	0,855	0,966

Rezultati u Tabeli 14 pokazuju da halkoni pokazuju antimikrobnu aktivnost prema standardnim bakterijskim sojevima. Aktivnost u okviru ove grupe jedinjenja kreće se u opsegu od 0,052 mM (halkoni iz grupe difenola **1POH, 1MOH i 1OOH**) do 2,1 mM (halkoni iz grupe metil halkona **1OCH3, 1MCH3 i 1PCH3**).

Veću osetljivost pokazali su sojevi Gram pozitivnih bakterija, dok su Gram negativne bakterije manje osetljive. Dobijeni rezultati mogu se tumačiti razlikama u građi ćelijskog zida Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Građa ćelijskog zida Gram pozitivnih bakterija je relativno jednostavna i čini ga polisaharid peptidoglikan i teihoična kiselina (polimer od oko 30 ostataka glicerol-3-fosfata) koji su međusobno povezani u mrežastu strukturu. Gram negativne bakterije imaju lipopolisaharide, lipoproteine i fosfolipide koji čine spoljašnju ćelijsku membranu i koja zajedno sa peptidoglikanom gradi ćelijski zid. Lipopolisaharidi povećavaju negativno naelektrisanje spoljašnje membrane i čine je nepropustljivom za difuziju hidrofobnih molekula. Peptidoglikanski sloj je tanji u poređenju sa peptidoglikanskim slojem Gram pozitivnih bakterija, ali dovoljno debeo da doprinosi jačini ćelijskog zida Gram negativnih bakterija.

Aktivnost ispitivanih halkona je manja u poređenju sa derivatima propafenona, što se može objasniti njihovim nespecifičnim delovanjem. Ako se izdvoje najaktivniji difenolni halkoni (1POH, 1MOH i 1OOH), red aktivnosti uglavnom prati redosled elektronegativnosti supstituenata uvedenih u terminalni benzenov prsten (Slika 25):

*S. aureus*: 1POH=1MOH=1OOH >1OCF3> 1OCl > 1PF=1MF=1OF > 1OOCH3 >1PCH3 =1MCH3 =1OCH3

*S. epidermidis*: 1POH=1MOH=1OOH > 1PF=3OF > 1OCF3 > 1OCl > 1MF > 1OOCH3 >1PCH3 =1MCH3 =1OCH3

*B. subtilis*: 1POH=1MOH=1OOH > 1OCl >1PF=2MF=3OF > 1OCF3 > 1OOCH3 >1PCH3 =1MCH3 =1OCH3

*M. luteus*: 1POH=1MOH=1OOH > 1PF=1MF=1OF > 1OCF3 > 1OCl > 1OOCH3 > 1PCH3 =1MCH3 =1OCH3

*M. flavus*: 1POH=1MOH=1OOH > 1OCl > 1PF=2MF=3OF > 1OCF<sub>3</sub> > 1OOCH<sub>3</sub> > 1PCH<sub>3</sub> =1MCH<sub>3</sub> =1OCH<sub>3</sub>

*E. faecalis*: 1POH=1MOH=1OOH > 1OCF<sub>3</sub> > 1OCl > 1PF=2MF=3OF > 1OOCH<sub>3</sub> > 1PCH<sub>3</sub> =1MCH<sub>3</sub> =1OCH<sub>3</sub>

*K. pneumoniae*: 1POH=1MOH=1OOH > 1OCF<sub>3</sub> > 1OCl > 1OOCH<sub>3</sub> > 1PF=2MF=3OF > 1PCH<sub>3</sub> =1MCH<sub>3</sub> =1OCH<sub>3</sub>

*P. aeruginosa*: 1POH=1MOH=1OOH > 1OCF<sub>3</sub> > 1OCl > 1OOCH<sub>3</sub> > 1PF=2MF=3OF > 1PCH<sub>3</sub> =1MCH<sub>3</sub> =1OCH<sub>3</sub>

Iako najhidrofilnija, difenolna jedinjenja iz halkonske grupe izdvajaju se kao najaktivnija (1POH,1MOH i 1OOH). Veću osetljivost na difenole pokazala su tri soja Gram pozitivnih bakterija: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*. Antimikrobna aktivnost monofluoridnih halkona (MIK od 0,258 do 1,030 mM) je manja u poređenju sa difenolnim jedinjenjima. Aktivnost *orto*-trifluorometil halkona (1OCF<sub>3</sub>) i *orto*-hlorovanog (1OCl) je slabija od fluoriranih halkona što se može objasniti razlikama u sternim efektima ovih grupa u poređenju sa fluoro grupom. Umerenu antimikrobnu aktivnost pokazuje i halkon sa metoksi grupom u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena B (MIK<sub>1OOCH<sub>3</sub></sub> od 0,983 do 1,966 mM ). Slabu antimikrobnu aktivnost pokazali su halkoni čiji su terminalni benzenovi prstenovi supstituisani metil grupom u *orto*, *meta* ili *para* položajima (MIK od 1,05 do 2,10 mM). Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti halkona su u skladu sa rezultatima do sada izvedenih studija na identičnim bakterijskim ATCC sojevima. Antimikrobna aktivnost difenolnih i fluoriranih derivata prema ispitivanim ATCC sojevima je bolja od literaturno navedenih podataka (205).

#### **4.3.1.2. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti halkona prema MRSA sojevima**

Meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA) je jedna od najčešćih bakterija koja izaziva brojne bolničke (*hospital acquired*, HA-MRSA) ali i vanbolničke infekcije (*community acquired*, CA-MRSA). Terapija infekcija izazvanih MRSA sojevima predstavlja značajan problem u svakodnevnoj kliničkoj praksi. MRSA obično dovodi do infekcija kože, infekcija respiratornog i urogenitalnog trakta, ali i do osteomijelitisa, endokarditisa i septicemije (206).

Ranije ispitivanje aktivnosti halkona na ekspresiju gena MRSA sojeva je pokazalo da halkoni dovode do promena u ekspresiji gena povezanih sa biosintezom ćelijskog zida i posledično do lize ćelija (207, 208).

MRSA sojevi pokazuju rezistenciju na  $\beta$ -laktamske antibiotike, naročito na meticilin i oksacilin. U novije vreme uočena je pojava rezistencije i na druge antibiotike, poput vankomicina, koji se uobičajeno koriste u terapiji stafilokoknih infekcija (206).

U izvedenoj studiji ispitivanja antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata prema MRSA sojevima uključeno je ukupno 7 izolovanih MRSA sojeva. Kao kontrola korišćen je standardni soj MRSA ATCC 43300.

Za sve ispitivane izolate MRSA sojeva izvršena je fenotipska identifikacija. Klinički izolati MRSA su identifikovani PCR metodom detekcijom *nuc* gena (gen za termonukleazu), koji je specifičan za vrstu *S. aureus* i *mecA* gena, koji je specifičan za MRSA. Svi sojevi, korišćeni u ispitivanju antimikrobne aktivnosti, su bili pozitivni na *nuc* i *mecA* gen. Smatra se da MRSA sojevi SCC*mec* I, II, i III tipa predstavljaju bolničke sojeve (HA-MRSA), a da SCC*mec* IV i V tipovi predstavljaju vanbolničke sojeve (CA-MRSA) (209, 210, 211). Bolnički i vanbolnički sojevi se, osim po genskoj strukturi, međusobno razlikuju i po osetljivosti na antibiotike i hemioterapeutike, kao i po bolestima koje izazivaju. Bolnički sojevi su epidemiološki definisani kao MRSA sojevi izolovani kod hospitalizovanih bolesnika (poreklo izolovanih bolničkih i vanbolničkih MRSA sojeva prikazano je u Tabeli 1). Osetljivost ispitivanih MRSA sojeva na komercijalno dostupne antibiotike prikazana je u Tabeli 15. MRSA sojevi su označeni brojevima: 3, 5, 6, 8, 10, 12 i 13.

**Tabela 15.** Osetljivost ispitivanih MRSA sojeva na komercijalno dostupne antibiotike

<b>Oznaka soja/antibiotic</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>Amikacin</b>	R	R	S	S	R	R	R
<b>Gentamicin</b>	R	R	R	S	R	R	R
<b>Kanamycin</b>	R	R	R	R	R	R	R
<b>Tobramicin</b>	R	R	R	S	R	R	R
<b>Netilmicin</b>	S	I	S	S	S	S	S
<b>Streptomycin</b>	R	R	S	R	R	R	R
<b>Trimetoprim-Sulfametoksazol</b>	S	S	S	S	S	R	S
<b>Teikoplanin</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>Vankomicin</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>Linkomicin</b>	R	S	S	S	R	R	S
<b>Klindamicin</b>	R	S	S	S	R	R	S
<b>Eritromicin</b>	R	R	R	S	R	R	R
<b>Klaritromicin</b>	R	R	R	S	R	R	R
<b>Azitromicin</b>	R	R	R	S	R	R	R
<b>Spiramicin</b>	R	S	S	S	R	R	S
<b>Pristinamicin</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>Kvinupristin-dalfopristin</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>Fusidinska kiselina</b>	S	R	S	I	S	S	R
<b>Linezolid</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>Nitrofurantoin</b>	S	S	S	S	S	S	S
<b>Ciprofloksacin</b>	R	R	S	S	R	R	R
<b>Rifampin</b>	S	R	S	S	S	S	R
<b>Tetraciklin</b>	S	R	S	R	R	S	R
<b>Doksiciklin</b>	S	R	S	S	R	S	S
<b>Minociklin</b>	S	I	S	S	S	S	R
<b>Hloramfenikol</b>	R	R	S	S	S	S	R
<b>produkcija Beta-laktamaza</b>	+	+	+	+	0	0	+

S- osetljiv – verovatnoća uspeha terapije je visoka nakon primene uobičajenih doza antibiotika, datih na uobičajeni način;

R- rezistentan - nikada se ne primenjuje u terapiji; bez obzira na dozu, terapija je neuspešna.

I- intermedijarno (umereno) osetljiv –mogući uspeh terapije ako se antibiotik daje u maksimalnim koncentracijama i pareneteralnim putem.

**Tabela 16.** Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti halkona i određenih antibiotika na rast MRSA sojeva

<b>MRSA broj soja</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>ATCC 43300</b>
<i>halkonska grupa MIK (µg/ml)</i>								
<b>1PF</b>	62,5	31,2	62,5	>500	31,2	>500	31,2	31,2
<b>1PCH3</b>	31,2	31,2	62,5	>500	250	>500	250	250
<b>1PCF3</b>	250	250	500	500	500	500	500	500
<b>1CF3</b>	7,8	3,9	7,8	7,8	7,8	15,6	3,9	3,9
<b>1OCL</b>	3,9	3,9	3,9	7,8	15,6	7,8	3,9	3,9
<b>1OF</b>	7,8	7,8	15,6	62,5	15,6	125	15,6	15,6
<b>1OCH3</b>	31,2	15,6	31,2	500	31,2	500	250	250
<b>4F2CH3</b>	500	250	500	>500	500	>500	500	500
<b>2,6OCH3</b>	15,6	7,8	7,8	31,2	15,6	125	15,6	15,6
<b>1,2OCH3</b>	3,9	7,8	15,6	15,6	62,5	31,2	7,8	7,8
antibiotici								
<b>ciprofloksacin</b>		1,00	0,50	0,25	16,00	16,00	0,25	NT
<b>ceftriakson</b>		32,00	32,00	64,00	32,00	64,00	32,00	NT
<b>gentamicin</b>		2,00	2,00	0,50	256,00	64,00	4,00	NT

NT-nije testirano

Efekat ispitivanih halkona na MRSA sojeve je slabiji u odnosu na propafenonske derivate. MIK vrednosti za halkone kreću se u opsegu od 13 do 1951  $\mu\text{M}$  tj. 3,9 do 500  $\mu\text{g/ml}$ . Halkoni 1PF, 1PCH3 i 4F2CH3 imali su MIK  $>500,0 \mu\text{g/ml}$ . Bolju aktivnost su pokazali *orto* mono i *orto* disupstituisani 2'-hidroksi halkoni u poređenju sa *para* mono i *orto*-, *para*- disupstituisanim halkonima. Najbolju aktivnost unutar halkonske grupe pokazala su jedinjenje sa hlora i trifluorometil grupama u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena, 1OCl i 1OCF3 (MIK od 13 do 60  $\mu\text{M}$  tj. od 3,9 do 125  $\mu\text{g/mL}$ ). Aktivnost *orto* fluoriranog halkona je nešto manja (MIK od 32 do 262  $\mu\text{M}$  tj. od 7,8 do 125  $\mu\text{g/mL}$ ). Uvođenje metoksi ili metil grupa u *orto* položaj terminalnog benzenovog prstena dodatno smanjuje aktivnost. Kako se kod supstituenata u *orto* položaju elektronski efekti ne mogu odvojeno posmatrati od sternih može se zaključiti da je inhibitorni efekat *orto* mono i *orto* disupstituisanih halkona u korelaciji sa promenom sterno/elektronskih efekata koji su definisani **Swain-Lupton konstantom F** (212). Vrednosti F konstante prikazane su u Tabeli 17.

**Tabela 17. Vrednosti Swain-Lupton konstante za odgovarajuće supstituent**

supstituent	F
-F	0,45
-CF3	0,38
-Cl	0,47
-OCH3	0,29
-CH3	0,01

Očigledno da kombinovani uticaj sterno/elektronskih efekta grupa u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena doprinosi razlikama u aktivnosti 2'-hidroksi halkona. *Para* supstituisani derivati (1PF i 1PCH3 i 1PCF3) su pokazali slabiju aktivnost od *orto* supstituisanih (MIK od 31,2 do preko 500  $\mu\text{g/ml}$ ), dok je *orto*, *para* disupstituisani 2'-hidroksi halkon 4F2CH3 pokazao najslabiji inhibitorni efekat (MIK  $> 500 \mu\text{g/mL}$ ).

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 16 može se zaključiti da najveću osetljivost pokazuju dva bolnička soja 3 i 5 (MIK3 od 1 do 500  $\mu\text{g/mL}$ , MIK5 od 1 do 250  $\mu\text{g/mL}$ ) dok je najmanje osetljiv vanbolnički soj 8.



#### **4.3.1.3. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti novosintetisanih halkona na rast kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je važan oportunistički patogen i vodeći uzročnik bolničkih infekcija (213, 214) kod imunokompromitovanih osoba (osobe sa opekotinama (215, 216), na hemioterapiji (217), kod kojih je izvršena transplantacija organa (218) i bolesnika sa cističnom fibrozom). U bolničkoj sredini se povremeno mogu javiti višestruko rezistentni sojevi kao uzročnici pneumonija (219). Velika otpornost ove Gram negativne bakterije pripisuje se veoma slaboj propustljivosti spoljašnje membrane (čak 12-100 puta manje propustljiva od membrane *E. coli*) (220). U terapiji se najčešće primenjuju karbenicilin, ureidopenicilini, cefalosporini treće generacije, imipenem.

U sprovedenoj studiji ispitivanja antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata prema kliničkim izolatima *P. aeruginosa* bilo je uključeno ukupno 11 sojeva. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u skladu sa literaturnim podacima (14, 221, 222 ).

Dobijeni rezultati antimikrobne aktivnosti prikazani su u Tabeli 18.

**Tabela 18.** Rezultati antimikrobne aktivnosti novosintetisanih halkona prema kliničkim izolatima *P. aeruginosa*

<i>P. aeruginosa</i> broj soja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
jedinjenje	MIK (µg/ml)										
1OF	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
1PF	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
1CF3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
1PCH3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
1OCL	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
1OCH3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Rezultati ukazuju da je aktivnost jedinjenja halkonske grupe slaba, dobijene MIK vrednosti prelaze 1000 µg/ml (od 3,42 mM za 1CF3 do 4,44 mM za fluorirane halkone).

#### 4.3.1.4. Analiza antimikrobne aktivnosti halkona

Iako mehanizam antibakterijskog dejstva halkona nije u potpunosti razjašnjen pretpostavlja se da halkoni izazivaju oštećenje integriteta ćelijske membrane mikroorganizama i da različita osetljivost pojedinih sojeva mikroorganizama na citotoksično dejstvo halkona potiče od razlike u mehanizmu destrukcije ćelijske membrane (223). Dosadašnje *QSAR* studije su pokazale da halkoni svoju antimikrobnu aktivnost ispoljavaju zahvaljujući prisustvu hidroksilnih grupa (mada nije utvrđeno kako njihov broj i položaj utiče na aktivnost) (29) i  $\alpha,\beta$ - nezasićenog karbonilnog niza u molekulu koji reaguje sa sulfhidrilnim grupama enzima i drugih proteina (30). Halkoni, takođe, ispoljavaju svoje dejstvo vezivanjem za DNK mikroorganizama, ali je pokazano da DNK ne predstavlja glavni ciljani molekul njihovog intracelularnog dejstva (223).

Da bi se odredio deo strukture odgovoran za dejstvo i uspostavila korelacija između strukture i antibakterijske aktivnosti ispitivanih halkona izvedena je *QSAR* analiza.

U cilju dobijanja pouzdanih i validnih *QSAR* modela MIK vrednosti su prevedene u negativne logaritamske vrednosti ( $\log(1/\text{MIK})$ ) koje su dalje korišćene u *QSAR* analizi. Primenom ANOVA testa potvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika (verovatnoća  $p=0,651$ ; veća od 0,05) u osetljivosti ispitivanih bakterijskih sojeva na halkone. Iako je ANOVA test pokazao da ne postoji značajna razlika u osetljivosti sojeva, urađena je statistička analiza i za Gram pozitivne i za Gram negativne bakterije.

U cilju definisanja *QSAR* modela izdvojene su dve grupe po 5 deskriptora:

- a) Deskriptori koji opisuju vodonik donorske osobine funkcionalnih grupa u jedinjenju;
- b) Deskriptori koji definišu kiselost fenolske grupe.

#### **a) Deskriptori koji opisuju vodonik donorske osobine funkcionalnih grupa u jedinjenju**

Deskriptori koji opisuju vodonik donorske osobine funkcionalnih grupa u jedinjenju su značajni jer funkcionalne grupe sa ovim osobinama učestvuju u građenju vodonične veze i povećavaju kiselost 2'-fenolske grupe koja u velikoj meri doprinosi aktivnosti. Neki od odabranih deskriptora su elektrotopološki deskriptori (*Electrotopological state descriptors*) i definišu elektronsko okruženje svakog atoma koje potiče od elektronskih svojstava posmatranog atoma i uticaja drugih atoma u molekuli.

Pet statistički najznačajnijih deskriptora su predstavljani u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Pet molekulskih deskriptora koji najbolje korelišu sa  $\log(1/\text{MIK})$  vrednostima halkona prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijskim sojevima

<b>Gram-pozitivni bakterijski sojevi</b>		<b>Gram-negativni bakterijski sojevi</b>	
<b>Deskriptor</b>	<b>Koeficijent determinacije (<math>R^2</math>)</b>	<b>Deskriptor</b>	<b>Koeficijent determinacije (<math>R^2</math>)</b>
<i>ETA_dEpsilon_D</i>	0,970	<i>MLFER_A</i>	0,997
<i>SHBd</i>	0,929	<i>SsOH</i>	0,996
<i>SHsOH</i>	0,929	<i>SHBd</i>	0,994
<i>MLFER_A</i>	0,922	<i>SHsOH</i>	0,994
<i>SsOH</i>	0,918	<i>ETA_dEpsilon_D</i>	0,989

*ETA\_dEpsilon\_D* (*Extended topochemical atom descriptor*)-topološki deskriptor koji prikazuje uticaj donora vodoničnih veza;

*SHBd* –elektrotopološki deskriptor jakih donora vodoničnih veza;

*SHsOH*–zbir elektrotopoloških indeksa vodonikovih atoma OH grupa;

*MLFER\_A*– ukupna kiselost analita koja potiče od vodonikovih atoma;

*SsOH* –zbir elektrotopoloških indeksa OH grupa.

Na osnovu dobijenih rezultata izračunate su regresione jednačine i odgovarajući koeficijenti korelacije (Tabela 20).

**Tabela 20.** Korelacija  $\log(1/MIC)$  sa odabranim deskriptorima i odgovarajući koeficijenti determinacije

Deskriptor	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )	Linearna regresiona jednačina
<i>ETA_dEpsilon_D</i>	0,990	$\log(1/MIC_{mean}) = 1,098 \text{ } ETA\_dEpsilon\_D - 0,017$
<i>SHBd</i>	0,961	$\log(1/MIC_{mean}) = 1,088 \text{ } SHBd + 0,040$
<i>SHsOH</i>	0,961	$\log(1/MIC_{mean}) = 1,088 \text{ } SHsOH + 0,040$
<i>MLFER_A</i>	0,956	$\log(1/MIC_{mean}) = 1,018 \text{ } MLFER\_A + 0,055$
<i>SsOH</i>	0,954	$\log(1/MIC_{mean}) = 1,046 \text{ } SsOH + 0,051$

Iako postoje značajne razlike u aktivnosti ispitivanih halkona bliska povezanost odabranih deskriptora ukazuje da mehanizam antibakterijske aktivnosti ispitivanih halkona ne pokazuje specifičnost prema soju bakterija. Enonska grupa u strukturi halkona (Slika 3) najčešće se smatra odgovornom za njihovu antimikrobnu aktivnost jer reaguje sa nukleofilima kao što su sulfidrilne grupe ćelijskih proteina (3). Kako je terminalni benzenov prsten (B) 2'-hidroksihalkona supstituisan različitim grupama (metil, metoksi hlora, fluoro, hidroksi) značajan je uticaj elektrondonorskih i elektroakceptorskih osobina supstituenata na elektronsku gustinu (elektrofilnost)  $\beta$ -ugljenikovog atoma enonske grupe (Slika 25) tj. na antimikrobnu aktivnost.

Iako fenolske grupe u prstenu B svojim elektrondonorskim efektom smanjuju elektropozitivnost beta-ugljenikovog atoma, halkoni difenoli pokazali su najbolju aktivnost. Neki autori su u svojim studijama pokazali da mehanizam alkilovanja ne zavisi od elektronske gustine na  $\beta$ -ugljenikovom atomu (23) i da se reaktivnost ka alkilovanju sulfhidrilnih grupa jedinjenja strukturno sličnih halkonima povećava prisustvom OH grupa u prstenu B. Upoređujući aktivnosti halkona difenola (Tabela 14) može se zaključiti da položaj fenolske grupe u prstenu B (*orto*, *meta* ili *para*) ne utiče na antibakterijsku aktivnost. Do sličnog zaključka su došli i drugi autori u svojim studijama antibakterijske aktivnosti halkona (224, 225). Izvedena *QSAR* analiza antimikrobne aktivnosti halkona difenola pokazala je da indeks reaktivnosti grupa na prstenu B nije pronađen kao značajan prediktor koji bi definisao aktivnost. Iako utiču na promenu elektronske gustine u prstenu B supstituenti ne utiču na elektrofilnost beta-ugljenikovog atoma i reaktivnost enonske grupe, već utiču na kiselost fenolske grupe u položaju 2'.

Rezultati izvedene *QSAR* analize ukazuju da su alternativni i komplementarni mehanizmi odgovorni za antibakterijsku aktivnost ispitivanih 2'-hidroksi halkona.

#### **b) Deskriptori koji definišu kiselost fenolske grupe**

2'-hidroksi-propiofenononske strukture mogu u vodenim rastvorima da se ponašaju kao bidentatni ligandi i grade komplekse sa jonima metala. Fenolska grupa u položaju 2' ostvaruje kovalentnu vezu, dok karbonilna grupa enona ostvaruje koordinativnu vezu. Dosadašnja istraživanja u kojima su proučavane konformacije polifenolskih jedinjenja, strukturno sličnih 2'-hidroksihalkonima, pokazala su da je stereohemija konformera sa najmanjim sadržajem potencijalne energije ključan faktor za građenje kompleksa sa jonima metala u vodi kao medijumu (226).

U daljoj *QSAR* analizi odabrani su deskriptori koji definišu kiselost fenolske grupe. Povećanjem kiselosti fenolske grupa olakšana je deprotonacija, a time i građenje kompleksa, što je bitno za antimikrobnu aktivnost. Formiranje helatnih kompleksa može da promeni funkcionalnost bakterijskih metaloproteina. *In situ* formirani kompleks sa

slobodnim intracelularnim jonima metala (npr.  $Mg^{2+}$ ) može uticati na elektronsku gustinu i delokalizaciju elektrona u molekulu čime se može povećati elektrofilnost halkona (halkonskog kompleksa) i reaktivnost u acilovanju SH grupa.

Molekulski deskriptori koji definišu kiselost fenolske grupe su prikazani u Tabeli 21.

**Tabela 21.** Pet molekulskih deskriptora koji definišu kiselost fenolske grupe i korelacija sa odnosom  $\log(1/MIK)$  vrednosti Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija

Deskriptor	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )	Linearna regresiona jednačina
<i>apol</i>	0,870	$Ratio = -0,966 \text{ apol} + 1,714$
<i>WA.polar</i>	0,717	$Ratio = -0,944 \text{ WA.polar} + 1,670$
<i>Wlambda2.eneg</i>	0,709	$Ratio = 0,708 \text{ Wlambda2.eneg} + 0,977$
<i>Wnu2.eneg</i>	0,693	$Ratio = 0,676 \text{ Wnu2.eneg} + 0,985$
<i>WA.unity</i>	0,674	$Ratio = -0,920 \text{ WA.unity} + 1,677$

*apol*–zbir polarizabilnosti atoma ispitivanog jedinjenja uključujući i atome vodonika;  
*WA.polar*–(Indirektni WHIM; *Weighted Holistic Invariant Molecular descriptors*);  
 geometrijski deskriptor koji je normiran atomskom polarizabilnošću;

*Wlambda2.eneg*–(Direktni WHIM); geometrijski deskriptor koji je normiran atomskom elektronegativnošću;

*Wnu2.eneg*–(Direktni WHIM); geometrijski deskriptor koji je normiran atomskom elektronegativnošću;

*WA.unity*–(Indirektni WHIM) predstavlja geometrijski deskriptor koji je normiran molekulskom masom ispitivanog jedinjenja.

Rezultati su pokazali da se povećanjem polarnosti halkona osetljivost Gram negativnih bakterija povećava, dok povećanje elektronegativnosti umanjuje efikasnost halkona prema Gram negativnim sojevima. Povećana polarnost ide u prilog činjenici da prisustvo lipopolisaharidnog omotača u spoljašnjoj membrani Gram negativnih bakterija, s jedne strane, i transporta posredovanog porinima, s druge strane, olakšava prodiranje hidrofilijskih molekula u unutrašnjost ćelije. Povećanje elektronegativnosti

usporava ili sprečava prolaz kroz ćelijsku membranu Gram-negativnih bakterija jer se javljaju odbojne sile sa negativno naelektrisanim lipopolisaharidima u spoljašnjoj membrani.

Primenom genetskog algoritma racionalizovan je broj deskriptora i sveden na dva koja pokazuju najbolju korelaciju sa antimikrobnom aktivnošću halkona.

$$\log(1/MIC_{mean}) = - (0,050 \pm 0,011) \mathit{apol} + (1,545 \pm 0,059) \mathit{SHBd} + (1,128 \pm 0,432)$$

$$R = 0,995, R^2 = 0,990, F = 448,66$$

$$t_{apol} = -4,564 (p = 0,001); t_{SHBd} = 26,067 (p < 0,001); t_{intercept} = 2,608 (p = 0,03)$$

Rezultati *QSAR* analize ispitivanih 2'-hidroksihalkona mogu se sumirati na sledeći način:

- antibakterijska aktivnost zavisi od vodonik-donorskih osobina fenolske grupe u položaju 2' prstena A. Povećanje kiselosti 2'-hidroksihalkona povećava antibakterijsku aktivnost;
- uvođenje fenolskih grupa u prsten B, uprkos njihovim elektrondonorskim osobinama, doprinosi antimikrobnoj aktivnosti, nezavisno od položaja *orto*, *meta* ili *para*;
- polarnost halkona kao i njihova elektronegativnost su od velikog značaja za osetljivost Gram negativnih bakterija prema halkonima;
- pored tiolne alkilacije mehanizam antibakterijske aktivnosti halkona uključuje i građenje helatnih kompleksa koji ujedno mogu biti i potencijalni alkilujući agensi.

Strukturno jednostavni 2'-hidroksi halkoni predstavljaju molekule sa obećavajućim antibakterijskim potencijalom koji se izvedenom *QSAR* studijom može poboljšati.

## **4.3.2. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata**

### **4.3.2.1. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama**

Rezultati antibakterijske aktivnosti propafenonskih derivata prikazani su u Tabeli 22 kao MIK vrednosti izražene u mM.



**Tabela 22.** Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenona i propafenonskih derivata na standardnim sojevima Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija

	MIK (mM)						
<b>Propafenonski analozi/ sojevi bakterija</b>	<b>5OCH3</b>	<b>5PCH3</b>	<b>5PF</b>	<b>5OF</b>	<b>5OCL</b>	<b>5CF3</b>	<b>propafenon</b>
Gram pozitivne bakterije							
<i>S. aureus</i>	0,160	0,320	0,318	0,159	0,305	0,280	>1,330
<i>S. epidermidis</i>	0,160	0,320	0,318	0,079	0,305	0,280	>1,330
<i>B. subtilis</i>	0,160	0,320	0,318	0,159	0,305	0,280	1,330
<i>M. luteus</i>	0,160	0,320	0,318	0,079	0,305	0,280	1,330
<i>E. faecalis</i>	0,640	0,640	0,635	0,635	0,610	0,560	>1,330
Gram negativne bakterije							
<i>K. pneumonia</i>	0,640	0,640	0,635	0,635	0,610	0,280	>1,330
<i>P. aeruginosa</i>	0,640	0,640	0,635	0,635	0,610	0,560	>1,330

Jedinjenja propafenonske grupe pokazala su bolju antimikrobnu aktivnost prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama u odnosu na halkone. Kao i kod halkona, veću osetljivost pokazali su sojevi Gram pozitivnih bakterija. Vrednosti MIK za ovu grupu jedinjenja kreću se u opsegu od 0,079 mM za *orto* fluorirani derivat **5OF** do 0,640 mM za metilovane derivate (**5OCH3** i **5PCH3**), dok je propafenon kao *lead* molekul u datoj grupi pokazao najslabiju antimikrobnu aktivnost (Tabela 22).

Ukoliko se uporede MIK vrednosti dobijene za propafenon (kao odabrani *lead* molekul) i sintetisane analoge može se konstatovati da prisustvo supstituenata na terminalnom benzenovom prstenu pozitivno utiče na antimikrobnu aktivnost. Supstitucija terminalnog benzenovog prstena povećava lipofilnost molekula i doprinosi bržoj difuziji kroz ćelijsku membranu. Na osnovu rezultata iz Tabele 22 može se napraviti opadajući niz efikasnosti jedinjenja prema ispitivanim sojevima:

*S. aureus*: 5OF >5OCH3>5CF3 >5OCl > 5PF >5PCH3>propafenon

*S. epidermidis*: 5OF >5OCH3>5CF3 >5OCl > 5PF >5PCH3>propafenon

*B. subtilis*: 5OF >5OCH3>5CF3 >5OCl > 5PF >5PCH3>propafenon

*M. luteus*: 5OF >5OCH3>5CF3 >5OCl > 5PF >5PCH3>propafenon

*E. faecalis*: 5CF3 >5OCl>5OF =5PF >5OCH3=5PCH3>propafenon

*K. pneumoniae*: 5CF3 >5OCl>5OF =5PF >5OCH3=5PCH3>propafenon

*P. aeruginosa*: 5CF3 >5OCl>5OF =5PF >5OCH3=5PCH3>propafenon

Supstitucija *orto* položaja u terminalnom benzenovom prstenu propafenonskih analoga doprinosi antimikrobnom dejstvu prema sojevima Gram pozitivnih bakterija, što se može objasniti povećanjem lipofilnosti molekula, ali i konformacionim promenama. Sa porastom voluminoznosti supstituenta u *orto* položaju antimikrobna aktivnost se smanjuje jer se smanjuje i brzina difuzije jedinjenja kroz ćelijsku membranu (vrednost difuzionog koeficijenta opada redom od 0,65 do 0,60). *Orto* fluorirana jedinjenja pokazala su se najaktivnijim prema najvećem broju sojeva, što je u skladu sa ranije poznatom činjenicom da uvođenje fluora u strukturu farmakološki aktivnih jedinjenja povećava njihovu permeabilnost kroz ćelijsku membranu (227, 228).

Efikasnost jedinjenja prema Gram negativnim sojevima bakterija zavisi ne samo od sternih efekata supstituenata, već i od elektronskih. Aktivnost raste sa povećanjem elektronegativnosti supstituenta. Veća elektronegativnost smanjuje elektronsku gustinu u terminalnom benzenovom prstenu i omogućava bolju interakciju sa negativno naelektrisanim lipopolisaharidima u spoljašnjoj membrani bakterija čime se olakšava difuzija molekule u citozol.

Na osnovu dobijenih MIK vrednosti za propafenonske analoge može se zaključiti da među Gram pozitivnim bakterijama najmanju osetljivost pokazuje soj *E. faecalis*, za koji je poznato da je izuzetno otporan. Studije pokazuju da metaboličke funkcije *Enterococcus faecalis* zavise od homeostaze  $K^+$  jona u ćeliji. Koncentracija  $K^+$  jona u citozolu *E. faecalis* se kreće od 0,4M do 0,6M i neophodna je za normalan ćelijski metabolizam, neutralizaciju intracelularnih anjona, aktivnost različitih enzima i regulaciju pH vrednosti unutar ćelije (229).

#### **4.3.2.2. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata na rast MRSA sojeva**

Ispitivana jedinjenja **propafenonske grupe** su ispoljila značajnu antimikrobnu aktivnost prema kliničkim izolatima MRSA kao i prema ispitivanom standardnom ATCC soju u odnosu na derivate halkona. Rezultati antimikrobne aktivnosti su prikazani u Tabeli 23.

**Tabela 23.** Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propiofenonskih derivata i određenih antibiotika na rast MRSA sojeva

<b>MRSA broj soja</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>ATCC 43300</b>
<i>propafenonska grupa MIK (µg/ml)</i>								
<b>5 CF3</b>	1	1	2	2	2	2	4	2
<b>5 PF</b>	1	4	8	16	16	8	1	16
<b>5PCH3</b>	8	32	32	32	32	32	32	64
<b>5 OF</b>	16	16	16	16	32	32	16	32
<b>5 OCH3</b>	4	4	4	4	8	8	4	16
<b>5 OCL</b>	4	8	8	16	8	8	8	16
<b>Propafenon</b>	62,5	125	125	125	62,5	31,2	125	125
antibiotici								
<b>ciprofloksacin</b>	NT	1,00	0,50	0,25	16,00	16,00	0,25	NT
<b>ceftriakson</b>	NT	32,00	32,00	64,00	32,00	64,00	32,00	NT
<b>gentamicin</b>	NT	2,00	2,00	0,50	256,00	64,00	4,00	NT

NT-nije testirano

Dobijene MIK vrednosti se kreću u opsegu od 1 do 64 µg/ml (Tabela 23). Najizraženiji inhibitorski efekat na svih osam ispitivanih sojeva pokazalo je jedinjenje sa trifluorometil grupom ( $V_v = 39,80 \text{ \AA}^3$  (230)) u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena. Vrednosti MIK za dato jedinjenje su u opsegu od 2,24 do 8,96 µM tj. od 1 do 4 µg/mL što je u granicama aktivnosti ispitivanog fluorohinolonskog antibiotika ciprofloksacina (MIK 0,25 do 16 µg/mL). Kako se smanjuje voluminoznost supstituenta u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena smanjuje se i inhibitorska aktivnost, pa su zabeležene MIK vrednosti kod 5OCH<sub>3</sub> jedinjenja sa metil grupom ( $V_v = 21,30 \text{ \AA}^3$  (230)) u *orto* položaju u opsegu od 10,24 do 40,96 µM tj. od 4 do 16 µg/mL. Istu aktivnost pokazuje *orto* hlorovano jedinjenje 5OCl ( $V_r = 1,75 \text{ \AA}^2$  (231) (Tabela 23), dok je aktivnost *orto* fluoriranog molekula ( $V_r = 1,47 \text{ \AA}^2$  (253)) manja (MIK od 40,64 do 81,28 µM tj. od 16 do 32 µg/mL). Kod jedinjenja kod kojih je terminalni benzenov prsten supstituisan u *para* položaju (5PF i 5PCH<sub>3</sub>) aktivnost opada sa porastom voluminoznosti supstituenta, pa je aktivnost *para* fluoriranog derivata veća (MIK od 2,54 do 40,64 µM tj. od 1 do 16 µg/mL) u poređenju sa *para* metilovanim derivatom (MIK od 20,48 do 81,92 µM tj. od 8 do 64 µg/mL). Najslabiju aktivnost pokazao je *lead* molekul propafenon ( $V_rH = 1,40 \text{ \AA}^2$  (231)) čije su MIK vrednosti u opsegu od 83,13 do 332,50 µM tj. od 31,2 do 125 µg/mL.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je broj osetljivih MRSA sojeva prema propafenonskoj grupi veći u poređenju sa halkonskom grupom.

Osetljivost prema propafenonskim derivatima pokazala su i dva vanbolnička soja 6 i 8 kao i bolnički soj 13, koji je pokazao osetljivost i prema halkonskim derivatima. Najmanje osetljiv za obe grupe ispitivanih jedinjenja je vanbolnički soj 8. Osetljivost standardnog ATCC soja je u opsegu osetljivosti izolovanih MRSA sojeva. Rezultati dobijeni sa propafenonskim analogima na vanbolničkim sojevima su od velikog značaja s obzirom da literaturni podaci ukazuju na veću rezistenciju vanbolničkih sojeva prema dostupnim antibioticima (232, 233).

#### **4.3.2.3. Rezultati ispitivanja aktivnosti propafenonskih derivata na rast kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa* sojeva**

Rezultati ukazuju da su ispitivani sojevi pokazali veću osetljivost prema jedinjenjima propafenonske grupe u odnosu na halkone. Aktivnost jedinjenja halkonske grupe bila je slaba, dobijene MIK vrednosti su prelazile 1000 µg/mL ( od 3,42 mM za 1CF3 do 4,44 mM za

fluorirane halkone). Rezultati antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata prema sojevima *P. aeruginosa* su prikazani u Tabeli 24 i 25.

**Tabela 24.** Rezultati antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata prema kliničkim izolatima *P. aeruginosa* izraženi kao MIK ( $\mu\text{g/mL}$ )

<i>P. aeruginosa</i> broj soja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
jedinjenje	MIK ( $\mu\text{g/mL}$ )										
5OF	500	1000	1000	>1000	1000	1000	>1000	1000	1000	500	500
5CF3	500	500	500	1000	500	500	1000	500	250	250	1000
5PF	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500
5PCH3	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	500
5OCH3	>1000	>1000	1000	>1000	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	1000
Propafenon	>1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	1000
5OCl	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	500	1000	500	500

**Tabela 25.** Rezultati antimikrobne aktivnosti ispitivanih propafenonskih derivata prema sojevima *P. aeruginosa* u kliničkim izolatima izraženi kao MIK u mM

<i>P. aeruginosa</i> broj soja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
jedinjenje	MIK (mM)										
5OF	1,27	2,54	2,54	>2,54	2,54	2,54	>2,54	2,54	2,54	1,27	1,27
5CF3	1,12	1,12	1,12	2,24	1,12	1,12	2,24	1,12	0,56	0,56	2,24
5PF	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54	2,54	1,27	1,27	1,27	1,27
5PCH3	2,56	2,56	2,56	2,56	2,56	2,56	2,56	2,56	2,56	1,28	1,28
5OCH3	>2,56	>2,56	2,56	>2,56	2,56	2,56	>2,56	2,56	2,56	2,56	2,56
Propafenon	>2,66	2,66	>2,66	>2,66	2,66	2,66	>2,66	>2,66	2,66	2,66	2,66
5OCl	>2,44	>2,44	>2,44	>2,44	2,44	2,44	>2,44	1,22	2,44	1,22	1,22

Ako se analizira aktivnost jedinjenja propafenonske grupe prema sojevima izolata može se napraviti sledeći niz opadajuće efikasnosti:

Soj 1: 5CF3>5OF>5PF>5PCH3. Propafenon i *orto* hlorovani (5OCl) i *orto* metilovani (5OCH3) derivati nisu pokazali aktivnost u ospegu ispitivanih koncentracija.

Soj 2: 5CF<sub>3</sub>>5OF=5PF>5PCH<sub>3</sub>>propafenon. *Orto* hlorovani (5OCl) i *orto* metilovani (5OCH<sub>3</sub>) derivati nisu pokazali aktivnost u ospegu ispitivanih koncentracija.

Soj 3: 5CF<sub>3</sub>>5OF=5PF>5PCH<sub>3</sub>=5OCH<sub>3</sub>. Propafenon i *orto* hlorovani derivat (5OCl) nisu pokazali aktivnost u ospegu ispitivanih koncentracija.

Soj 4: 5CF<sub>3</sub>>5PF=5OF>5PCH<sub>3</sub>. Propafenon i *orto* halogenovani (5OF, 5OCl) i *orto* metilovani (5OCH<sub>3</sub>) derivati nisu pokazali aktivnost u ospegu ispitivanih koncentracija.

Soj 5: 5CF<sub>3</sub>>5OCl>5OF=5PF>5PCH<sub>3</sub>=5OCH<sub>3</sub>>propafenon.

Soj 6: 5CF<sub>3</sub>>5OCl>5OF=5PF>5PCH<sub>3</sub>=5OCH<sub>3</sub>>propafenon.

Soj 7: 5CF<sub>3</sub>>5PF>5PCH<sub>3</sub>, propafenon i *orto* halogenovani 5OF, 5OCl i *orto* metilovani 5OCH<sub>3</sub> derivati nisu pokazali aktivnost u ospegu ispitivanih koncentracija.

Soj 8: 5CF<sub>3</sub>>5OCl>5PF>5OF>5PCH<sub>3</sub>=5OCH<sub>3</sub> propafenon nije pokazao aktivnost u ospegu ispitivanih koncentracija.

Soj 9: 5CF<sub>3</sub>>5PF>5OF>5OCl>5PCH<sub>3</sub>=5OCH<sub>3</sub>>propafenon.

Soj 10: 5CF<sub>3</sub>>5OCl>5OF=5PF>5PCH<sub>3</sub>>5OCH<sub>3</sub>>propafenon

Soj 11: 5OCl>5OF=5PF>5PCH<sub>3</sub>>5CF<sub>3</sub>>5OCH<sub>3</sub>>propafenon.

Ako se porede elektronski efekti uvedenih supstituenata u terminalni benzenov prsten može se zaključiti da supstituenti sa elektron akceptorskim osobinama (-F, -CF<sub>3</sub>, -Cl) doprinose aktivnosti, dok je aktivnost slabija ako supstituent pokazuje elektrondonorske efekte. Najveću aktivnost prema svim sojevima (izuzetak soj 11 izolovan iz sputuma pacijenta) pokazalo je jedinjenje sa trifluorometil grupom u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena (MIK vrednosti 0,56 mM za sojeve 9 i 10 do 2,24 mM za sojeve 2, 4 i 11). Slabiju aktivnost pokazali su *orto* i *para* mono fluorirani derivati (MIK vrednosti od 1,27 mM do 2,54 mM). Aktivnost sličnu fluoriranim derivatima pokazao je i *orto* hlorovani derivat (MIK vrednosti od 1,22 mM do 2,44 mM) ali su sojevi 1, 2, 3, 4 i 7 pokazali rezistenciju prema ovom jedinjenju kada je primenjeno u maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji.

Uvođenje metil grupe u *orto* ili *para* položaj terminalnog benzenovog prstena propafenona umereno modifikuje njegovu aktivnost tako da je broj osetljivih sojeva veći u poređenju sa brojem sojeva osetljivih prema propafenonu. Svi ispitivani sojevi pokazali su osetljivost prema 5PCH<sub>3</sub> derivatu (*para* metilovanom) dok su sojevi 1, 2, 4 i 7 pokazali rezistenciju prema *orto* metilovanom derivatu za maksimalnu ispitivanu koncentraciju.

Najveću osteljivost su pokazali sojevi 5, 6, 9, 10 i 11, dok su se kao najmanje osetljivi pokazali sojevi 4 i 7.

#### 4.3.2.4. Propafenonski derivati kao modulatori jonskih kanala (*docking* studije)

S obzirom da su propafenon i njegovi analozi modulatori funkcije jonskih kanala izvedena je *in silico* analiza molekuskog uklapanja (molekulski *docking*) kristalografskih struktura zatvorenog (PDB 1J95) i otvorenog (PDB 3FB7) bakterijskog KcsA kanala i ispitivanih jedinjenja primenom programa *AutoDock Vina 1.1.2*.

Pozicioniranja jedinjenja u kanalu i energetske afiniteti vezivanja predstavljeni su u Tabeli 26 i na Slici 26.

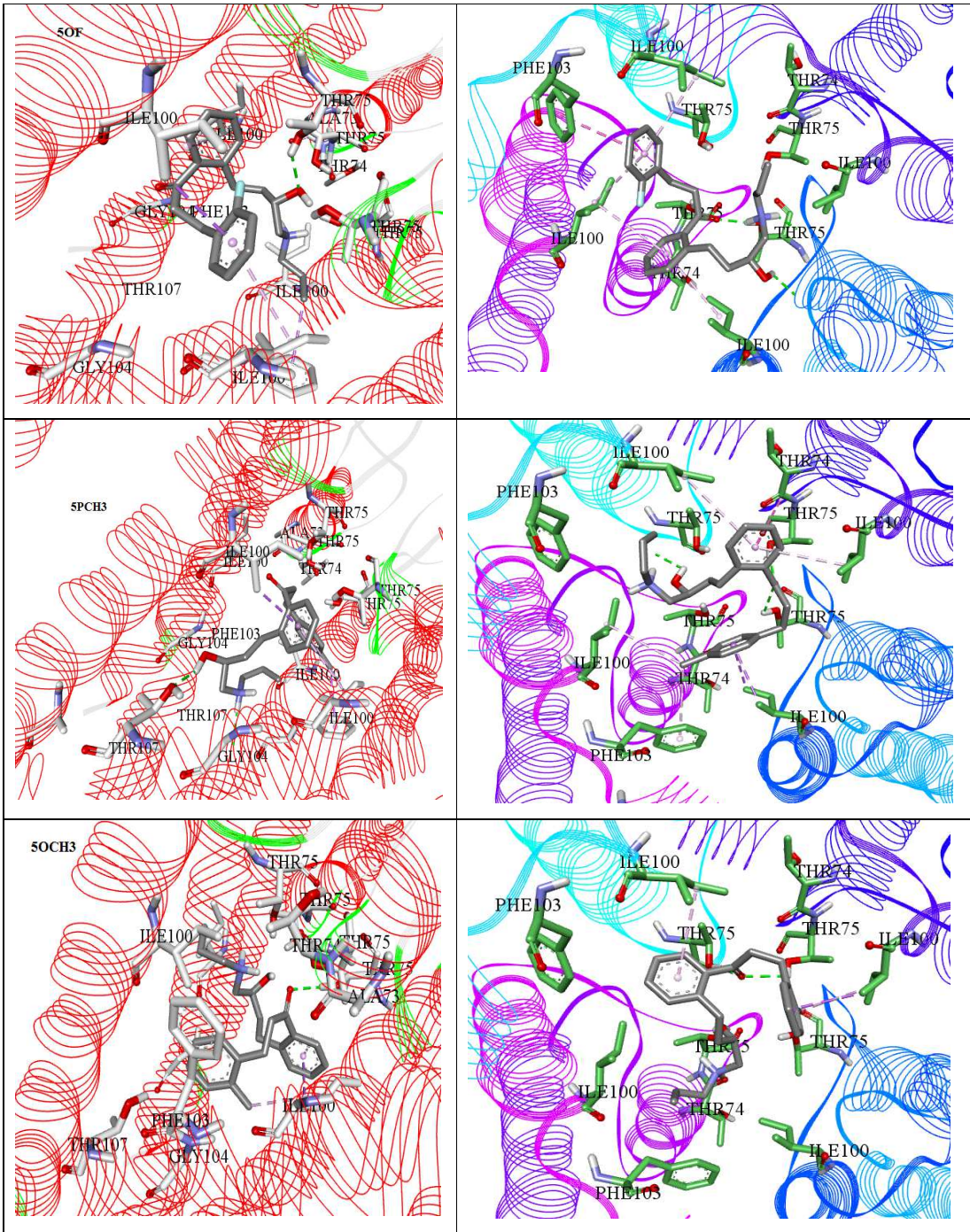
**Tabela 26.** Energije vezivanja (kcal/mol) ispitivanih propafenonskih analoga za zatvoreni (PDB 1J95) i otvoreni (PDB 3FB7) bakterijski KcsA kanal

jedinjenje	zatvoreni K <sup>+</sup> kanala (PDB 1J95)	otvoreni K <sup>+</sup> kanala (PDB 3FB7)
5PF	-8,1	-7,2
5OF	-8,8	-7,3
5PCH3	-8,2	-7,2
5OCH3	-8,0	-7,0
5OCL	-8,0	-7,1
5CF3	-8,9	-7,4
propafenon	-8,0	-7,4

Vrednosti vezivnih energija koje se kreću u opsegu od -8,0 do -8,9 (za zatvorenu konformaciju kanala) i od -7,4 do -7,0 (za otvorenu konformaciju) ukazuju da ispitivani analozi (uključujući i propafenon) pokazuju sličan afinitet vezivanja za K kanal.











Analizom vrednosti vezivnih energija ispitivanih propafenonskih derivata i propafenona konstatovano je da *orto* fluorirani derivati (5CF3 i 5OF) pokazuju veći afinitet prema vezivnom mestu u kanalu u odnosu na druge derivate i propafenon ( $E_{5CF3} = -8,90$  kcal/mol,  $E_{5OF} = -8,80$  kcal/mol za zatvoren kanal tj.  $E_{5CF3} = -7,40$  kcal/mol  $E_{5OF} = -7,30$  kcal/mol za otvoren kanal). Prisustvo elektronegativnog fluora u *orto* položaju povećava lipofilnost *lead* molekule propafenona ( $\text{Log } P_{\text{propafenon}} = 3,46$ ,  $\text{Log } P_{5OF} = 3,58$ ,  $\text{Log } P_{5OCF3} = 4,31$ ). Veći radijus atoma fluora u poređenju sa vodonikovim atomom ( $V_r = 1,47$  Å za fluor i  $V_r = 1,20$  Å za vodonik) utiče na dužinu C-F veze (C-F = 1,41 Å, C-H = 1,09 Å), što doprinosi polarnim interakcijama sa aminokiselinskim ostatkom Thr<sup>75</sup> i pojačava hidrofobne interakcije terminalnog benzenovog prstena sa Ile<sup>100</sup> u izdvojenoj aminokiselinskoj sekvenci zatvorenog kanala tj. sa Ile<sup>100</sup> i Phe<sup>103</sup> u izdvojenoj aminokiselinskoj sekvenci otvorenog kanala (Slika 27). Prisustvo fluoro grupe u *para* položaju terminalnog benzenovog prstena orijentiše terminalni benzenov prsten u pori kanala tako da se on udaljava od Ile<sup>100</sup> jedne  $\alpha$  sujednice čime izostaje jedna od dominantnih  $\pi$ -alkil interakcija u oba konformaciona stanja kanala (Slika 27).

Literaturni podaci ukazuju da se hlorovana jedinjenja bolje pozicioniraju u vezivnim mestima koja su bogata aromatičnim aminokiselinskim ostacima poput fenilalanina, tirozina, triptofana, histidina (235) što delimično može objasniti slabiji afinitet vezivanja 5OCl derivata na vezivnom mestu.

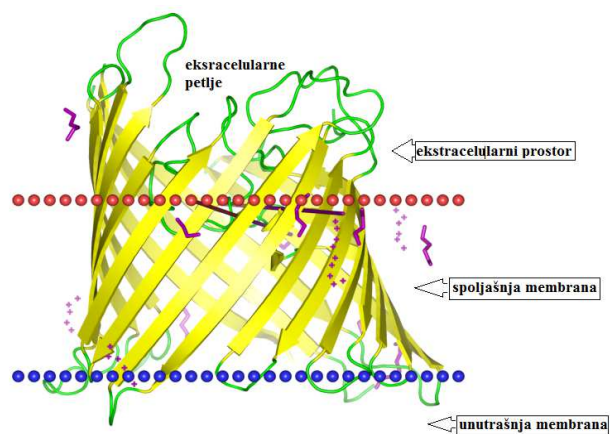
Sprovedena *docking* studija je ukazala da je interakcija propafenonskih analoga sa jonskim kanalima bakterija jedan od mogućih puteva njihovog antimikrobnog dejstva.

#### **4.3.2.5. Interakcija propafenonskih derivata sa porinom *Pseudomonas aeruginosa* (*docking* studija)**

Kako bi se razjasnio mogući put delovanja propafenonskih derivata izvedena je *Docking* studija sa kristalografskom strukturom OccK4 (ranije OpdL) transportnog porina *Pseudomonas aeruginosa* (196). Za razliku od drugih Gram negativnih mikroorganizama koji sadrže veliki broj nespecifičnih porina *Pseudomonas* spp. je jedinstven po prisustvu supstrat specifičnih porina (*substrate-specific outer membrane*). Kroz ove porine odvija se transport malih hidrofilnih molekula, hranljivih materija koje bakterija koristi za rast i funkciju ćelije (220, 222). Zbog prisustva supstrat specifičnih porina spoljašnja membrana je visoko

nepropustljiva za male, polarne molekule i otporna na dejstvo antibiotika (236). Specifični porini imaju stereospecifična vezivna mesta za supstrat ali i energetski povoljne konformacije koja olakšavaju ulazak strukturno sličnih molekula kroz najuži deo porina (237). Ovakav vid olakšane resorpcije je značajan kada je količina hranljivih materija u spoljašnjoj sredini nedovoljna da zadovolji potrebe rasta i razvoja ćelije i kada difuzija kroz nespecifične porine postane neefikasna. Vezivna mesta specifičnih porina ne isključuju mogućnost vezivanja strukturno različitih molekula pa tako ovi porini pokazuju i neke od osobina opštih porina (238).

U spoljašnjoj membrani *Pseudomonasa* identifikovani su strukturno jednostavni supstrat-specifični kanali (porini) koji su proteinski monomeri izgrađeni od beta subjedinice sa tri ekstracelularne petlje, od kojih dve ulaze u centralnu šupljinu kanala (Slika 28).

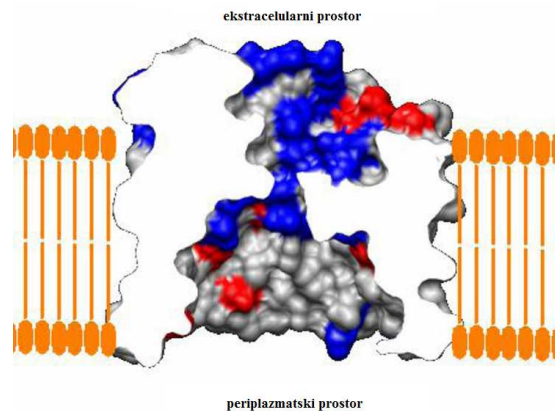


**Slika 28.** Porin *P. aeruginosa*

(preuzeto sa <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=2y0h>)

Ovi kanali su poznati kao karboksilatni, voltažno-zavisni kanali spoljašnje membrane, Occ porini (*Outer membrane Carboxylate Channel*). Na osnovu sub-supstratne specifičnosti Occ porini se mogu podeliti u dve podfamilije: OccD i OccK. Pored supstratne specifičnosti ovi porini se razlikuju i po jonskoj selektivnosti. OccD porini su katjon selektivni, dok se OccK porini mogu smatrati jon neselektivnim (239). OccK familija transmembranskih proteina ima 11 članova od kojih su 10 strukturno okarakterisani. Arhitektura ovih porina je ista, svi su monomeri sa osamnaeststrukim helixom koji formira transmembranski porin u čijem se lumenu nalaze aminokiseline značajne za prepoznavanje i transport supstrata (Slika 29).

Amplitude provodljivosti ovih kanala su malog ili srednjeg intenziteta. Karakteristično je da se ovi porini mogu naći u dva ili tri otvorena stanja (240).

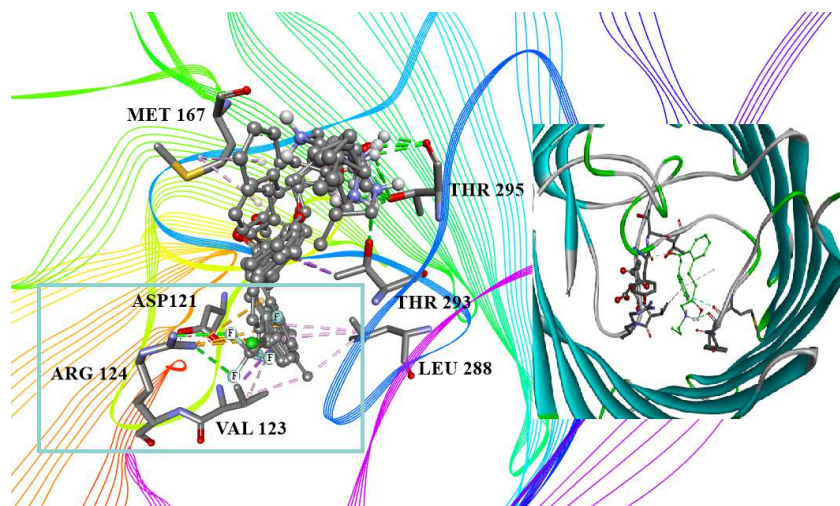


**Slika 29.** Bočni presek kroz OccK kanal u ravni lipidnog dvosloja. Negativno naelektrisane aminokiseline su obojene crvenom bojom, dok su pozitivno naelektrisane aminokiseline obojene plavom bojom. Uočava se prisustvo pozitivno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka u aminokiselinskom nizu koji vodi ka suženju kanala i od suženja kanala (240).

Pozitivno naelektrisani aminokiselinski niz koji vodi do suženja porina odgovoran je za selektivnost i specifičnost porina kod većine članova OccK familije. Poznato je da ovaj aminokiselinski niz u najvećoj meri čine ostaci Arg (236). Arg prepoznaje karboksilatni supstrat i transportuje ga kroz suženje porina. Ovi porini u velikoj meri pokazuju supstratnu specifičnost za organske kiseline: mlečnu, ćilibarnu, limunsku, vinsku, glukuronsku, piroglutamatnu (222).

S obzirom da propafenonon kao *lead* molekul nije selektivan za odgovarajući tip kanala i da je selektivnost propafenonskih derivata veća, za *docking* studije odabran je OccK4 kanal (porin) čija je provodljivost i jonska selektivnost niska, a aminokiselinska sekvenca u suženju kanala je slabije očuvana u poređenju sa drugim članovima OccK familije (manji broj nepravilno rapoređenih ostataka Arg) (222).

*Docking* rezultati ukazuju da se vezivno mesto ispitivanih jedinjenja nalazi u unutrašnjosti porina, između tri unutrašnje petlje i uključuje sledeće aminokiselinske ostatke: Val<sup>123</sup>, Arg<sup>124</sup>, Asp<sup>121</sup>, Met<sup>167</sup>, Leu<sup>288</sup>, Thr<sup>293</sup>, Thr<sup>295</sup> i Arg<sup>296</sup> (Slika 30).



**Slika 30.** Vezivna mesta u porinu OccK4 (ranije OdpL) sa označenim aminokiselinama, strukturama *dokovanih* jedinjenja i interakcijama (zeleno: vodonična veza, narandžasto: elektrostatičke interakcije, purpurno: alkil- $\pi$  interakcije, roze: hidrofobne alkil-alkil interakcije).

Označeni deo na slici ukazuje na dominantne interakcije halogenovanih jedinjenja sa Arg<sup>124</sup>. Uzimajući u obzir veliku strukturnu sličnost ispitivanih jedinjenja (razlika u prirodi i poziciji supstituenta na terminalnom benzenovom prstenu) u analizi pozicioniranja jedinjenja u vezivnom mestu, interakcije protein/ ligand mogu se podeliti u dve grupe: na one koje su zajedničke (opšte) i one koje determinišu aktivnost jedinjenja.

Opštim interakcijama pripadaju stabilne vodonične veze sa ostacima Thr<sup>295</sup> koje grade sva ispitivana jedinjenja preko protonovane sekundarne amino ili sekundarne alkoholne grupe bočnog niza. Osim toga, sva ispitivana jedinjenja ostvaruju i stabilizirajuće hidrofobne interakcije S- $\pi$  (sa atomom sumpora metionina Met<sup>67</sup>), alkil- $\pi$  interakcije (sa metil grupama Val<sup>123</sup> i Leu<sup>288</sup>), katjon- $\pi$  interakcije (sa gvanidino grupom Arg<sup>124</sup>) kao i anjon- $\pi$  interakcije (sa karboksilatnim anjonom Asp<sup>121</sup>).

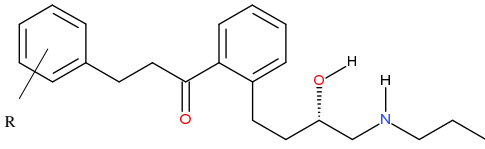
Interakcije koje se mogu smatrati specifičnim su interakcije koje halogenovani derivati (posebno *orto* trifluorometilovani derivat) ostvaruju preko halogena u terminalnom prstenu sa ključnim aminokiselinim ostatkom Arg<sup>124</sup>. Interakcija koju ostvaruje fluor sa pozitivno naelektrisanom gvanidino grupom ima karakter vodonične veze, ali je slabijeg intenziteta i



kratkotrajna (241). Drugu grupu specifičnih interakcija predstavljaju hidrofobne interakcije u hidrofobnom džepu vezivnog mesta koje ostvaraju metil grupe Val<sup>123</sup> i Leu<sup>288</sup>.

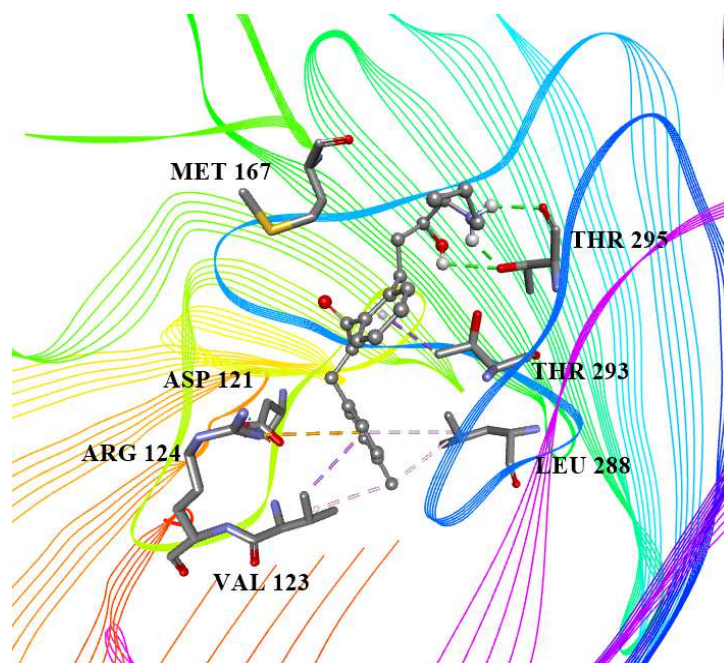
Rezultati iz Tabele 27 pokazuju da je najslabiji afinitet vezivanja *lead* molekule (propafenona) kod koga je terminalni benzenov prsten nesupstituisan (Tabela 27).

**Tabela 27.** Izračunate vezivne energije ispitivanih jedinjenja iz propafenonske grupe (kcal/mol) u centralnoj šupljini porina OccK4

jedinjenje	Opšta strukturna formula 	vezivne energije kcal/mol
	R	
5OF	2-F	-7,3
5CF3	2-CF <sub>3</sub>	-7,1
5PF	4-F	-7,3
5PCH3	4-CH <sub>3</sub>	-7,9
5OCH3	2-CH <sub>3</sub>	-7,7
propafenon	H	-7,2
5OCL13	2-Cl	-7,3

Najveći afinitet za vezivno mesto pokazuje jedinjenje sa metil grupom u *para* položaju terminalnog benzenovog prstena (5PCH3) iz čega se može zaključiti da metil grupa doprinosi stabilizaciji molekula u hidrofobnom džepu u blizini Val<sup>123</sup> i Leu<sup>288</sup>. Položajni izomer, 5OCH3 ima manju vezivnu energiju od *para* supstituisanog analoga. Razlika u afinitetu se objašnjava položajem metil grupe: rastojanje od hidrofobnog džepa je kraće kod *para* nego kod *orto* supstituisanih analoga (Slika 31).

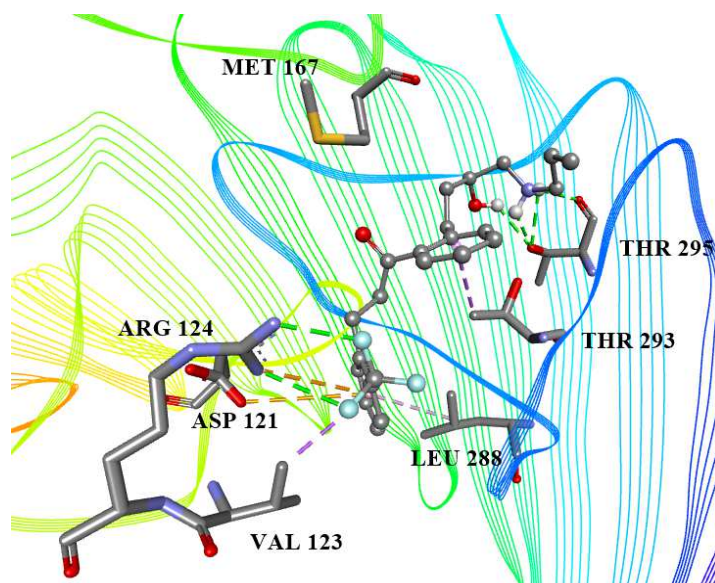




**Slika 31.** Pozicioniranje 5PCH3 u hidrofobnom džepu

*Orto* i *para* fluorirani derivati ostvaruju slabe vodonične veze sa aminokiselinom Arg<sup>124</sup> na vezivnom mestu. Ova interakcija ne zavisi od pozicije supstituenta pa su energije vezivanja iste.

Sličnu interakciju ostvaruje i *orto* hlorovani derivat (5OCl), dok jedinjenje koje u *orto* položaju sadrži trifluorometil grupu ima nižu vezivnu energiju. Iako CF<sub>3</sub> grupa ostvaruje najjače elektrostatičke interakcije sa Arg<sup>124</sup>, voluminoznost ove grupe doprinosi odbojnim disperzionim interakcijama u hidrofobnom džepu (sa Val<sup>123</sup>) čime se smanjuje afinitet vezivanja jedinjenja (Slika 32).



**Slika 32.** Pozicioniranje *ortho* trifluoro metilovanog derivata u porinu

*Docking* studija je pokazala da najveći afinitet vezivanja pokazuje 5PCH3 jedinjenje koje ostvaruje najbolju interakciju sa hidrofobnim džepom. Ova interakcija ne uključuje Arg<sup>124</sup>, ključnu aminokiselinu u transportu karboksilatnih supstrata (Slika 31). Slično antibioticima, ovaj molekul blokira porin (236), ali se influks potrebnih sastojaka očigledno i dalje odvija nesmetano. To je potvrđeno *in vitro* eksperimentima na sojevima kliničkih izolata prema kojima je 5PCH3 pokazao slabiju aktivnost u poređenju sa halogenovanim derivatima (Tabela 27).

Interakcije fluoriranih derivata sa ključnom aminokiselinom Arg<sup>124</sup> su elektrostatičke i podrazumevaju građenje vodoničnih veza za koje se može reći da su energetski slabe i vremenski kratkotrajne. Zbog elektronegativnosti fluora one su i repulzivne te su kontakt orijentacije većim delom slučajne, ali vremenski učestale. Kako je Arg<sup>124</sup> ključna aminokiselina u transportu karboksilatnih supstrata moguće je da se u toku transporta dešava kompetitivna interakcija F/ Arg, koja okupira vezivno mesto supstrata što uslovljava zastoje u transportu kroz suženje porina. Postavljena hipoteza testirana je u daljim *in vitro* eksperimentima koji uključuju ispitivanje inhibicije produkcije biofilma i pirocijanina kao faktora virulencije, u prisustvu *ortho* fluoriranih derivata.

#### **4.3.2.6. Rezultati ispitivanja aktivnosti orto fluoriranih derivata propafenona na produkciju biofilma kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa***

Poslednjih godina veliko interesovanje privlače studije koje se bave razvojem antimikrobnih jedinjenja koja selektivno deluju na faktore virulencije (enterotoksine, hemolizine, produkciju biofilma, pigmenata i sl.) (242). Poznato je da klinički uspeh konvencionalnih antibiotika ne zavisi samo od bakteriostatskog ili baktericidnog efekta, već i od njihovog uticaja na sintezu i oslobađanje faktora virulencije.

Rezistencija sojeva *Pseudomonas aeruginosa* prema antimikrobnim lekovima pripisuje se i njegovoj sposobnosti da formira biofilm (243).

Produkcija biofilma kod devet kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa* i jednog standardnog soja (ATCC 27853) ispitana je u tri eksperimenta koji su izvedeni tokom tri uzastopna dana. Produkcija biofilma je ispitana u TSB bujonu (sa dodatkom 1% glukoze) ili BHI bujonu (sa dodatkom 2% glukoze i 2% saharoze), bez statistički značajne razlike u produkciji biofilma u odnosu na primenjen medijum ( $p > 0,05$ ). Predstavljeni rezultati su dobijeni kao prosečna vrednost tri eksperimenta koja su izvedena sa TSB medijumom.

Produkcija biofilma ispitivanih sojeva *P. aeruginosa* je određena nakon 24 h i 48 h kultivacije. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u produkciji biofilma u odnosu na dužinu kultivacije ( $p > 0,05$ ). Iz navedenih razloga, uticaj fluoriranih derivata na produkciju biofilma je ispitan posle 24 h kultivacije *P. aeruginosa* u prisustvu pet opadajućih koncentracije fluoriranih derivata (1, 12, 0,56, 0,28, 0,14 i 0,07 mM tj. 500, 250, 125, 62,5 i 31,2  $\mu\text{g/mL}$ ). Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 28.

**Tabela 28.** Ispitivanje *in vitro* efekta 5CF3 na produkciju biofilma *Pseudomonas aeruginosa*\*

<i>P. aeruginosa</i>	5CF3 (C <sub>inhibitorno</sub> (mM))					Kontrola rasta
	1,12	0,56	0,28	0,14	0,07	
broj soja	kategorija produkcije					
1	0	1	2	2	2	2
2	1	1	2	3	3	3
3	0	1	2	2	2	2
4	1	2	2	3	3	3
5	1	1	2	3	3	3
6	0	1	2	3	3	3
7	1	2	2	3	3	3
8	1	1	3	3	3	3
9	1	2	2	3	3	3
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	0	1	2	3	3	3

\* 0 – odsustvo produkcije biofilma, 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

Kultivacija sa 5CF3 jedinjenjem je dovela do smanjene produkcije biofilma kod ispitivanih sojeva. Pod uticajem najveće koncentracije 5CF3 (1,12 mM), 4/10 (40%) sojeva nije produkovalo biofilm, dok je produkcija u 6/10 (60%) bila slaba. Korišćenjem dvostruko manje koncentracije (0,56 mM) svi ispitivani sojevi su produkovali biofilm tako da je kod 7/10 (70%) sojeva zabeležena slaba produkcija biofilma dok su 3/10 (30%) ispitivanih sojeva umereno produkovali biofilm. Umerena produkcija biofilma zabeležena je kod čak 90% ispitivanih sojeva u prisustvu 0,28 mM 5CF3, dok je samo kod soja 8 zabeležena intenzivna produkcija kao i u kontrolnoj grupi. U prisustvu nižih koncentracija (0,14 mM i 0,07 mM) 5CF3 svi ispitivani sojevi su zadržali produkciju biofilma kao kontrolna grupa (Tabela 28). Slični rezultati dobijeni su i sa 5OF derivatom (Tabela 29).

**Tabela 29.** Ispitivanje *in vitro* efekta 5OF na produkciju biofilma *Pseudomonas aeruginosa*\*

	5OF ( $c_{\text{inhibitorno}}$ (mM))					
<i>P. aeruginosa</i>	1,27	0,64	0,32	0,16	0,08	Kontrola rasta
broj soja	kategorija produkcije					
1	0	1	2	2	2	2
2	0	1	1	3	3	3
3	0	0	1	2	2	2
4	0	1	1	3	3	3
5	0	1	2	3	3	3
6	0	1	2	3	3	3
7	0	2	2	3	3	3
8	0	1	2	3	3	3
9	0	1	1	2	3	3
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	2	3	3	3

Najznačajniji inhibitorski efekat na produkciju biofilma 5OF derivat je ostvario u najvećoj primenjenoj koncentraciji (1,27 mM tj. 500 $\mu$ g/mL) gde je produkcija biofilma inhibirana kod svih ispitivanih sojeva. Pri dvostruko manjoj koncentraciji 2 soja nisu proizvela biofilm, 7 sojeva je pokazalo slabu produkciju dok je samo jedan soj ostvario umerenu produkciju biofilma. U prisustvu srednje inhibitorne koncentracije od 0,32 mM svi ispitivani sojevi su zadržali produkciju biofilma i to tako što su 4/10 (40%) slabo proizveli biofilm, dok je 6/10 pokazalo umerenu produkciju u odnosu na kontrolnu grupu. U prisustvu nižih koncentracija (0,16 i 0,08 mM) produkcija biofilma bila je identična produkciji biofilma kod kontrolne grupe za svih 10 ispitivanih sojeva.

Dobijeni rezultati pokazuju da je inhibicija produkcije biofilma pod uticajem oba fluorirana derivata dozno zavisna i da je inhibitorski efekat izraženiji kod 5OF derivata. Ako se uzmu u obzir rezultati *docking* studije na transportnom porinu OccK4 koji su pokazali da je afinitet vezivanja monofluoriranih derivata veći u poređenju sa *orto* trifluorometilovanim derivatom (E 5OF= -7,3kcal/mol, E 5CF3=7,1 kcal/mol) dobijeni rezultati su i očekivani.

Inhibicija i smanjenje produkcije biofilma u prisustvu ispitivanih jedinjenja je potvrda pretpostavke proistekle iz *docking* studije da fluorirani derivati kratkotrajno zauzimaju

ključna supstrat-specifična mesta u porinu (Arg<sup>124</sup>) i na taj način prekidaju transport karboksilatnih supstrata koji su uključeni u sintezu komponenata biofilma (244).

#### **4.3.2.7. Rezultati ispitivanja aktivnosti fluoriranih derivata propafenona na produkciju pigmenta piocijanina *Pseudomonas aeruginosa***

Proizvodnja pigmenta jedna je od najvažnijih karakteristika *P. aeruginosa*. Plavičasti pigment, piocijanin, je po hemijskom sastavu derivat fenazina i smatra se jednim od najbitnijih faktora virulencije *Pseudomonas aeruginosa* (245). Piocijanin je toksičan za respiratorni epitel i deluje na strukturu ćelija i funkciju pila. Služi kao ćelijski transmitter koji učestvuje u regulaciji ekspresije gena. Piocijanin i njegov derivat piohelin su siderofore, vezuju se za jone gvožđa i tako omogućavaju opstanak *P. aeruginosa*.

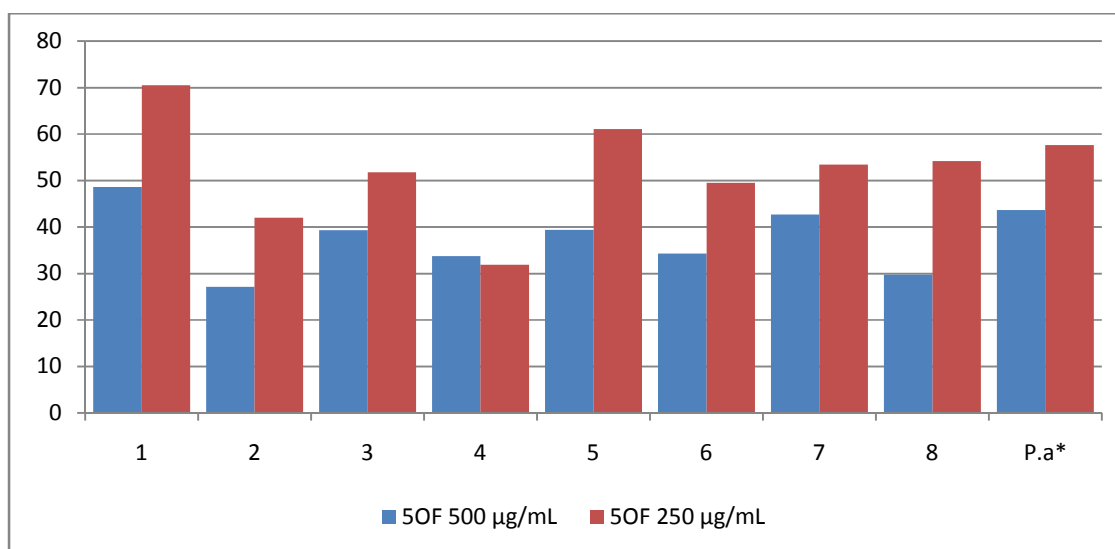
Ispitivanje produkcije pigmenta piocijanina u prisustvu fluoriranih derivata izvedeno je spektrofotometrijskom metodom koju su postavili Sandy and Foong (201). Ispitivanje je obavljeno na 8 sojeva kliničkih izolata kao i na standardnom soju (ATCC 27853).

Uticao fluoriranih derivata na produkciju pigmenta piocijanina ispitan je u tri nezavisna eksperimenta. Sojevi kliničkih izolata kao i standardni soj *P. aeruginosa* kultivisani su u prisustvu dve koncentracije (MIK:500 i 250 µg/mL tj 1,12 mM i 0,56 mM za 5CF3 i 1,27 mM i 0,64 mM za 5OF). Kontrola inhibicije produkcije piocijanina su bili supernatanti sojeva *P. aeruginosa* koji su kultivisani u medijumu bez fluoriranih dervata. Rezultati su prikazani kao procenat produkcije piocijanina u odnosu na kontrolu, koja je predstavljena kao 100,0% produkcije piocijanina svakog pojedinačnog soja (Tabela 30 i Slika 33).

**Tabela 30.** Produkcija piocijanina (%) u prisustvu fluoriranih jedinjenja

	5OF 500 µg/mL	5OF 250 µg/mL	5CF3 500 µg/mL	5CF3 250 µg/mL	Kontrola rasta
<b>soj</b>	<b>% produkcije piocijanina u odnosu na kontrolnu produkciju (100%)</b>				
<b>1</b>	48,6	70,5	74,0	79,8	100,0
<b>2</b>	27,1	42,0	36,6	76,4	100,0
<b>3</b>	39,3	51,8	68,5	99,4	100,0
<b>4</b>	33,7	31,9	34,6	54,2	100,0
<b>5</b>	39,4	61,1	48,3	104,9	100,0
<b>6</b>	34,3	49,5	35,2	46,6	100,0
<b>7</b>	42,7	53,4	51,0	56,3	100,0
<b>8</b>	29,8	54,2	36,9	52,4	100,0
<b><i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853</b>	43,6	57,6	47,9	64,0	100,0

Produkcija piocijanina u prisustvu fluoriranih jedinjenja kod svih ispitivanih sojeva je smanjena. Pri koncentraciji od 500 µg/mL 5OF produkcija pigmenta je smanjena na 27,1% za soj 2 dok je najmanje osetljiv (za datu koncentraciju) soj 1 koji je produkovao 48% piocijanina. Pri dvostruko manjoj koncentraciji 5OF soj 1 produkuje 70,5% pigmenta, dok soj 4 produkuje 32% piocijanina.

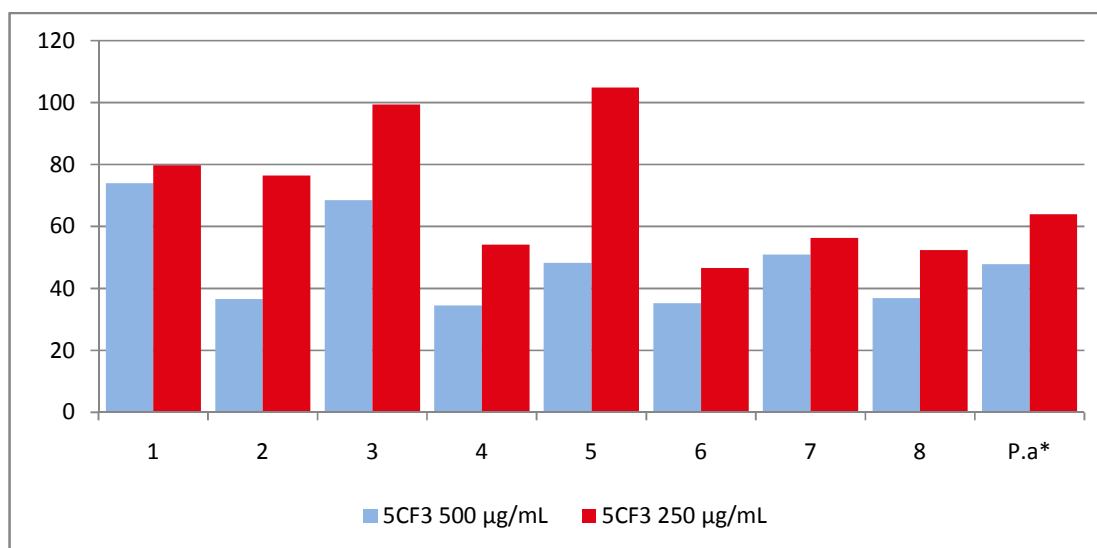


\**P.aeruginosa* ATCC 27853

**Slika 33.** Grafički prikaz inhibitornog efekta 5OF jedinjenja na produkciju piocijanina

Smanjenje produkcije piocijanina je zabeleženo u prisustvu 5CF3 (koncentracija 500 µg/mL). Pod ovim uslovima produkcija piocijanina soja 4 i 6 je 34,6 % i 35,2 % dok je najmanje osetljiv soj 1 (48,6 %). U prisustvu dvostruko manje koncentracije 5CF3 derivata, sojevi 3 i 5 su produkovali piocijanin kao i kontrolna grupa, dok je kod soja 6 produkcija bila na 46,6% (Slika 34).

U slučaju inhibicije produkcije piocijanina veću efikasnost pokazalo je 5OF jedinjenje.



\**P.aeruginosa* ATCC 27853

**Slika 34.** Grafički prikaz inhibitornog efekta 5CF3 jedinjenja na produkciju piocijanina

*Orto* mono fluorirani derivat 5OF pokazao je bolji inhibitorni efekat na produkciju piocijanina u poređenju sa komercijalnim antibioticima (ampicilin i streptomycin) (200). Efekti 5CF3 derivata su u opsegu komercijalno dostupnih antibiotika (200).

*In vitro* i *in silico* metode su izdvojile *orto* fluorirane derivate kao potencijalne antimikrobne lekove.



## 4.4. Rezultati QSAR studija inhibicije rasta MRSA sojeva

Da bi se definisale strukturne karakteristike ispitivanih jedinjenja koje doprinose antimikrobnoj aktivnosti prema MRSA sojevima izvedena je QSAR studija inhibicije rasta MRSA sojeva.

Za formiranje i validaciju osam nezavisnih 3D QSAR modela korišćeno je 16 optimizovanih struktura (*data set*) propiofenonskih derivata halkonske i propafenonske grupe (Tabela 31).

Kao nezavisno promenljive vrednosti (X) u formiranju i optimizaciji 3D QSAR molekularnih modela korišćeni su konstitucionalni, geometrijski, fizičko-hemijski i elektronski deskriptori. Kao zavisno pomenljiva vrednost (Y) uzeta je biološka aktivnost predstavljena kao negativni dekadni logaritam MIK vrednosti ( $\log_{10} 1/\text{MIK}$ ).

Efekti svakog od testiranih jedinjenja ispitani su odvojeno na svakom od 8 MRSA sojeva, a dobijeni rezultati dalje korišćeni u formiranju i validaciji 3D QSAR modela. Formirani *training set* obuhvata relativno širok interval aktivnosti čime je obezbeđena široka primena formiranih 3D QSAR modela.

3D QSAR studija je izvedena pomoću programa *Pentacle 1.0.6*. Program započinje analizu struktura formiranjem 3D mapa polja energija interakcije (tzv. *GRID based Molecular Interaction Fields-MIFs*) između molekula i hemijskih proba, a zatim generiše tzv. *GRIND*-nezavisne deskriptore (*GRIND* i *GRIND2* deskriptore). Dobijena matrica *GRIND* varijabli/deskriptora je analizirana metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (*PLS*).

Izvedena *anchor-GRIND* metoda je naročito korisna kada se analiziraju novosintetisana jedinjenja koja imaju zajedničke strukturne ili biološke karakteristike. Rezultati dobijeni ovom analizom su precizniji i lakši za tumačenje (246).

Biološka aktivnost, izražena kao  $\log_{10} 1/\text{MIK}$  (zavisna varijabla) korelisana je sa *GRIND* deskriptorima (nezavisna varijabla). U cilju povećanja kvaliteta dobijenih modela početni broj *GRIND* deskriptora je redukovano pomoću Frakacionog faktorijal dizajna (FFD), algoritma za selekciju varijabli implementiranog u programu *Pentacle*. Rezultati analize glavne komponente (*PCA*) ukazali su na strukturne karakteristike u okviru *data set*-a na osnovu čega

je on podeljen na *training* set (grupa molekula za razvoj modela) i *test* set (grupa molekula za validaciju modela). Na osnovu vrednosti statističkih parametara  $R^2$ ,  $RMSEE$ ,  $Q^2$ , i  $RMSEP$  (Tabela 31) odabrani su optimalni *3D QSAR* modeli za svih osam ispitivanih MRSA sojeva. Dobijene vrednosti za statističke parameter ( $Q^2 \geq 0,5$ ) ukazuju na visoku prognostičku sposobnost formiranih modela. .

Tabela 31. Rezultati 3D QSAR studije:

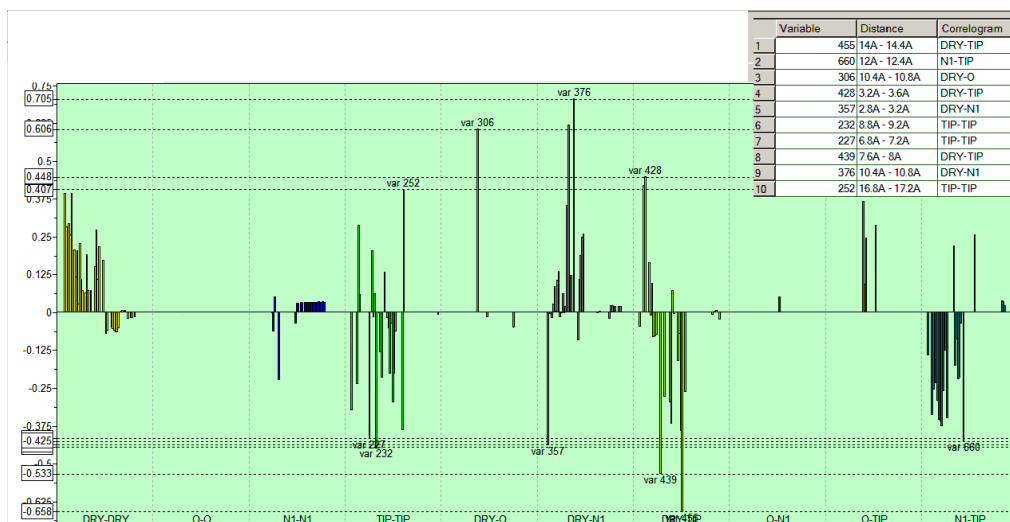
MRSA	3	5	6	8	10	12	13	ATCC 43300
	<b>-log(MIC)</b>							
<b>1-MRSA-5 CF3</b>	5,650	5,650	5,349	5,349	5,349	5,349	5,048	5,349
<b>2-MRSA-5 PF</b>	5,595	4,993	4,692	4,391	4,391	4,692	5,595	4,391
<b>3-MRSA-5PCH3</b>	4,689	4,087*	4,087	4,087	4,087	4,087	4,087	4,087
<b>4-MRSA-5 OF</b>	4,391	4,391	4,391	4,391	4,090	4,090	4,391	4,090
<b>5-MRSA-5 OCH3</b>	4,990*	4,990*	4,990*	4,990*	4,689*	4,689*	4,990*	4,388
<b>6-MRSA-5 OCL</b>	5,011	4,710	4,710	4,408	4,710	4,710	4,710	4,408*
<b>7-MRSA-1PF</b>	3,588	3,889	3,588	2,500	3,889	2,500	3,889*	3,889
<b>8-MRSA-1PCH3</b>	3,883*	3,883*	3,582	2,500	2,979	2,500	2,979	2,979*
<b>9-MRSA-1PCF3</b>	3,068	3,068	2,767*	2,767*	2,767*	2,767*	2,767	2,767
<b>10-MRSA-1CF3</b>	4,569	4,886	4,569	4,569	4,569	4,276	4,886	4,886
<b>11-MRSA-1OCL</b>	4,824	4,824	4,824	4,523	4,222	4,523	4,824	4,824
<b>12-MRSA-1OF</b>	4,495*	4,495	4,194	3,582	4,194	3,883*	4,194	4,194*
<b>13-MRSA-1OCH3</b>	3,883	4,180	3,883*	2,678*	3,883*	2,678	2,979*	2,979
<b>14-MRSA-4F2CH3</b>	2,710	3,011	2,710	2,500	2,710	2,500	2,710	2,710
<b>15-MRSA-26OCH3</b>	4,260	4,569	4,569	4,959	4,260	3,358	4,260	4,260
<b>16-MRSA-12OCH3</b>	4,824	4,509	4,215	4,215	3,910	4,215	4,509	4,509
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	<b>0,91</b>	<b>0,94</b>	<b>0,84</b>	<b>0,94</b>	<b>0,91</b>	<b>0,96</b>
<b>Q<sup>2</sup></b>	<b>0,71</b>	<b>0,84</b>	<b>0,60</b>	<b>0,70</b>	<b>0,61</b>	<b>0,76</b>	<b>0,55</b>	<b>0,53</b>
<b>LV</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>RMSEE</b>	<b>0,069</b>	<b>0,070</b>	<b>0,199</b>	<b>0,228</b>	<b>0,188</b>	<b>0,244</b>	<b>0,308</b>	<b>0,361</b>
<b>RMSEP</b>	<b>0,655</b>	<b>0,699</b>	<b>0,871</b>	<b>0,752</b>	<b>0,777</b>	<b>0,778</b>	<b>0,697</b>	<b>0,904</b>

\* Jedinjenja test seta

Rezultati *PLS* analize dobijenih *3D QSAR* modela prikazani su u obliku histograma *PLS* koeficijenata. Histogrami olakšavaju detekciju najuticajnijih varijabli i opisivanje farmakofornih karakteristika. Apcisa je podeljena na delove koji reprezentuju autokorelograme (DRY-DRY; O-O; N1-N1; TIP-TIP) i kroskorelograme (DRY-O; DRY-N1; DRY-TIP; O-N1; O-TIP; N1-TIP). Varijable sa pozitivnim vrednostima  $y$  pozitivno korelišu sa aktivnošću i obrnuto (varijable sa negativnim vrednostima  $y$  smanjuju aktivnost). Najveća apsolutna vrednost  $y$  označava varijablu sa najvećim uticajem na model. *3D QSAR* modeli su dobijeni za svih 8 ispitivanih MRSA sojeva:

### **MRSA 3**

Sa histograma *PLS* koeficijenata predloženog *3D QSAR MRSA 3* modela (Slika 35) izabrani su deskriptori od najvećeg značaja za antimikrobnu aktivnost ispitivanih jedinjenja. Deskriptori kao što su: v252: TIP-TIP; v306 (DRY-O); v376 (DRY-N1); v428 (DRY-TIP) pozitivno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću, za razliku od deskriptora: v227: TIP-TIP; v232 (TIP-TIP); v357: DRY-N1; v439: DRY-TIP; v455: DRY-TIP; v660: N1-TIP koji negativno korelišu (unutar obe ispitivane grupe).

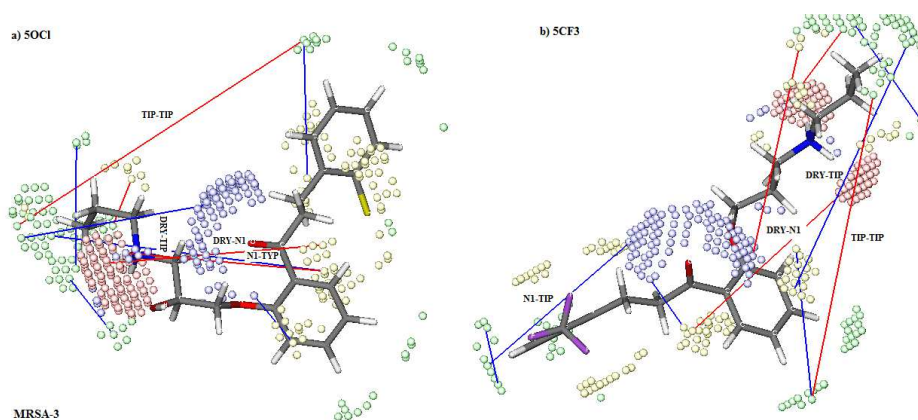


**Slika 35.** Histogrami *PLS* koeficijenata sa najvažnijim varijablama formiranog *3D QSAR* MRSA 3 modela.

Propafenonski derivati kod kojih je terminalni benzenov prsten *orto* supstituisan hlora i trifluorometil grupom (5OCl, 5CF<sub>3</sub>) su najpotentniji prema MRSA3 soju. Najizraženiji pozitivan uticaj na antibakterijsku aktivnost utvrđen je za:

TIP-TIP deskriptore (v252) koji je izračunat kao rastojanje između položaja 4 terminalnog benzenovog prstena B 5OCL derivata (Slika 36a) tj. centralnog benzenovog prstena 5CF<sub>3</sub> derivata (Slika 36 b) i propil grupe na N atomu sekundarnog amina i DRY-N1 deskriptor (v376) koji je izračunat kao rastojanje između karbonilne grupe kao akceptora vodonične veze i hidrofobne površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 36 a,b).

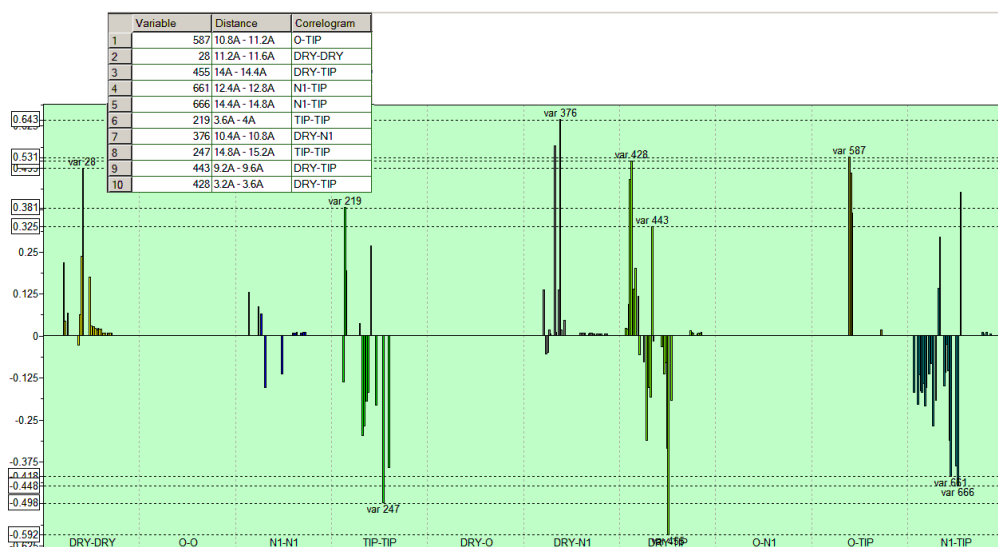
Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za DRY-TIP deskriptor (v455) koji je izračunat kao rastojanje između benzenovog prstena A i propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 36 a,b) i N1-TIP deskriptor (v660) koji predstavlja rastojanje između topološke površine benzenovog prstena i/ili N atoma sekundarne amino grupe (Slika 36 a), odnosno, O atoma karbonilne grupe (Slika 36 b), kao akceptora vodonične veze.



**Slika 36.** 3D QSAR (MRSA3) farmakoforni model a) 5OCl, b) 5CF3. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem, plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost.

## MRSA 5

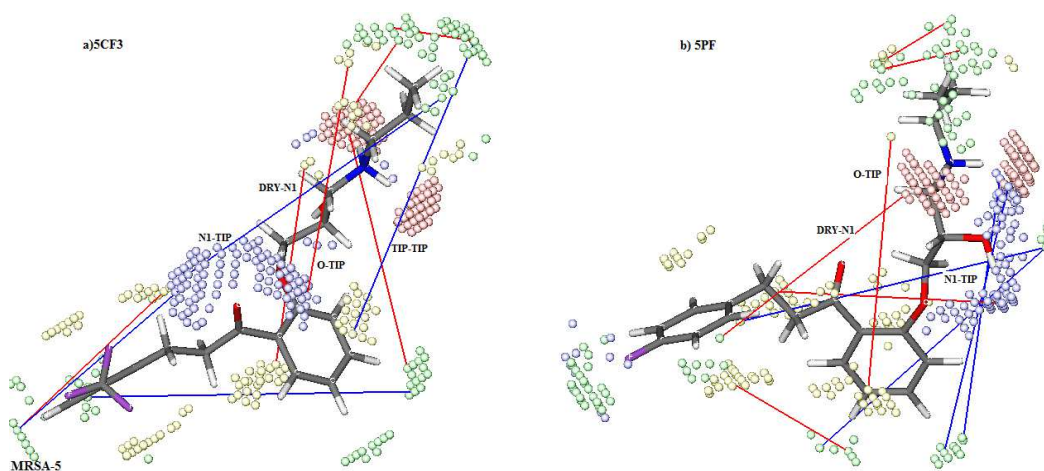
Sa histograma *PLS* koeficijena predloženog 3D QSAR **MRSA 5** modela (Slika 37) izabrano je deset deskriptora od najvećeg značaja za antimikrobnu aktivnost ispitivanih jedinjenja. Deskriptori kao što u: v28: DRY-DRY; v219: TIP-TIP; v376: DRY-N1; v428: DRY-TIP; v443: DRY-TIP; v587: O-TIP pozitivno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću. Deskriptori koji negativno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću su: v247: TIP-TIP; v455: DRY-TIP; v661: N1-TIP; v666: N1-TIP.



**Slika 37.** Histogrami *PLS* koeficijena sa najvažnijim varijablama formiranog 3D QSAR MRSA 5 modela

Najizraženiji pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost utvrđen je za: DRY-N1 deskriptor (v376) izračunatog kao rastojanje između hidrofobne površine benzenovog prstena i sekundarne alkoholne grupe, kao akceptora vodonične veze (Slika 38 a i b) i O-TIP deskriptor (v587) koji predstavlja rastojanje između sekundarne alkoholne grupe (kao donora vodonične veze) i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 38 a i b).

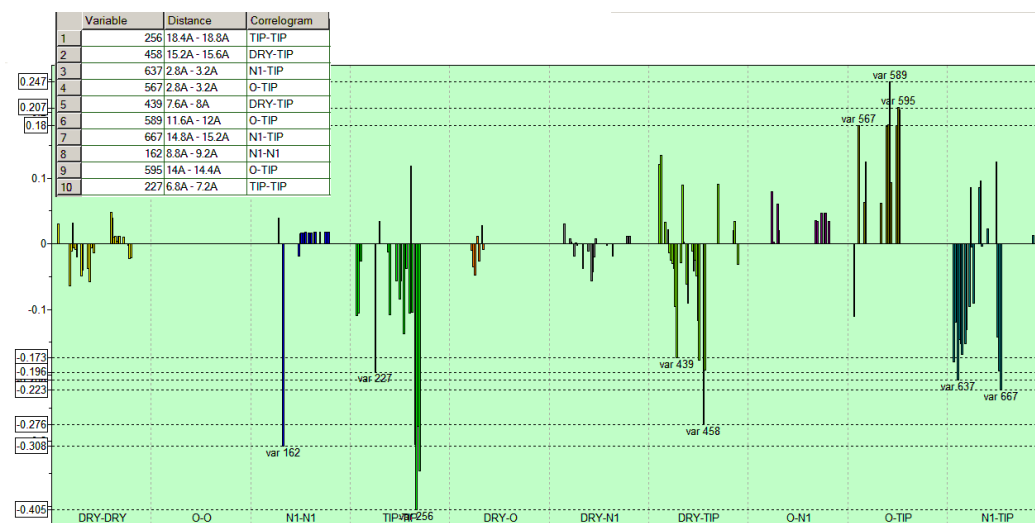
Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za N1-TIP deskriptor (v661, v666) koji predstavlja rastojanje između karbonilne (Slika 38 a)/sekundarne alkoholne grupe (Slika 38 b) (kao akceptora vodonične veze) i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina i TIP-TIP deskriptor (v247) koji je izračunat kao rastojanje između topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina i benzenovog prstena (Slika 38 a).



**Slika 38.** 3D QSAR (MRSA5) farmakoforni model a) 5CF3, b) 5PF. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem, plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost.

## MRSA 6

Sa histograma *PLS* koeficijenata predloženiog 3D QSAR MRSA 6 modela (Slika 39) izabrani su najznačajniji deskriptori. Pozitivnu korelaciju sa antimikrobnom aktivnošću pokazuju tri deskriptora: v567: O-TIP; v589: O-TIP; v596: O-TIP, dok deskriptori: v162: N1-N1; v227: TIP-TIP; v256: TIP-TIP; v439: DRY-TIP; v458: DRY-TIP; v637: N1-TIP; v667: N1-TIP negativno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću ispitivanih jedinjenja.

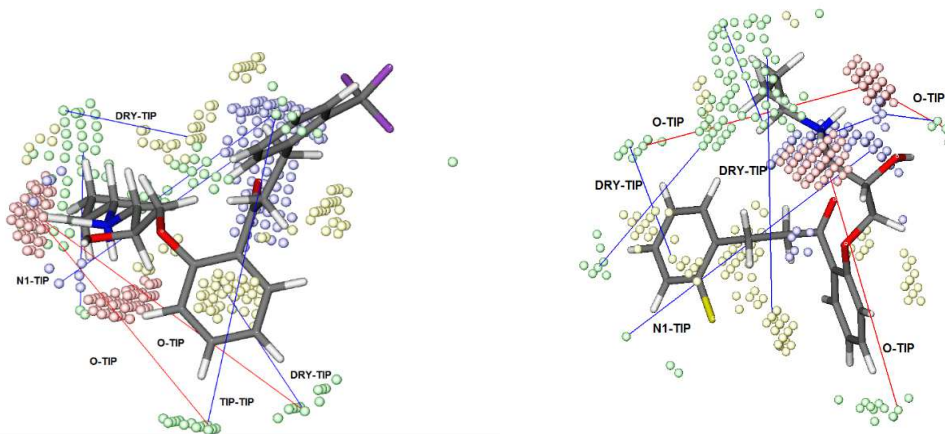


**Slika 39.** Histogrami *PLS* koeficijenta sa najvažnijim varijablama formiranog *3D QSAR* MRSA 6 modela

Najizraženiji pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost utvrđen je za: O-TIP deskriptor (v589, v595, v567) koji predstavlja rastojanje između sekundarne alkoholne grupe (kao donora vodonične veze) i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 40).

Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za TIP-TIP deskriptor (v256, v227) deskriptor između topoloških površina benzenovih prstenova i propil grupe na sekundarnom aminu, DRY-TIP deskriptor (v458) koji je izračunat kao rastojanje između benzenovog prstena A i propil grupe na N atomu sekundarnog amina i N1-TIP (v667) koji predstavlja rastojanje između karbonilne/sekundarne alkoholne grupe (kao akceptora vodonične veze) i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina.

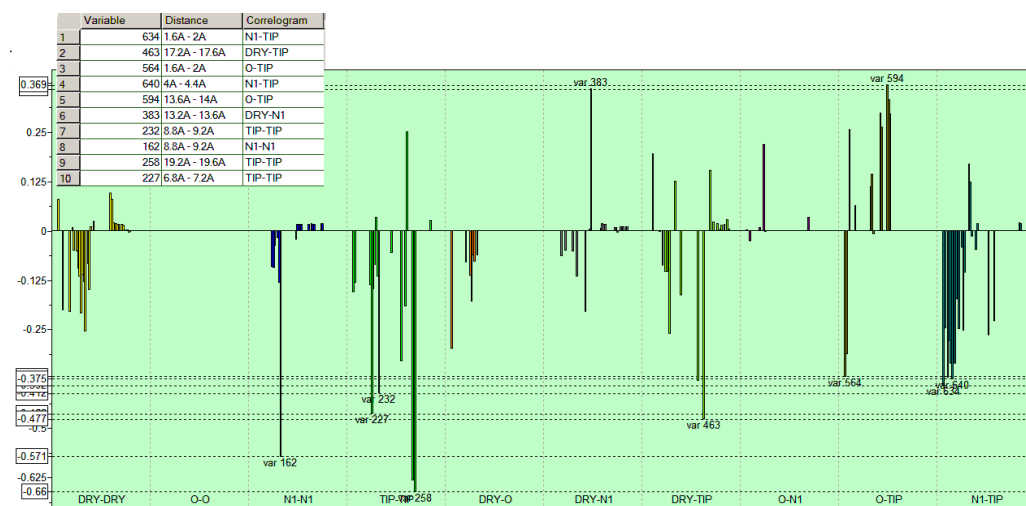




**Slika 40.** 3D QSAR (MRSA6) farmakoforni model a) 5CF3 , b) 5PF. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem, plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost.

## MRSA 8

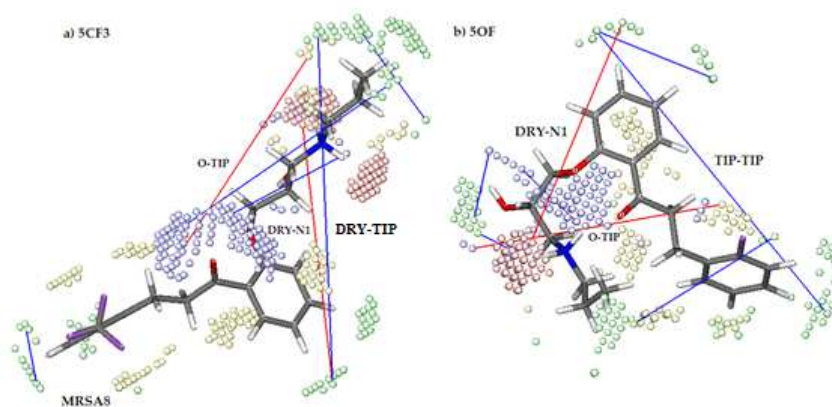
Sa histograma *PLS* koeficijena predloženiog 3D QSAR MRSA 8 modela (Slika 41) izabrano je deset deskriptora od najvećeg značaja za antimikrobnu aktivnost ispitivanih jedinjenja. Deskriptori kao što su: v383: DRY-N1; v594: O-TIP pozitivno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću, za razliku od deskriptora: v162: N1-N1; v227: TIP-TIP; v232: TIP-TIP; v258: TIP-TIP; v463: DRY-TIP; v564: O-TIP; v634: N1-TIP koji negativno korelišu.



**Slika 41.** Histogrami *PLS* koeficijena sa najvažnijim varijablama formiranog 3D QSAR MRSA 8 modela

Pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za O-TIP deskriptor (v594) koji je izračunat kao rastojanje između sekundarne alkoholne ili amino grupe (kao akceptora vodonične veze) i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 42 a) tj. topološke površine terminalnog benzenovog prstena (Slika 42 b) i DRY-N1 deskriptor (v383) koji predstavlja rastojanje između sekundarne amino grupe (kao akceptora vodonične veze) i hidrofobne površine benzenovog prstena (Slika 42 a i b).

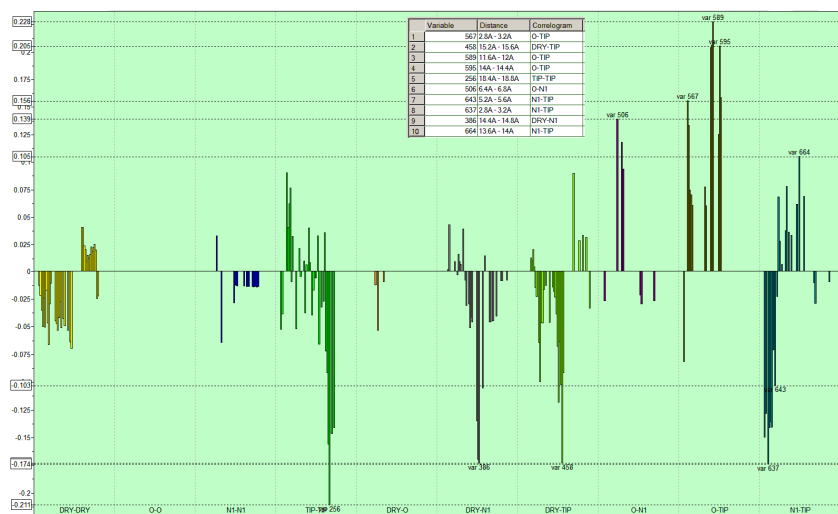
Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost utvrđen je za: DRY-TIP deskriptor (v463) izračunat između hidrofobne površine propil grupe na N-atomu sekundarnog amina i topološke površine benzenovog prstena (Slika 42 a) kao i TIP-TIP (v258) deskriptor između topoloških površina benzenovih prstenova i propil grupe na sekundarnom aminu (Slika 42 b).



**Slika 42.** 3D QSAR (MRSAS8) farmakoforni model a) 5CF3, b) 5PF. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem, plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost

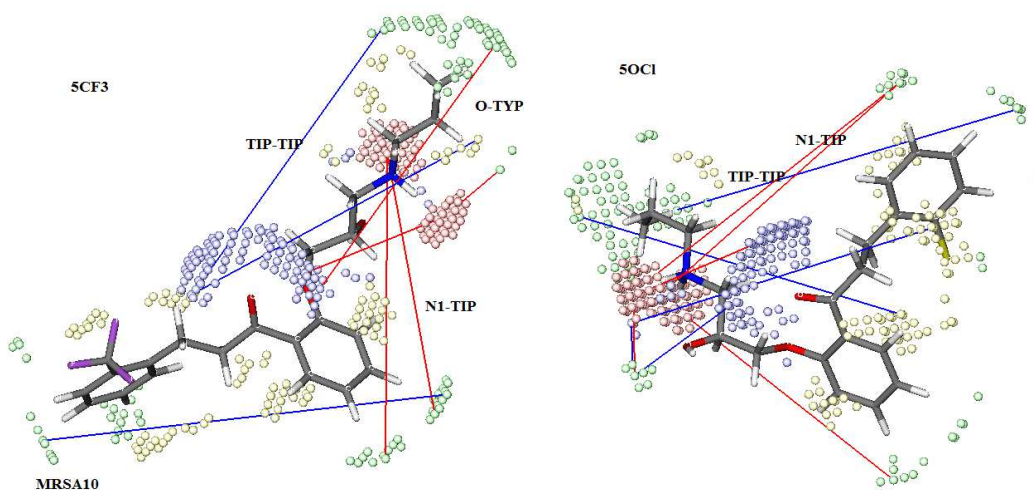
## MRSA 10

Sa histograma *PLS* koeficijenata predloženiog 3D QSAR MRSA 10 modela (Slika 43) izabrani su najznačajniji deskriptori koji definišu antimikrobnu aktivnost ispitivanih jedinjenja. Pozitivnu korelaciju pokazuje pet deskriptora: v506: O-N1; v567: O-TIP; v589: O-TIP; v595: O-TIP; v664: N1-TIP, dok deskriptori: v386: DRY-N1; v458: DRY-TIP; v637: N1-TIP; v643: N1-TIP; v640: N1-TIP negativno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću ispitivanih jedinjenja.



**Slika 43.** Histogrami *PLS* koeficijenta sa najvažnijim varijablama formiranog *3D QSAR* MRSA 10 modela

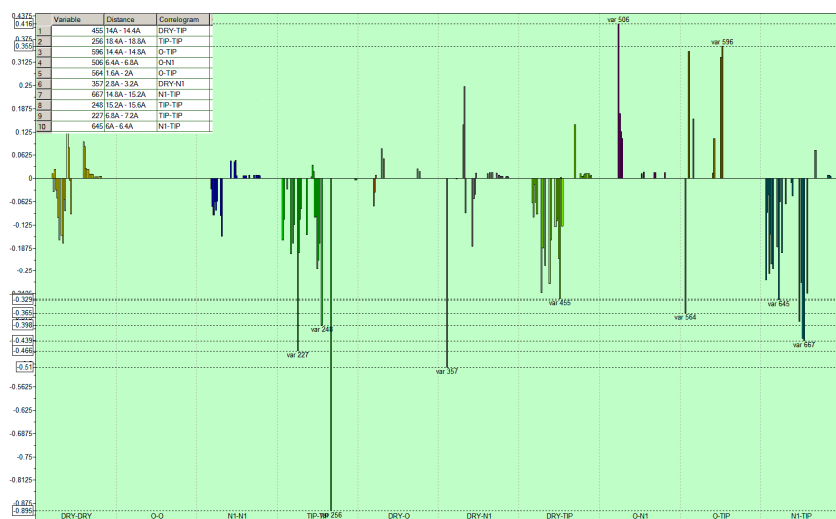
Pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za O-TIP deskriptor (v595) koji je izračunat kao rastojanje između sekundarne alkoholne grupe (kao akceptora vodonične veze) i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 44 a) i N1-TIP deskriptor (v664) izračunat između sekundarne amino grupe kao akceptora vodonične veze i hidrofobne površine benzenovog prstena (Slika 44 a i b). Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost utvrđen je za TIP-TIP (v256) deskriptor između topoloških površina benzenovih prstenova i propil grupe na sekundarnom aminu (Slika 44 a i b).



**Slika 44.** 3D QSAR (MRSA10) farmakoforni model a) 5CF3, b) 5OC1. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem, plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost

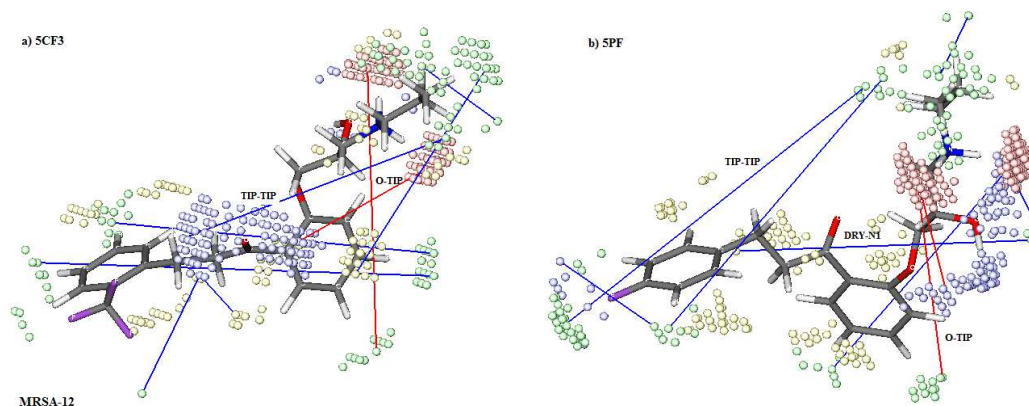
## MRSA 12

Sa histograma *PLS* koeficijenata predloženiog 3D QSAR MRSA 12 modela (Slika 45) izabrani su najznačajniji deskriptori koji definišu antimikrobnu aktivnost ispitivanih jedinjenja. Pozitivnu korelaciju pokazuju dva deskriptora: v506: O-N1; v596 O-TIP, dok deskriptori: v227: TIP-TIP; v248: TIP-TIP; v256: TIP-TIP; v357: DRY-N1; v455: DRY-TIP; v564: O-TIP; v645: N1-TIP; v667: N1-TIP negativno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću ispitivanih jedinjenja.



**Slika 45.** Histogrami *PLS* koeficijenta sa najvažnijim varijablama formiranog *3D QSAR* MRSA 12 modela

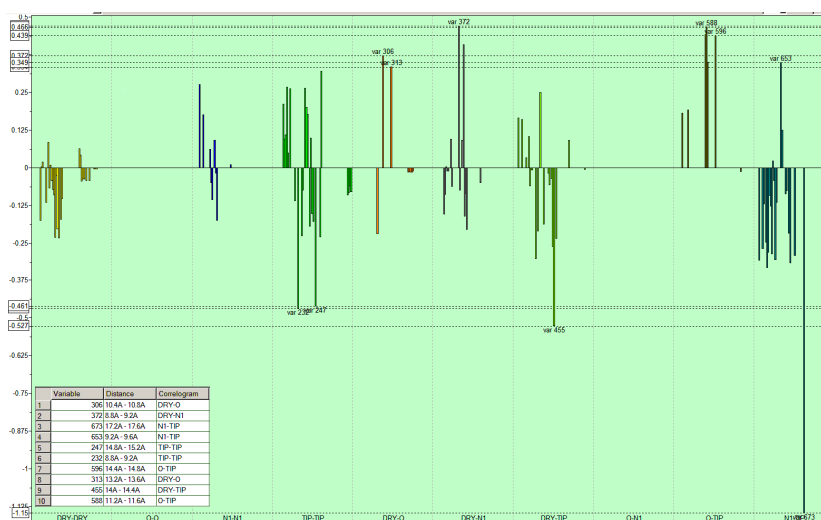
Pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za O-TIP deskriptor (v596) izračunat između sekundarne alkoholne grupe i topološke površine benzenovog prstena (Slika 46 a i b). Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost utvrđen je za TIP-TIP (v256) deskriptor između topoloških površina terminalnog benzenovog prstena i propil grupe na sekundarnom aminu (Slika 46 a i b) i DRY-N1 deskriptor (v357) izračunat između kiseonikovog atoma sekundarne alkoholne grupe (kao donora vodonične veze) i hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena (Slika 46 b).



**Slika 46.** 3D QSAR (MRSA12) farmakoforni model a) 5CF3 , b) 5PF. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem, plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost

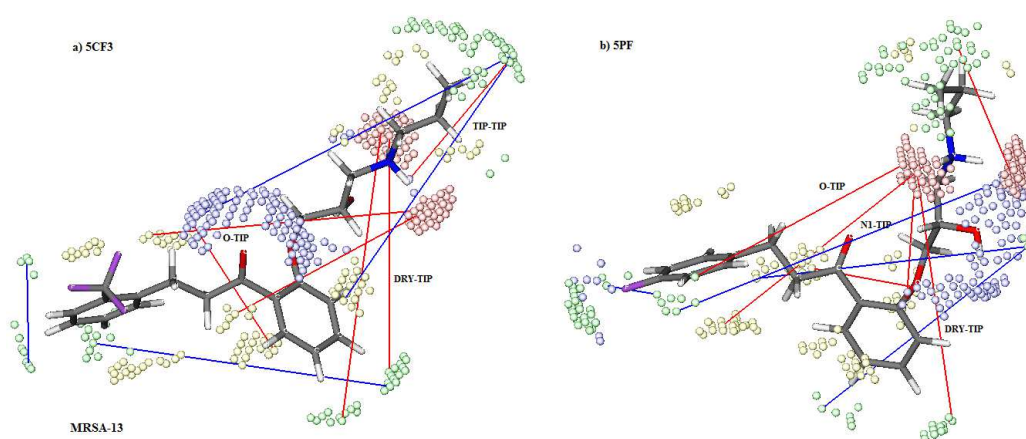
### MRSA 13

Sa histograma *PLS* koeficijenata predloženiog 3D QSAR MRSA 13 modela (Slika 47) izabrano je deset deskriptora koji su najbitniji za definisanje antimikrobne aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Pozitivnu korelaciju pokazuju deskriptori: v306: DRY-O; v313: DRY-O; v372: DRY-N1; v588: O-TIP; v596:O-TIP; v653: N1-TIP, dok deskriptori: v232: TIP-TIP; v247: TIP-TIP; v455: DRY-TIP; v673: N1-TIP negativno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću ispitivanih jedinjenja.



**Slika 47.** Histogrami *PLS* koeficijenata sa najvažnijim varijablama formiranog 3D QSAR MRSA 13 modela

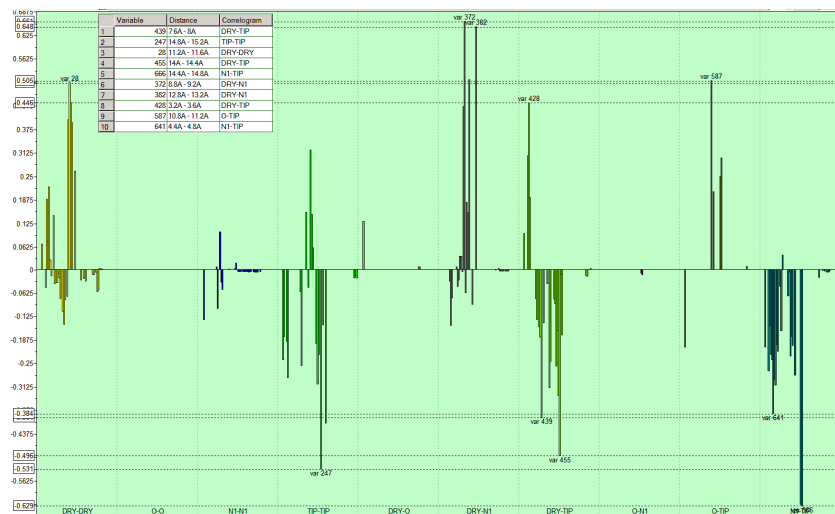
Pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za O-TIP (v596) deskriptor između sekundarne alkoholne/amino grupe kao donora vodonične veze i topološke površine terminalnog benzenovog prstena (Slika 48 a i b) i DRY-O (v306) deskriptora izračunatog kao rastojanje između sekundarne alkoholne/amino grupe i hidrofobne površine benzenovog prstena. Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost utvrđen je za: TIP-TIP (v247) deskriptor između topoloških površina benzenovog prstena i propil grupe na sekundarnom aminu (Slika 48 a), N1-TIP deskriptor (v673) izračunat između N atoma sekundarnog amina kao akceptora vodonične veze i topološke površine benzenovih prstena (Slika 48 b).



**Slika 48.** 3D QSAR (MRSA12) farmakoforni model a) 5CF3 , b) 5PF. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem, plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost

### MRSA (ATCC 43300)

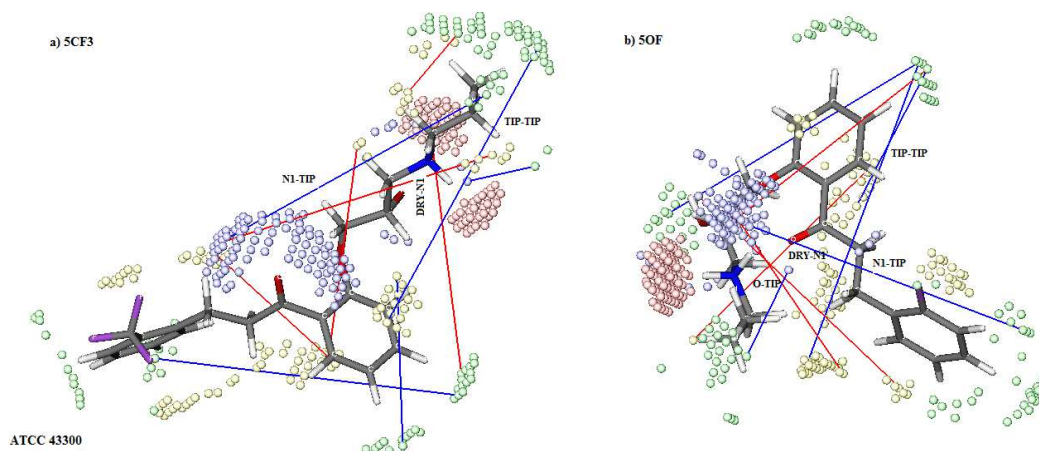
Sa histograma *PLS* koeficijenata predloženog 3D QSAR MRSA (ATCC 43300) modela (Slika 49) izabrani su deskriptori koji najbolje definišu antimikrobnu aktivnost ispitivanih jedinjenja. Pozitivnu korelaciju pokazuju deskriptori: v28: DRY-DRY; v372: DRY-N1; v382: DRY-N1; v428: DRY-TIP; v587: O-TIP, dok deskriptori: v247: TIP-TIP; v439: DRY-TIP; v455: DRY-TIP; v641: N1-TIP; v666: N1-TIP negativno korelišu sa antimikrobnom aktivnošću ispitivanih jedinjenja.



**Slika 49.** Histogrami *PLS* koeficijena sa najvažnijim varijablama formiranog *3D QSAR MRSA (ATCC 43300)* modela.

Pozitivan uticaj na antimikrobnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za O-TIP (v587) deskriptor koji je izračunat kao rastojanje između sekundarne alkoholne grupe i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 50 b); DRY-N1 deskriptor (v 372) koji predstavlja rastojanje između karbonilne grupe kao akceptora vodonične veze i hidrofobne površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina (Slika 50 a i b). Najizraženiji negativan uticaj na antimikrobnu aktivnost utvrđen je za: N1-TIP deskriptor (v666) koji definiše rastojanje između sekundarne alkoholne grupe (Slika 50 b)/karbonilne grupe (Slika 50 a) i topološke površine propil grupe na N atomu sekundarnog amina i TIP-TIP (v247) deskriptor između topoloških površina benzenovog prstena i propil grupe na sekundarnom aminu (Slika 50 a i b).





**Slika 50.** 3D QSAR (ATCC 43300) farmakoforni model a) 5CF3 , b) 5OF. Crvenim linijama su predstavljene deskriptori sa pozitivnim uticajem, a plavim linijama deskriptori sa negativnim uticajem na antimikrobnu aktivnost

Formirani 3D QSAR modeli i definisane farmakoforne karakteristike ispitivanih jedinjenja mogu da budu osnov za dizajniranje novih jedinjenja sa proširenom antimikrobnom aktivnošću koji se kao potencijalni lekovi mogu koristiti u terapiji infekcija izazvanih MRSA.

#### 4.5. Rezultati PAMPA testova i ADMET Predictor-a

U izvedenim studijama ispitivanja antibakterijske aktivnosti propiofenonskih derivata, halkonska grupa jedinjenja je pokazala slabiji antibakterijski efekat u poređenju sa propafenonskom grupom jedinjenja. Halkoni (u opsegu ispitivanih koncentracija) nisu pokazali antimikrobni efekat prema visoko rezistentnim *P. aeruginosa* sojevima.

Razlike u antibakterijskom efektu mogu biti posledica različitog mehanizma antibakterijskog delovanja. Izvedene *in silico* studije ukazuju da propafenonski derivati najverovatnije efekat ostvaruju menjajući aktivnost jonskih kanala u ćelijskoj membrani bakterija, dok halkonska grupa gradi helatne komplekse čime se smanjuje koncentracija jona metala od vitalnog značaja za život bakterija. Drugo objašnjenje je da grade helatne komplekse jer kao elektrofili, mogu acilovati –SH grupe proteina bakterijske ćelije.

Efekat i propafenonskih i halkonskih derivata zavisi od prolaza kroz ćelijsku membranu koja predstavlja biološku barijeru. Ispitivanje permeabilnosti navedenih jedinjenja je izvršeno PAMPA testom u trajanju od 24 h (vreme inkubacije u *in vitro* ispitivanjima antibakterijske aktivnosti). Ispitivanje je izvedeno u triplikatu, a rezultati predstavljeni kao srednje vrednosti sva tri merenja.

Nakon izvršenih PAMPA ispitivanja primenom LC-MS-MS metode izračunata je retencija propiofenonskih derivata u membrani (R) primenom jednačine:

$$R = 1 - \frac{C_D}{C_0} - \frac{V_R}{V_D} \cdot \frac{C_R}{C_0}$$

$$\%R = 100 \cdot R$$

gde su:

$C_0$ – koncentracija ispitivanih propiofenonskih derivata u donorskoj ćeliji na početku inkubacije koja je ekvivalentna koncentraciji u polaznom rastvoru ( $\mu\text{M}$ );

$C_D$ – koncentracija ispitivanih propiofenonskih derivata u donorskom odeljku nakon 24 h inkubacije ( $\mu\text{M}$ );

$C_R$ – koncentracija ispitivanih propiofenonskih derivata u akceptorskom odeljku nakon 24 h inkubacije ( $\mu\text{M}$ );

$V_R$  – zapremina rastvora u akceptorskom odeljku;

$V_D$  – zapremina rastvora u donorskog odeljka.

Pored eksperimentalno dobijenih rezultata, procenat retencije ispitivanih jedinjenja je određen *in silico*, primenom računarskog programa *MembranePlus*. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 32.

**Tabela 32.** Vrednosti retencije određene PAMPA testom ( $R_{exp}$ ) i izračunate u programu *MembranePlus* ( $R_{Meb.Plus}$ )

	<b>jedinjenje</b>	$R_{exp}$ (%)	$R_{Meb.Plus}$ (%)
1	propafenon	47,26	38,63
2	5OF	44,29	42,11
3	5PF	46,52	43,03
4	5OCH3	46,32	43,94
6	5CF3	48,58	53,24
7	1OCl	>99,99	99,11
8	1OCF3	>99,99	99,32
9	1PCF3	>99,99	99,41
10	H2,6OCH3	>99,99	98,06
11	H4F2CH3	>99,99	99,20
12	1OCH3	>99,99	98,87
13	1OF	>99,99	98,78
14	1OOCH3	>99,99	98,87
15	1PF	>99,99	98,83
16	1MCH3	>99,99	98,92

Eksperimentalno dobijeni podaci, na osnovu *in vitro* PAMPA testova, ukazuju da je retencija halkona u membrani nakon 24 h, pri pH 7,4 veoma visoka (>99,99%), dok je retencija propafenonskih derivata manja (od 44,29% za 5OF do 48,58% za 5CF3). Visoka retencija halkona u ćelijskoj membrani može biti razlog slabog antimikrobnog efekta prema *P. aeruginosa* soju jer najveći deo molekula ostaje u spoljašnjoj membrani i ne prodire u ćeliju. Kako je retencija propafenonskih derivata manja može se zaključiti da antibakterijski efekat ostvaruju putem porina i/ili jonskih kanala unutar ćelijske membrane. Poređenjem eksperimentalno dobijenih i izračunatih vrednosti studentovim t testom ( $t=0,320 < t_{tab}=2,131$ ) zaključeno je da ne postoji statistički značajna razlika u dobijenim rezultatima pa se *MembranePlus* može sa pouzdanošću koristiti u izračunavanju retencije propiofenonskih derivata.

Pored poznavanja fizičko-hemijskih osobina potencijalno novih lekova neophodno je ispitati i procese apsorpcije, distribucije, metabolizama, eliminacije i toksičnosti novih jedinjenja. Primenom *ADMET Predictor-a* (247) predviđen je farmakokinetički i toksikološki profil propafenonskih i halkonskih derivata. Rezultati su prikazani u Tabeli 33.

**Tabela 33. ADMET osobine ispitivanih jedinjenja**

propafenonski derivati									
	% slobodnog leka	Supstrat za Pgp	Lipinski pravilo 5	Interakcija sa CYP 450	Interakcija sa CYP izoformama	Afinitet za hERG (%)	Afinitet za hERG (IC <sub>50</sub> ; mol/l)	Toksičnost (od 0 do 7)	ADMET Risk
5OF	12,84	+	0	1	D6	Toksičan (99%)	5,89	1	2
5OCl	10,94	+	0	1	D6	Toksičan (99%)	6,09	1	2
5CF3	12,76	+	0	1	D6	Toksičan (99%)	5,72	1	3
5OCH3	12,42	+	0	1	D6	Toksičan (99%)	5,62	0	1
5PF	13,31	+	0	1	D6	Toksičan (99%)	5,98	0	1
5PCH3	12,77	+	0	1	D6	Toksičan (93%)	5,48	0	1
Halkonski derivati									
1OF	13,71	-	0	1	1A	Netoksičan (67%)	5,19	0	1
1OCl	9,6	-	1(Log P)	1	1A	Toksičan (80%)	5,54	1	3
1PF	14,04	-	0	1	1A	Netoksičan (68%)	5,12	1	3
1OOH	12,62	-	0	0	-	Netoksičan (76%)	4,88	1	1
1OCF3	12,65	-	1(Log P)	0	-	Toksičan (78%)	5,07	1	3
1POH	13,63	-	0	0	-	Netoksičan (79%)	4,8	0	0
1OCH3	12,59	-	0	0	-	Netoksičan (67%)	5,07	0	1
1OOCH3	11,73	-	0	0	-	Netoksičan (67%)	4,95	1	1
H2,6OCH3	10,62	-	0	0	-	Netoksičan (68%)	4,92	1	1
H2CH34F	12,75	-	1 (Log P)	1	1A	Netoksičan (69%)	5,07	0	2
1PCH3	12,82	-	0	0	-	Netoksičan (67%)	5,06	0	1
1PCF3	12,56	-	1(Log P)	1	1A	Toksičan (80%)	5,14	1	4
1MF	14,04	-	0	1	1A	Netoksičan (67%)	5,23	1	2
1MCH3	12,82	-	0	0	-	Netoksičan (67%)	5,06	0	1
1MOH	13,93	-	0	0	-	Netoksičan (69%)	4,99	0	0

U programu *ADMET Predictor* izračunati su sledeći *ADMET* parametri:

- vrednosti za Lipinski *pravilo 5*;
- afiniteti vezivanja za: proteine plazme, P-glikoprotein, hERG kalijumov kanal, kao i interakcije sa izoformama CYP 450.

Značajan parametar u proceni *ADMET* osobina je *pravilo 5* koje ima numeričke vrednosti od 0 do 5. Numeričke vrednosti se pridružuju jedinjenju na osnovu sledećih kriterijuma:  $\text{Log } P > 4,15$  (prekomerna lipofilnost),  $M_r > 500$  (voluminozan molekul),  $\text{HBD} > 5$  (broj vodonik donorskih grupa u molekulu),  $\text{HBA} > 10$  (broj vodonik akceptorskih grupa u molekulu). Većina komercijalno dostupnih lekova za *per os* primenu ne krši više od jednog pravila. Rezultati pokazuju da propafenonski derivati ispunjavaju sve zahteve pravila pet dok u grupi ispitivanih halkona jedinjenja sa voluminoznim trifluorometil grupama u *orto* ili *para* položajima prstena B (1PCF3 i 1OCF3), hlorom u *orto* položaju (1OCl) kao i disupstituisani H<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>4F su visoko lipofilna jedinjenja ( $\text{Log } P > 4,17$ ) i krše jedno od navedenih pravila (dobijaju numeričku vrednost 1 za ispitivani parametar *pravilo 5* (Tabela 33).

P-glikoprotein ima važnu ulogu u distribuciji i ekskreciji lekova, indukuje rezistentnost na lekove (MDR) i posreduje u lek-lek interakcijama pa je od velikog značaja predvideti da li ispitivano jedinjenje predstavlja supstrat za PgP. Rezultati pokazuju da su propafenonski derivati PgP supstrati za razliku od halkonskih jedinjenja za koja *ADMET Predictor* nije predvideo moguće interakcije sa PgP.

Metabolizam igra ključnu ulogu u bioraspoloživosti lekova i lek-lek interakcijama. CYP 450 su najvažniji enzimi koji učestvuju u biotransformaciji najvećeg broja lekova. Oko 90 do 95 % metaboličkih reakcija koje su posredovane CYP enzimima odvijaju se preko izoformi: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4. Primenom *ADMET Predictor*-a utvrđena je interakcija propafenonskih derivata sa 2D6 CYP izoformom koji učestvuje u aromatičnoj hidroksilaciji prstena A i nastajanju aktivnih metabolita. Mono fluorirani, *para* trimetilfluorirani, *orto* hlorovani i disupstituisani 2-metil-4-fluoro-halkoni su supstrati za CYP 450 1A, dok za ostale halkone prediktor nije predvideo rizik na nivou CYP 450 izoformi.

Veliki broj lekova koji ne deluju mehanizmom modulacije jonskih kanala mogu da ostvaruju interakciju sa hERG kalijumovim kanalom što za posledicu ima poremećaj srčanog ritma sa mogućim fatalnim ishodom. Kao modulatori jonskih kanala propafenonski derivati pokazuju afinitet prema hERG kanalu, ali samo u visokim koncentracijama ( $IC_{50}$  oko 6 mol/l, toksičnim se smatraju jedinjenja čiji je vrednost  $IC_{50}$  1 mol/l i manje) (247). Afinitet vezivanja za kalijumov hERG kanal većine halkonskih derivata je nizak (<80%) pa ne postoji rizik od interakcije na nivou hERG kanala. Granične vrednosti su dobijene za tri najlipofilnija halkona (1OCF3, 1PCF3 i 1OCl).

Ako se posmatraju ukupni rizici (Toksičnost i *ADMET* Risk) procenjeni programom *ADMET Predictor* propafenonski derivati 5OCH3, 5PF i 5PCH3 su jedinjenja kod kojih izračunati (predviđeni) rizici toksičnosti nisu od značaja, kao ni kod 1OF, 1POH, 1OCH3, H2,6OCH3, 1PCH3, 1MCH3 i 1MOH jedinjenja iz halkonske grupe. Značajniju toksičnost program predviđa za jedinjenja 5OF, 5OCl, 1MF, H2CH34F, 1OOH, 1OOCH3. Najveći rizik procenjen je za najvoluminozniji, najlipofilniji propafenonski derivat sa trifluorometil grupom u *orto* položaju (5CF3), kao i za halkonska jedinjenja koja sadrže istu grupu u strukturi (*ADMET* Risk 3-4).

## **5. ZAKLJUČAK**

1. *Claisen-Schmidtovom* aldolnom kondenzacijom iz 2-hidroksiacetofenona i mono- ili disupstituisanih benzaldehida sintetisano je šest mono- i disupstituisanih 1-(2-hidroksifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona (halkona). Dobijena jedinjenja su prečišćena metodom tankoslojne hromatografije, snimljeni IR spektri a struktura potvrđena snimanjem NMR spektara.

2. Primenom RP HPLC metode određena je lipofilnost (Log P) za 18 priopiofenonskih derivata koji su prema strukturalnoj sličnosti podeljeni u dve grupe: halkonsku i propafenonsku. Određene su vrednosti  $t_r$  i  $t_0$ , faktora kapaciteta  $k$ , ispitana zavisnost dobijenih Log  $k$  vrednosti od udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi i ekstrapolacijom određen parametar lipofilnosti Log  $k_w$  za svako ispitivano jedinjenje. Iz konstruisane standardne krive izračunate su Log  $P_{Exp}$  vrednosti i upoređene sa izračunatim vrednostima Log P, dobijene primenom različitih teorijskih algoritama zasnovanih na metodama fragmentacije.

3. Primenom modifikovane metode mućkanja (*shake-flask*) određen je distribucioni koeficijent šest propafenonskih derivata. Eksperimentalno dobijeni podaci su korelisani sa izračunatim vrednostima Log D, koje su dobijene korišćenjem programskog paketa *Marvin Sketch*.

4. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti derivata halkona dobijeni primenom bujon mikrodilucione metode ukazuju da:

- halkoni ispoljavaju antimikrobnu aktivnost prema standardnim sojevima. Veću osetljivost pokazuju sojevi Gram pozitivnih bakterija (što se može objasniti razlikama u građi ćelijskog zida Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija). Naj snažniju antimikrobnu aktivnost su pokazali halkoni iz grupe difenola 1POH, 1MOH i 1OOH (MIK od 0,052 mM). Antimikrobna aktivnost halkona uglavnom prati redosled elektronegativnosti supstituenata uvedenih u terminalni benzenov prsten.
- na kliničkim izolatima MRSA najbolju aktivnost unutar halkonske grupe pokazuju jedinjenja sa hlora i trifluorometil grupama u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena, 1OCl i 1OCF<sub>3</sub> (MIK od 13 do 60  $\mu$ M tj. od 3,9 do 125  $\mu$ g/mL).
- jedinjenja halkonske grupe pokazuju slabu aktivnost na 11 kliničkih izolata *P. aeruginosa*, dobijene MIK vrednosti prelaze 1000  $\mu$ g/mL.



5. Da bi se odredio deo strukture odgovoran za antimikrobno dejstvo halkona i uspostavila korelacija između strukture i aktivnosti ispitivanih jedinjenja izvedena je *QSAR* analiza. Za izvođenje studije odabrane su dve grupe po pet statistički značajnijih deskriptora koji najbolje korelišu sa  $\log(1/\text{MIK})$ : deskriptori koji opisuju vodonik donorske osobine funkcionalnih grupa i deskriptori koji definišu kiselost fenolske grupe. Rezultati *QSAR* analize mogu se sumirati na sledeći način:

- antibakterijska aktivnost zavisi od vodonik-donorskih osobina fenolske grupe u položaju 2' prstena A; povećanje kiselosti 2'-hidroksihalkona favorizuje antibakterijsku aktivnost;
- uvođenje fenolskih grupa u prsten B, uprkos njihovim elektrondonorskim osobinama, doprinosi antimikrobnoj aktivnosti, nezavisno od položaja *orto*, *meta* ili *para*;
- polarnost halkona kao i njihova elektronegativnost su od velikog značaja za osetljivost Gram negativnih bakterija prema halkonima;
- pored tiolne alkilacije mehanizam antibakterijske aktivnosti halkona uključuje i građenje helatnih kompleksa koji ujedno mogu biti i potencijalni alkilujuć agensi.

6. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti propafenona i propafenonskih derivata dobijeni primenom bujon mikrodilucione metode ukazuju da:

- jedinjenja propafenonske grupe pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost prema standardnim sojevima Gram pozitivnih bakterija i Gram negativnih bakterija u odnosu na halkone. Zaključeno je da supstitucija *orto* položaja u terminalnom benzenovom prstenu doprinosi antimikrobnom dejstvu prema sojevima Gram pozitivnih bakterija, a najaktivnije jedinjenje je *orto* fluorirani derivat 5OF ( 0,079 mM ).
- najizraženiji inhibitorni efekat na 7 kliničkih izolata MRSA pokazuje jedinjenje sa trifluorometil grupom u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena ( MIK u opsegu od 2,24 do 8,96  $\mu\text{M}$  tj. od 1 do 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Kod *para* supstituisanih jedinjenja aktivnost opada sa porastom voluminoznosti supstituenta (5PF i 5PCH3).
- propafenonski derivati pokazuju antimikrobnu aktivnost prema 11 kliničkih izolata *P. aeruginosa*. Rezultati pokazuju da supstituenti sa elektron akceptorskim osobinama doprinose aktivnosti i da najveću aktivnost pokazuje jedinjenje sa trifluorometil grupom u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena ( 0,56 mM ).

7. Izvedene su molekulske *docking* studije antimikrobne aktivnosti propafenonskih derivata. Za izvođenje studije korišćena je kristalografska struktura zatvorenog i otvorenog K<sup>+</sup> kanala deponovana u bazi *Protein Data Bank*. Ispitivane strukture jedinjenja su zajedno sa strukturom proteina pripremljene za analizu u programu *Autodock Tools*. *Docking* eksperimenti su pokazali:

- da se vezivno mesto propafenona i njegovih analoga nalazi u pori kanala, ispod selektivnog filtera;
- da su ključne interakcije karbonilne grupe, sekundarne alkoholne i sekundarne amino grupe sa Thr<sup>75</sup> (vodonična veza);
- da su značajne hidrofobne  $\pi$ -alkil interakcije oba benzenova prstena svih 7 ispitivanih jedinjenja sa Ile<sup>100</sup> (5OCl derivat ostvaruje isti tip interakcije dodatno i preko hlora grupe);
- da fluoro grupa 5OF derivata ostvaruje elektrostatičku interakciju sa Gly<sup>104</sup>, ali samo sa zatvorenim kanalom. Isti tip interakcije ostvaruju i tri fluorova atoma 5CF3 derivata sa Thr<sup>75</sup>.

8. *Docking* studijama ispitana je interakcija propafenonskih derivata sa transportnim porinom *Pseudomonas aeruginosa*. Ispitivanje je rađeno sa kristalografskom strukturom OccK4 porina. *Docking* rezultati ukazuju da se vezivno mesto ispitivanih jedinjenja nalazi u unutrašnjosti porina, između tri unutrašnje petlje i da najveći afinitet vezivanja pokazuje 5PCH3 jedinjenje koje ostvaruje najbolju interakciju sa hidrofobnim džepom. Sva ispitivana jedinjenja preko protonovane sekundarne amino ili sekundarne alkoholne grupe bočnog niza grade stabilne vodonične veze sa ostacima Thr<sup>295</sup> i stabilizirajuće hidrofobne interakcije:

S- $\pi$  (sa atomom sumpora metionina Met<sup>67</sup>), alkil- $\pi$  interakcije (sa metil grupama Val<sup>123</sup> i Leu<sup>288</sup>), katjon- $\pi$  interakcije (sa gvanidino grupom Arg<sup>124</sup>) kao i anjon- $\pi$  interakcije (sa karboksilatnim anjonom Asp<sup>121</sup>).

9. Dobijeni rezultati pokazuju da fluorirani derivati (5CF3, 5OF) u pet opadajućih koncentracija pokazuju inhibitorni efekat na produkciju biofilma kod 9 kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*. Inhibicija produkcije biofilma pod je dozno zavisna; jači inhibitorni efekat pokazuje

5OF derivat. Najznačajniji inhibitorni efekat na produkciju biofilma 5OF derivat je ostvario u najvećoj primenjenoj koncentraciji (1,27 mM tj. 500 $\mu$ g/mL).

10. Fluorirani derivati (5CF3, 5OF) pokazuju inhibitorni efekat na produkciju pigmenta piocijanina kod 8 kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*. Inhibicija produkcije biofilma pod uticajem oba fluorirana derivata je dozno zavisna, a inhibitorni efekat je izraženiji kod 5OF derivata pri koncentraciji od 500  $\mu$ g/mL (produkcija pigmenta je smanjena na 27,1%).

11. Izvedena je *QSAR* studija inhibicije rasta 8 MRSA sojeva. Za formiranje i validaciju osam nezavisnih *3D QSAR* modela korišćeno je 16 optimizovanih struktura propiofenonskih derivata halkonske i propafenonske grupe. Kao nezavisno promenljive vrednosti korišćeni su konstitucionalni, geometrijski, fizičko-hemijski i elektronski deskriptori. Na osnovu vrednosti statističkih parametara  $R^2$ , *RMSEE*,  $Q^2$ , i *RMSEP* odabrani su optimalni *3D QSAR* modeli koji pokazuju visoku prognostičku sposobnost.

12. Ispitana je permeabilnost propiofenonskih derivate PAMPA testom i *in silico* simulacijom u računarskom programu *MembranePlus*. Eksperimentalno dobijeni podaci ukazuju da je retencija halkona >99,99% što može biti razlog slabog antimikrobnog efekta prema *P. aeruginosa* soju. Kako je retencija propafenonskih derivata manja može se zaključiti da antibakterijski efekat ostvaruju putem porina i/ili jonskih kanala unutar ćelijske membrane.

13. Primenom *ADMET Predictor*-a predviđen je farmakokinetički i toksikološki profil ispitivanih jedinjenja. Najveći rizik procenjen je za najvoluminozniji, najlipofilniji propafenonski derivat sa trifluorometil grupom u *orto* položaju (5CF3), kao i za halkonska jedinjenja koja sadrže istu grupu u strukturi (*ADMET Risk* 3-4).

## **6. LITERATURA**

1. Denyer SP, Hodges N, Gorman SP, Gilmore BF: Hugo & Russell's Pharmaceutical microbiology, 8th edition, Wiley-Blackwell (2011).
2. Lowes DJ, Guiguemde WA, Connelly MC, Zhu F, Sigal MS, Clark JA et al. Optimization of propafenone analogues as antimalarial leads. *J Med Chem.* 2011;54(21):7477-85.
3. Le Guennec JY, Ouadid-Ahidouch H, Soriani O, Besson P, Ahidouch A, Vandier C. Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2007;2(3):189-202.
4. Arcangeli A., Becchetti A. New Trends in Cancer Therapy: Targeting Ion Channels and Transporters. *Pharmaceuticals.* 2010; 3:1202-1224.
5. Minghua L, Zhi-Gang X. Ion channels as targets for cancer therapy. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2011; 3(2):156-166.
6. Kunzelmann K. Ion Channels and cancer. *J.Membrane Biol.* 2005; 205:159-173.
7. Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discov Today.* 2000;5(11):506-520.
8. Triggle DJ. The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Pharmacol.* 1999;375(1-3):311-25.
9. Becchetti A. Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301(2):C255-65.
10. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pillozzi S, Becchetti A. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Curr Med Chem.* 2009;16(1):66-93.
11. Armstrong CM. Gating currents. *Scholarpedia.* 2008; 3(10):3482-3489
12. Gojković- Bukarica Lj, Kažić T. Jonski kanali i kanalopatije.U: Klinička kardiovaskularna farmakologija.Urednik: Kažić T, Ostojić M., 4. izdanje, Integra, Beograd 2004;37-56.
13. Kažić T. Lekovi propiv aritmije U: Klinička Kardiovaskularna farmakologija, Urednik, Kažić T., Ostojić M., Integra , Beograd, 2004; 407-448.
14. Batovska DI, Todorova IT. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Curr Clin Pharmacol.* 2010;5(1):1-29.

15. Jabeen I, Pleban K, Rinner U, Chiba P, Ecker GF. Structure-activity relationships, ligand efficiency, and lipophilic efficiency profiles of benzophenone-type inhibitors of the multidrug transporter P-glycoprotein. *J Med Chem.* 2012;55(7):3261-73.
16. Fischer M. Propafenone-A new generation anti-arrhythmia agent. *Med Klin.* 1980;75(1):39-41.
17. Chiba P, Burghofer S, Richter E, Tell B, Moser A, Ecker G. Synthesis, pharmacologic activity, and structure-activity relationships of a series of propafenone-related modulators of multidrug resistance. *J Med Chem.* 1995;38(14):2789-93.
18. Weisman JL, Liou AP, Shelat AA, Cohen FE, Guy RK, DeRisi JL. Searching for new antimalarial therapeutics amongst known drugs. *Chem Biol Drug Des.* 2006;67(6):409-16.
19. Tasanor O, Ernst M, Thriemer K, Ecker GF, Noedl H, Chiba P. Characterization of a novel class of antimalarials and its applicability to plasmodial target identification. *Wien Klin Wochenschr.* 2007;119(19-20 Suppl 3):83-7.
20. Lowes D, Pradhan A, Iyer LV, Parman T, Gow J, Zhu F et al. Lead optimization of antimalarial propafenone analogues. *J Med Chem.* 2012;55(13):6087-93.
21. Thai KM, Windisch A, Stork D, Weinzinger A, Schiesaro A, Guy RH et al. The hERG potassium channel and drug trapping: insight from docking studies with propafenone derivatives. *ChemMedChem.* 2010;5(3):436-42.
22. Madeja M, Steffen W, Mesic I, Garic B, Zhorov BS. Overlapping binding sites of structurally different antiarrhythmics flecainide and propafenone in the subunit interface of potassium channel Kv2.1. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33898-905.
23. Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem.* 2007;42(2):125-37.
24. Ansari FL, Nazir S, Noureen H, Mirza B. Combinatorial synthesis and antibacterial evaluation of an indexed chalcone library. *Chem Biodivers.* 2005;2(12):1656-64.
25. Lahtchev KL, Batovska DI, Parushev SP, Ubiyovk VM, Sibirny AA. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. *Eur J Med Chem.* 2008;43(10):2220-8.
26. Dimmock JR, Kandepu NM, Hetherington M, Quail JW, Pugazhenti U, Sudom AM et al. Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds. *J Med Chem.* 1998;41(7):1014-26.

27. Sabzevari O, Galati G, Moridani MY, Siraki A, O'Brien PJ. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chem Biol Interact.* 2004;148(1-2):57-67.
28. Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, Zhou LM, Nie W, Chen FC. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem.* 2002;10(8):2795-802.
29. Dimmock JR, Elias DW, Beazely MA, Kandepu NM. Bioactivities of chalcones. *Curr Med Chem.* 1999;6(12):1125-49.
30. Sivakumar PM, Priya S, Doble M. Synthesis, biological evaluation, mechanism of action and quantitative structure-activity relationship studies of chalcones as antibacterial agents. *Chem Biol Drug Des.* 2009;73(4):403-15.
31. López SN, Castelli MV, Zacchino SA, Domínguez JN, Lobo G, Charris-Charris J et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg Med Chem.* 2001;9(8):1999-2013.
32. Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* 2002;417(6888):515-22.
33. Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature.* 2003;423(6935):33-41.
34. MacKinnon R. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004 Aug 20;43(33):4265-77.
35. Cohen CN, The Molecular Modeling Perspective in Drug Design, In: *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*, ed. Cohen CN, San Diego, California, Academic Press Inc. 1996:1-17.
36. Kinghorn DA. Drug Discovery from Natural Products, In: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry 7th edition*, Lemke TL, Williams DA., Baltimore eds. Lippincott Williams & Wilkins. 2007; 13-29
37. Patrick GL. Drug discovery and drug development, In: *An Introduction to Medicinal Chemistry, 2nd edition*, New York: Oxford University Press. 2001:142-190.
38. Macarron R, Banks MN, Bojanic D, Burns DJ, Cirovic DA, Garyantes T et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(3):188-95.
39. Leach AR, Gillet VJ, Lewis RA, Taylor R. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. *J Med Chem.* 2010;53(2):539-58.

40. Selassie CD. History of Quantitative Structure-Activity Relationships. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Sixth Edition, Volume 1: Drug Discovery. John Wiley&Sons, Inc, 2003; 1-48.
41. Todeschini R, Consonni V. Introduction, Molecular Descriptors for Chemoinformatics., Germany, WILEY-VCH,Verlag GmbH and Co KGaA 2009; XVI-XVII
42. Luque Ruiz I, , Gómez-Nieto MÁ, Computational Science and its Applications ICCSA 2008, Workshop on Molecular Simulations Structures and Processes (MOSSAP 2008) Lecture Notes in Computer Science, Perugia, Italy. 2008; 986.
43. van de Waterbeemd H, Rose S. Quantitative Approaches to Structure Activity Relationships. In: The Practice of Medicinal Chemistry, Ed Wermuth C., 3th edition, San Diego, California, Academic Press Inc, 2008: 481-490.
44. Tropsha A, Gramatica P, Gombar VJ. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. QSAR & Comb. Sci. 2003;22: 69-77.
45. Todeschini R, Consonni V. Handbook of Molecular Descriptors, Methods and Principles in Medicinal chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.
46. Bajorath J. Selected concepts and investigations in compound classification, molecular descriptor analysis, and virtual screening. J Chem Inf Comput Sci. 2001;41(2):233-45.
47. Ashrafi F, Rostami A, Mahdavi-pour N. Study on QSPR method for theoretical calculation of heat of formation for some organic compounds. African Journal of Pure and Applied Chemistry. 2008; .2(1): 006-009.
48. Randić M. Generalized molecular descriptors. J. Math. Chem. 1991; 7(1):155-168.
49. Sović I, Piškorec M, Čanadi I. Nova robusna metoda za QSAR analizu temeljena na multivarijantnoj regresiji i normi L1. Sveučilište u Zagrebu. Fakultet Elektrotehnike i Računarstva, 2010.
50. Funar-Timofei S, Fabian WMF, Simu GM, Suzuki T. Quantitative Structure-Retention Relationships (QSRR) for Chromatographic Separation of Disazo and Trisazo 4,4'-Diaminobenzanilide-based Dyes. Croat. Chem. Acta. 2006; 79(2): 227-236.
51. Héberger K. Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. J Chromatogr A. 2007;1158 (1-2):273-305.
52. Put R, Vander Heyden Y. Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure-retention relationships. Anal Chim Acta. 2007;602(2):164-72.



53. Natić M, Marković R, Milojković-Opsenica D, Tesić Z. Structure-retention relationship study of diastereomeric (Z)- and (E)-2-alkylidene-4-oxothiazolidines. *J Sep Sci.* 2007;30(14):2241-8.
54. Trifković J, Andrić F, Ristivojević P, Andrić D, Tesić ZLj, Milojković-Opsenica DM. Structure-retention relationship study of arylpiperazines by linear multivariate modeling. *J Sep Sci.* 2010;33(17-18):2619-28.
55. Dabić D, Natić M, Džambaski Z, Marković R, Milojković-Opsenica D, Tešić Ž. Quantitative structure-retention relationship of new N-substituted 2-alkylidene-4-oxothiazolidines. *J Sep Sci.* 2011;34(18):2397-404.
56. Van de Waterbeemd H, Kansy M, Wagner B, Fischer H. Lipophilicity in drug action and toxicology; Lipophilicity measurement by high performance liquid chromatography (RP HPLC). Wiley-VCH, Weinheim. 2008: 73-87.
57. Lombardo F, Shalaeva MY, Tupper KA, Gao F. ElogD(oct): a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds. *J Med Chem.* 2001;44(15):2490-7.
58. Liu X, Tanaka H, Yamauchi A, Testa B, Chuman H. Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Influence of 1-octanol in the mobile phase. *J Chromatogr A.* 2005;1091(1-2):51-9.
59. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 2008; 31: 79-96.
60. Heberger K, Kowalska T. Thermodynamic significance of boiling point correlations for alkylbenzenes in gas chromatography: Extension of Trouton's rule. *J. Chromatogr. A.* 1999; 845:13-20.
61. Hinckley DA, Bidleman TF, Foreman WT, Tuschall JR. Determination of vapor pressures for nonpolar and semipolar organic compounds from gas chromatographic retention data. *J. Chem. Eng. Data.* 1990; 35:232-237.
62. Heberger K, Kowalska T. Thermodynamic properties of alkylbenzenes from retention-boiling point correlations in gas chromatography. *Chromatographia.* 1997; 44:179-186.
63. Heberger K, Kowalska T, Gorgenyi M. Determination of the Gibbs free energy of one methylene unit from Kováts retention index-boiling point correlations on DB-210 stationary phase. *Acta Chromatogr.* 1999; 9(1): 25-37.
64. Szaleniec M, Dudzik A, Pawul M, Kozik B. Quantitative structure enantioselective retention relationship for high-performance liquid chromatography chiral separation of 1-phenylethanol derivatives. *J Chromatogr A.* 2009;1216(34):6224-35.

65. Karelson M, Lobanov VS, Katritzky AR. Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies. *Chem Rev.* 1996;96(3):1027-1044.
66. Katritzky AR, Karelson M, Lobanov VS. QSPR as a means of predicting and understanding chemical and physical properties in terms of structure. *Pure & Appl. Chem.* 1997; 69(2): 245-248.
67. Guo W, Lu Y, Zheng XM. The predicting study for chromatographic retention index of saturated alcohols by MLR and ANN. *Talanta.* 2000;51(3):479-88.
68. Kaliszan R, van Straten MA, Markuszewski M, Cramers CA, Claessens HA. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships. *J Chromatogr A.* 1999;855(2):455-86.
69. Duff DG, Horobin RW, Proctor GB. Estimating the hydrophobic character of dyestuffs: A comparison of partition, reverse-phase thin-layer chromatography, and calculation. *Dyes Pigm.* 1985; 6: 61-73.
70. Kaliszan R. *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships.* Wiley and Sons, New York. 1987; 303.
71. Kaliszan R, Markuszewski M, Haber P, Nasal A, Buszewski B, Gadzala-Kopciuch RM et al. Quantitative structure-retention relationships (QSRR) in evaluation of new stationary phases for high-performance liquid chromatography (HPLC). *Chem. Anal. (Warsaw).* 1998; 43:547-559.
72. Kaliszan R. Quantitative structure-retention relationships applied to reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1993; 656 (1-2) 417-435.
73. Kaliszan R. Quantitative structure-retention relationships. *Anal. Chem.* 1992; 64(11): 619A-631A.
74. Consonni V, Todeschini R. *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications, Molecular descriptors.* Springer. New York, USA. 2009.
75. Berthelot M, Jungfleisch E. On the laws that operate for the partition of a substance between two solvents. *Ann. Chim. Phys.* 1872; (26): 396-407.
76. H. Meyer. Zur theorie der alkoholnarkose. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1899; (42): 109-118.
77. Overton E. *Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen, Pharmakologie.* Gustav Fischer, Jena. 1901; 1-195.

78. Walter H. Brooks DE, Fisher D. Partitioning in Aqueous Two-Phase System. Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. Academic Press INC, Orlando, Florida. 1985.
79. Buchwald P, Bodor N. Octanol–water partition of nonzwitterionic peptides: Predictive power of a molecular size-based model. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 1998; 30:86-99.
80. Nasal A, Siluk D, Kaliszan R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr Med Chem.* 2003;10(5):381-426.
81. Gaudette LE, Brodie BB. Relationship between the lipid solubility of drugs and their oxidation by liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1959;2:89-96.
82. Selassie CD. Burger's medicinal Chemistry and Discovery, Volume 1: Drug Discovery Edited by Donald L. Abraham. Chapter 1, Wiley-Interscience, New York. 2003.
83. Leo A, Hanch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. *Chern. Rev.* 1971; 71(6): 525-616.
84. Leo AJ. Some advantages of calculating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci.* 1987;76(2):166-8.
85. Leo AJ. Hydrophobic parameter: measurement and calculation. *Methods Enzymol.* 1991;202:544-91.
86. Lambert WJ. Modeling oil--water partitioning and membrane permeation using reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1993; 656 (1-2): 469-484.
87. Kubinyi H. Lipophilicity and drug activity. *Prog. Drug. Res.,* 1979; 23: 97-198.
88. DeBolt SE, Kollman PA. Investigation of structure, dynamics, and solvation in 1-octanol and its water-saturated solution: molecular dynamics and free-energy perturbation studies. *J. Am. Chem. Soc.* 1995; 117(19): 5316-5340.
89. Leahy D. E., Taylor P. J., Wait A. R., Model solvent systems for QSAR. Part I. Propylene glycol dipelargonate (PGDP). A new standard solvent for use in partition coefficient determination. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 1989; 8: 17-31.
90. Leahy D E, Morris J J, Taylor P J, Wait AR. Model solvent systems for QSAR. Part II. Fragment values ('f-values') for the 'critical quartet'. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1992; 2: 723-731.
91. Brandstrom A. A rapid method for the determination of distribution coefficient of bases for biological purposes. *Acta. Chem. Scand.* 1963; 17: 1218-1224.

92. Brooke DN, Dobbs AJ, Williams N. Octanol:water partition coefficients (P): measurement, estimation, and interpretation, particularly for chemicals with P greater than 10(5). *Ecotoxicol Environ Saf.* 1986;11(3):251-60.
93. Kubinyi H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*. Wiley Online Library, 2008.
94. Consden R, Gordon AH, Martin AJ. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem J.* 1944;38(3):224-32.
95. Bate-Smith EC, Westall RG. Chromatographic behavior and chemical structure in some naturally occurring phenolic substances. *Biochem. Biophys. Acta.* 1950; (4): 427-440.
96. Boyce CBC, Milborrow BV. A simple assessment of partition data for correlating structure and biological activity using thin-layer chromatography. *Nature.* 1965; 208: 537-538.
97. Dorsey JG, Khaledi MG. Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography. Implications for biological partitioning processes. *J Chromatogr.* 1993;656(1-2):485-99.
98. Poole SK, Poole CF. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;797(1-2):3-19.
99. Cserháti T. Determination of the lipophilicity of some aniline derivatives by reversed-phase thin-layer chromatography. The effect of the organic phase in the eluent. *Chromatographia.* 1984; 18: 318-322.
100. Braumann T. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships. *J Chromatogr.* 1986;373(2):191-225
101. Lanin SN, Nikitin YS. Molecular interactions in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1991; 537: 33-49.
102. Sciler P. Simultaneous determination of partition coefficient and acidity constant of a substance. *Eur. J. Med. Chem.* 1974; 9(6): 663-665.
103. Leo AJ. Calculating log Poct from structures. *Chem. Revs.* 1993; 93(4):1281-1306.
104. Rekker RF, Mannhold R, Bijloo G, De Vries G, Dross K. The lipophilic behaviour of organic compounds:2. The development of an aliphatic hydrocarbon/water fragmental system via interconnection with octanol-water partitioning data. *Quant. Struct. Act. Relat.* 1998; 17(06): 537-548.

105. Kellogg GE, Joshi GS, Abraham DJ. New tools for modeling and understanding hydrophobicity and hydrophobic interactions. *Med. Chem. Res.* 1992; 1: 444.
106. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* 2002; 45:2615-2623.
107. Ekins S, Andreyev S, Ryabov A, Kirillov E, Rakhmatulin EA, Bugrim A, Nikolskaya T. Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling. *Expert Opin. Drug Toxicol.* 2005; 1.
108. Cserháti T, Válko K. *Chromatographic Determination of Molecular Interactions, Applications in Biochemistry, Chemistry and Biophysics.* CRC Press: Boca Ration. 1994.
109. Baczek T, Markuszewski M, Kaliszan R, Van Straten MA, Claessens HA. Linear and Quadratic Relationships between Retention and Organic Modifier Content in Eluent in Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography: A Systematic Comparative Statistical Study. *J. High Resol. Chromatogr.* 2000; 23(12): 667-676.
110. Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18(5):581-6.
111. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* 1998;280(5360):69-77.
112. Deane CM, Blundell TL. *Protein Comparative Modelling and Drug Discovery.* In: *The Practice of Medicinal Chemistry.* London, Academic Press. 2003; 445-458.
113. Xiang Z. Advances in homology protein structure modeling. *Curr Protein Pept Sci.* 2006;7(3):217-27.
114. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins.* 2006;65(1):15-26.
115. Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW. A review of protein-small molecule docking methods. *J Comput Aided Mol Des.* 2002;16(3):151-66.
116. Guvench O, MacKerell AD Jr. Computational evaluation of protein-small molecule binding. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19(1):56-61.
117. Milenković M, Arsenović-Ranin N. *Opšta i specijalna bakteriologija-za studente farmacije.* Beograd: Farmaceutski fakultet; 2016.

118. Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet*. 1948;2(6530):641-4.
119. Jevons MP, Rolinson GN, Knox R. Celbenin-resistant staphylococci. *British Med J*. 1961; 1: 124-5.
120. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997;350(9092):1670-3.
121. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP et al; Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1342-7.
122. Brown DF, Reynolds PE. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*. 1980;122(2):275-8.
123. Hayes MV, Curtiss NAC, Wyke AW, Ward JB. Decreased affinity of a penicillin-binding protein for beta-lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *FEMS Microbiol Lett*. 1981; 10: 119-22.
124. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1984;158(2):513-6.
125. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28(3):397-403.
126. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(4):781-91.
127. Rooijackers SH, van Strijp JA. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol*. 2007;44(1-3):23-32.
128. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G et al. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med*. 2001;193(9):1067-76
129. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*. 2007;13(12):1510-4.

130. Ploy MC, Grélaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*. 1998;351(9110):1212.
131. Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA, MacGowan AP, Diekema D. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2439-44.
132. Maltezou HC, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(2):87-96.
133. Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:17-38.
134. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):382-402.
135. Poole K, Srikumar R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(1):59-71.
136. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*. 2011;5;2:65.
137. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010;13(6):151-71.
138. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634-40.
139. Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2578-83.
140. Nedeljković NS, Kocić B, Todorović B, Branković S, Antić SM. Serotyping and analysis of produced pigments kinds by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Vojnosanit Pregl*. 2011;68(11):923-9.
141. Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. ASM Press; Washington, DC, USA: 2007; 734–48.
142. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis*. 2005;18(4):306-13.

143. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents hemother.* 2006;50(1):43-8.
144. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC et al. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist.* 2005;11(1):68-74.
145. Bergogne-Bérézin E. Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections. *Drugs.* 1999;58(1):51-67.
146. Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2003;37(6):745-51.
147. Le Guennec JY, Ouadid-Ahidouch H, Soriani O, Besson P, Ahidouch A, Vandier C. Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2007;2(3):189-202.
148. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pillozzi S, Becchetti A. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Curr Med Chem.* 2009;16(1):66-93.
149. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981;391(2):85-100.
150. Hodgkin A L, Huxley A F. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre *Nature* 1939; 144:710-711.
151. Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA. Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell.* 1987;50(3):405-13.
152. Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN, Jan LY. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science.* 1987; 237(4816):770-5.
153. Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, Jan YN, Jan LY. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*. *Nature.* 1988;331(6152):137-42. Erratum in: *Nature* 1988;332(6166):740.
154. Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M et al. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 1995;14(21):5170-8.



155. Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature*. 2001;414(6859):37-42.
156. Yamagishi T, Li RA, Hsu K, Marbán E, Tomaselli GF. Molecular architecture of the voltage-dependent Na channel: functional evidence for alpha helices in the pore. *J Gen Physiol*. 2001;118(2):171-82.
157. Kuo MM, Haynes WJ, Loukin SH, Kung C, Saimi Y. Prokaryotic K(+) channels: from crystal structures to diversity. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(5):961-85.
158. Sansom MS, Shrivastava IH, Bright JN, Tate J, Capener CE, Biggin PC. Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1565(2):294-307.
159. Rowley CN, Roux B. A computational study of barium blockades in the KcsA potassium channel based on multi-ion potential of mean force calculations and free energy perturbation. *J Gen Physiol*. 2013;142:451-463.
160. Shimizu H, Iwamoto M, Konno T, Nihei A, Sasaki YC, Oiki S. Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating. *Cell*. 2008;132(1):67-78.
161. Nikaido H. Outer membrane. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2nd ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1996; 29–47.
162. Achouak W, Heulin T, Pagès JM. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;199(1):1-7.
163. Nakae T. Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;71(3):877-84.
164. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol*. 2002. 56:17–38.
165. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med*. 2011;6.
166. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O et al. PAMPA--a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci*. 2004;21(4):429-41.
167. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem*. 1998;41(7):1007-10.

168. Liu H, Sabus C, Carter GT, Du C, Avdeef A, Tischler M. In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection. *Pharm Res.* 2003;20(11):1820-6.
169. Ottaviani G, Martel S, Carrupt PA. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J Med Chem.* 2006;49(13):3948-54.
170. Ottaviani G, Martel S, Carrupt PA. In silico and in vitro filters for the fast estimation of skin permeation and distribution of new chemical entities. *J Med Chem.* 2007;50(4):742-8.
171. Avdeef A, Nielsen PE, Tsinman O. PAMPA--a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *Eur J Pharm Sci.* 2004;22(5):365-74.
172. Dagenais C, Avdeef A, Tsinman O, Dudley A, Beliveau R. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *Eur J Pharm Sci.* 2009;38(2):121-37.
173. BIOVIA Draw. Dostupno na: <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-draw>. Pristup: 16.12.2015.
174. AutoDock. Dostupno na: <http://autodock.scripps.edu>. Pristup: 15.12.2015.
175. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 2012;4(1):17.
176. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-61.
177. Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model.* 1999;17(1):57-61.
178. SPSS Statistics. Dostupno na: [www.ibm.com/software/products/en/spss-statistics](http://www.ibm.com/software/products/en/spss-statistics). Pristup: 15.11.2015.
179. Mierswa I, Wurst M, Klinkenberg R, Scholz M, Euler T. YALE: rapid prototyping for complex data mining tasks. *Proceedings of the 12th ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery and data mining, New York, NY, USA: ACM.* 2006; 935–940.

180. Pechenizkiy M, Wojciechowski M. New Trends in Databases and Information Systems. Advances in Intelligent Systems and Computing. 2013; 185.
181. MOPAC2012, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, 2012.
182. Stewart JJ. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. J Mol Model. 2013;19(1):1-32.
183. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th Informational Supplement. Approved Standard. CLSI document M100-S17. Wayne, PA, USA. 2007.
184. Yap CW. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. J. Comput. Chem. 2011;32(7):1466-74.
185. Halgren TA. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. J. Comput. Chem. 1996; 17(5-6): 490-519.
186. Halgren TA. Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. J. Comput. Chem. 1996; 17(5-6): 520-552.
187. Halgren TA, Nachbar RB. Merck molecular force field. IV. conformational energies and geometries for MMFF94. J. Comput. Chem. 1996; 17(5-6): 587-615 .
188. Stewart JJ. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. J Mol Model. 2013;19(1):1-32.
189. Protein Data Bank. Dostupno na: <http://www.rcsb.org/pdb>. Pristup: 09.11.2015.
190. Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. Nature. 2001;411(6838):657-61.
191. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem. 2009;30(16):2785-91.
192. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 1992; 30(7):1654-60.
193. Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the mec-A gene and phenotypic detection of resistance in Staphylococcus aureus isolates with

- borderline or low-level methicillinresistance. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 37(1):53-63.
194. The Official Gaussian Website. Dostupno na: <http://www.gaussian.com/index.htm>. Pristup: 01.11.2015.
195. Eriksson L; Johansson E; Kettaneh-Wold N et al. (eds.) *Multi-and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I*, 2nd edition., Umetrics Academy, Umeå, 2001:39.
196. Liu J, Eren E, Vijayaraghavan J, Cheneke BR, Indic M, van den Berg B, Movileanu L. OccK channels from *Pseudomonas aeruginosa* exhibit diverse single-channel electrical signatures but conserved anion selectivity. *Biochemistry.* 2012;51(11):2319-30.
197. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Kaulfers PM, Mack D. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(4):683-7.
198. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 2007; 115: 891-889.
199. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 2000; 40: 175-9.
200. Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, Fernandes Â, Barros L; Calhelha RC et al. Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal mushroom. *Journal of Ethnopharmacology.* 2015; 162: 323–332.
201. Sandy SM, Foong-Yee T. Anti-quorum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Malaysian Journal of Microbiology.* 2012; 8 (1): 11–20.
202. Avdeef A, Strafford M, Block E, Balogh MP, Chambliss W, Khan I. Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes. 2. Studies of the permeability properties of lactones in *Piper methysticum* Forst. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14(4):271-80.
203. Bašić JV, Ivković BM, Stevanović S, Lazarević A, Vujić Z. Determination of the lipophilicity of 2 hydroxy chalcones by RP HPLC method, *Hemijska industrija. OnLine-First Issue 00.* 2016; 57-57.
204. Viswanadhan VN, Ghose AK, Ganapathi R. Revankar GR, Robins RK. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative

- structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *Chem. Inf. Comput. Sci.* 1989; 29 (3):163–172.
205. Avila HP, Smânia Ede F, Monache FD, Smânia A Jr. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(22):9790-4.
  206. Garau J, Bouza E, Chastre J, Gudiol F, Harbarth S. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(2):125-36.
  207. Božić DD, Milenković M, Ivković B, Ćirković I. Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res.* 2014;140(1):130-7.
  208. Bozic DD, Milenkovic M, Ivkovic B, Cirkovic I. Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol.* 2014;45(1):263-70.
  209. Lee SM, Ender M, Adhikari R, Smith JM, Berger-Bächi B, Cook GM. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1497-9.
  210. Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2008;197(11):1523-30.
  211. Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 837-45.
  212. Hansch C, Leo A, Taft RW. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field, Parameters. *Chem. Rev.* 1991; 97(2): 165-195.
  213. Odeh R, Quinn JP. Problem pulmonary pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*. *Semin Respir Crit Care Med.* 2000;21(4):331-9.
  214. Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Croatian Journal of Infection.* 2012; 32:2, 71-80.
  215. Holder IA. *P. aeruginosa* burn infections: pathogenesis and treatment. *Infectious Agents and Pathogenesis.* 1993; 275-295.

216. Campa M, Bendinelli M, Friedman H (ed.), *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Plenum Press, Inc., New York, NY.1993:19.
217. Simon A, Bode U, Beutel K. Diagnosis and treatment of catheter-related infections in paediatric oncology: an update. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(7):606-20.
218. Dua S, Chalermkulrat W, Miller MB, Landers M, Aris RM. Bilateral hematogenous *Pseudomonas aeruginosa* endophthalmitis after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6(1):219-24.
219. Dupont H, Marciniak S, Zogheib E, Mammeri H, Friggeri A, Ammenouche N et al. Use of aztreonam in association with cefepime for the treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* to  $\beta$ -lactams in ICU patients: A pilot study. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2015;34(3):141-4.
220. Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:17-38.
221. Rao AS, Simon L, Srinivasan KK, Moorkoth A, Haleem ZA, Jadon SS ET AL. Synthesis and in vitro Antimicrobial Evaluation of 5'-Acetamido-2'-Hydroxy Chalcone derivatives, *Res. J. Chem. Sci.* Vol. 2014: 4(2): 56-59.
222. Eren E, Vijayaraghavan J, Liu J, Cheneke BR, Touw DS, Lepore BW ET AL. Substrate specificity within a family of outer membrane carboxylate channels. *PLoS Biol.* 2012; 10(1):e1001242.
223. Lawrence NJ, Patterson RP, Ooi LL, Cook D, Ducki S. Effects of alpha-substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16(22):5844-8.
224. Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(6):3404-9.
225. Batovska D, Parushev S, Slavova A, Bankova V, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*. *Eur J Med Chem.* 2007;42(1):87-92.
226. Hur S, Newby ZE, Bruice TC. Transition state stabilization by general acid catalysis, water expulsion, and enzyme reorganization in *Medicago sativa* chalcone isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2730-5.
227. Böhm HJ, Banner D, Bendels S, Kansy M, Kuhn B, Müller K et al. Fluorine in medicinal chemistry. *Chembiochem.* 2004;5(5):637-43.

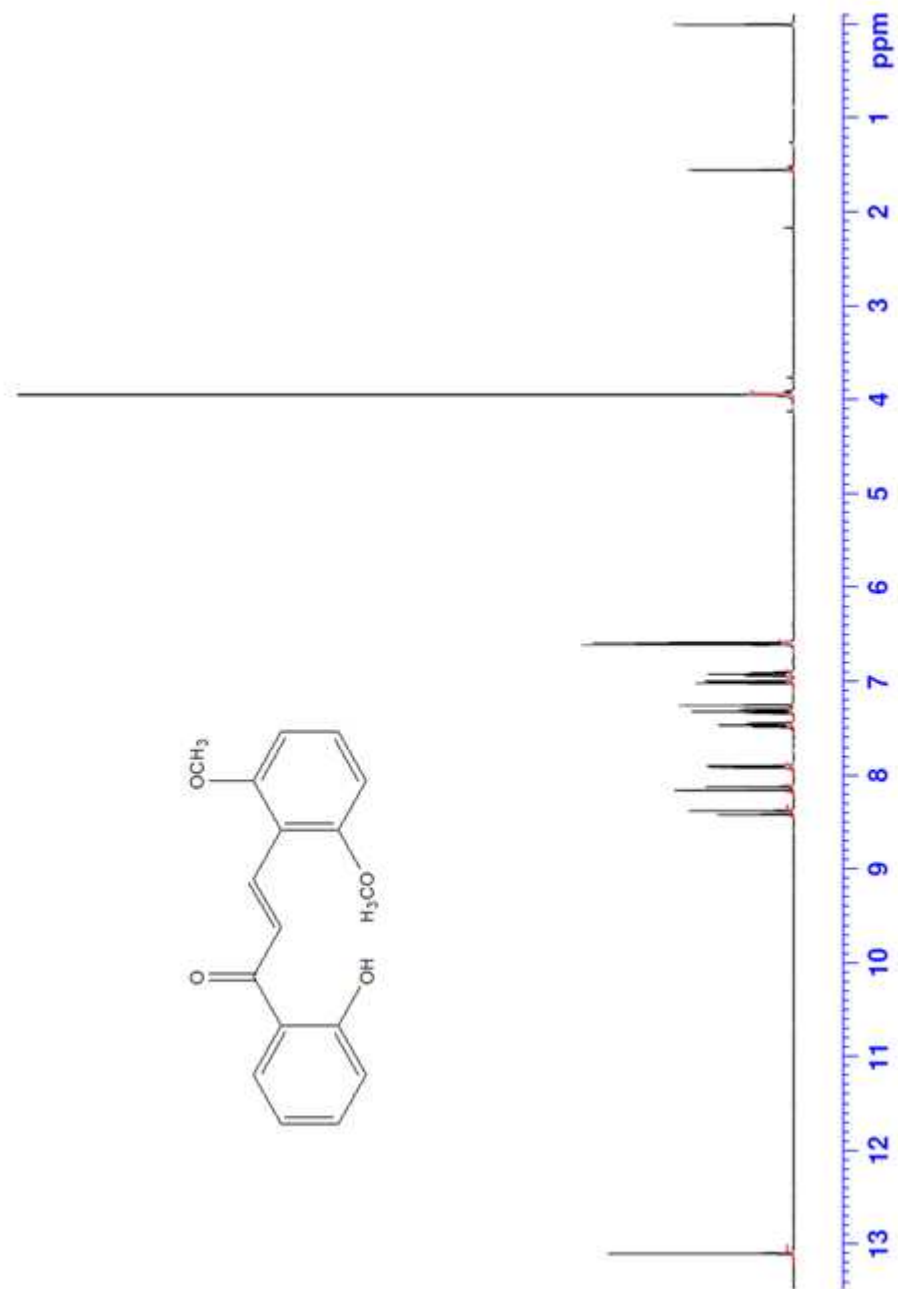
228. Gerebtzoff G, Li-Blatter X, Fischer H, Frentzel A, Seelig A. Halogenation of drugs enhances membrane binding and permeation. *Chembiochem*. 2004;5(5):676-84.
229. Michael G, Clewell DB, Couvvalin PM, Dunny GM, Murray BE, Rice LB. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2002.
230. Leroux F. Atropisomerism, Biphenyls, and Fluorine: A Comparison of Rotational Barriers and Twist Angles. *Chembiochem*. 2004; 5: 644 – 649.
231. Smart BE. Fluorinated Bioactive Compounds. *J Fluorine Chem*. 2001; 109(1):3–11.
232. Okubo T, Yabe S, Otsuka T, Takizawa Y, Takano T, Dohmae S et al. Multifocal pelvic abscesses and osteomyelitis from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a 17-year-old basketball player. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60: 313-8.
233. Redziniak DE, Diduch DR, Turman K, Hart J, Grindstaff TL, MacKnight JM et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Athlete. *Int J Sports Med* 2009; 30: 557-62.
234. Wold S; Johansson E; Cocchi M. *3D QSAR in drug design, theory, methods, and applications*. ESCOM Science Publishers: Leiden. 1993; 523–550.
235. Yumi N. Imai, Yoshihisa Inoue, Isao Nakanishi, Kazuo Kitaura, Cl- $\pi$  interactions in protein–ligand complexes *Protein Sci*. 2008; 17(7): 1129.
236. Eren E, Parkin J, Adelanwa A, Cheneke B, Movileanu L, Khalid S et al. Toward understanding the outer membrane uptake of small molecules by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2013;288(17):12042-53.
237. Schirmer T, Keller TA, Wang YF, Rosenbusch JP. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science*. 1995;267(5197):512-4.
238. Huang H, Hancock RE. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1993;175(24):7793-800.
239. Liu J, Wolfe AJ, Eren E, Vijayaraghavan J, Indic M, van den Berg B et al. Cation selectivity is a conserved feature in the OccD subfamily of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(11):2908-16.
240. Liu J, Eren E, Vijayaraghavan J, Cheneke BR, Indic M, van den Berg B et al. OccK channels from *Pseudomonas aeruginosa* exhibit diverse single-channel electrical signatures but conserved anion selectivity. *Biochemistry*. 2012;51(11):2319-30.

241. Zhou P, Zou J, Tian F, Shang Z. Fluorine bonding--how does it work in protein-ligand interactions? *J Chem Inf Model.* 2009;49(10):2344-55.
242. Escaich S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12(4):400-8.
243. Lai S, Tremblay J, Déziel E. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environ Microbiol.* 2009;11(1):126-36.
244. Hay ID, Rehman ZU, Ghafoor A, Rehm BHA. Bacterial biosynthesis of alginates. *ChemTechnol Biotechnol.* 2010; 85: 752–759.
245. Britigan BE, Railsback MA, Cox CD. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun.* 1999;67(3):1207-12.
246. Pastor M, Cruciani G, McLay I, Pickett S, Clementi S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *J Med Chem.* 2000;43(17):3233-43.
247. ADMET Predictor v. 6.5., Simulation Plus, Inc.42505 10th Street West, Lancaser, California 93534-7059USA. Dostupno na:<http://www.simulations-plus.com/>. Pristup: 10.01.2016.



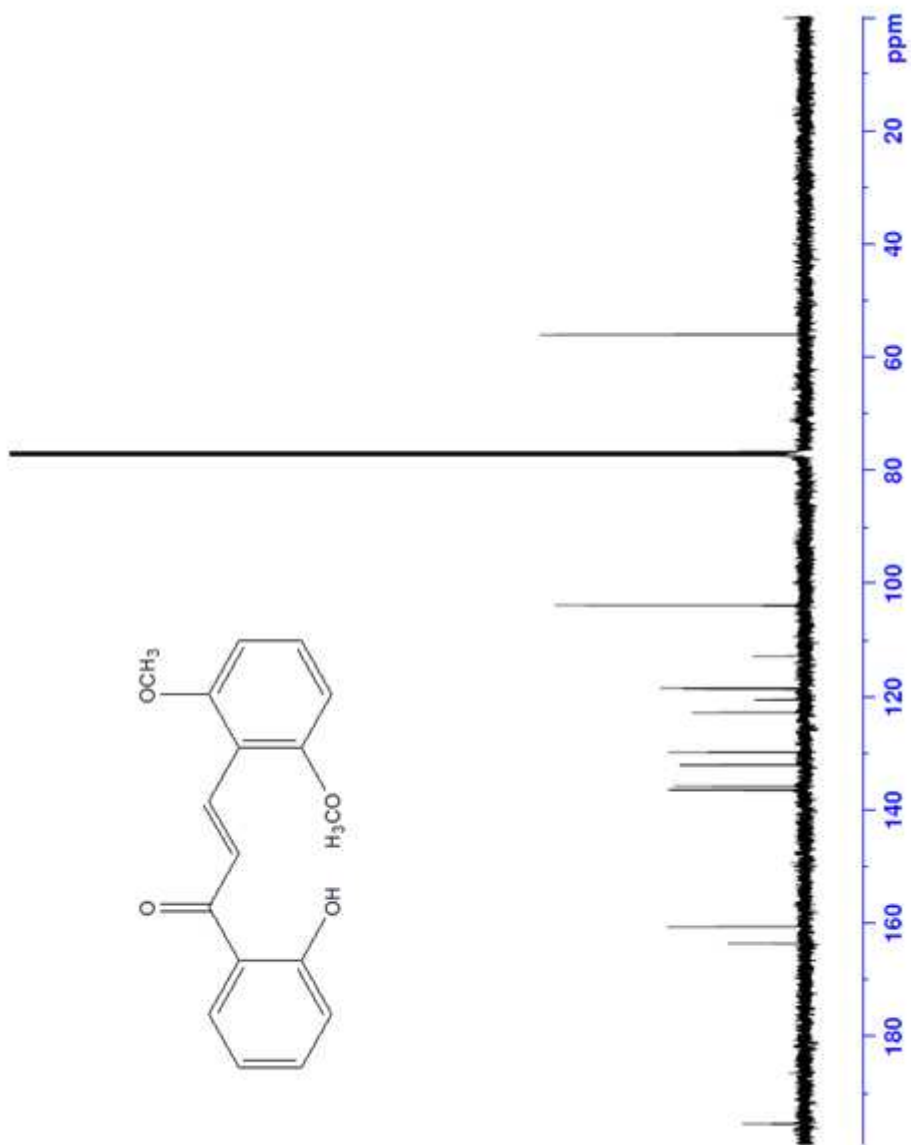
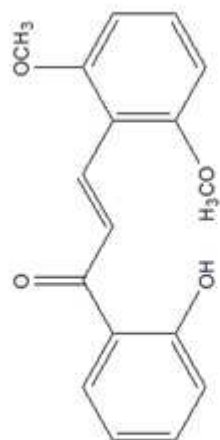
## **7. PRILOZI**

## PRILOG 1: NMR (1H, 13C) spektri sintetisanih jedinjenja

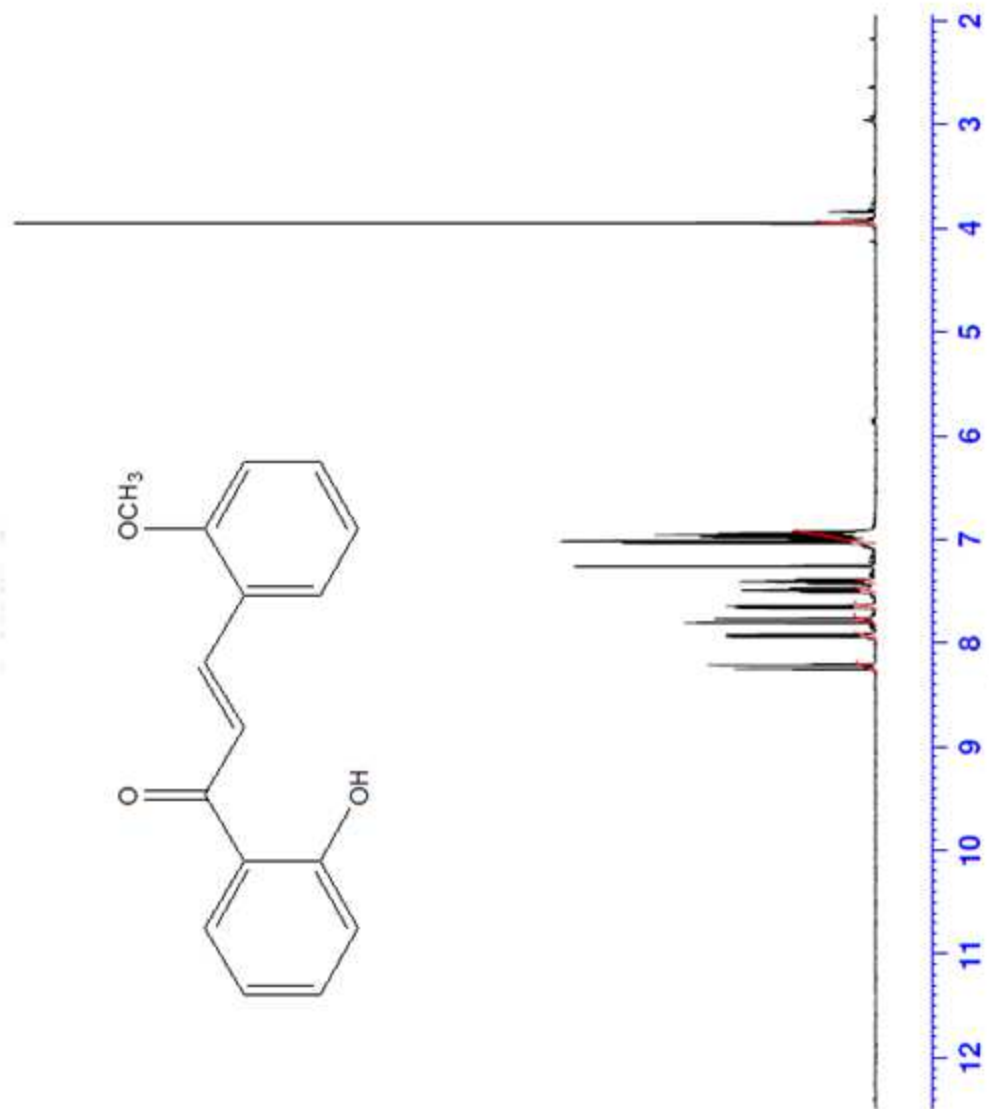


Slika 51. <sup>1</sup>H NMR spektar H<sub>2</sub>,6OCH<sub>3</sub>

(C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2,6-dimeoksifenil)-2-propen-1-on

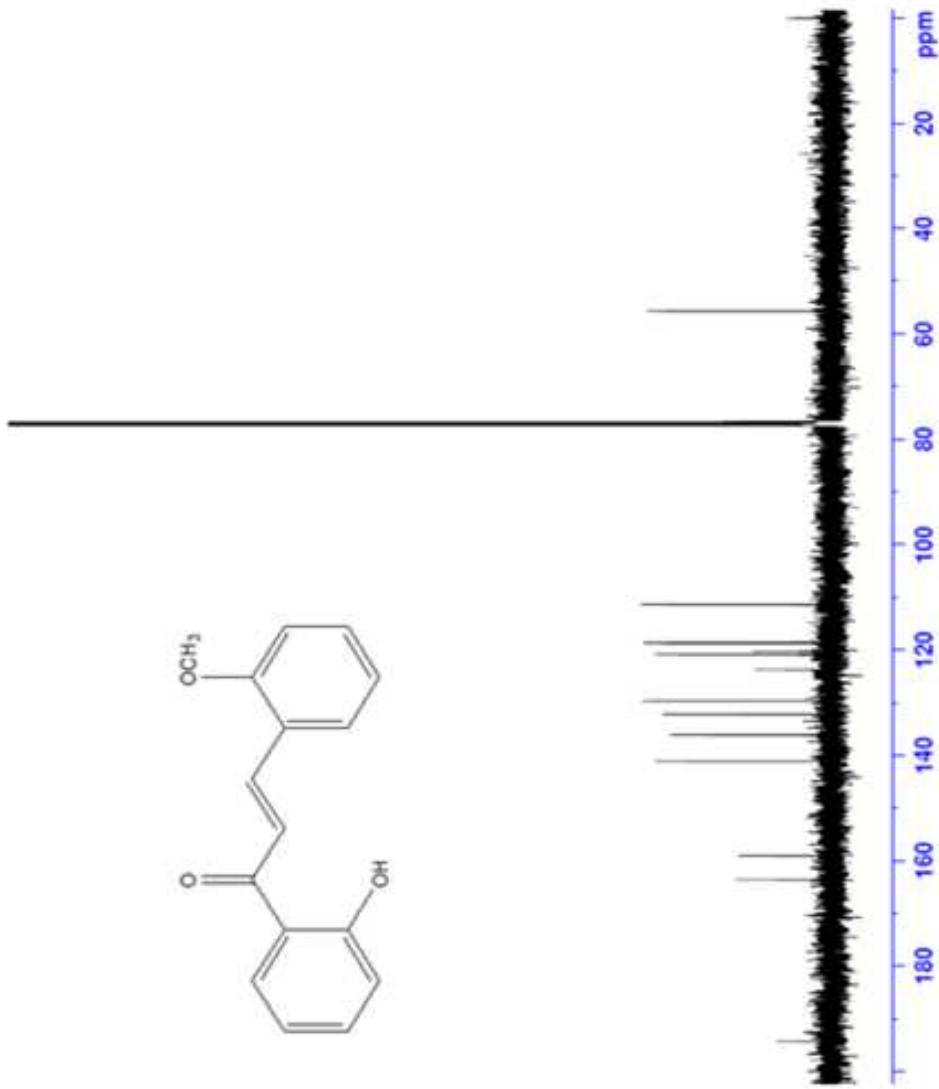
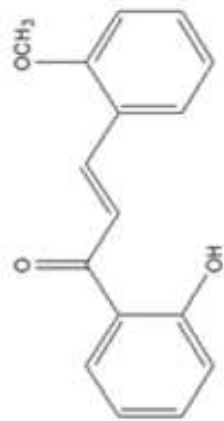


Slika 52. <sup>13</sup>CNMR spektar H<sub>2</sub>,6OCH<sub>3</sub>

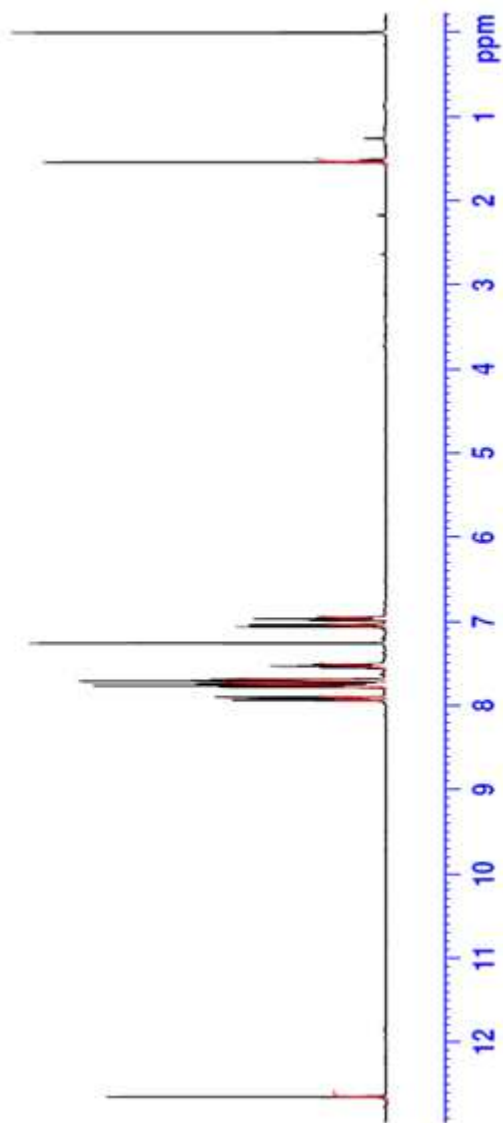
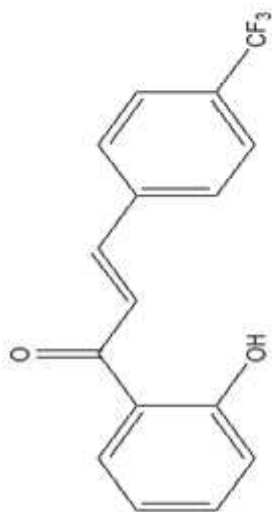


Slika 53. <sup>1</sup>H NMR spektar 100CH<sub>3</sub>

(C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-metoksifenil) 2-propen-1-on

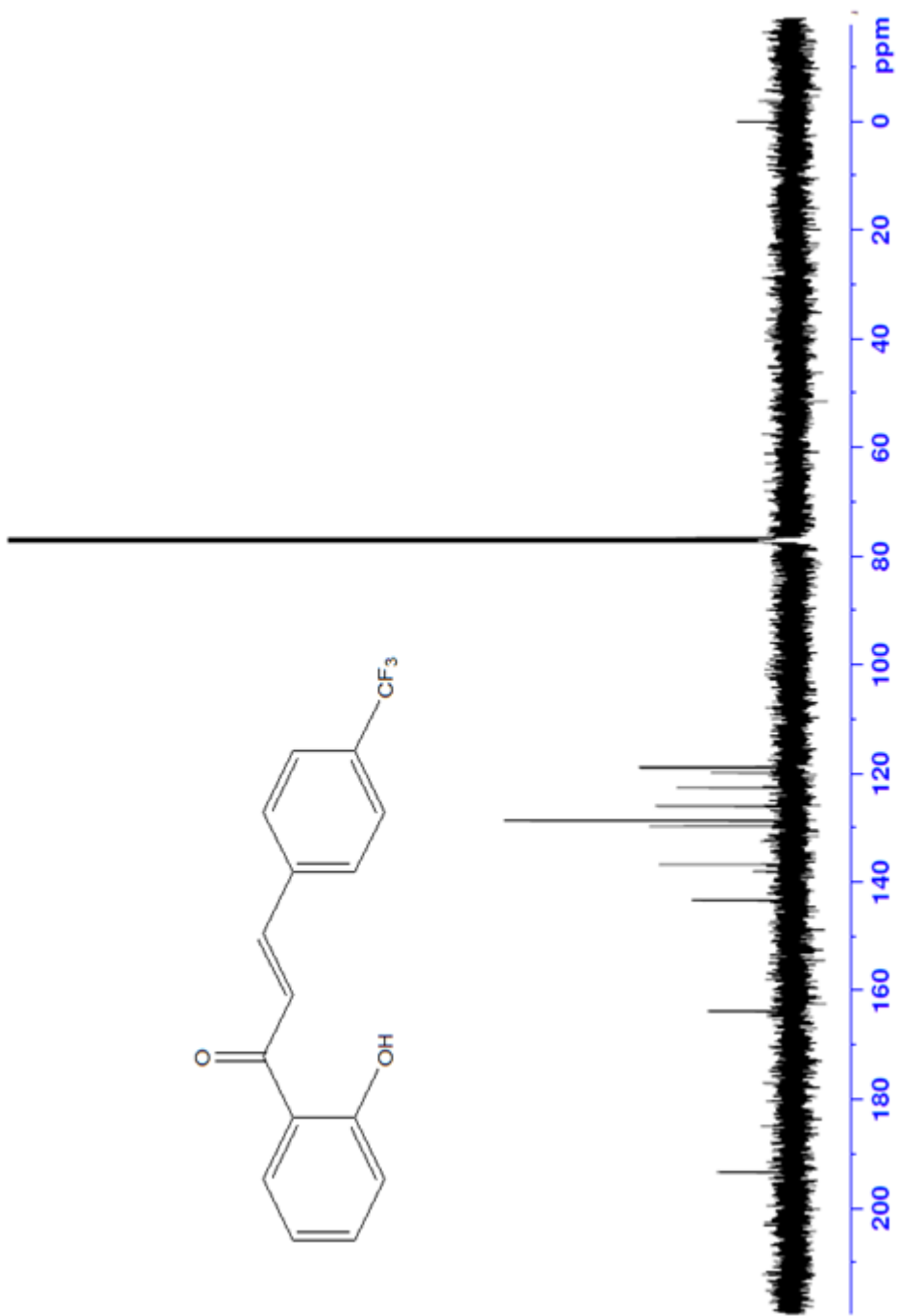


Slika 54. <sup>13</sup>CNMR spektar 10OCH3

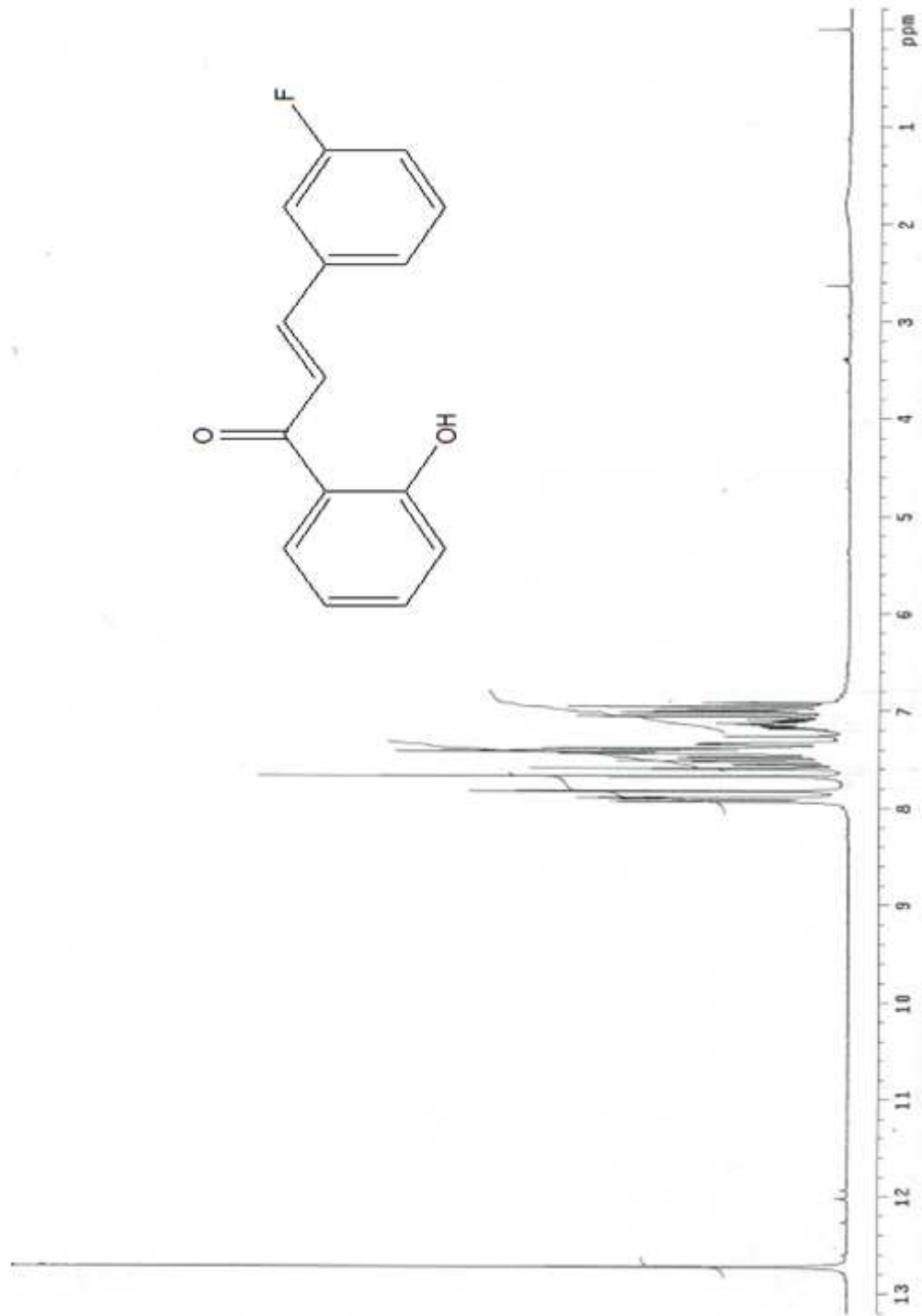


Slika 55.  $^1\text{H}$ NMR spektar 1PCF<sub>3</sub>

(C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>O<sub>2</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-(trifluorometil)fenil)-2-propen-1-on



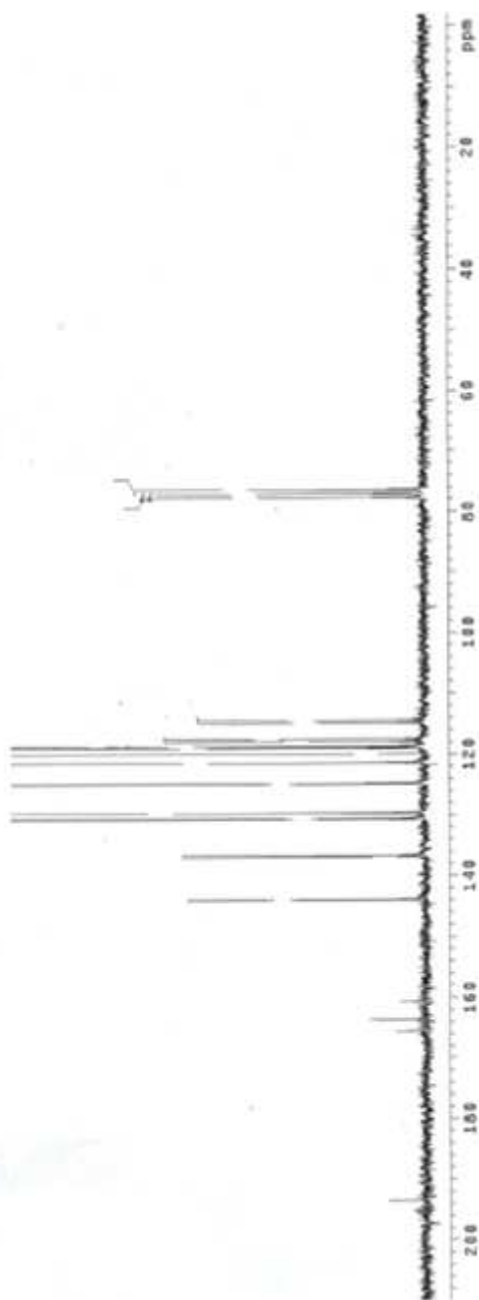
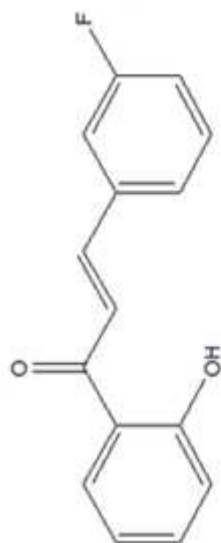
Slika 56. <sup>13</sup>CNMR spektar IPCF<sub>3</sub>



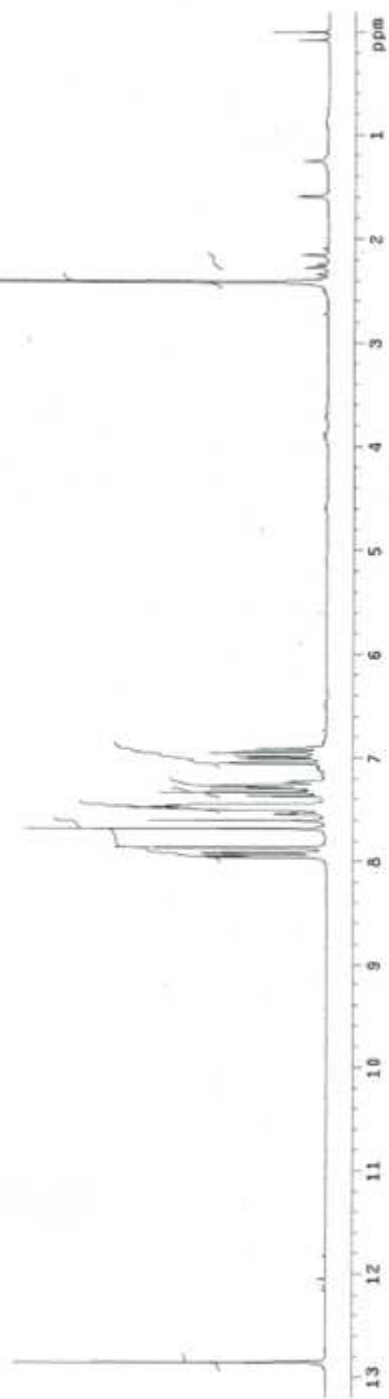
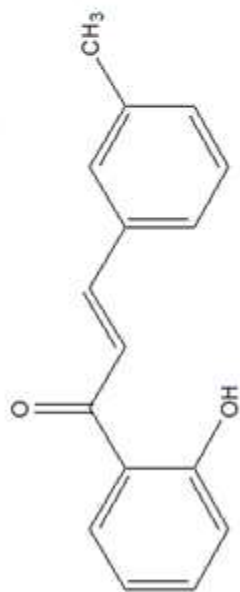
Slika 57. <sup>1</sup>H NMR spektar 1MF

(C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>FO<sub>2</sub>): (E)-3-(3-fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)2-propen-1-on



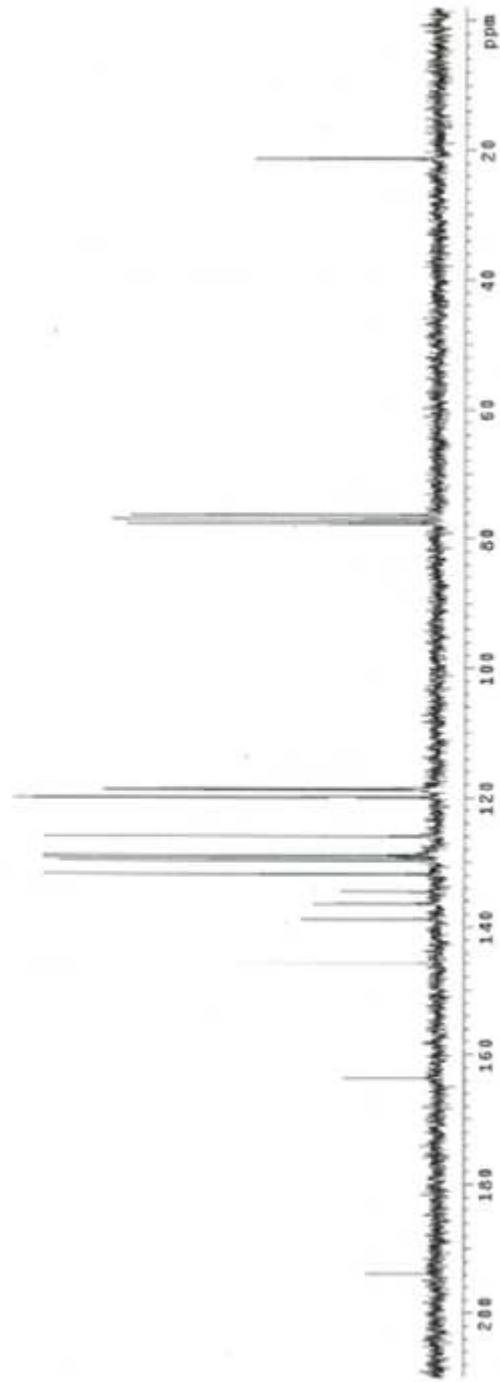


Slika 58.  $^{13}\text{C}$ NMR spektar IMF

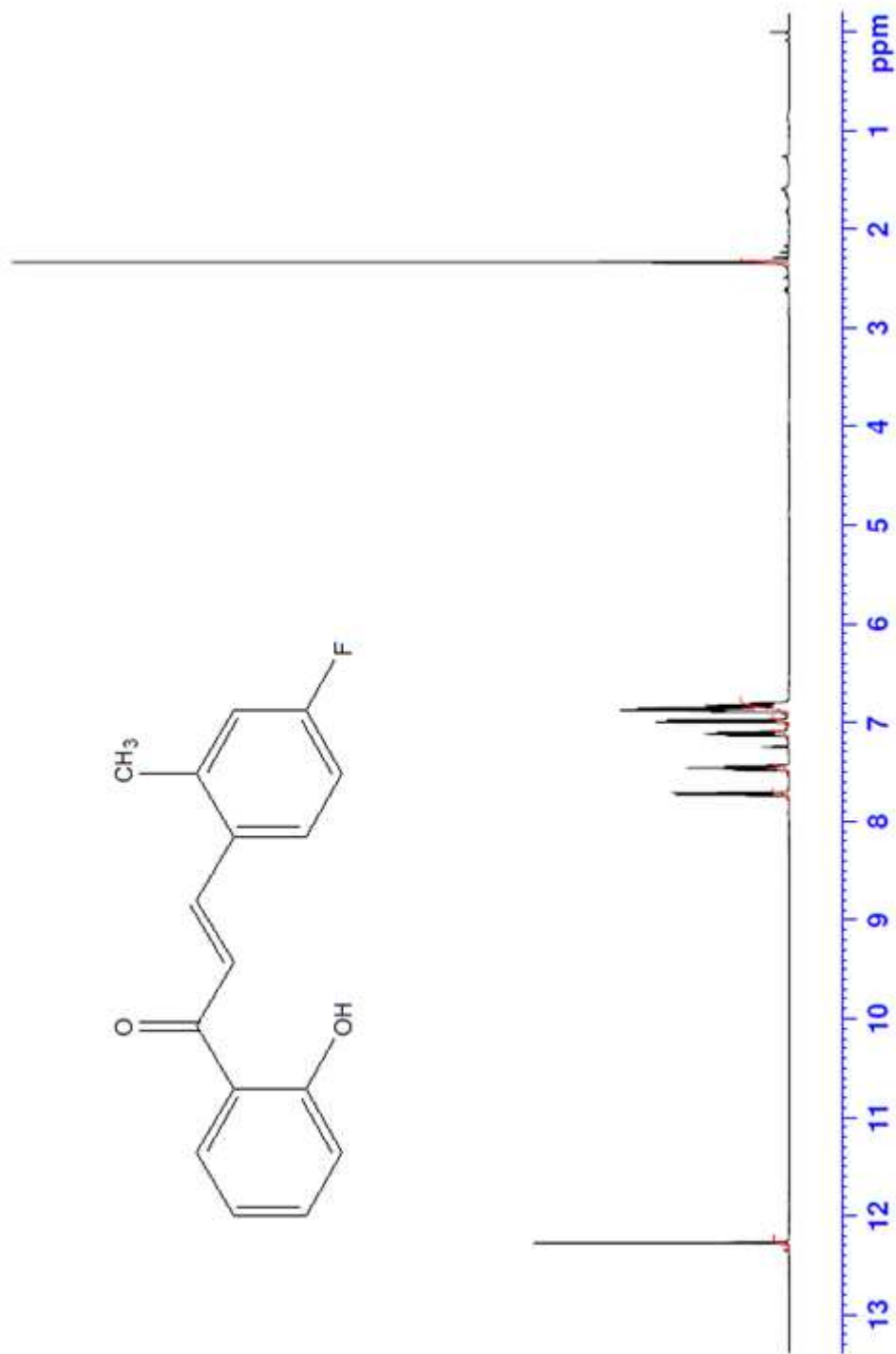


Slika 59. <sup>1</sup>H NMR spektar 1MCH<sub>3</sub>

(C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>): (E)-1-(2-hidroksifenil)-3-m-tolil-2-propen-1-on

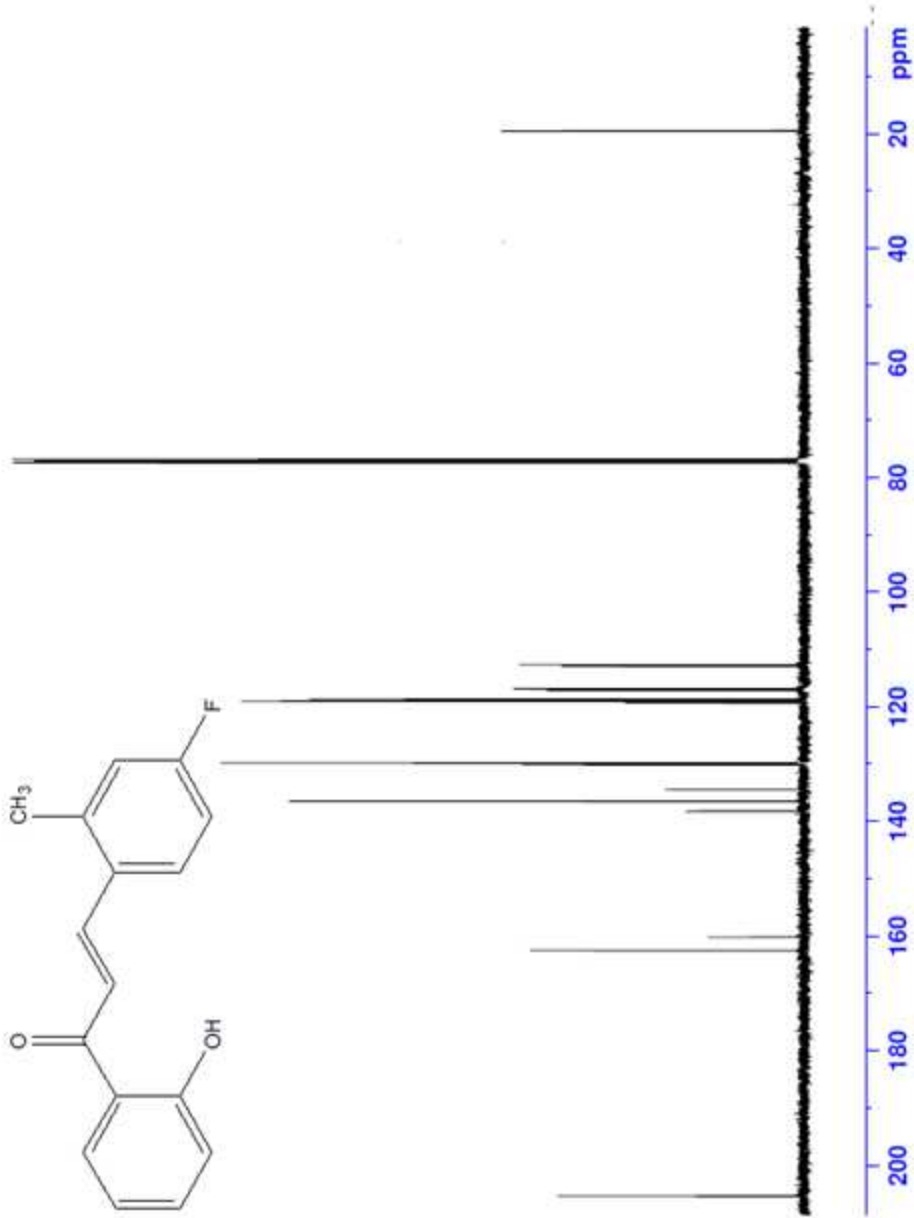


Slika 60.  $^{13}\text{C}$ NMR spektar IMF



Slika 61.  $^1\text{H NMR}$  spektar  $\text{H}_4\text{F}_2\text{CH}_3$

(C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>2</sub>): (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-fluoro-2-metifenil)-2-propen-1-on



Slika 62.  $^{13}\text{C}$ NMR spektar  $\text{H}_4\text{F}_2\text{CH}_3$

## **PRILOG A: Spisak publikovanih radova i saopštenja**

### **Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije**

1. **Bašić J**, Kalinić M, Ivković B, Erić S, Milenković M, Vladimirov S, Vujić Z, Synthesis, QSAR analysis and mechanism of antibacterial activity of simple 2-hydroxy chalcones. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2014 (9): 1537 - 1546. **M23**
2. **Bašić J**, Ivković B, Stevanović S, Lazarević A, Vujić Z. Determination of the lipophilicity of 2 hydroxy chalcones by RP HPLC method. Hemijska industrija 2016 OnLine-First Issue 00, Pages: 57-57 **M23**

### **Radovi saopšteni na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu:**

1. J. Bašić, G. Lugonja, B. Ivković, Z. Vujić. Determination of anastrozole in pharmaceutical dosage forms by high performance liquid chromatography, Zbornik sažetaka, II Kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, maj 2015, Bečići, Crna Gora
2. **J. Bašić**, B. Ivković, M. Milenković, Z. Vujić, Antimikrobna aktivnost novosintetisanih modulatora jonskih kanala, Antimicrobial Activity of Newly Synthesized Ion Channels Modulators, Zbornik sažetaka, VI Kongres farmaceuta sa međunarodnim učešćem 15-19. oktobar 2014., Beograd, 172
3. **J. Bašić**, K. Kovačević, D. Tešić, T. Neđić, V. Savić, Summary of Product Characteristics (SmPC) – Information for health professionals, Zbornik radova; V Kongres farmaceuta sa međunarodnim učešćem, Beograd, 2010.

4. D.Tešić, T.Neđić, K.Kovačević, **J. Bašić**, V.Savić, The importance of patient information leaflet in the information society, Zbornik radova; V Kongres farmaceuta sa međunarodnim učešćem, Beograd, 2010.

## **PRILOG B: Biografija**

Jasmina Bašić (rođena Stanišić) rođena je 23. 10. 1976. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju (1995.godine) je završila u Beogradu. Studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 1996/1997. godine i diplomirala 2004. godine sa prosečnom ocenom 8,48. Diplomski rad pod nazivom „Kinetičko-analitičke metode“ odbranila je na Katedri za analitičku hemiju sa ocenom 10. Nakon završenog stručnog staža za farmaceute položila je stručni ispit 2005. godine.

Doktorsku disertaciju pod nazivom „**Ispitivanje korelacije između hemijske strukture, fizičko-hemijskih i retencionih parametara i antimikrobne aktivnosti novosintetisanih derivata propiofenona**“ uradila je pod rukovodstvom prof. dr Zorice Vujić.

Od marta 2014. godine do danas je zaposlena u Visokoj zdravstvenoj školi strukovnih studija, gde je birana da predaje Hemiju i Biohemiju. Od februara 2007. godine do marta 2014. godine je radila u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije, kao stručni saradnik u Nacionalnoj-kontrolnoj laboratoriji i Sektoru za izdavanje dozvola za lek. U tom periodu je položila stručni ispit za rad u organima državne uprave. U periodu od 2004-2006.godine je radila kao farmaceut u apoteci Trg i Galipea.

Autor je dva naučna rada objavljena u međunarodnim časopisima. Učestvovala je na naučnim skupovima međunarodnog značaja sa četiri saopštenja štampana u izvodu.