



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Ana N. Kolarević

**INHIBICIJA DEZOKSIRIBONUKLEAZE I
DERIVATIMA TIAZOLIDINA,
BENZIMIDAZOLA, 4H-HROMENA I
5,6,7,8-TETRAHIDROBENZO[4,5]TIENO
[2,3-*d*]PIRIMIDINA U *IN VITRO* USLOVIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Ana N. Kolarević

**INHIBITION OF DEOXYRIBONUCLEASE I
BY THE DERIVATIVES OF
THIAZOLIDINE, BENZIMIDAZOLE,
4*H*-CHROMENE AND 5,6,7,8-
TETRAHYDROBENZO[4,5]THIENO[2,3-*d*]
PYRIMIDINE IN *IN VITRO* CONDITIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Андрија Шмелцеровић, ванредни професор, Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Наслов: Инхибиција дезоксирибонуклеазе I дериватима тиазолидина, бензимидазола, 4*H*-хромена и 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидина у *in vitro* условима

У овој докторској дисертацији испитана је инхибиција дезоксирибонуклеазе I дериватима тиазолидина, бензимидазола, 4*H*-хромена и 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидина у *in vitro* условима. Као резултат, 23 једињења, од укупно 91 испитаних, инхибирало је ДНазу I са IC₅₀ вредностима мањим од 200 μМ, и то десет деривата тиазолидина, четири деривата бензимидазола, један дериват 4*H*-хромена и осам деривата 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидина. Ова једињења су се уједно показала ефикаснијим инхибиторима ДНазе I од кристал виолета (IC₅₀ > 300 μМ) који је коришћен као позитивна контрола. На основу Лајнвивер-Беркових дијаграма утврђено је да неки од најефикаснијих инхибитора ДНазе I показују неконкурентан тип инхибиције. Међумолекулске интеракције испитиваних једињења са ДНазом I предвиђене су методом молекулског *docking*-а.

У циљу стварања комплетније слике о могућој терапијској примени испитиваних тиазолидина, бензимидазола, 4*H*-хромена и 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидина који су инхибирали ДНазу I са IC₅₀ вредностима испод 200 μМ, предвиђене су и њихове физичко-хемијске, биофармацеутске, фармакокинетичке и токсиколошке карактеристике применом *in silico* метода. Већина инхибитора ДНазе I испуњава правила „Липинског” и „Вебера” што указује на то да би ова једињења могла испољити задовољавајући степен оралне биорасположивости у *in vitro/in vivo* условима. За сва једињења се предвиђа могућност интестиналне апсорпције, а за скоро сва и могућност проласка кроз крвно-мождану баријеру. Највећи број испитиваних деривата се прелиминарно може сврстати у биофармацеутску класу I и/или II. Испитивани инхибитори ДНазе I су углавном предвиђени као незнатно токсична и неканцерогена једињења, без ризика од појаве мутагених, туморогених и/или иритационих ефеката.

Генерални закључак ове докторске дисертације је да најефикаснији инхибитори ДНазе I из група испитиваних тиазолидина, бензимидазола, 4*H*-хромена и 5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидина представљају добру основу за дизајн нових и ефикаснијих инхибитора ДНазе I који могу имати потенцијалну терапијску примену, имајући у виду значај ДНазе I у патофизиологији бројних болести и поремећаја. С обзиром на чињеницу да не постоји инхибитор ДНазе I дефинисан као „златни стандард”, ове структуре могу

	представљати и нове стандарде у будућим испитивањима.
Научна област:	Фармацеутске науке
Научна дисциплина:	Фармацеутска хемија и Биофармација
Кључне речи:	Дезоксирибонуклеаза I, Инхибиција, Тиазолидини, Бензимидазоли, 4 <i>H</i> -Хромени, 5,6,7,8-Тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3- <i>d</i>]пиримидини, <i>In silico</i> студија
УДК:	577.114.3:615.355(043.3)
CERIF класификација:	В 740 Фармаколошке науке, фармакогнозија, фармација, токсикологија
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Dr. Andrija Šmelcerović, Associate Professor, University of Niš, Faculty of Medicine
Title:	Inhibition of Deoxyribonuclease I by the Derivatives of Thiazolidine, Benzimidazole, 4 <i>H</i> -Chromene and 5,6,7,8-Tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3- <i>d</i>]pyrimidine in <i>In Vitro</i> Conditions
Abstract:	<p>In this doctoral dissertation the inhibition of deoxyribonuclease I by the derivatives of thiazolidine, benzimidazole, 4<i>H</i>-chromene and 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-<i>d</i>]pyrimidine was evaluated <i>in vitro</i>. As a result, 23 compounds, out of 91 tested, inhibited DNase I with IC₅₀ values below 200 μM, including ten thiazolidine, four benzimidazole, one 4<i>H</i>-chromene, and eight 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-<i>d</i>]pyrimidine derivatives. These compounds were more effective DNase I inhibitors than crystal violet (IC₅₀ > 300 μM), used as a positive control. According to the Lineweaver-Burk plots, some of the most effective DNase I inhibitors show non-competitive type of inhibition. The intermolecular interactions of the tested compounds with DNase I were predicted by molecular docking studies.</p> <p>To provide a more complete picture of possible therapeutic applications of the investigated thiazolidines, benzimidazoles, 4<i>H</i>-chromenes and 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-<i>d</i>]pyrimidines that inhibited DNase I with IC₅₀ values below 200 μM, <i>in silico</i> study of their physico-chemical, biopharmaceutical, pharmacokinetic, and toxicological properties was performed. Most DNase I inhibitors fulfilled Lipinski's and Veber's rules predicting good oral bioavailability in <i>in vitro/in vivo</i> conditions. All compounds were predicted as able to be absorbed by intestine, as well as permeable across blood-brain barrier. Most of the tested derivatives could be preliminary classified as biopharmaceutical class I and/or II. The investigated DNase I inhibitors are generally predicted as slightly toxic and non-carcinogenic compounds, without risk of mutagenic, tumorigenic and/or irritant effects.</p> <p>The general conclusion of this doctoral dissertation is that the most effective DNase I inhibitors from the groups of the investigated thiazolidines, benzimidazoles, 4<i>H</i>-chromenes and 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-<i>d</i>]pyrimidines represent a good basis for the development of novel and more efficient DNase I inhibitors with potential therapeutic applications, considering the importance of DNase I in the pathophysiology of numerous disease conditions. Since there is no DNase I inhibitor defined as a "gold standard", the tested compounds could represent a new ones in future research.</p>
Scientific Field:	Pharmaceutical sciences
Scientific	Pharmaceutical chemistry and Biopharmacy

Discipline:

Key Words:

UDC:

CERIF
Classification:

Creative
Commons
License Type:

Doktorska disertacija „Inhibicija dezoksiribonukleaze I derivatima tiazolidina, benzimidazola, 4H-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidina u in vitro uslovima” je rađena na Katedri za farmaciju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Dobijanje, fizičko-hemijska karakterizacija, analitika i biološka aktivnost farmakološki aktivnih supstanci” broj OI 172044 pod rukovodstvom prof. dr Andrije Šmelcerovića, i u okviru internog projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu pod nazivom „Dizajn, sinteza i biološka evaluacija novih inhibitora medicinski značajnih enzima” broj 4 pod rukovodstvom doc. dr Jelene Lazarević.

Veliku i iskrenu zahvalnost za rukovođenje izradom ove disertacije dugujem svom mentoru dr Andriji Šmelceroviću, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Zahvaljujem se i dr Gordani Kocić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, dr Danici Agbabi, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Nataši Milić, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i dr Mariji Tasić-Kostov, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na izuzetno korisnim savetima i sugestijama.

Veliku zahvalnost dugujem dr Budimiru S. Iliću, asistentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, koji mi je pomogao u izvođenju studija molekuskog docking-a. Zahvaljujem se i dr Bojanu Bondžiću, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, i dr Denici Jančevoj, docentu Instituta za organsku hemiju sa Centrom za fitohemiju Bugarske akademija nauka u Sofiji, na ustupljenim supstancama (derivatima tiazolidina, benzimidazola i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidina) koje su ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji.

Neizmerno sam zahvalna svojoj porodici na ogromnoj podršci, razumevanju i strpljenju.

Skraćenice i simboli

ATK – aurintrikarboksilna kiselina

BCRP – protein rezistencije raka dojke (*breast cancer resistance protein*)

BSEP – eksportna pumpa za žučne soli (*bile salt export pump*)

BSK – biofarmaceutski sistem klasifikacije

CNS – centralni nervni sistem

DIPS – diizopropilsalicilna kiselina

DMF – dimetilformamid

DMSO – dimetil sulfoksid

DNaza – dezoksiribonukleaza

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilen diamin tetrasirćetna kiselina

EGTA – etilen glikol tetrasirćetna kiselina

HEMA – hidrolizovani etilen maleinski anhidrid

hERG – humani *ether-à-go-go-related* gen

HMGB1 – *high mobility group box 1*

IC₅₀ – koncentracija inhibitora koja smanjuje brzinu enzimske reakcije na polovinu

KMB – krvno-moždana barijera

LD₅₀ – srednja letalna doza

MATE1 – *multidrug and toxin extrusion 1*

m_iLogP – particioni koeficijent oktanol/voda

MOE – *molecular operating environment*

M_r – molekulska masa

MV – molekulska zapremina

NAPHI – *N*-acetil-*p*-benzohinon-imin

n_{OHNH} – broj donora vodoničnih veza (OH i NH grupe)

n_{ON} – broj akceptora vodikovih veza (O i N atomi)

n_{rot} – broj veza sa mogućnošću rotacije

NTCB – 2-nitro-5-tiocijanobenzojeva kiselina

NTSB – 2-nitro-5-tiosulfobenzojeva kiselina

OATP – organski anjonski transportni polipeptid (*organic anion-transporting polypeptide*)

OCT – organski katjonski transporter (*organic cation transporter*)

PES – polietilensulfonska kiselina

P-gp – P-glikoprotein

PPAR γ – peroksizom proliferatorom-aktivirani receptor γ

SD – standardna devijacija

$S_{\text{N}1}$ – $S_{\text{N}1}$ alifatična nukleofilna supstitucija

$S_{\text{N}2}$ – $S_{\text{N}2}$ alifatična nukleofilna supstitucija

$S_{\text{N}Ar}$ – aromatična nukleofilna supstitucija

TBAB – tetra-*n*-butilamonijum bromid

TD_{50} – srednja toksična doza

TPSA – topološka polarna površina molekula (*topological polar surface area*)

ΔG – Gibsova slobodna energija

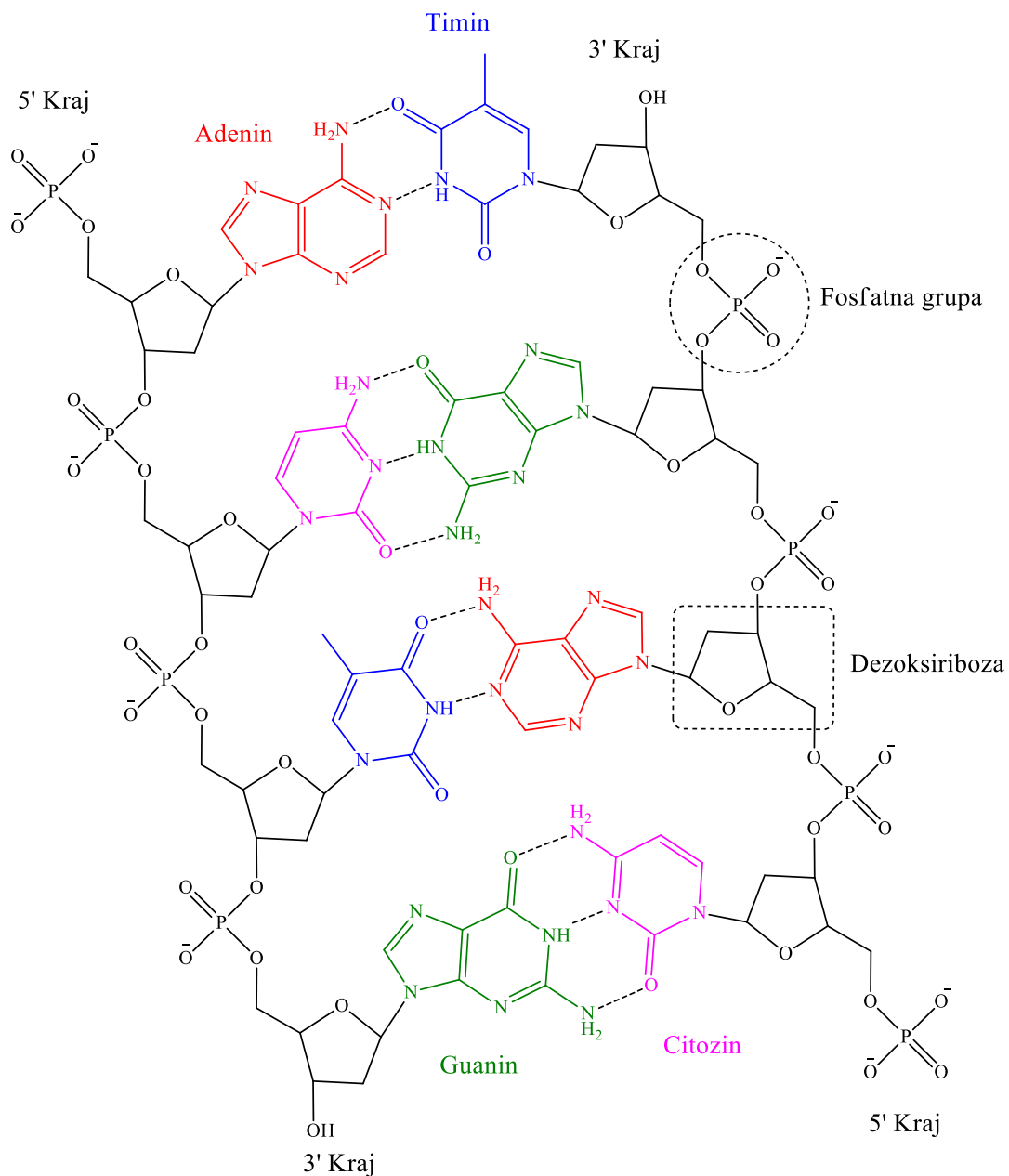
SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	2
2.1. DNaza I	2
2.1.1. Opšte karakteristike DNaze I	2
2.1.2. Optimalni reakcioni uslovi za aktivnost DNaze I	4
2.1.3. Mehanizam aktivnosti DNaze I.....	5
2.1.4. Značaj DNaze I u apoptozi	7
2.2. Inhibicija enzima	10
2.3. Značaj inhibicije DNaze I	12
2.4. Pregled inhibitora DNaze I.....	17
2.4.1. Organski inhibitori DNaze I	17
2.4.1.1. Prirodni organski inhibitori DNaze I.....	17
2.4.1.2. Sintetski organski inhibitori DNaze I.....	21
2.4.2. Neorganski inhibitori DNaze I.....	26
2.5. Hemijska struktura i biološka aktivnost tiazolidina, benzimidazola, 4 <i>H</i> -hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidina	27
2.5.1. Hemijska struktura i biološka aktivnost tiazolidina	27
2.5.2. Hemijska struktura i biološka aktivnost benzimidazola.....	32
2.5.3. Hemijska struktura i biološka aktivnost 4 <i>H</i> -hromena.....	34
2.5.4. Hemijska struktura i biološka aktivnost 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidina	35
2.6. <i>In silico</i> ispitivanja inhibitora medicinski značajnih enzima	36
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
4. MATERIJALI I METODE.....	38
4.1. Ispitivani derivati tiazolidina, benzimidazola, 4 <i>H</i> -hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidina	38

4.1.1. Ispitivani derivati tiazolidina	38
4.1.2. Ispitivani derivati benzimidazola	39
4.1.3. Ispitivani derivati 4 <i>H</i> -hromena	40
4.1.4. Ispitivani derivati 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidina	40
4.2. <i>In vitro</i> ispitivanje inhibicije komercijalne DNaze I	40
4.3. Određivanje kinetike inhibicije DNaze I.....	41
4.4. <i>Docking</i> studije interakcija ispitivanih jedinjenja sa DNazom I	41
4.5. Predviđanje fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina inhibitora DNaze I <i>in silico</i> metodama	42
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	50
5.1. Inhibicija DNaze I derivatima tiazolidina	50
5.2. Inhibicija DNaze I derivatima benzimidazola	71
5.3. Inhibicija DNaze I derivatima 4 <i>H</i> -hromena	81
5.4. Inhibicija DNaze I derivatima 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidina.....	83
5.5. Fizičko-hemijske, biofarmaceutske, farmakokinetičke i toksikološke osobine inhibitora DNaze I predviđene <i>in silico</i> metodama.....	99
5.5.1. Fizičko-hemijske i biofarmaceutske osobine inhibitora DNaze I.....	99
5.5.2. Biofarmaceutske i farmakokinetičke osobine inhibitora DNaze I	101
5.5.3. Biofarmaceutski sistem klasifikacije	105
5.5.4. Toksikološke osobine inhibitora DNaze I predviđene softverom <i>admetSAR</i>	106
5.5.5. Toksikološke osobine inhibitora DNaze I predviđene softverom <i>DataWarrior</i> .	111
5.5.6. Mogućnost vezivanja inhibitora DNaze I za DNK i proteine.....	111
6. ZAKLJUČAK	115
7. LITERATURA	118
BIOGRAFIJA AUTORA	131
BIBLIOGRAFIJA AUTORA.....	133
IZJAVE AUTORA	135

1. UVOD

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je jedan od najvažnijih makromolekula u živim organizmima koji sadrži genetske instrukcije neophodne za njihov rast, razvoj, funkcionisanje i reprodukciju. Strukturno, DNK predstavlja dvolančani polimer koji se sastoji iz nukleotida, međusobno povezanih jakim fosfodiesterkim vezama. U sastav nukleotida ulaze tri osnovne komponente: šećer dezoksiriboza, fosfatna grupa i purinska (adenin ili guanin) ili pirimidinska (timin ili citozin) baza (slika 1) [Nelson i Cox, 2004].



Slika 1. Struktura DNK lanca [Nelson i Cox, 2004].

Nukleaze su enzimi koji katalizuju degradaciju nukleinskih kiselina, odnosno raskidaju fosfodiesterne veze između nukleotidnih jedinica. Nukleaze koje raskidaju fosfodiesterne veze na krajevima polinukleotidnog lanca su egzonukleaze i mogu biti specifične za 3' ili 5' kraj, dok endonukleaze deluju unutar polinukleotidnog lanca dajući 3'-OH/5'-P ili 5'-OH/3'-P krajeve. Mogu biti specifične za jednolančane i/ili dvolančane strukture. Nukleaze specifične za molekul RNK su ribonukleaze, dok se nukleaze specifične za DNK nazivaju dezoksiribonukleaze (DNaze) [Eun, 1996; Schildkraut, 2001].

Dva glavna tipa DNaza su DNaza I, prisutna u egzokrinom pankreasu, i DNaza II (lizosomalna „kisela” DNaza), prisutna u timusu, jetri i slezini. Oba enzima poseduju endonukleolitičku aktivnost, pri čemu DNaza I kao proizvod reakcije daje 5'-P oligonukleotide, dok DNaza II kao proizvod reakcije daje 3'-P oligonukleotide [Kreuder i sar., 1984; Eun, 1996]. DNaze imaju važnu ulogu u patogenezi brojnih oboljenja i programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) [Baranovskii i sar., 2004], dok su inhibitori DNaza jedinjenja koja kontrolišu i/ili modifikuju ove procese [Lazarides i Lindberg, 1974].

2. TEORIJSKI DEO

2.1. DNaza I

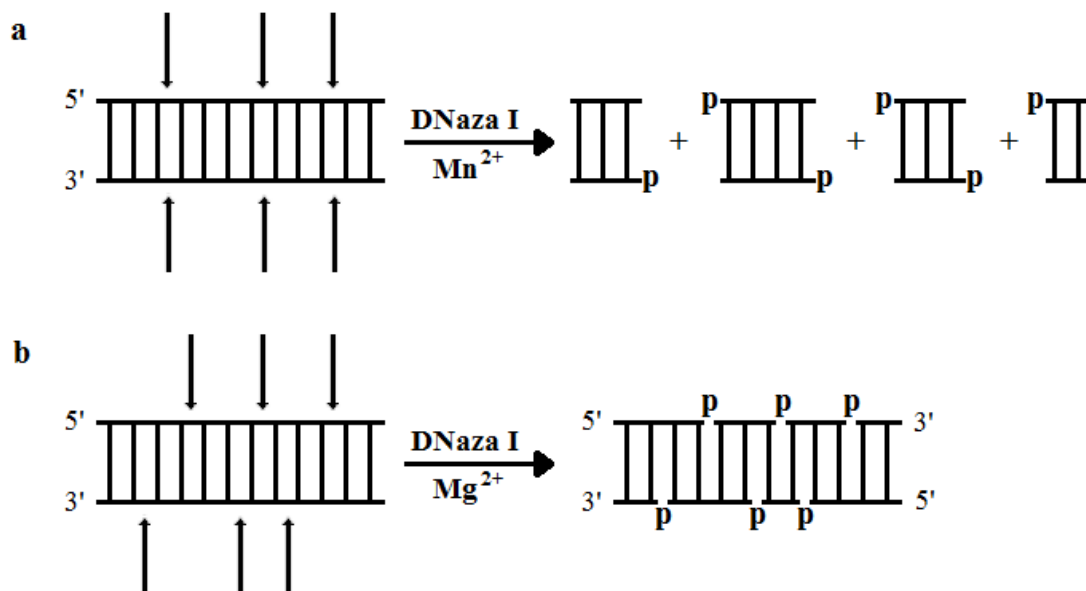
2.1.1. Opšte karakteristike DNaze I

Goveđa pankreasna dezoksiribonukleaza (DNaza I) [EC 3.1.21.1], koja je po svojim osobinama vrlo slična humanoj DNazi I [Funakoshi i sar., 1977; Love i Hewitt, 1979], predstavlja jednu od najbolje okarakterisanih endonukleaza sisara. Ima molekulsku masu od 30,5 kDa i predstavlja mešavinu četiri izoenzima sa sličnim katalitičkim aktivnostima: DNaze A, B, C, i D. Glavni oblik (DNaza A) i u manjim količinama zastupljeni oblici (DNaza B i DNaza C) su prisutni u molarnom odnosu 4:1:1, dok je izoenzim DNaza D prisutan u vrlo maloj količini. Sva tri proteina (A, B i C) imaju NH₂-terminalni leucin, COOH-terminalni treonin i ugljeni hidrat vezan u jednoj poziciji. DNaze A i B imaju isti aminokiselinski sastav, ali se razlikuju po tome što frakcija A poseduje dva ostatka *N*-acetilglukozamina i šest ostataka manoze, dok frakcija B poseduje po jedan ostatak sijalinske kiseline i galaktoze, pored tri ostatka *N*-acetilglukozamina i pet ostataka manoze. DNaza C je slična DNazi A po prisustvu neutralnog ugljenohidratnog dela (dva ostatka *N*-acetilglukozamina i pet ostataka manoze), ali sadrži jedan ostatak histidina manje i jedan ostatak prolina više u odnosu na

DNazu A ili DNazu B. U ćelijama pankreasa se, dakle, sintetišu DNaze koje se razlikuju po ugljenohidratnom lancu i aminokiselinskoj sekvenci [Salnikow i sar., 1970; Eun, 1996].

DNaza I razlaže i jednolančanu i dvolančanu DNK proizvodeći 3'-OH/5'-P krajeve [Eun, 1996; Shiokawa i Tanuma, 2001], ali je dvolančana DNK 100-500 puta bolji supstrat za DNazu I nego jednolančana DNK [Drew, 1984]. Kao finalni proizvodi, delovanjem DNaze I, prvenstveno nastaju dinukleotidi (60%), zatim trinukleotidi (25%), ali i ostali oligonukleotidi (15%) [Vanecko i Laskowski, 1961]. Najmanji supstrat za DNazu I je trinukleotid koji nosi 3'-P grupu. Na primer, DNaza I razlaže trinukleotid (d)ApApTp (deoksiadenilil-(3'-5')-deoksiadenilil-(3'-5')-timidin-3'-fosfat) na (d)ApA (deoksiadenilil-(3'-5')-adenozin) i (d)pTp (timidin-(3'-5')-difosfat) specifično cepajući vezu između purinske i pirimidinske baze (pPu-pPy) [Potter i sar., 1958].

U zavisnosti od reakcionih uslova, DNaza I može vršiti ili potpuno cepanje dvolančane DNK ili samo zasecanje jednog lanca dvolančane DNK (tzv. *nicking* aktivnost). U prisustvu oba jona Ca^{2+} i Mg^{2+} (ili Mn^{2+}), DNaza I vrši potpuno cepanje dvolančane DNK, dok u prisustvu samo jona Mg^{2+} vrši zasecanje jednog lanca dvolančane DNK (slika 2) [Eun, 1996].



Slika 2. Aktivnost DNaze I: (a) potpuno cepanje dvolančane DNK; (b) zasecanje (*nicking*) dvolančane DNK [Eun, 1996].

2.1.2. Optimalni reakcioni uslovi za aktivnost DNaze I

DNaza I ispoljava svoju maksimalnu aktivnost, u prisustvu oba jona Mg^{2+} i Ca^{2+} , pri optimalnoj pH vrednosti između 7,0 i 8,0. U prisustvu samo jona Mg^{2+} , DNaza I ispoljava svoju maksimalnu aktivnost pri pH = 5,5, ali ona iznosi svega 3% od vrednosti koja se postiže u prisustvu oba jona Mg^{2+} i Ca^{2+} . U prisustvu samo jona Ca^{2+} , DNaza I je optimalno aktivna pri pH = 8,0, a maksimalna aktivnost iznosi samo 1% od vrednosti dobijene u prisustvu oba jona Mg^{2+} i Ca^{2+} [Price, 1975; Eun, 1996].

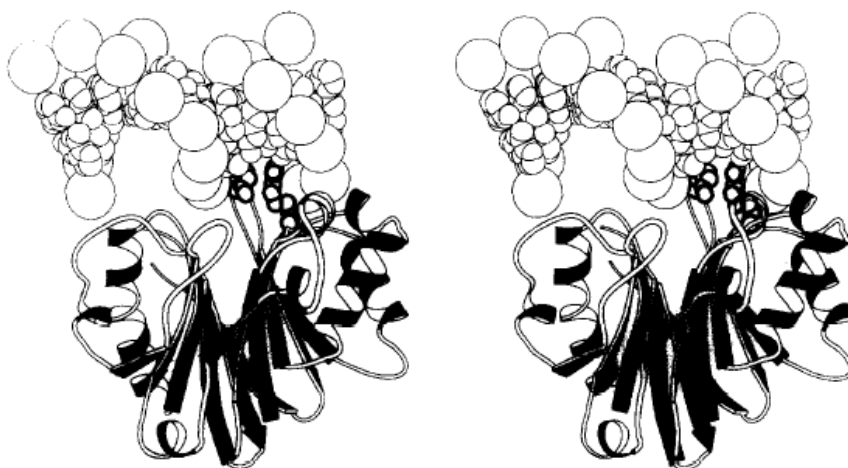
Vezivanje jona Ca^{2+} je neophodno da bi DNaza I vezala supstrat. Dakle, u odsustvu jona Ca^{2+} , vezivanje DNK za enzim je praktično jednako nuli. Optimalna koncentracija jona Ca^{2+} koja je neophodna da bi DNaza I ispoljila svoju aktivnost iznosi 0,5 mM. Prisustvo jona Ca^{2+} ne samo da čini DNazu I sposobnom za vezivanje DNK, već i transformiše enzim u katalitički kompetentan oblik. Vezivanje jona Ca^{2+} stabilizuje aktivnu konformaciju DNaze I i čini je otpornijom prema denaturaciji i digestiji tripsinom. U koncentraciji od 0,1 mM jona Ca^{2+} , postiže se 50% zaštite enzima. DNaza I može vezati pet do sedam jona Ca^{2+} . Pri pH = 7,5 DNaza I može snažno vezati dva jona Ca^{2+} , a slabo još tri jona Ca^{2+} , dok pri pH = 5,5 DNaza I može snažno vezati samo jedan jon Ca^{2+} [Price, 1972; Price, 1975; Eun, 1996].

Pored jona Ca^{2+} , za aktivnost DNaze I neophodan je i Mg^{2+} jon, u optimalnoj koncentraciji od 5-10 mM. Aktivacijski efekat jona Mg^{2+} pripisuje se u velikoj meri njegovoj sposobnosti da se veže za DNK supstrat, iako se jon Mg^{2+} može vezati i za enzim. DNaza I ima dva mesta za snažno vezivanje jona Mg^{2+} . Pri pH = 7,5, joni Mg^{2+} se mogu takmičiti za jedno od dva mesta za koja se snažno vezuju joni Ca^{2+} , ali ne predstavljaju konkurenciju za jedino mesto za koje se jon Ca^{2+} snažno vezuje pri pH = 5,5 [Price, 1972; Eun, 1996].

DNaza I je u prisustvu jona Mg^{2+} stabilna pri optimalnoj temperaturi od 37°C, dok je u prisustvu jona Mn^{2+} stabilnost znatno veća, kada enzim ostaje aktivan i do 60°C [Pohl i sar., 1982]. Termostabilnost DNaze I u visokoj meri zavisi od koncentracije jona Mg^{2+} . Naime, nakon podvrgavanja temperaturi od 95°C tokom 30 minuta, DNaza I ostaje aktivna u prisustvu 2 mM $MgCl_2$, dok je potpuno inaktivirana u prisustvu 6 mM $MgCl_2$. Međutim, inaktivirana DNaza I može povratiti svoju aktivnost nakon inkubacije sa 2 mM $MgCl_2$ [Bickler i sar., 1992; Eun, 1996].

2.1.3. Mehanizam aktivnosti DNaze I

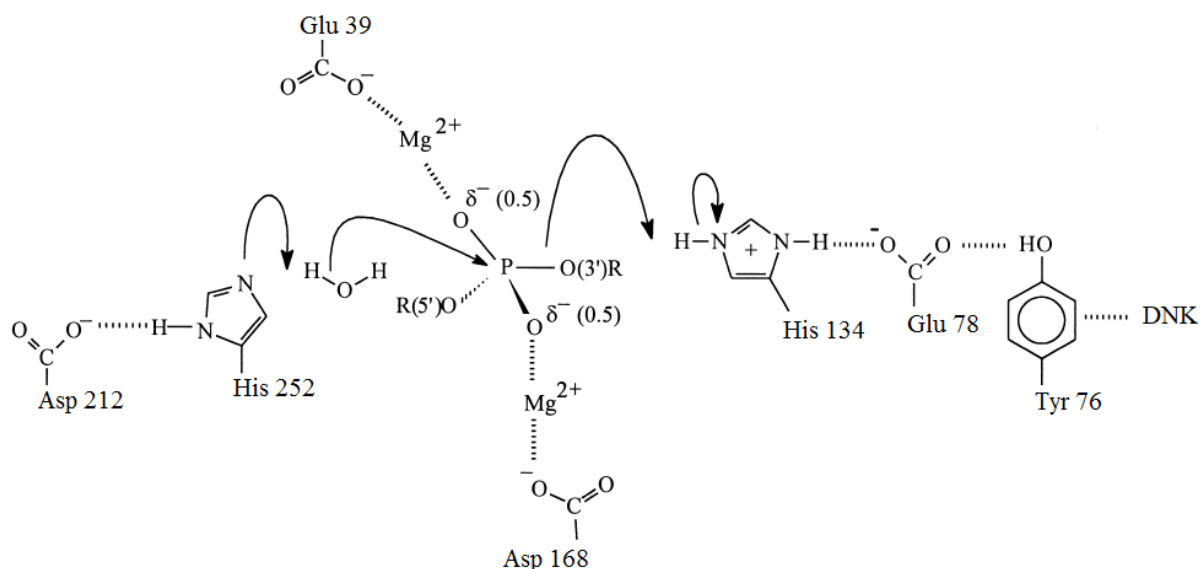
DNaza I se vezuje isključivo za mali žleb dvolančane DNK i raskida svaki lanac pojedinačno. Pritom, enzim formira kontakte unutar samog žleba, ali i sa fosfatnim osnovama duž obe strane malog žleba. Vezivanje DNaze I za mali žleb je asimetrično, pri čemu enzim pokriva, ali ne ostvaruje kontakte sa velikim žlebom (slika 3). Interakcije između DNK i DNaze I se protežu preko površine od 817 \AA^2 . Direktni kontakt DNaze I i DNK se ostvaruje preko šest baznih parova i šest fosfatnih grupa, obuhvatajući ukupno 14 vodoničnih veza, jedan soni most (tip nekovalentnih interakcija koji predstavlja kombinaciju vodoničnog vezivanja i elektrostatičkih interakcija), nekoliko van der Valsovih interakcija i jednu steking (*stacking*) interakciju (nekovalentna interakcija između aromatičnih prstenova). Pored ovih direktnih kontakata, zastupljene su i interakcije posredovane vodom koje dodatno stabilizuju kompleks između DNK i DNaze I. Prilikom interakcija između DNK i DNaze I dolazi do konformacionih promena DNK, ali ne i DNaze I. Naime, u molekulu DNK dolazi do proširenja malog žleba sa 3 \AA na oko 15 \AA savijajući DNK ka glavnom žlebu za oko 20° . Najznačajnija interakcija koja doprinosi konformacionim promenama u molekulu DNK je steking interakcija tirozinskog prstena (Tyr 76) sa dezoksiribozom. Smatra se da katalitička aktivnost DNaze I prvenstveno zavisi od širine i konformacione savitljivosti (rigidnosti) samog žleba [Lahm i Suck, 1991].



Slika 3. Vezivanje DNaze I za mali žleb dvolančane DNK [Lahm i Suck, 1991].

DNaza I katalizuje hidrolizu DNK konformacije tipa B, dok se DNK konformacije tipa A ili Z može razgraditi samo nakon konverzije u konformaciju tipa B [Suck i Oefner, 1986].

Najznačajnu ulogu u katalitičkom mehanizmu DNaze I imaju četiri aminokiseline, His 134, His 252, Glu 39 i Asp 168 [Pan i sar., 1998; Jones i sar., 1996; Guérout i sar., 2010]. Aminokiseline His 134 i His 252 omogućavaju opštu kiselo-baznu katalizu i apsolutno su neophodne za katalitičku funkciju DNaze I, dok aminokiseline Glu 39 i Asp 168 vrše koordinaciju metalnih jona (slika 4) [Jones i sar., 1996; Pan i sar., 1998]. U molekulu DNaze I karboksilat iz Asp 212 prihvata proton iz His 252 koji zauzvrat prihvata proton iz molekula vode. Hidroksilna grupa (iz molekula vode), kao nukleofil, napada atom fosfora i raskida P-O3' vezu. Nukleofilni napad hidroksilne grupe je olakšan pozitivno naelektrisanim jonima Ca^{2+} ili Mg^{2+} koji interaguju sa kiseonikom iz fosfatne grupe. Sa druge strane, može se videti da Glu 78 ostvaruje jake vodonične veze i sa Tyr 76, aminokiselinom ključnom za vezivanje za DNK, i sa His 134, aminokiselinom ključnom za katalitičku aktivnost. Nukleofilni napad hidroksilne grupe prvenstveno raskida P-O3' vezu, ali ne i P-O5' vezu najverovatnije usled toga što se metalni jon (Ca^{2+} ili Mg^{2+}) vezuje na takav način da je veza P-O5' stabilnija od veze P-O3' (slika 4) [Jones i sar., 1996].



Slika 4. Mehaniizam katalitičke aktivnosti DNaze I zasniva se na opštoj kiselo-baznoj katalizi u prisustvu vode, pri čemu His 252 deluje kao baza (akceptor protona), a His 134 kao kiselina (donor protona) [Jones i sar., 1996].

Značajne interakcije sa molekulom DNK formiraju i aminokiseline koje se nalaze u neposrednoj blizini aktivnog mesta, Gln 9, Arg 41, Arg 111, Asn 170, Tyr 76, Tyr 175, Tyr 211. Sa druge strane, interakcije sa aminokiselinama udaljenim od aktivnog mesta enzima, Arg 73, Asn 110, Asn 74, Asp 107, Glu 13, His 44, Pro 206, Ser 43, Ser 75, Thr 10, Thr 14, Thr 205, Thr 207, nisu od velikog značaja za hidrolitičku aktivnost DNaze I [Pan i sar., 1998].

Na osnovu svega navedenog, može se izvršiti klasifikacija aminokiselinskih ostataka u zavisnosti od njihove funkcionalne uloge (tabela 1), pri čemu su aminokiseline klase I najznačajnije, dok su aminokiseline klase IV najmanje značajne za katalitičku aktivnost DNaze I.

Tabela 1. Klasifikacija aminokiselinskih ostataka DNaze I.

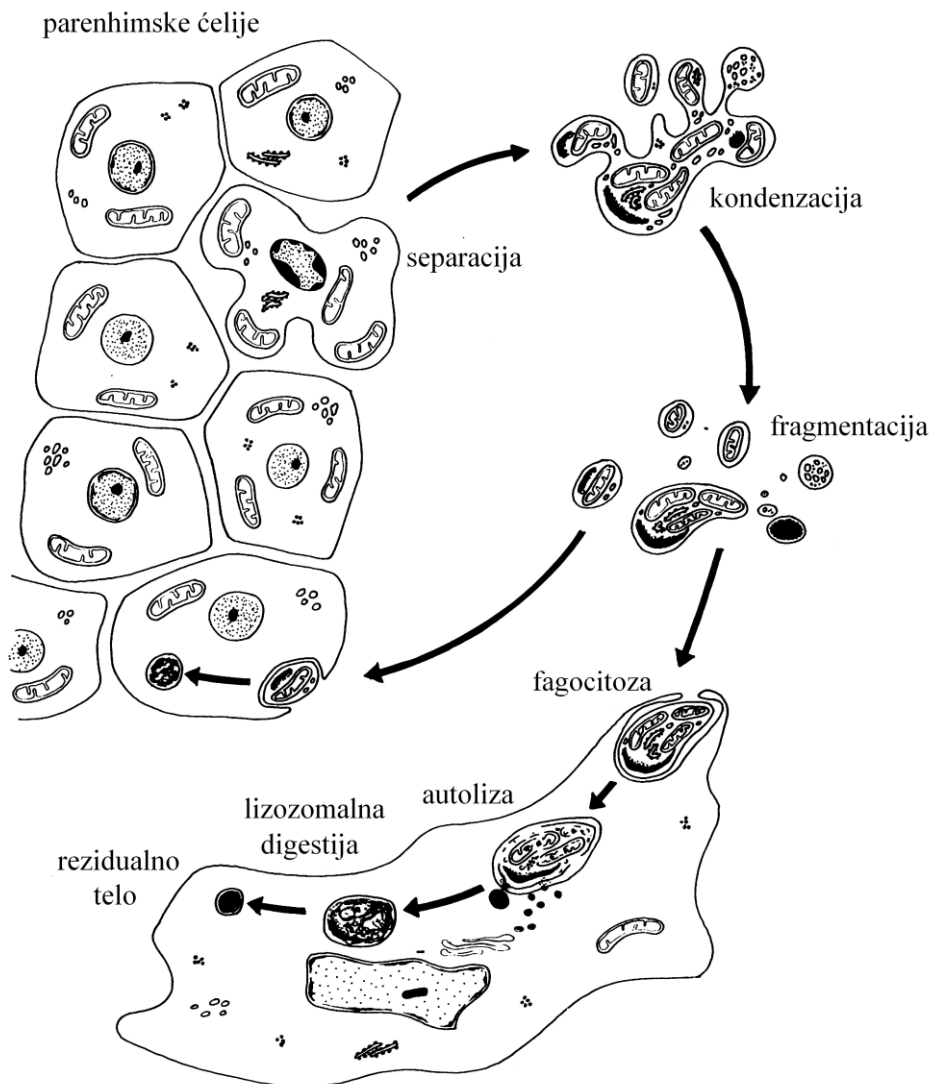
Klasa	Aminokiseline	Uloga
I	His 134, His 252	Kataliza
II	Glu 39, Asp 168	Koordinacija metalnih jona
III	Gln 9, Arg 41, Arg 111, Asn 170, Tyr 76, Tyr 175, Tyr 211	Interakcije sa DNK u neposrednoj blizini aktivnog mesta
IV	Arg 73, Asn 110, Asn 74, Asp 107, Glu 13, His 44, Pro 206, Ser 43, Ser 75, Thr 10, Thr 14, Thr 205, Thr 207	Interakcije sa DNK udaljene od aktivnog mesta

2.1.4. Značaj DNaze I u apoptozi

Apoptoza predstavlja mehanizam kontrolisane ćelijske smrti i ima komplementarnu, ali suprotnu ulogu u odnosu na proliferaciju ćelija kako bi se održala uravnotežena ćelijska populacija (homeostaza). Ovaj aktivan i specifično programiran fenomen može biti pokrenut od strane niza spoljašnjih i/ili unutrašnjih signala, kako fizioloških, tako i patoloških. Apoptoza se ne javlja nasumično u svim ćelijama, već je to proces kojim organizam eliminiše „neželjene”, odnosno stare, oštećene, prekancerozne, prekomerno proizvedene, nepravilno razvijene ili genetski oštećene ćelije [Kerr i sar., 1972; Bursch i sar., 1992; Thompson, 1995].

Proces apoptoze započinje aktivacijom endogenih proteaza, a rezultuje nizom morfološki različitih promena, kao što su odvajanje ćelija od susednih ćelija, kondenzacija

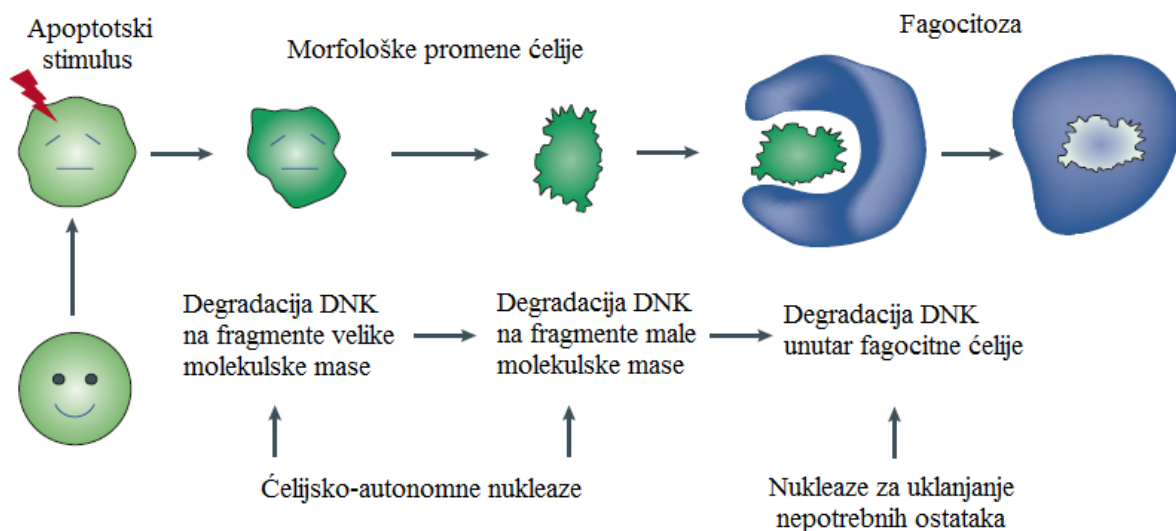
citoplazme i jedra, smanjenje volumena čitave ćelije i fragmentacija ćelije na membranama ograničena apoptotska tela. Unutrašnje i spoljašnje membrane ćelija ostaju intaktne, tako da nema oslobađanja ćelijskog sadržaja u okolinu, niti pojave zapaljenjskog odgovora. Na kraju, apoptotska tela podležu procesu fagocitoze i lizosomalnoj digestiji (slika 5) [Kerr i sar., 1972; Bursch i sar., 1992].



Slika 5. Morfološke karakteristike apoptoze [Kerr i sar., 1972].

Do kondenzacije jedra tokom apoptoze dolazi usled aktivacije endonukleaza koje počinju da razlažu jedarnu DNK. Postoje dve klase apoptotskih nukleaza, i to ćelijsko-autonomne nukleaze i nukleaze za uklanjanje nepotrebnih ostataka (*waste-management*

nucleases) (slika 6). Ćelijsko-autonomne nukleaze su odgovorne za inicijalno raskidanje DNK, pa moraju imati direktan pristup nukleoplazmi kako bi razgradile DNK, i to najpre na fragmente velike molekulske mase, a zatim i na fragmente male molekulske mase. Sa druge strane, nukleaze za uklanjanje nepotrebnih ostataka deluju nakon fagocitoze apoptotskih ćelija kada razlažu preostalu DNK. Ćelijsko-autonomne nukleaze se smatraju neesencijalnim, dok se nukleaze za uklanjanje nepotrebnih ostataka smatraju esencijalnim enzimima za proces apoptoze. Naime, ako ćelijsko-autonomne nukleaze ne razlože DNK, ona će se onda, nakon fagocitoze, razložiti od strane nukleaza za uklanjanje nepotrebnih ostataka. Ukoliko ni one ne deluju, organizam postaje konstantno zatrpan nerazloženom DNK [Samejima i Earnshaw, 2005].



Slika 6. Ćelijsko-autonomne i nukleaze za uklanjanje nepotrebnih ostataka [Samejima i Earnshaw, 2005].

DNaza I predstavlja jednu od glavnih nukleaza uključenih u degradaciju DNK tokom apoptoze [Polzar i sar., 1993; Peitsch i sar., 1993; Oliveri i sar., 2001; Oliveri i sar., 2004; Rauch i sar., 1997; Samejima i Earnshaw, 2005]. Ona deluje i kao ćelijsko-autonomna nukleaza i kao nukleaza za uklanjanje nepotrebnih ostataka [Oliveri i sar., 2001; Samejima i Earnshaw, 2005].

2.2. Inhibicija enzima

Inhibicija enzima je jedan od načina kojim se reguliše aktivnost enzima, kako u prirodnim, tako i u eksperimentalnim uslovima. Većina lekova funkcioniše inhibiranjem specifičnog enzima. Inhibitori enzima se mogu klasifikovati kao reverzibilni (povratni) i ireverzibilni (nepovratni) [Ha i Bhagavan, 2011]. Ireverzibilni inhibitori najčešće formiraju kovalentne veze sa enzimom dovodeći do kompletnog gubitka enzimske aktivnosti nakon određenog vremena: $E + I \leftrightarrow EI \rightarrow E'I$ (inaktiviran enzim). Sa druge strane, reverzibilni inhibitori se za enzim vezuju nekovalentno, pri čemu nagrađeni kompleks enzim-inhibitor može disosovati do slobodnog enzima i inhibitora: $E + I \leftrightarrow EI$. To znači da enzim može povratiti svoju aktivnost kada se inhibitor ukloni iz sistema u kojem enzim funkcioniše. Postoji nekoliko tipova reverzibilne inhibicije: konkurentna (kompetitivna), beskonkurentna (beskompetitivna), nekonkurentna (nekompetitivna) i mešovita [Ha i Bhagavan, 2011].

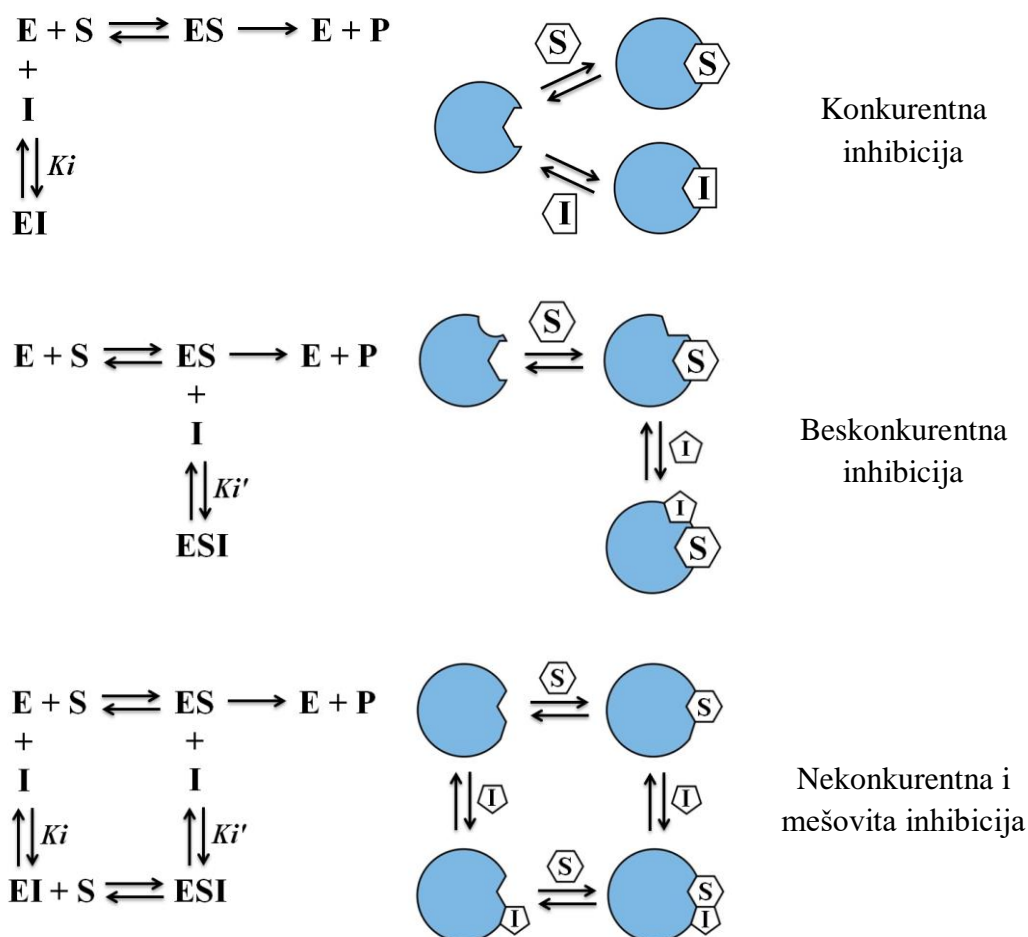
Konkurentni inhibitori se mogu vezati samo za slobodan enzim. Inhibitor i supstrat su strukturno vrlo slični i imaju afinitet za isto mesto u aktivnom centru enzima. Enzim u jednom trenutku može vezati ili inhibitor ili supstrat, ali ne i oba istovremeno. Konkurentna inhibicija se može prevazići nadmašivanjem koncentracije inhibitora, odnosno primenom većih koncentracija supstrata (slike 7 i 8) [Ha i Bhagavan, 2011; Ramsay i Tipton, 2017].

Beskonkurentni inhibitori se mogu vezati samo za kompleks enzim-supstrat, ali ne i za slobodan enzim. Dakle, za enzim prvo mora da se veže supstrat, kako bi došlo do modifikacije i aktivacije mesta za koje se onda može vezati inhibitor [Kenakin, 2012]. Supstrat i inhibitor su strukturno različiti i ne vezuju se za iste grupe na površini enzima. Ovaj tip inhibicije zavisi samo od koncentracije inhibitora i ne može se umanjiti povećanjem koncentracije supstrata (slike 7 i 8).

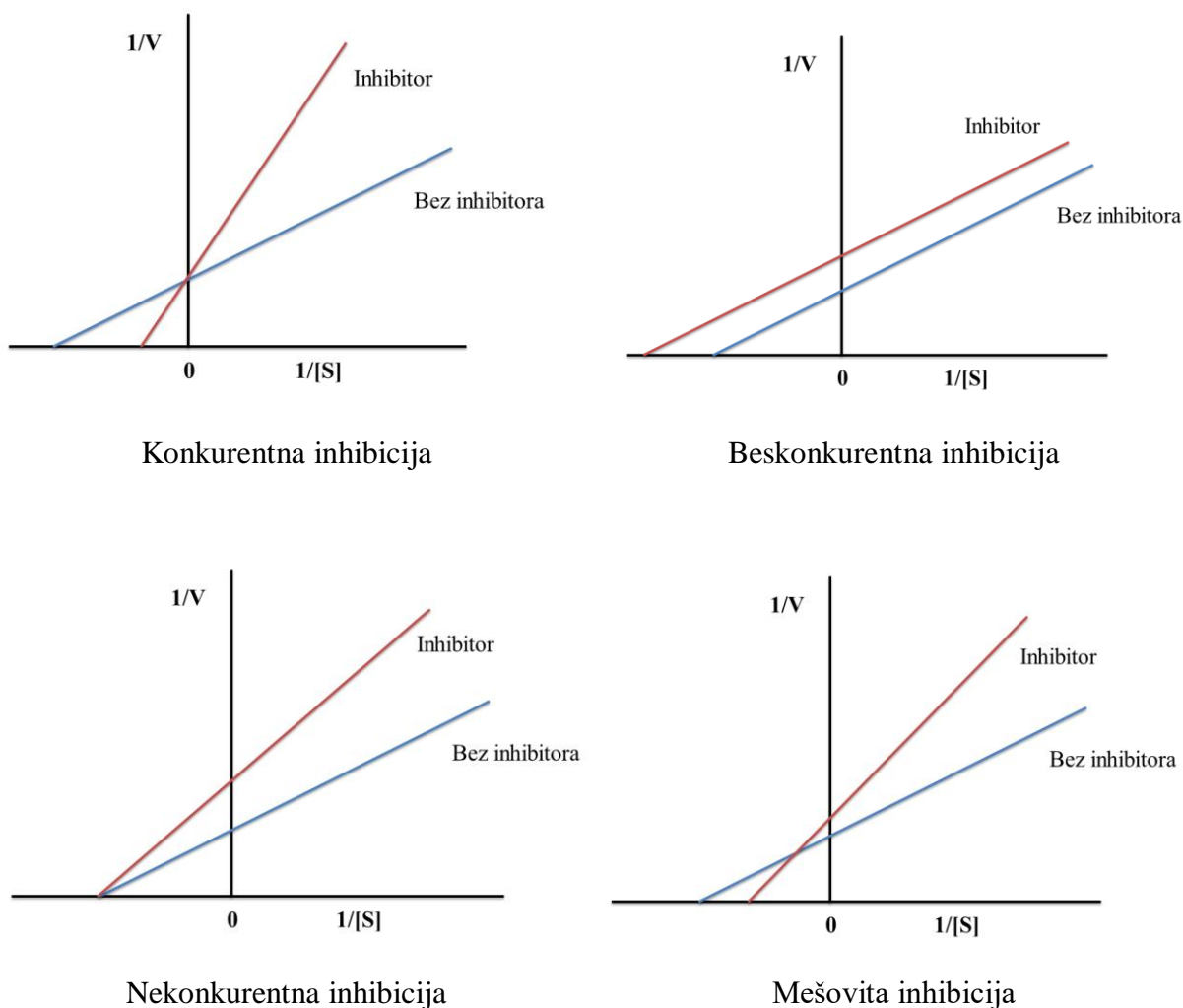
Nekonkurentni inhibitori obično nemaju nikakvu strukturnu sličnost sa supstratom, a vezuju se za alosterijsko mesto enzima koje se razlikuje od mesta vezivanja supstrata. Inhibitor se jednakim afinitetom vezuje ili za slobodan enzim ili za kompleks enzim-supstrat. U oba slučaja, kompleks je katalitički neaktivan. Između inhibitora i supstrata nema konkurencije, odnosno vezivanje inhibitora ne sprečava vezivanje supstrata, i obratno. Nekonkurentna inhibicija se ne može prevazići povećanjem koncentracije supstrata (slike 7 i 8) [Ha i Bhagavan, 2011]. Ima podataka da se nekonkurentni inhibitori mogu vezati i za deo aktivnog mesta ometajući interakciju enzima sa supstratom [Blat, 2010].

Mešoviti inhibitori se mogu vezati i za slobodan enzim i za kompleks enzim-supstrat, ali ne jednakim afinitetom, već je afinitet inhibitora veći za jedan od ova dva stanja. Inhibitor i supstrat se ne vezuju za isto mesto na površini enzima [Kenakin, 2012]. Za razliku od beskonkurentne i nekonkurentne inhibicije, gde inhibitor ne utiče na afinitet vezivanja enzima sa supstratom, kod mešovite inhibicije vezivanje inhibitora smanjuje sposobnost enzima da veže supstrat, i obratno (vezivanje supstrata smanjuje sposobnost enzima da veže inhibitor). Povećana koncentracija supstrata može smanjiti inhibiciju, ali je ne može potpuno prevazići (slike 7 i 8).

Kao mera efikasnosti jedinjenja u inhibiciji određene biološke/biohemijske funkcije koristi se i koncentracija inhibitora koja smanjuje brzinu enzimske reakcije na polovinu, i označava se sa IC_{50} [Hendriks, 2010].



Slika 7. Tipovi reverzibilne inhibicije enzima [Nelson i Cox, 2004].

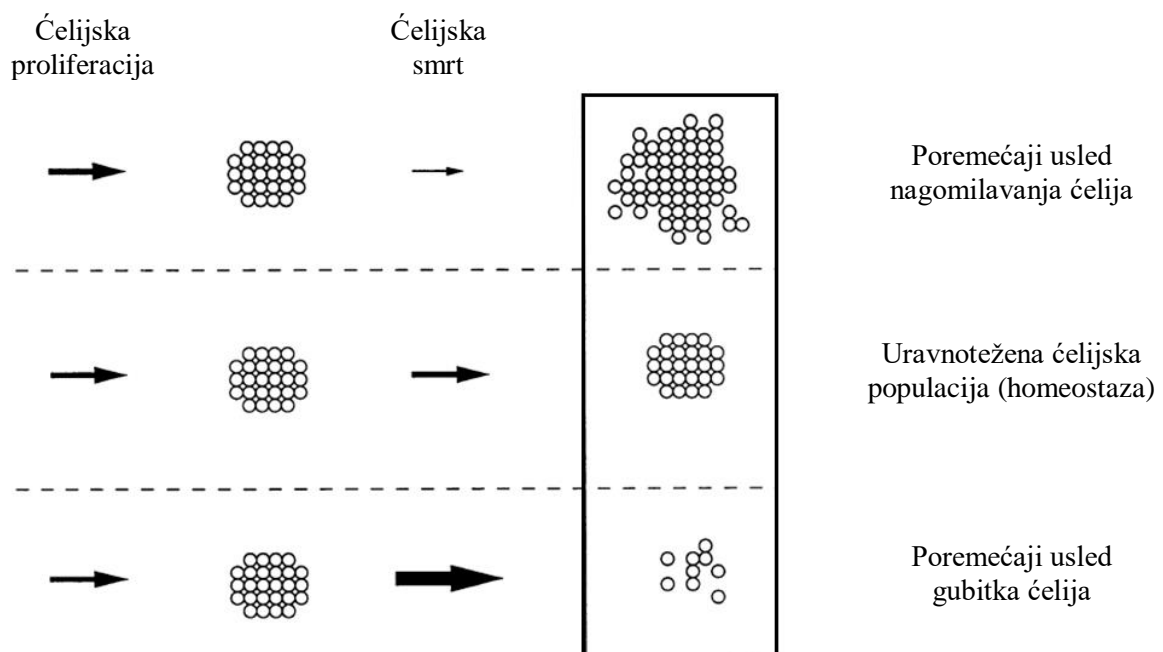


Slika 8. Lajnvider-Berkovi dijagrami za različite tipove inhibicije [Nelson i Cox, 2004; Ha i Bhagavan, 2011].

2.3. Značaj inhibicije DNaze I

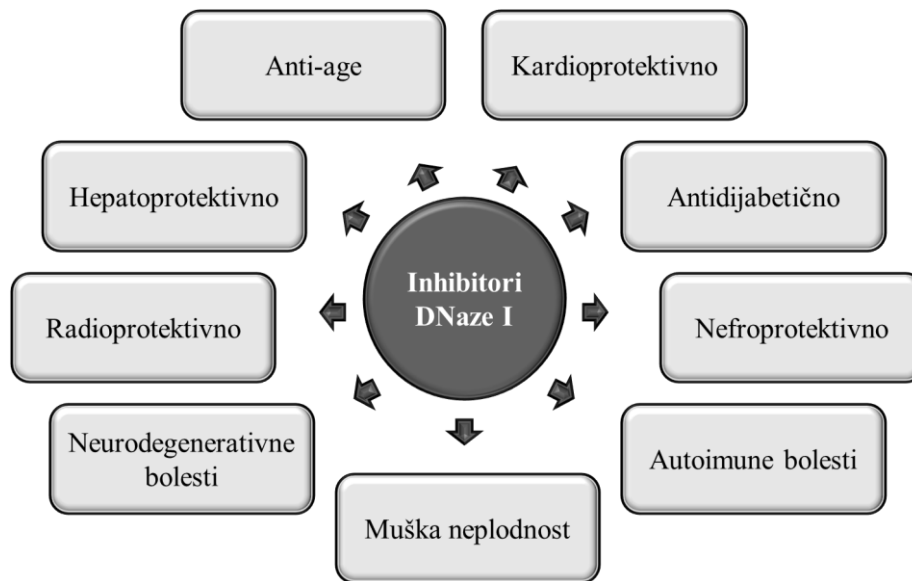
Inhibicija DNaze I predstavlja značajan mehanizam zaštite DNK od prevremene degradacije tokom oštećenja ćelija [Eulitz i Mannherz, 2007]. Inhibitori DNaze I se mogu koristiti kao jedinjenja za dijagnozu, praćenje i terapiju raznih oboljenja. Na primer, ljudski pankreasni inhibitor DNaze I je pouzdan indikator pankreasnog inflamatornog stanja i može se koristiti za ranu detekciju hroničnih pankreasnih poremećaja [Funakoshi i sar., 1980]. Inhibitori DNaze γ , člana DNaza I familije, mogu imati potencijalnu primenu u terapiji sepse, cerebralne ishemijske i drugih inflamatornih oboljenja uzrokovanih oslobađanjem HMGB1 (*high mobility group box 1*) proteina [Yamada i sar., 2011].

Narušavanje ravnoteže između proliferacije i smrti ćelija rezultuje ili akumulacijom ili gubitkom ćelija, što kod ljudi može doprineti razvoju različitih bolesti (slika 9). Prekomerna ćelijska smrt može biti rezultat stečenih ili genetskih faktora koji povećavaju akumulaciju signala koji indukuju apoptozu ili koji smanjuju prag do koga ovi signali indukuju apoptozu [Thompson, 1995]. Prekomerna apoptoza povezana je sa razvojem mnogih bolesti i poremećaja, uključujući autoimune poremećaje (AIDS) [Oliveri i sar., 2001; Elmore, 2007], neurodegenerativne poremećaje (Alchajmerovu bolest, Parkinsonovu bolest, Hantingtonovu bolest, amiotrofičnu lateralnu sklerozu, pigmentnu retinopatiju (*retinitis pigmentosa*), spinalnu mišićnu atrofiju, cerebelarnu degeneraciju) [Isacson, 1993; Heintz, 1993; Thompson, 1995; Oliveri i sar., 2001; Elmore, 2007], akutnu bolest „kalem protiv domaćina” (*graft-versus-host disease*) [Oliveri i sar., 2001], ishemijske poremećaje (miokardnu ishemiju, infarkt miokarda i moždani udar) [Tanaka i sar., 1994; Rosenbaum i sar., 1994; Thompson, 1995; Oliveri i sar., 2001; Elmore, 2007] i akutnu masnu degeneraciju jetre (indukovanu različitim toksinama, uključujući alkohol) [Goldin i sar., 1993]. S obzirom na fundamentalnu ulogu u degradaciji DNK tokom apoptoze, DNaza I ima važnu ulogu u razvoju ovakvih patoloških stanja, dok inhibitori DNaze I mogu biti od izuzetnog značaja u njihovoj prevenciji i terapiji (slika 10).



Slika 9. Uticaj različitih stopa smrtnosti ćelija na homeostazu [Thompson, 1995].

Inhibitori DNaze I predstavljaju atraktivnu potencijalnu metu za dizajn alternativnih strategija za lečenje brojnih patoloških stanja praćenih povišenim nivoima DNaze I, kao što su miokardna disfunkcija kod starijih osoba, idiopatska dilatirana kardiomiopatija, dijabetes tipa 2, nefrotoksičnost izazvana cisplatinom, oštećenja izazvana gama zračenjem, hepatocelularna nekroza izazvana acetaminofenom (slika 10).



Slika 10. Potencijalni terapijski efekti inhibitora DNaze I.

Miokardna disfunkcija kod starijih osoba

Starenje doprinosi povećanoj apoptozi, odnosno povećanoj osetljivosti ćelija na apoptozu, pa je u tom slučaju i stepen fragmentacije DNK znatno veći. Posledica toga je disfunkcija određenih tkiva i organa kod starijih osoba [Higami i Shimokava, 2000]. Ispitivanja na pacovima i ljudima su pokazala da starenje ubrzava fragmentaciju DNK u miocitima, uzrokujući značajan gubitak miocita (apoptozu miocita), a time i miokardnu disfunkciju kod starijih osoba [Anversa i sar., 1990; Olivetti i sar., 1991; Liu i sar., 1998]. Smatra se da enzim DNaza I ima značajnu ulogu u patogenezi ovakvih stanja jer je utvrđeno da se starenjem povećava njegova aktivnost u miocitima. Naime, ispitivanja na pacovima su pokazala da se starenjem povećava nivo dijastolnog kalcijuma koji dovodi do aktivacije DNaze I, a ona dalje izaziva apoptozu, odnosno gubitak miocita i posledično miokardnu disfunkciju kod starijih osoba [Nitahara i sar., 1998].

Idiopatska dilatirana kardiomiopatija

Kod pacijenata sa dijagnostifikovanom idiopatskom dilatiranom kardiomiopatijom utvrđen je povišen nivo DNaze I što ukazuje na moguću implikaciju apoptoze u patofiziologiji ovog poremećaja [Yao i sar., 1996].

Dijabetes tip 2

Ispitivanja su pokazala da je kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 značajno povećana aktivnost DNaze I u serumu i pankreasu. Naime, visoki nivoi glukoze kod ovih pacijenata indukuju ekspresiju DNaze I i istovremeno povećavaju stopu apoptoze. Dakle, povećana aktivnost DNaze I se može dovesti u vezu sa oštećenjima pankreasa i može biti jedan od uzročnika koji izazivaju dijabetes [Zhu i sar., 2014].

Nefrotoksičnost izazvana cisplatinom

Cisplatina, često korišćeni hemoterapeutik, ima ograničenu upotrebu zbog svog nefrotoksičnog efekta. U ćelijama bubrega, cisplatina uzrokuje morfološke promene karakteristične za apoptozu, kao što su smežuranje i skupljanje ćelija, kondenzacija hromatina, nuklearna marginacija i značajno povećana fragmentacija DNK. Fragmentacija DNK je posredovana DNazom I, jednom od najaktivnijih endonukleaza u bubregu. Ovi podaci ukazuju na značajnu ulogu DNaze I u razvoju oštećenja bubrega izazvanih cisplatinom [Takeda i sar., 1996; Basnakian i sar., 2005]. Postavlja se, međutim, pitanje da li DNaza I deluje kao jedini enzim ili je fragmentacija DNK i smrt bubrežnih ćelija posledica delovanja i nekih drugih endonukleaza [Basnakian i sar., 2005; Yin i sar., 2007]. Utvrđeno je da fragmentacija DNK izazvana cisplatinom zavisi, kako od DNaze I, tako i od endonukleaze G [Yin i sar., 2007]. DNaza I je neophodna za indukciju endonukleaze G koja se tokom apoptoze oslobađa iz mitohondrija i translocira do nukleusa gde uzrokuje fragmentaciju DNK i smrt bubrežnih ćelija [Li i sar., 2001; Yin i sar., 2007]. Prema tome, inhibicija i DNaze I i endonukleaze G predstavlja značajan zaštitni mehanizam ćelija bubrega od oštećenja izazvanih cisplatinom.

Oštećenja izazvana gama zračenjem

Gama zračenje može izazvati oštećenja brojnih organa, uključujući creva, slezinu i koštanu srž. Apoptoza indukovana gama zračenjem u ovim radiosenzitivnim organima je posledica fragmentacije DNK koja je posredovana DNazom I. Inaktivacija ili inhibicija DNaze I može, dakle, imati radioprotektivne efekte. Tako je utvrđeno da cinkov helat 3,5-diizopropilsalicilne kiseline (Zn-DIPS) inhibira aktivnost DNaze I *in vitro* i time sprečava fragmentaciju DNK i naknadno oštećenje tkiva. Razvoj specifičnih inhibitora DNaze I može doprineti otkrivanju moćnih radioprotektivnih agenasa [Apostolov i sar., 2009].

Hepatoceularna nekroza izazvana acetaminofenom

Prekomerna doza acetaminofena (paracetamola), široko korišćenog analgetika i antipiretika može dovesti do hepatocelularne nekroze. Naime, reakcijom oksidacije acetaminofena formira se visoko reaktivan metabolit *N*-acetil-*p*-benzohinon-imin (NAPHI). Reakcija oksidacije je katalizovana citohrom P450 oksidaza kompleksom koji je lociran u membrani endoplazmatskog retikuluma. Smatra se da produkcija NAPHI narušava integritet endoplazmatskog retikuluma pri čemu dolazi do oslobađanja DNaze I. DNaza I tada dobija pristup, ne samo ekstracelularnom prostoru, već i citoplazmi i nukleusu gde uzrokuje fragmentaciju DNK i smrt velikog broja hepatocita [Napirei i sar., 2006].

Inhibitori DNaze I u prevenciji muške neplodnosti

Nedavna istraživanja su pokazala da inhibitori DNaze I mogu biti korisni u prevenciji i/ili terapiji muške neplodnosti. Pored oksidativnog stresa, apoptoza predstavlja jedan od glavnih uzročnika muške neplodnosti. Vitamin C, široko zastupljen u svakodnevnoj ljudskoj ishrani, svojim antioksidantnim dejstvom sprečava produkciju reaktivnih vrsta kiseonika i time štiti DNK ćelija sperme od degradacije. Pored toga, utvrđeno je da vitamin C ima sposobnost inhibicije DNaze I čime sprečava apoptozom indukovanu degradaciju DNK u ćelijama sperme. Ovo ukazuje na mogući dualni mehanizam vitamina C u prevenciji muške neplodnosti, a ujedno predstavlja i dobru osnovu za razvoj novih struktura sa istim/sličnim mehanizmom delovanja [Ilić i sar., 2018].

2.4. Pregled inhibitora DNaze I

Broj poznatih inhibitora DNaze I je relativno mali. Neki inhibitori DNaze I su izolovani iz različitih prirodnih izvora (ljudi, životinja, biljaka, mikroorganizama), a neki su dobijeni hemijskom sintezom. Međusobno se razlikuju po hemijskoj strukturi i mehanizmu delovanja [Kolarevic i sar., 2014].

2.4.1. Organski inhibitori DNaze I

2.4.1.1. Prirodni organski inhibitori DNaze I

Inhibitori DNaze I izolovani iz humanih izvora

Somatostatin je prvi fiziološki faktor koji ima sposobnost regulacije aktivnosti DNaze I *in vivo*. Pokazalo se da intraperitonealna primena somatostatina kod pacova dovodi do smanjenja nivoa serumske DNaze I na dozno-zavisan način. Pored toga, somatostatin smanjuje nivo aktivnosti DNaze I u hipofizi, želucu, tankom crevu i debelom crevu, ali ne menja enzimsku aktivnost u parotidnoj žlezdi, jetri i bubregu [Yasuda i sar., 2001].

Želudačne tečnosti sadrže holesterol sulfat u koncentracijama od 14-131 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteina. Sam holesterol sulfat ne pokazuje inhibitorni efekat prema DNazi I, čak i u dozi od 50 μg , ali potpuno inhibira aktivnost DNaze I kada se rastvori u dimetil sulfoksidu ili žučnim kiselinama. Inhibicija je ireverzibilna i dozno-zavisna. Sulfatna grupa i hidrofobni bočni lanac u molekulu holesterol sulfata su neophodni za inhibitorni efekat. Takođe je neophodan optimalan molarni odnos između žučnih kiselina i holesterol sulfata (0,18 za natrijum tauroholat/holesterol sulfat). Niži molarni odnosi onemogućavaju stvaranje micela holesterol sulfata, a viši molarni odnosi sprečavaju interakciju holesterol sulfata sa DNazom I. Holesterol sulfat je specifičan inhibitor za pankreasnu DNazu I jer druge lipidne komponente u digestivnom traktu, kao što su holesterol, sulfatidi, slobodne masne kiseline, trigliceridi, fosfatidil etanolamin, fosfatidil holin, fosfatidil serin, sfingomijelin i galaktozilceramid ne inhibiraju DNazu I [Iwamori i sar., 2000].

Inhibitor humane serumske DNaze I je prisutan u leukocitima čoveka. To je protein, rastvorljiv u fiziološkom rastvoru i stabilan na 56°C [Kurnick i sar., 1953]. Ispitivanja su pokazala da se dodavanjem 0,5 mL leukocitnog ekstrakta u inkubacionu smešu inhibira humana serumska DNaza I na konkurentan način [Doctor, 1962].

Protein iz *KB* ćelija (tip *HeLa* ćelija), molekulske težine od oko 140 kDa, ima sposobnost vezivanja za molekul DNK sprečavajući njegovu hidrolizu katalizovanu DNazom I. Ovaj protein može inhibirati samo hidrolizu jednolančane, ali ne i dvolančane DNK [Nass i Frenkel, 1979].

Inhibitori DNaze I izolovani iz životinjskih izvora

Aktin, jedan od glavnih strukturnih proteina mišićnih i nemišićnih ćelija, pokazuje inhibitornu aktivnost prema DNazi I formiranjem stabilnog kompleksa sa enzimom [Lazarides i Lindberg, 1974]. Samo monomerni oblik aktina inhibira DNazu I, ali ne i filamentozni oblik [Blikstad i sar., 1978]. Inhibicija aktivnosti DNaze I monomernim aktinom se kod mnogih vrsta pokazala kao značajan mehanizam samozaštite od prevremene degradacije DNK tokom apoptoze. Ukoliko se interakcija između aktina i DNaze I naruši, dolazi do pojačane degradacije DNK i apoptoze što za posledicu ima razvoj različitih poremećaja [Eulitz i Mannherz, 2007].

Iz teleće slezine izolovana su dva proteina koji pokazuju inhibitorni efekat prema DNazi I i definisana su kao inhibitor I i inhibitor II. Oba inhibitora (I i II) formiraju stabilne komplekse sa DNazom I u stehiometrijskom odnosu 1:1 [Lindberg, 1966]. Inhibitor II je homogeni protein sa prosečnom molekulskom težinom od 59,4 kDa [Lindberg, 1967] i pokazuje veću specifičnu aktivnost prema DNazi I nego inhibitor I [Lindberg, 1966]. Analizom aminokiselina utvrđeno je da je inhibitor II po sastavu Asp₄₉Thr₃₈Ser₃₅Glu₅₄Pro₂₇-Gli₄₄Ala₄₂Val₃₇Met₂₀Ile₃₄Leu₄₂Tir₁₉Phe₁₉Lis₃₁His₁₂Arg₂₅(ukupni polucys₉)(CONH₂)₂₈. Može se primetiti da je sadržaj aminokiselina sa sumporom i aromatičnim grupama relativno mali [Lindberg, 1967]. Inhibitor II je osetljiv na dejstvo kiselina (pH = 3,5), uree (3-5 M) ili *p*-hidroksimerkuribenzoata kada dolazi do njegove agregacije i inaktivacije [Lindberg, 1966]. Stabilizacija se, međutim, može postići dodatkom fosfatnog pufera ili glicina u visokoj koncentraciji [Lindberg, 1967].

Protein izolovan iz timusa teleta inhibira pankreasnu DNazu I i po svojim osobinama je sličan inhibitoru II koji je izolovan iz teleće slezine. Oba inhibitora formiraju agregate velike molekulske mase, specifična su za DNazu I i formiraju komplekse u stehiometrijskom odnosu 1:1. Sa druge strane, optimalna stabilnost se postiže u različitim uslovima zbog njihove različite strukture. Takođe, molekulska masa inhibitora izolovanog iz telećeg timusa

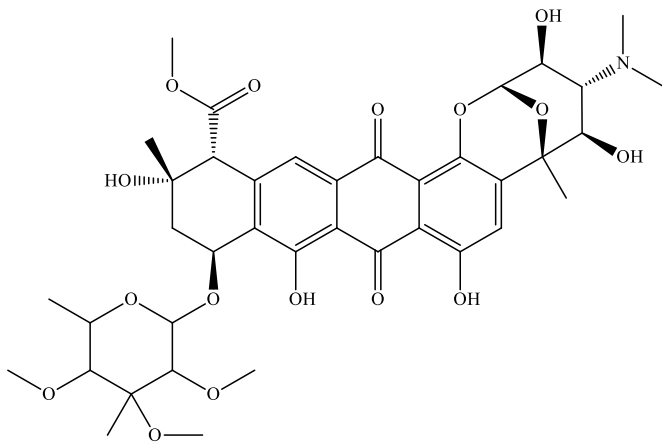
(48,7 kDa) je niža od molekulske mase inhibitora II izolovanog iz teleće slezine (59,4 kDa) [Lindberg i Skoog, 1970].

Inhibitori DNaze I izolovani iz mikroorganizama

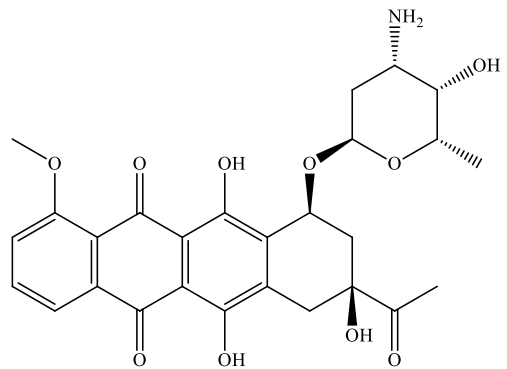
Nogalamicin, daunomicin i aktinomicin D (slika 11) su antibiotici koji mogu inhibirati aktivnost DNaze I formiranjem stabilnih kompleksa sa molekulom DNK. Ispitivanja na kompleksima metil zeleno-DNK (metil zeleno se često koristi za bojenje DNK) su pokazala da ovi antibiotici imaju sposobnost da zamene (istisnu) metil zeleno iz kompleksa sa DNK pri čemu stepen zamene zavisi od procenta adenina i timina u molekulu DNK. Nogalamicin i daunomicin su bolji inhibitori DNaze I od aktinomicina D i mogu da zamene veće količine metil zelenog nego aktinomicin D. Oba inhibitora su antraciklinski antibiotici i stoga pokazuju sličnu aktivnost. Sa druge strane, aktinomicin D je polipeptidni antibiotik koji deluje drugačije od nogalamicina i daunomicina, i nema sposobnost potpune zamene metil zelenog [Zelevnick i Sweeney, 1967].

Među aminoglikozidnim antibioticima, neomicin B (slika 11) je najefikasniji inhibitor degradacije DNK. Molekul neomicina snažno interaguje sa molekulom DNK i time sprečava vezivanje DNaze I. Neomicin B potpuno inhibira degradaciju plazmidne DNK u *in vitro* uslovima u koncentraciji od 2 mM. Paromomicin (slika 11) takođe inhibira degradaciju DNK, ali samo u većim koncentracijama. Za razliku od neomicina, koji u svojoj strukturi sadrži pozitivno naelektrisanu amino grupu, paromomicin u toj poziciji sadrži hidroksilnu grupu što uzrokuje nepovoljne elektrostatičke interakcije i smanjen afinitet paromomicina za fosfatni skelet molekula DNK [Woegerbauer i sar., 2000].

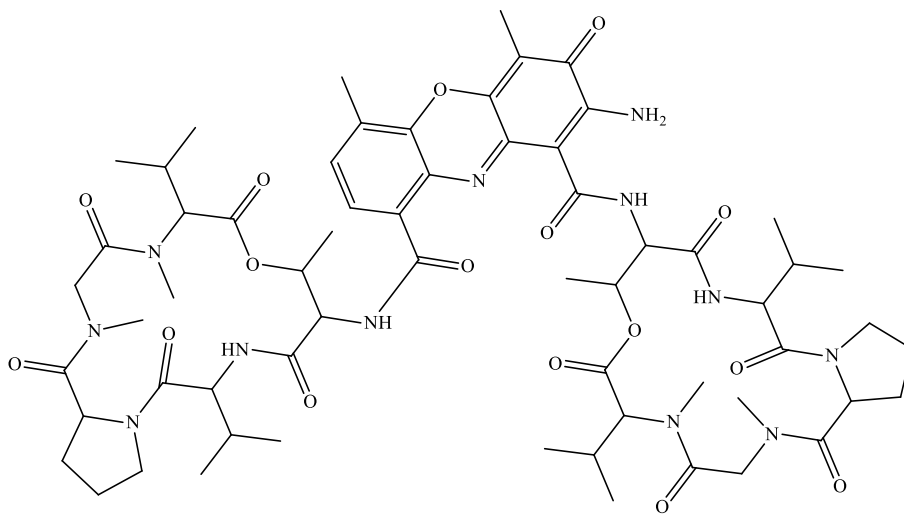
Iz bakterije *Micromonospora echinospora* MG299-fF35 izolovano je jedinjenje male molekulske mase koje je pokazalo inhibitornu aktivnost prema DNazi I sa IC_{50} vrednošću od 6,1 μ g. Tačna struktura ovog jedinjenja nije utvrđena. Mehanizam inhibicije DNaze I zasniva se na njegovom direktnom vezivanju za enzim [Ogawara i sar., 1982].



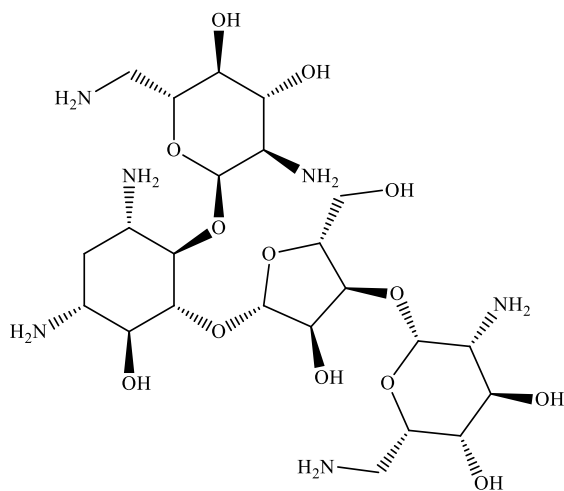
Nogalamicin



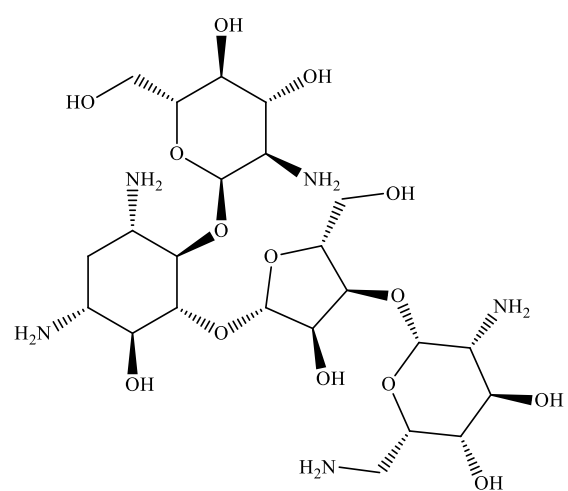
Daunomicin



Aktinomycin D



Neomicin B



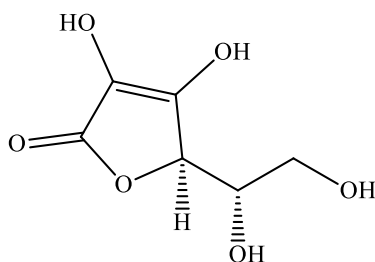
Paromomicin

Slika 11. Inhibitori DNaze I izolovani iz mikroorganizama.

Inhibitori DNaze I izolovani iz biljaka

Prvi specifični inhibitor DNaze I biljnog porekla izolovan je iz ćelijskih kultura biljke *Nicotiana tabacum*. Ovaj homogeni protein, molekulske mase od 14,5 kDa, inhibira hidrolizu DNK *Escherichia-e coli* katalizovane DNazom I, a smanjuje i aktivnost DNK specifične nukleaze izolovane iz ćelijskih kultura duvana. Međutim, neaktivan je prema mikrokokalnoj nukleazi što ukazuje na to da je ovaj proteinski inhibitor specifičan za aktivno mesto eukariotskih DNaza. Inhibitorski protein stupa u interakciju sa DNazom I u odsustvu DNK i sa DNazom I formira kompleks u stehiometrijskom odnosu 1:1. Ova interakcija pokazuje jaku temperaturnu zavisnost sa prosečnom konstantom disocijacije od 5,2 nM na 20°C i 110 nM na 26°C [Szopa i Vagner, 1980].

Vitamin C (slika 12), široko zastupljen u namirnicama koje se koriste u svakodnevnoj ljudskoj ishrani (voću i povrću), ima sposobnost inhibicije DNaze I. Ispitivanja su pokazala da vitamin C inhibira govedu pankreasnu DNazu I sa IC_{50} vrednošću od $330,74 \pm 29,92 \mu\text{M}$. Kao derivat furana, vitamin C se može smatrati pionikom supstrat-baziranih inhibitora DNaze I [Ilić i sar., 2018].



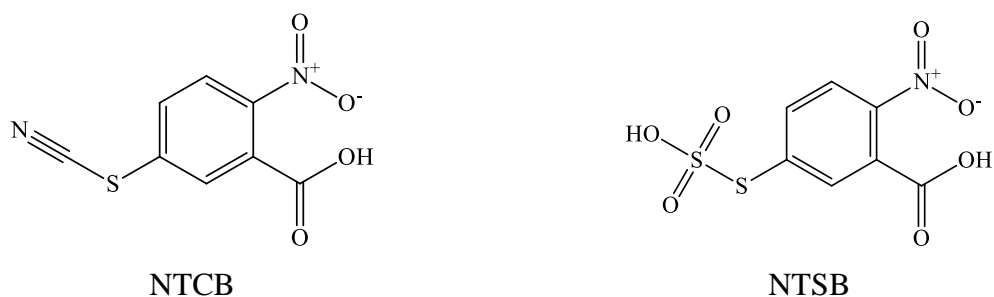
Slika 12. Hemijska struktura vitamina C.

2.4.1.2. Sintetski organski inhibitori DNaze I

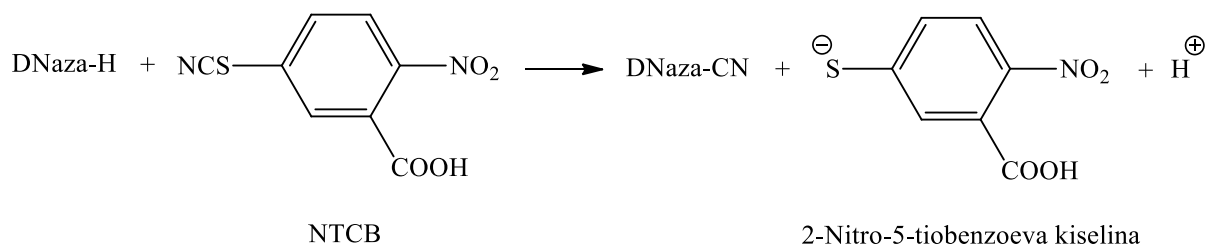
Derivati 2-nitro-5-tiobenzoeve kiseline

2-Nitro-5-tiocijanobenzoeva kiselina (NTCB) i 2-nitro-5-tiosulfobenzoeva kiselina (NTSB) (slika 13) imaju sposobnost inhibicije aktivnosti DNaze I u prisustvu jona Ca^{2+} ili Mg^{2+} pri $\text{pH} = 7,5$ [Liao i McKenzie, 1979; Chen i Liao, 2008]. Inhibicija DNaze I molekulom NTCB je ireverzibilna i rezultat je kovalentne modifikacije enzima. NTCB ne uzrokuje samo inaktivaciju, već i fragmentaciju polipeptidnog lanca (nastaje nekoliko fragmenata male molekulske mase). Tokom reakcije inaktivacije, vodonik iz DNaze I biva

zamenjen cijano grupom iz molekula NTCB pri čemu dolazi do formiranja cijano-DNaze I i 2-nitro-5-tiobenzoeve kiseline (slika 14) [Liao i McKenzie, 1979].



Slika 13. Derivati 2-nitro-5-tiobenzoeve kiseline kao inhibitori DNaze I.



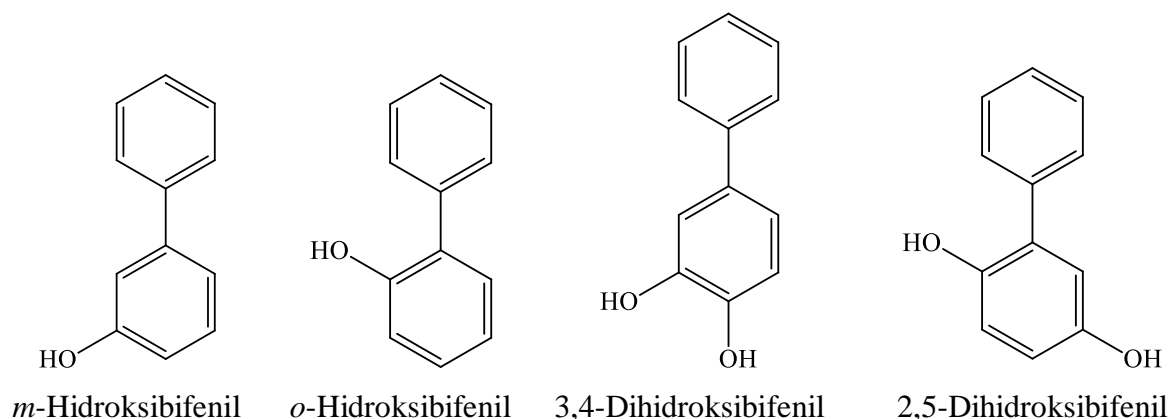
Slika 14. Reakcija inaktivacije DNaze I molekulom NTCB [Liao i McKenzie, 1979].

Sa druge strane, inaktivacija DNaze I molekulom NTSB je reverzibilna. U prisustvu kiselina, inaktivirani enzim može povratiti i do 40% svoje početne aktivnosti. Inaktivacija je takođe rezultat kovalentne modifikacije enzima, ali bez fragmentacije polipeptidnog lanca [Chen i Liao, 2008]. Analizom aminokiselina utvrđen je smanjen nivo treonina i serina kod inaktivirane DNaze I, dok su sva četiri polucistina (cistein kome je uklonjen atom vodonika iz tiolne grupe) prisutna i kod potpuno inaktiviranog i kod prirodno aktivnog enzima. Ovo ukazuje na to da se reakcija inaktivacije ne odvija na polucistinskim ostacima, već da su moguća mesta reakcije teronin i serin. NTCB i NTSB su specifični inhibitori DNaze I, s obzirom na to da ne inhibiraju ostale DNaze [Liao i McKenzie, 1979; Chen i Liao, 2008].

Hidroksibifenili

Neki mono- i dihidroksibifenili inhibiraju hidrolizu DNK katalizovanu DNazom I usled formiranja kompleksa sa molekulom DNK, ali nemaju direktan uticaj na DNazu I.

Interakcija između hidroksibifenila i DNK se bazira na umetanju nesupstituisane fenil grupe između nukleotidnih baza, kao i na uspostavljanju vodoničnih veza između hidroksilnih grupa i nukleotidnih baza. Za ispoljavanje inhibitorne aktivnosti hidroksibifenila neophodno je prisustvo slobodne hidroksilne grupe i nesupstituisane (ili *o*-supstituisane) fenil grupe. Određen intramolekularni položaj hidroksilne grupe je takođe od izuzetnog značaja. Tako su se među monohidroksibifenilima kao najefikasniji inhibitori DNaze I pokazali oni sa hidroksilnom grupom u *m*-položaju (koja može lako formirati vodonične veze sa nukleotidnim bazama). Interakcija je slabija kada je hidroksilna grupa u *o*-položaju (*o*-hidroksibifenili su nešto slabiji inhibitori DNaze I), dok je interakcija skoro nemoguća kada je hidroksilna grupa u *p*-položaju fenil grupe (*p*-hidroksibifenili skoro da su potpuno neaktivni) (slika 15). Među dihidroksibifenilima, kao najjači inhibitori DNaze I pokazali su se 3,4-dihidroksibifenil i 2,5-dihidroksibifenil (slika 15). Prisustvo voluminoznih funkcionalnih grupa negativno utiče na inhibitornu aktivnost jer, zbog sternih efekata, ometaju interakciju sa molekulom DNK [Gottesfeld i sar., 1971].



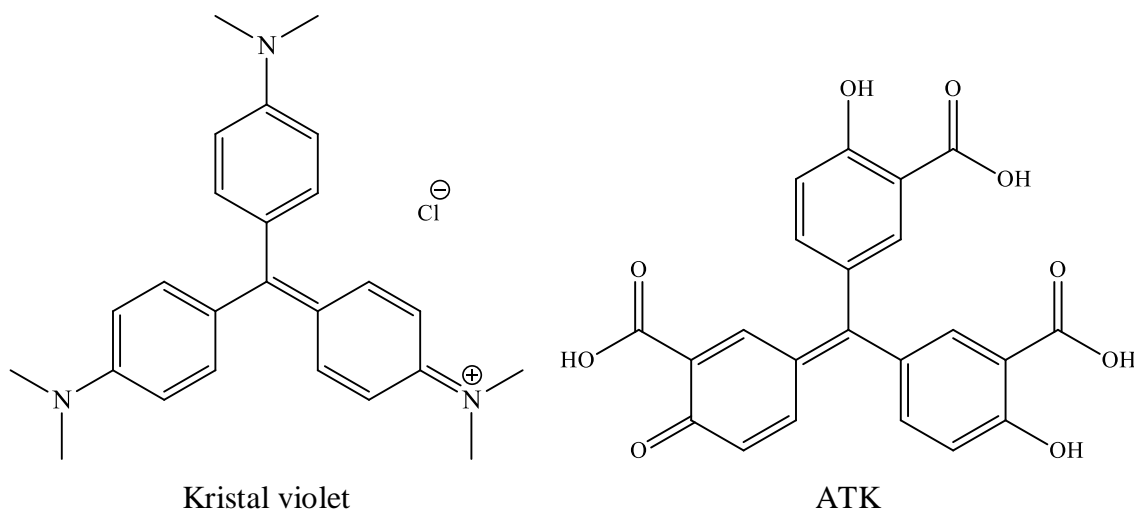
Slika 15. Hidroksibifenili kao inhibitori DNaze I.

Derivati trifenilmetana

Utvrđeno je da kristal violet (slika 16), trifenilmetanska boja koja se često koristi u histološkim i histohemijskim ispitivanjima, ima sposobnost da inhibira aktivnost DNaze I [Zhou i sar., 2012].

Aurintrikarboksilna kiselina (ATK) (slika 16) deluje kao opšti inhibitor nukleaza. Pokazalo se da, u *in vitro* uslovima, ATK može inhibirati DNazu I, ali i RNazu A, S1

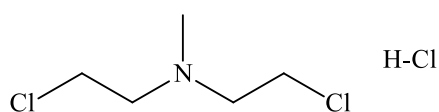
nukleazu, egzonukleazu III, kao i restrikcione endonukleaze Sal I, Bam HI, Pst I i Sma I [Hallick i sar., 1977]. Takeda i sar. (1998) su takođe pokazali da ATK deluje kao inhibitor endonukleaza i sprečava fragmentaciju DNK u cisplatinom tretiranim S3 ćelijama.



Slika 16. Derivati trifenilmetana kao inhibitori DNaze I.

Azotni iperit

Azotni iperit (metil-bis(β -hloretil)amin hidrohlorid) (slika 17), poznati hemoterapeutski agens, inhibira aktivnost humane serumske DNaze I na nekonkurentan način kada se u inkubacionu smešu doda 2 mg ove supstance [Doctor, 1962].

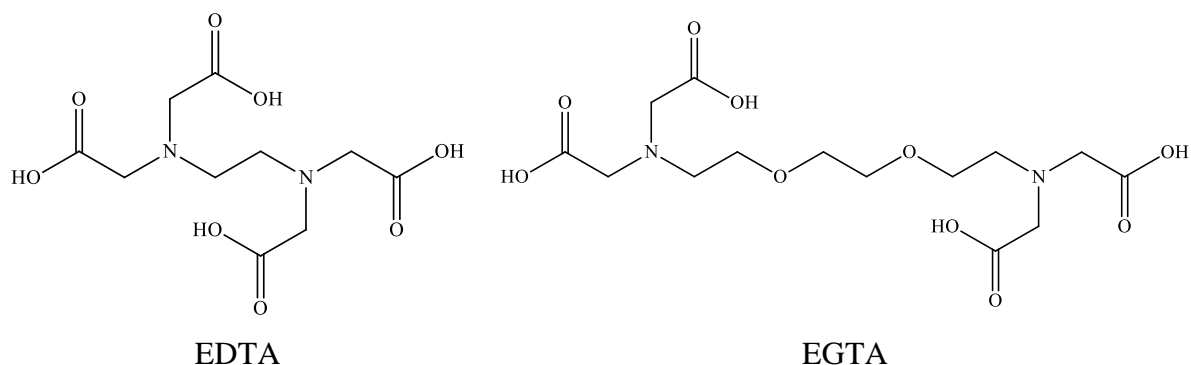


Slika 17. Hemijska struktura azotnog iperita.

Helacioni agensi

Etilen diamin tetrasirćetna kiselina (EDTA) i etilen glikol tetrasirćetna kiselina (EGTA) (slika 18) mogu inhibirati aktivnost DNaze I formiranjem helatnih kompleksa sa jonima Mg^{2+} i/ili Ca^{2+} koji su neophodni za aktivnost DNaze I. Pritom, EDTA ima veći

afinitet za jone Mg^{2+} , dok EGTA ima veći afinitet za jone Ca^{2+} [Price, 1975; Sanyal i sar., 1997].



Slika 18. Helacioni agensi kao inhibitori DNaze I.

Polimeri

Hidrolizovani etilen maleinski anhidrid (HEMA) nema inhibitorni efekat prema DNazi I pri optimalnoj pH vrednosti od 7,5, dok pri pH vrednosti nižoj od optimalne (pH = 5,0) pokazuje umeren inhibitorni efekat. Štaviše, velike količine polimera (oko 100 μ g) su potrebne za samo 50% enzimske inhibicije. Utvrđeno je da HEMA ne inhibira DNazu I pri pH vrednostima ≥ 6 [Tunis i Regelson, 1963].

Polietilensulfonska kiselina (PES) inhibira DNazu I samo u visokim koncentracijama, dok u nižim koncentracijama stimuliše njenu aktivnost [Bach, 1964]. Tunis i Regelson (1963), međutim, nisu ustanovili nikakav efekat PES na DNazu I. Bach (1964) smatra da je ovo neslaganje rezultat različito korišćenih koncentracija supstance, različitih metoda ispitivanja i različitog sastava inkubacione smeše.

Oligonukleotidi

Oligonukleotid d[ApAp(S)ApA], fosforotioatni analog d[ApApApA] tetramera, otporan je na hidrolizu katalizovanu DNazom I. Ova otpornost potiče od prisutne fosforotiatne grupe, pa njeno inkorporiranje u oligonukleotide i DNK predstavlja značajan mehanizam zaštite od enzimskog razlaganja [Spitzer i Eckstein, 1988].

2.4.2. Neorganski inhibitori DNaze I

Ispitivanjem inhibitorne aktivnosti prema DNazi I, Gilbert i sar. (1951) su utvrdili da neke neorganske supstance skoro potpuno inhibiraju DNazu I, dok neke ispoljavaju samo delimičnu inhibiciju enzima (tabela 2).

Tabela 2. Inhibicija DNaze I neorganskim supstancama [Gilbert i sar., 1951].

Supstanca	Koncentracija (M)	Inhibicija DNaze I
Natrijum arsenat	0,1	kompletna
Natrijum selenit	0,1	kompletna
Bakar sulfat	0,01	kompletna
Cink sulfat	0,01	kompletna
Natrijum sulfid	0,125	kompletna
Kalijum fluorid	0,1	kompletna
Natrijum citrat	0,1	kompletna
Natrijum borat	0,1	kompletna
Kalijum fluorid	0,01	delimična
Natrijum citrat	0,01	delimična
Tioglikolna kiselina	0,5	delimična

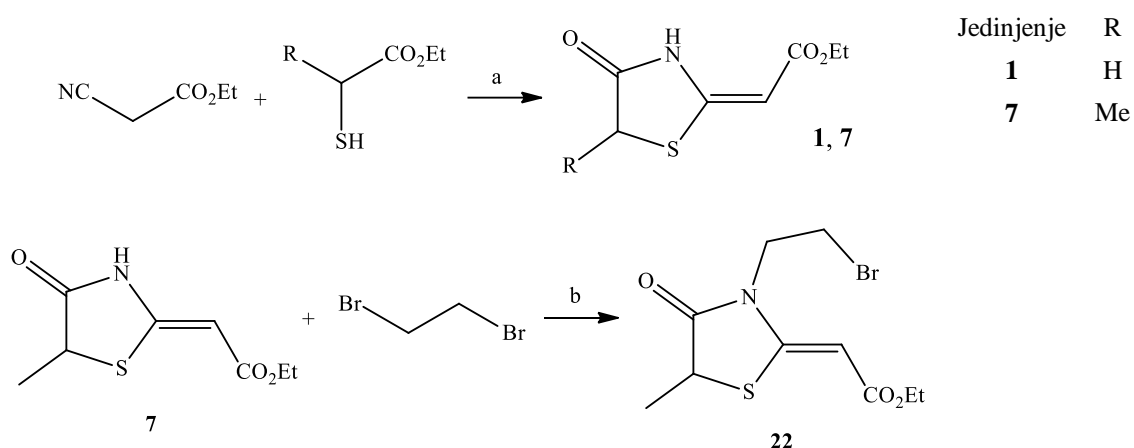
Pri neutralnoj pH vrednosti, joni zlata (Au^{3+}) pokazuju inhibitorni efekat prema DNazi I koji je praćen konformacionom promenom enzimskog molekula. Iako su Au^{3+} joni jaki oksidansi, ne dolazi do oksidacije ili agregacije DNaze I. Naime, joni zlata formiraju koordinacioni kompleks sa molekulom DNaze I pri čemu enzim gubi svoju aktivnost. Smatra se da su najverovatnija mesta vezivanja Au^{3+} jona ostaci histidina i metionina u molekulu DNaze I. Inhibicija je delimično reverzibilna dodavanjem tiouree koja kompleksira Au^{3+} jone, pri čemu DNaza I može povratiti i do 60% svoje početne aktivnosti [Maruyama i sar., 2007].

2.5. Hemijska struktura i biološka aktivnost tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina

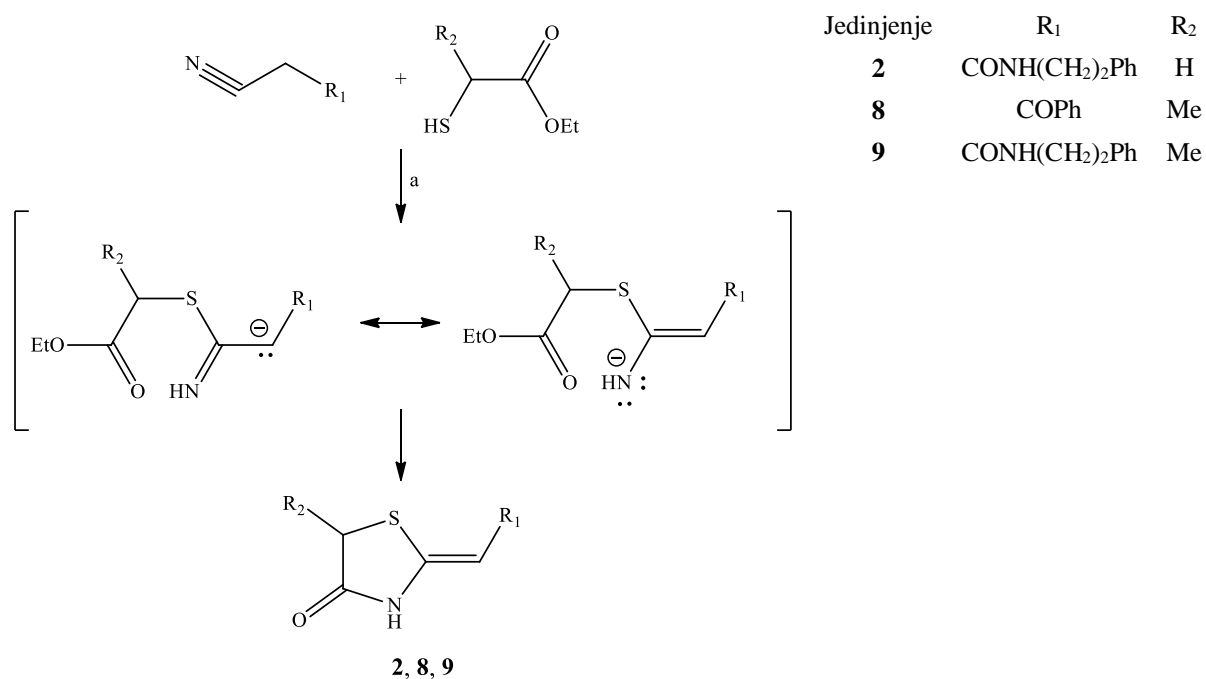
2.5.1. Hemijska struktura i biološka aktivnost tiazolidina

Prirodni i sintetski derivati tiazolidina predstavljaju jedinjenja od velikog interesa u oblasti medicinske hemije zbog svog širokog spektra bioloških aktivnosti, uključujući antibakterijsku, antifungalnu, antituberkularnu, antikancersku, analgetsku, antiinflamatornu, antikonvulzivnu, antidepresivnu, antivirusnu/anti-HIV, antidijabetičnu i antiaritmijsku aktivnost [Jain i sar., 2012]. Shodno tome, sintetisan je veliki broj novih derivata tiazolidina, kao što su:

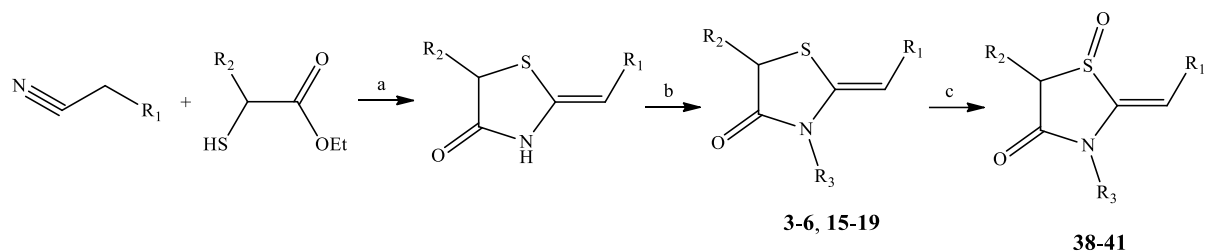
- a) derivati 2-alkiliden-4-oksotiazolidina – **1** [Stojanović i sar., 2011], **2** [Marković i sar., 2006], **3-6** [Džambaski i sar., 2013], **7** [Stojanović i sar., 2011], **8, 9** [Marković i sar., 2006], **10-14** [Marković i sar., 2003], **15-19** [Džambaski i sar., 2013], **20, 21** [Bondžić i sar., 2012], **22** [Stojanović i sar., 2011], **23-26** [Bondžić i sar., 2012], **27-35** [Kolarević i sar., 2019] (šeme 1-6);
- b) derivati 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina – **36 i 37** [Kolarević i sar., 2019] (šema 6);
- c) derivati 2-alkiliden-4-oksotiazolidin-*S*-oksida – **38-41** [Džambaski i sar., 2013] (šema 3);
- d) derivati 6,7-dihidro-2*H*-tiazolo[3,2-*a*]piridin-3(5*H*)-ona – **42-48** [Bondžić i sar., 2012] (šema 5);
- e) derivati 2-alkiliden-7*a*-metilheksahidro-2*H*-pirano[2,3-*d*]tiazola – **49, 50** [Bondžić i sar., 2012] (šema 5) i **51** [Kolarević i sar., 2019] (šema 6) i
- f) derivati 4*a*-metil-2,3,4,4*a*,7,8,9,10*a*-oktahidropirano[2',3':4,5]tiazolo[3,2-*a*]piridina – **52 i 53** [Bondžić i sar., 2012] (šema 5).



Šema 1. Sinteza 2-alkiliden-4-oksotiazolidina **1**, **7** i **22**. Reagensi i uslovi: (a) K_2CO_3 (kat.), 75-80°C, 15-30 min.; (b) K_2CO_3 , DMF, sobna temp. [Stojanović i sar., 2011].

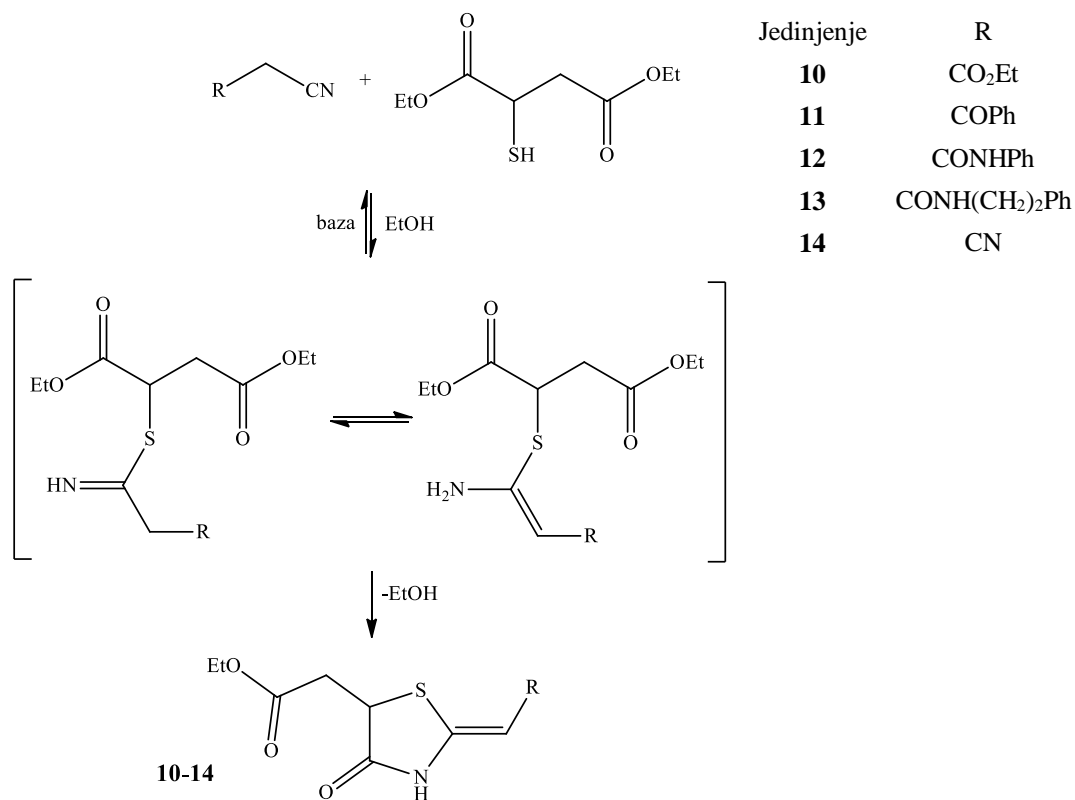


Šema 2. Sinteza 2-alkiliden-4-oksotiazolidina **2**, **8** i **9**. Reagensi i uslovi: (a) K_2CO_3 (kat.), mikrotalasi, 2 min. [Marković i sar., 2006].

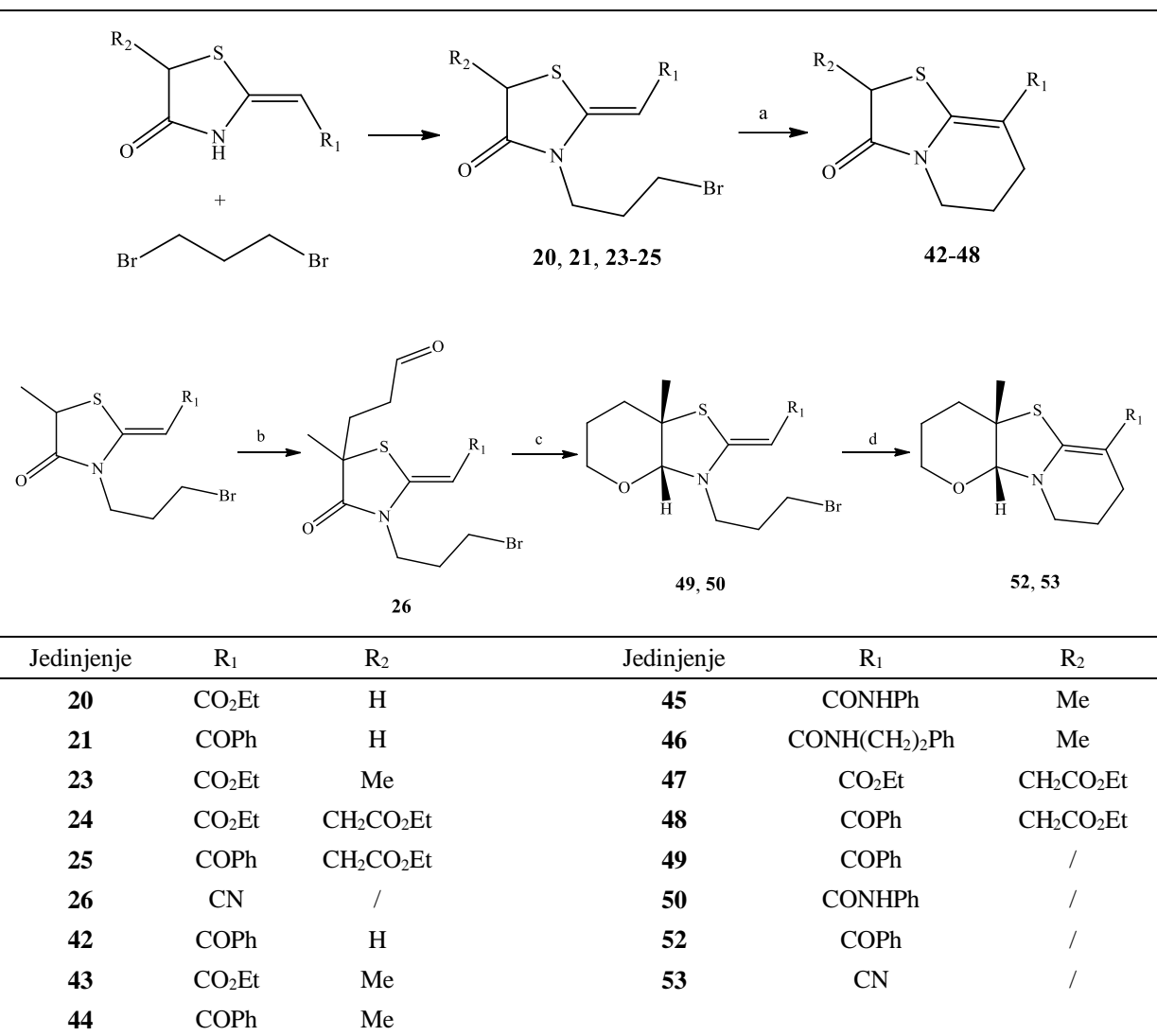


Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃
3	CO ₂ Et	H	Me	18	COPh	CH ₂ CO ₂ Et	Bn
4	COPh	H	Me	19	CONHPh	CH ₂ CO ₂ Et	Bn
5	CONHPh	H	Me	38	CO ₂ Et	H	Me
6	CONH(CH ₂) ₂ Ph	H	Me	39	COPh	H	Me
15	CO ₂ Et	Me	Me	40	CONHPh	H	Me
16	CONHPh	Me	Me	41	CONH(CH ₂) ₂ Ph	H	Me
17	COPh	H	Bn				

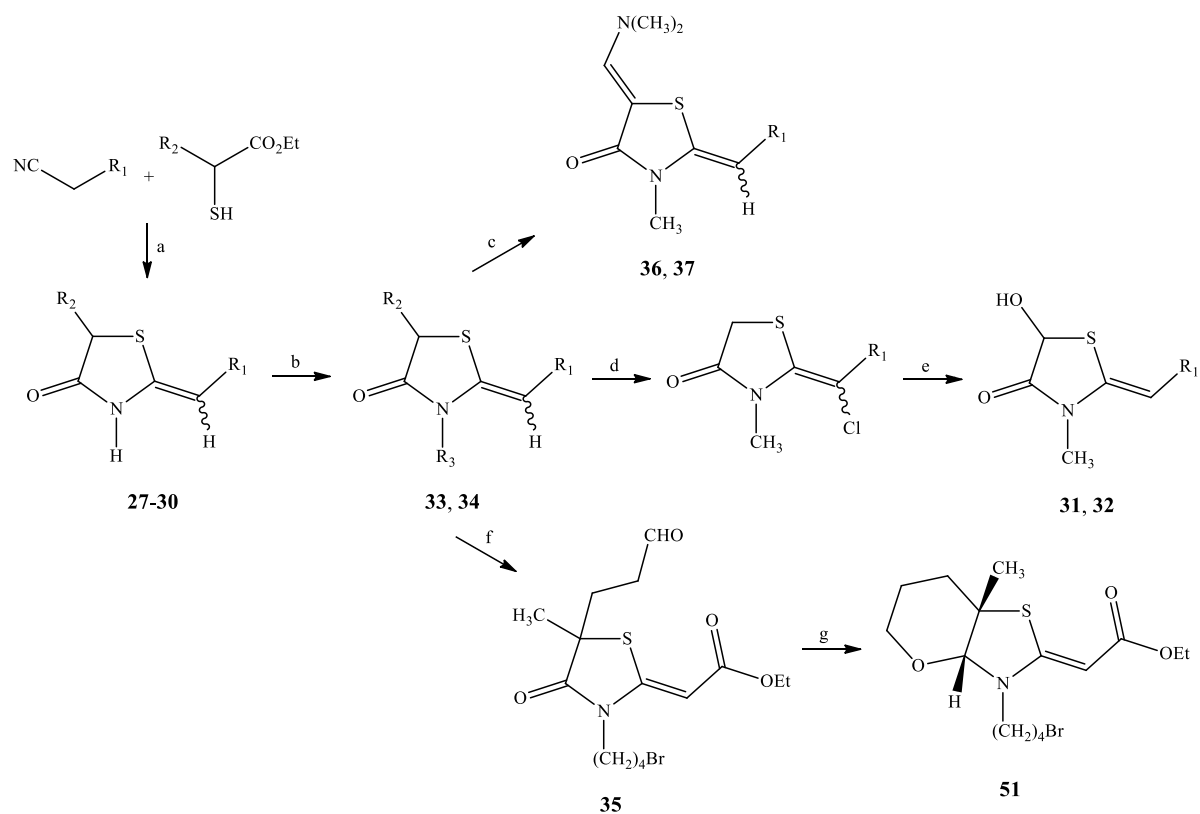
Šema 3. Sintaza 2-alkiliden-4-oksotiazolidina **3-6**, **15-19** i 2-alkiliden-4-oksotiazolidin-S-oksida **38-41**. Reagensi i uslovi: (a) K₂CO₃ (kat.), etanol, refluks; (b) MeI, BnBr, Br(CH₂)₃Br ili BrCH₂CO₂Et (1,1-1,5 ekviv.), K₂CO₃ (1 ekviv.), DMF, sobna temp.; (c) *m*-hlorperoksibenzoeva kiselina (1,5-2 ekviv.), CH₂Cl₂, 0°C [Džambaski i sar., 2013].



Šema 4. Sintaza 2-alkiliden-4-oksotiazolidina **10-14** [Marković i sar., 2003].



Šema 5. Sinteza 2-alkiliden-4-oksotiazolidina **20**, **21**, **23-26**, 6,7-dihidro-2*H*-tiazolo[3,2-*a*]piridin-3(5*H*)-ona **42-48**, 2-alkiliden-7*a*-metilheksahidro-2*H*-pirano[2,3-*d*]tiazola **49** i **50** i 4*a*-metil-2,3,4,4*a*,7,8,9,10*a*-oktahidropirano[2',3':4,5]tiazolo[3,2-*a*]piridina **52** i **53**. Reagensi i uslovi: (a) KI (0,3 ekviv.), DMF, 120°C; (b) K₂CO₃ (0,1 ekviv.), akrolein (1,2 ekviv.), DMF, sobna temp.; (c) (i) NaBH₄ (10 ekviv.), etanol, 0°C, HCl (kat.), (ii) konc. HCl; (d) KI, DMF, 100°C, vreme [Bondžić i sar., 2012].



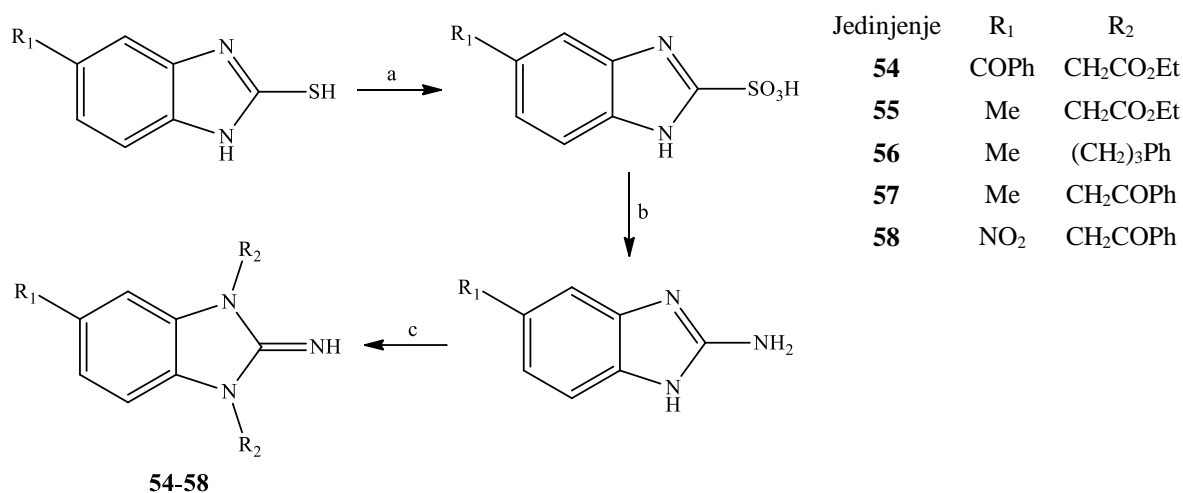
Jedinjenje	R ₁	R ₂	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃
27	COPh	H	32	CONH(CH ₂) ₂ Ph	/	/
28	CONHPh	H	33	CO ₂ Et	H	<i>o</i> -BrC ₆ H ₄ CH ₂
29	CN	H	34	COPh	Me	(CH ₂) ₄ Br
30	CONHPh	Me	36	COPh	/	/
31	COPh	/	37	CONH(CH ₂) ₂ Ph	/	/

Šema 6. Sintaza 2-alkiliden-4-oksotiazolidina **27-35**, 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina **36, 37** i 2-alkiliden-7a-metilheksahidro-2*H*-pirano[2,3-*d*]tiazola **51**. Reagensi i uslovi: (a) K₂CO₃ (kat.), etanol, refluks; (b) MeI, *o*-BrC₆H₄CH₂Br ili Br(CH₂)₄Br (1,1-1,5 ekviv.), K₂CO₃ (1-1,2 ekviv.), DMF, sobna temp.; (c) ^tBuOCH(NMe₂)₂ (1,5 ekviv.), toluen, 110°C; (d) (i) *m*-hlorperoksibenzoeva kiselina (1,2-2 ekviv.), CH₂Cl₂, 0°C, (ii) SOCl₂ (1,1 ekviv.), CH₂Cl₂, -10°C → sobna temp.; (e) DMSO, 70°C; (f) K₂CO₃ (0,1 ekviv.), akrolein (1,2 ekviv.), DMF, sobna temp.; (g) (i) NaBH₄ (10 ekviv.), etanol, 0°C, HCl (kat.), (ii) konc. HCl [Kolarević i sar., 2019].

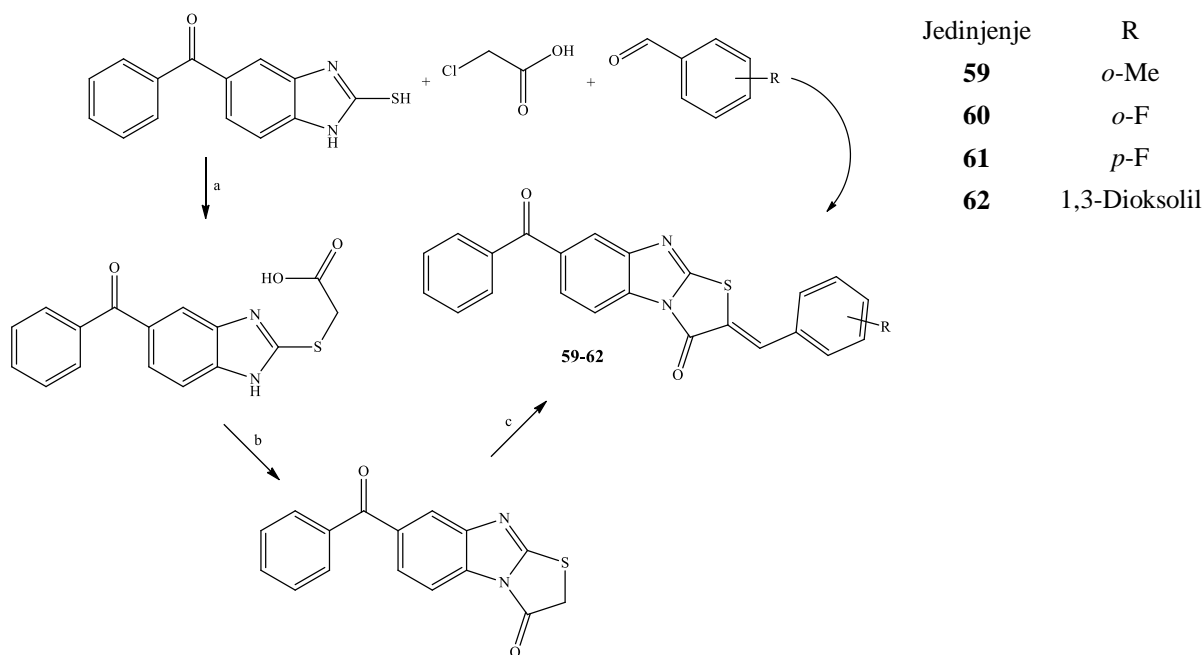
2.5.2. Hemijska struktura i biološka aktivnost benzimidazola

Derivati benzimidazola pokazuju brojne farmakološke aktivnosti, kao što su analgetska, anthelmintska, antialergijska, antikancerska, antikoagulantna, antidijabetična, anti-HIV, antihipertenzivna, antiinflamatorna, antimikrobna, antimikobakterijska, antioksidantna, antiparazitska, antiulcerogena, antivirusna, anksiolitička, CNS stimulantna i koagulantna aktivnost, a deluju i kao hormonski modulatori, imunomodulatori, modulatori nivoa lipida i inhibitori protonske pumpe [Bansal i Silakari, 2012; Narasimhan i sar., 2012; Salahuddin i sar., 2017]. Neki od njih su klinički odobreni: albendazol, mebendazol i tiabendazol kao anthelmintici; lansoprazol, omeprazol i pantoprazol kao inhibitori protonske pumpe; astemizol kao antihistaminik; envirodin kao antivirotik; kandesartan i telmisartan kao antihipertenzivi [Akhtar i sar., 2017].

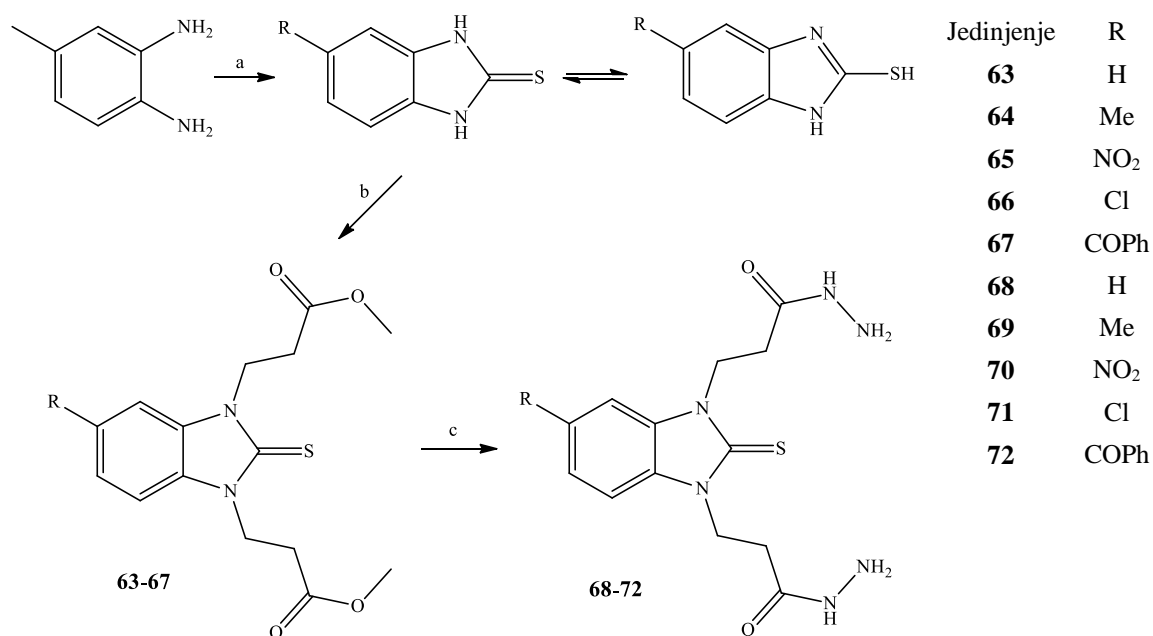
Mavrova i sar. (2015) i Anastassova i sar. (2018) su sintetisali 19 benzimidazola, i to pet 1,3-disupstituisanih-benzimidazol-2-imina (**54-58**) (šema 7) [Mavrova i sar., 2015], četiri 2-supstituisana-1,3-tiazolo[3,2-*a*]benzimidazolona (**59-62**) (šema 8) [Mavrova i sar., 2015] i deset 1,3-disupstituisanih-benzimidazol-2-tiona (**63-72**) (šema 9) [Anastassova i sar., 2018].



Šema 7. Sinteza benzimidazola **54-58**. Reagensi i uslovi: (a) KMnO₄, vodeni rastvor NaOH, refluks; (b) NH₄OH, 150°C u zavarenim ampulama; (c) TBAB (tetra-*n*-butilamonijum bromid), suv K₂CO₃, halogeni derivat, 25°C, acetonitril [Mavrova i sar., 2015].



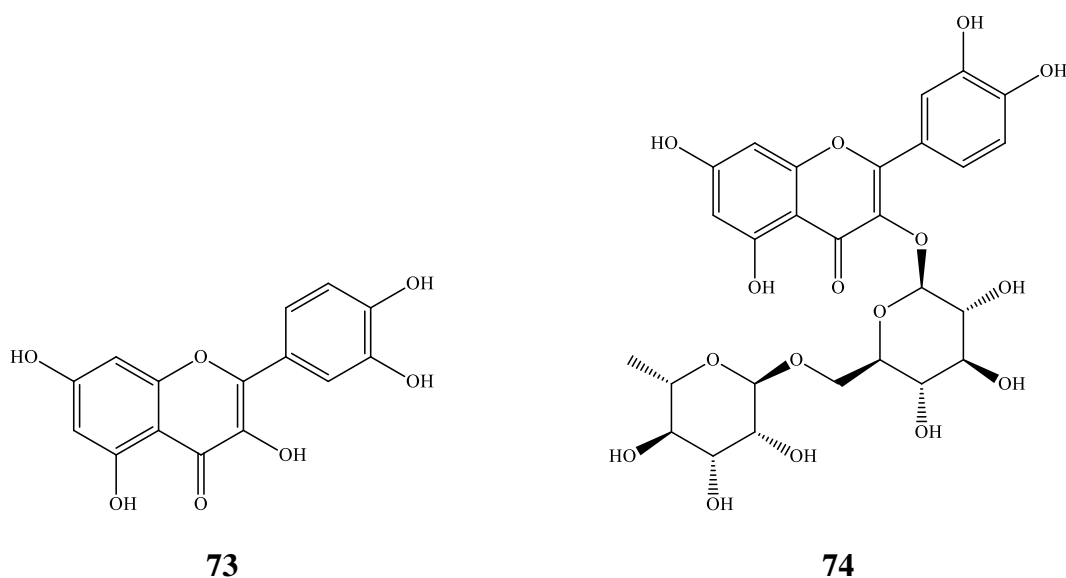
Šema 8. Sinteza benzimidazola **59-62**. Reagensi i uslovi: (a) ClCH_2COOH , etanolni rastvor NaOH, refluks 3h; (b) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, piridin, refluks 10 min.; (c) aromatični aldehidi, piridin (kat.), etanol, refluks 4-6h [Mavrova i sar., 2015].



Šema 9. Sinteza benzimidazola **63-72**. Reagensi i uslovi: (a) CS_2 , etanolni rastvor KOH, refluks; (b) metil akrilat, DMF, refluks; (c) hidrazin hidrat, etanolni rastvor, refluks [Anastassova i sar., 2018].

2.5.3. Hemijska struktura i biološka aktivnost 4H-hromena

Kverectin (**73**) i rutin (**74**) (slika 19) su derivati 4H-hromena koji su široko zastupljeni u prirodnim proizvodima i svakodnevnoj ljudskoj ishrani, a zbog svojih brojnih bioloških aktivnosti predstavljaju jedinjenja od izuzetnog značaja u prevenciji i terapiji raznih bolesti. Rutin, glikozid koji se sastoji od flavonolnog aglikona kvercetina i disaharida rutinoze, je najviše zastupljen u hrani poput kapara [Inocencio i sar., 2000], crnih maslina [Romani i sar., 1999], heljde [Oomah i Mazza, 1996], špargle [Makris i Rossiter, 2001], crnog čaja [Price i sar., 1998], malina, kupina [Wada i Ou, 2002], ribizla [Määttä i sar., 2003] i šljiva [Donovan i sar., 1998]. Rutin je pokazao niz farmakoloških aktivnosti, uključujući neuroprotektivnu [Javed i sar., 2012], kardioprotektivnu [Annapurna i sar., 2009], antikancersku [Webster i sar., 1996], antiastmatičnu [Jung i sar., 2007], antiartritisnu [Ostrakhovitch i Afanas'ev, 2001], nefroprotektivnu [Hu i sar., 2009], hepatoprotektivnu [Khan i sar., 2012], antihiperglikemijsku i antioksidantnu [Yang i sar., 2008] aktivnost. Namirnice poput zelene salate, špargle, luka, zelene paprike, paradajza i zelenog čaja predstavljaju odlične izvore kvercetina [Nishimuro i sar., 2015] koji takođe ispoljava brojne efekte korisne po ljudsko zdravlje. Dosadašnje studije su pokazale da je kverectin odličan antioksidantni, antiinflamatorni, antivirusni i antikancerogeni agens, a pokazao se efikasnim i u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (bolesti srca, hipertenzije, povišenog nivoa holesterola u krvi) [Wang i sar., 2016].

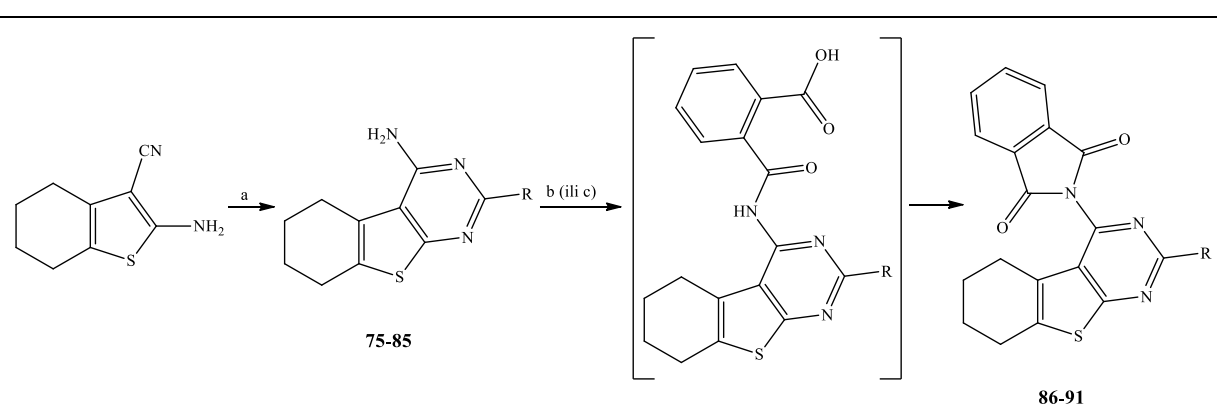


Slika 19. Derivati 4H-hromena.

2.5.4. Hemijska struktura i biološka aktivnost 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini mogu ispoljiti neuroprotektivno [Di Fruscia i sar., 2015], antibakterijsko [Abbas i sar., 2013], antitumorsko [Abbas i sar., 2013], analgetsko [Alagarsamy i sar., 2006] i antiinflamatorno [Alagarsamy i sar., 2006] dejstvo.

Mavrova i sar. (2018) su sintetisali jedanaest 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina (**75-85**) koji su korišćeni kao polazna jedinjenja za sintezu 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ftalimida (**86-91**) (šema 10).



Jedinjenje	R	Jedinjenje	R	Jedinjenje	R
75		81		86	
76		82		87	
77		83		88	
78		84		89	
79		85		90	
80				91	

Šema 10. Sinteza 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina (**75-91**): (a) RCN, suvi HCl gas, dioksan, 6h; (b) ftalni anhidrid, acetatna kiselina, refluks; (c) toluen, ftalni anhidrid, acetatni anhidrid, piridin [Mavrova i sar., 2018].

2.6. *In silico* ispitivanja inhibitora medicinski značajnih enzima

Ispitivanja fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih, farmakokinetičkih i toksikoloških karakteristika inhibitora medicinski značajnih enzima su od izuzetnog značaja za procenu mogućnosti njihove primene u terapijske svrhe. Pored utvrđenih *in vitro* i *in vivo* metoda, kompjuterske metode, komplementarne laboratorijskim eksperimentima, postaju sve značajnije u proučavanju strukture i funkcije biomolekula [Rudnitskaya i sar., 2010]. Pored toga, one mogu biti od izuzetne koristi u najranijim fazama razvoja lekova. *In silico* studije omogućavaju preliminarnu procenu (*screening*) fizičko-hemijskih (particioni koeficijent, polarna površina molekula, molekulska masa, molekulska zapremina, broj veza sa mogućnošću rotacije i broj akceptora/donora vodoničnih veza), farmakokinetičkih (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija) i toksikoloških (toksični efekti na određene organe, ekotoksičnost, genotoksičnost) karakteristika ispitivanih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata se mogu preliminarno selektovati ona jedinjenja koja poseduju najpovoljnije karakteristike, ali i dobiti smernice za poboljšanje manje povoljnih profila.

Kako je najčešći put primene leka oralni, biofarmaceutska ispitivanja zauzimaju posebno mesto u različitim fazama otkrivanja i razvoja novih lekova. Ova ispitivanja omogućavaju rano otkrivanje kritičnih faktora koji utiču na brzinu i stepen apsorpcije supstanci, ali i njihovu optimizaciju u cilju postizanja maksimalne biološke raspoloživosti, odnosno razvoja što kvalitetnijeg finalnog proizvoda [Grbic i sar., 2013; Batchelor i sar., 2013]. Sve veći značaj biofarmaceutske karakterizacije lekova povećao je interesovanje za razvoj i evaluaciju *in silico* metoda kojima se mogu predvideti bioraspoloživost i apsorpcija ispitivanih jedinjenja, ali i identifikovati kritični faktori (npr. rastvorljivost i permeabilnost) koji mogu uticati na ove procese [Grbic i sar., 2013].

Molekulski *docking* ima sve veću ulogu u dizajnu lekova. Koristi se za predviđanje interakcija (načina vezivanja) malih molekula (npr. inhibitora) sa ciljnim makromolekulima (npr. enzimima) poznate trodimenzionalne strukture i bazira se na određivanju energetski najpovoljnijih orijentacija i konformacija liganda i receptora. Većina *docking* programa koristi ulazne podatke u PDB formatu (tekstualni format koji opisuje trodimenzionalnu strukturu ciljnog proteina) [<http://www.pdb.org>]. Rezultati dobijeni molekulskim *docking*-om omogućavaju razjašnjenje mehanizma inhibicije medicinski značajnih enzima [Kroemer, 2007; Rudnitskaya i sar., 2010].

In silico studije omogućavaju relativno brzu procenu željenih parametara, smanjuju potrebu za velikim brojem *in vitro* ili *in vivo* eksperimenata, od izuzetne su koristi u uspostavljanju *in vitro-in vivo* korelacije, a pored toga smanjuju i troškove i vreme potrebno za selekciju i razvoj novih struktura sa potencijalnom primenom u medicinskoj hemiji. Sa druge strane, ove metode sa sobom nose i određen stepen rizika u pogledu tačnosti, preciznosti, pouzdanosti, relevantnosti i reproduktivnosti [Batchelor i sar., 2013; Elder i Holm, 2013; Grbic i sar., 2013]. Važno je napomenuti da rezultati dobijeni *in silico* metodama predstavljaju samo procenu određenih karakteristika, ali ne znače nužno da će ispitivano jedinjenje i ispoljiti takve karakteristike u *in vitro* ili *in vivo* uslovima.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Značaj DNaze I u patofiziologiji brojnih patoloških stanja, s jedne strane, ali i relativno mali broj poznatih organskih inhibitora DNaze I, kako prirodnih tako i sintetskih, s druge strane, ukazuju na potrebu za pronalaskom novih inhibitora ovog enzima, naročito onih sa potencijalnom terapijskom primenom.

Cilj ove doktorske disertacije je bio najpre razvoj metode kojom je vršeno ispitivanje inhibicije goveđe pankreasne DNaze I u *in vitro* uslovima, a zatim i ispitivanje inhibicije DNaze I derivatima tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina u *in vitro* uslovima. Analiziran je odnos njihovih struktura i aktivnosti, za neke od najefikasnijih inhibitora DNaze I određena je kinetika enzimske inhibicije na osnovu Lajnviver-Berkovih dijagrama, a metodom molekuskog *docking*-a su predviđene i najznačajnije interakcije ispitivanih jedinjenja sa DNazom I.

U cilju stvaranja kompletnije slike o mogućoj primeni ispitivanih derivata tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina u terapijske svrhe, *in silico* metodama su predviđene i analizirane njihove osnovne fizičko-hemijske, biofarmaceutske, farmakokinetičke i toksikološke karakteristike.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitivani derivati tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina

4.1.1. Ispitivani derivati tiazolidina

Derivati tiazolidina ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji (1-53) su sintetskog porekla i dobijeni su od dr Bojana Bondžića (Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd, Srbija).

2-Alkiliden-4-oksotiazolidini

Jedinjenja **1**, **7** i **22** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Stojanović i sar. (2011) (šema 1), jedinjenja **2**, **8** i **9** prema protokolu publikovanom u radu Marković i sar. (2006) (šema 2), jedinjenja **3-6**, **15-19** prema protokolu publikovanom u radu Džambaski i sar. (2013) (šema 3), jedinjenja **10-14** prema protokolu publikovanom u radu Marković i sar. (2003) (šema 4), jedinjenja **20**, **21**, **23-26** prema protokolu publikovanom u radu Bondžić i sar. (2012) (šema 5), dok su jedinjenja **27-35** sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Kolarević i sar. (2019) (šema 6).

2,5-Dialkiliden-4-oksotiazolidini

Jedinjenja **36** i **37** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Kolarević i sar. (2019) (šema 6).

2-Alkiliden-4-oksotiazolidin-S-oksidi

Jedinjenja **38-41** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Džambaski i sar. (2013) (šema 3).

*6,7-Dihidro-2*H*-tiazolo[3,2-*a*]piridin-3(5*H*)-oni*

Jedinjenja **42-48** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Bondžić i sar. (2012) (šema 5).

2-Alkiliden-7a-metilheksahidro-2H-pirano[2,3-d]tiazoli

Jedinjenja **49** i **50** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Bondžić i sar. (2012) (šema 5), dok je jedinjenje **51** sintetisano prema protokolu publikovanom u radu Kolarević i sar. (2019) (šema 6).

4a-Metil-2,3,4,4a,7,8,9,10a-oktahidropirano[2',3':4,5]tiazolo[3,2-a]piridini

Jedinjenja **52** i **53** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Bondžić i sar. (2012) (šema 5).

4.1.2. Ispitivani derivati benzimidazola

Derivati benzimidazola ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji (**54-72**) su sintetskog porekla i dobijeni su od doc. dr Denice Jančeve (Institut za organsku hemiju sa Centrom za fitohemiju, Bugarska akademija nauka, Sofija, Bugarska).

1,3-Disupstituisani-benzimidazol-2-imini

Jedinjenja **54-58** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Mavrova i sar. (2015) (šema 7).

2-Supstituisani-1,3-tiazolo[3,2-a]benzimidazoloni

Jedinjenja **59-62** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Mavrova i sar. (2015) (šema 8).

1,3-Disupstituisani-benzimidazol-2-tioni

Jedinjenja **63-72** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Anastassova i sar. (2018) (šema 9).

4.1.3. Ispitivani derivati 4H-hromena

Derivati 4H-hromena, kvercetin (**73**) i rutin (**74**), ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji, kupljeni su kao standardne hemikalije (*Sigma-Aldrich*).

4.1.4. Ispitivani derivati 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidina

Derivati 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidina ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji (**75-91**) su sintetskog porekla i dobijeni su od doc. dr Denice Jančeve (Institut za organsku hemiju sa Centrom za fitohemiju, Bugarska akademija nauka, Sofija, Bugarska).

5,6,7,8-Tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidin-4-amini

Jedinjenja **75-85** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Mavrova i sar. (2018) (šema 10).

5,6,7,8-Tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidin-4-ftalimidi

Jedinjenja **86-91** su sintetisana prema protokolu publikovanom u radu Mavrova i sar. (2018) (šema 10).

4.2. In vitro ispitivanje inhibicije komercijalne DNaze I

Ispitivanje inhibicije komercijalne DNaze I iz goveđeg pankreasa (tip IV, liofilizovani prašak, ≥ 2000 Kunitz jedinica/mg proteina; *Sigma-Aldrich*) je vršeno spektrofotometrijski, merenjem apsorbance nastalih oligonukleotida na 260 nm [Ilić i sar., 2018]. Spektrofotometrijska merenja su vršena na spektrofotometru *Beckman DU[®] 530*.

Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 1040 μ L. Prva grupa uzoraka je sadržala 80 μ L rastvora DNaze I u destilovanoj vodi (80 Kunitz jedinica DNaze I), 40 μ L rastvora ispitivane supstance u dimetil sulfoksidu (DMSO; čistoće $\geq 99,5\%$; *Sigma-Aldrich*), 0,0077% DNK (natrijumova so dezoksiribonukleinske kiseline iz timusa teleta, tip I; *Sigma-Aldrich*) i 80,77 mM TRIS-HCl pufera (pH 7,6). Druga grupa uzoraka je ispitivana u cilju određivanja uticaja rastvarača, a sadržala je iste količine DNaze I, DNK i TRIS-HCl pufera

kao prva grupa, ali je umesto rastvora ispitivane supstance dodavan DMSO. Predinkubacija uzoraka je trajala 15 minuta na sobnoj temperaturi, dok je vreme inkubacije uzoraka iznosilo 30 minuta na temperaturi od 37°C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodatkom 80 µL ledene perhlorne kiseline. Kontrolni uzorci i prve i druge grupe su pripremani na isti način kao i uzorci analize, samo je supstrat (DNK) dodavan nakon dodavanja ledene perhlorne kiseline. Nakon zamrzavanja (2h na -20°C) i centrifugiranja (10 minuta brzinom 3600 obrtaja/min korišćenjem centrifuge *Centric 322A Tehnica*) vršena su spektrofotometrijska merenja. DMSO u finalnoj koncentraciji od 3,85% v/v ne utiče na aktivnost enzima. Kristal violet (*Sigma-Aldrich*) je korišćen kao pozitivna kontrola. Sva ispitivanja su rađena u triplikatu [Ilić i sar., 2018].

Aktivnost i inhibicija DNaze I su računati kao procentualni odnos razlike absorbanci analize i kontrole za ispitivana jedinjenja i DMSO. Sva jedinjenja su najpre ispitivana u koncentraciji od 200 µM. Za jedinjenja koja su u koncentraciji od 200 µM pokazala inhibiciju veću od 50% izračunate su IC₅₀ vrednosti na osnovu četiri koncentracije (200, 150, 100 i 50 µM). U tabeli 3 je dat primer izračunavanja stepena inhibicije komercijalne DNaze I jedinjenjem **29**.

4.3. Određivanje kinetike inhibicije DNaze I

Kinetika enzimske inhibicije za neke od najefikasnijih inhibitora DNaze I među ispitivanim jedinjenjima utvrđena je na osnovu Lajnviver-Berkovih dijagrama. Ova kinetička studija izvedena je u odsustvu i prisustvu inhibitora sa različitim koncentracijama DNK kao supstrata.

4.4. Docking studije interakcija ispitivanih jedinjenja sa DNazom I

Docking studije o interakcijama ispitivanih jedinjenja sa DNazom I vršene su upotrebom softvera MOE [Molecular Operating Environment, 2014.0901].

Tabela 3. Primer izračunavanja uticaja jedinjenja **29** na aktivnost komercijalne DNaze I.

C (μM) ^a	A ^b	K ^c	A – K ^d	A – K (DMSO)*	Aktivnost DNaze I (%)	Inhibicija DNaze I (%)	\bar{X} (%) ^e
200	0,963	0,716	0,247	0,510	48,43	51,57	
200	0,957	0,705	0,252	0,510	49,41	50,59	52,68
200	0,940	0,715	0,225	0,510	44,12	55,88	
150	0,889	0,572	0,317	0,510	62,16	37,84	
150	0,883	0,576	0,307	0,510	60,20	39,80	37,45
150	0,894	0,561	0,333	0,510	65,29	34,71	
100	0,787	0,381	0,406	0,510	79,61	20,39	
100	0,794	0,402	0,392	0,510	76,86	23,14	23,33
100	0,771	0,396	0,375	0,510	73,53	26,47	
50	0,652	0,220	0,432	0,510	84,71	15,29	
50	0,671	0,218	0,453	0,510	88,82	11,18	12,55
50	0,660	0,207	0,453	0,510	88,82	11,18	

^akoncentracija jedinjenja; ^bapsorbanca analize; ^capsorbanca kontrole; ^drazlika između apsorbance analize i apsorbance kontrole; ^esrednja vrednost inhibicije DNaze I

*primer izračunavanja uticaja DMSO-a na aktivnost komercijalne DNaze I:

	A	K	A – K	A – K Srednja vrednost	Aktivnost DNaze I (%)	Inhibicija DNaze I (%)
DMSO	0,525	0,016	0,509			
	0,520	0,012	0,508	0,510	100	0
	0,531	0,018	0,513			

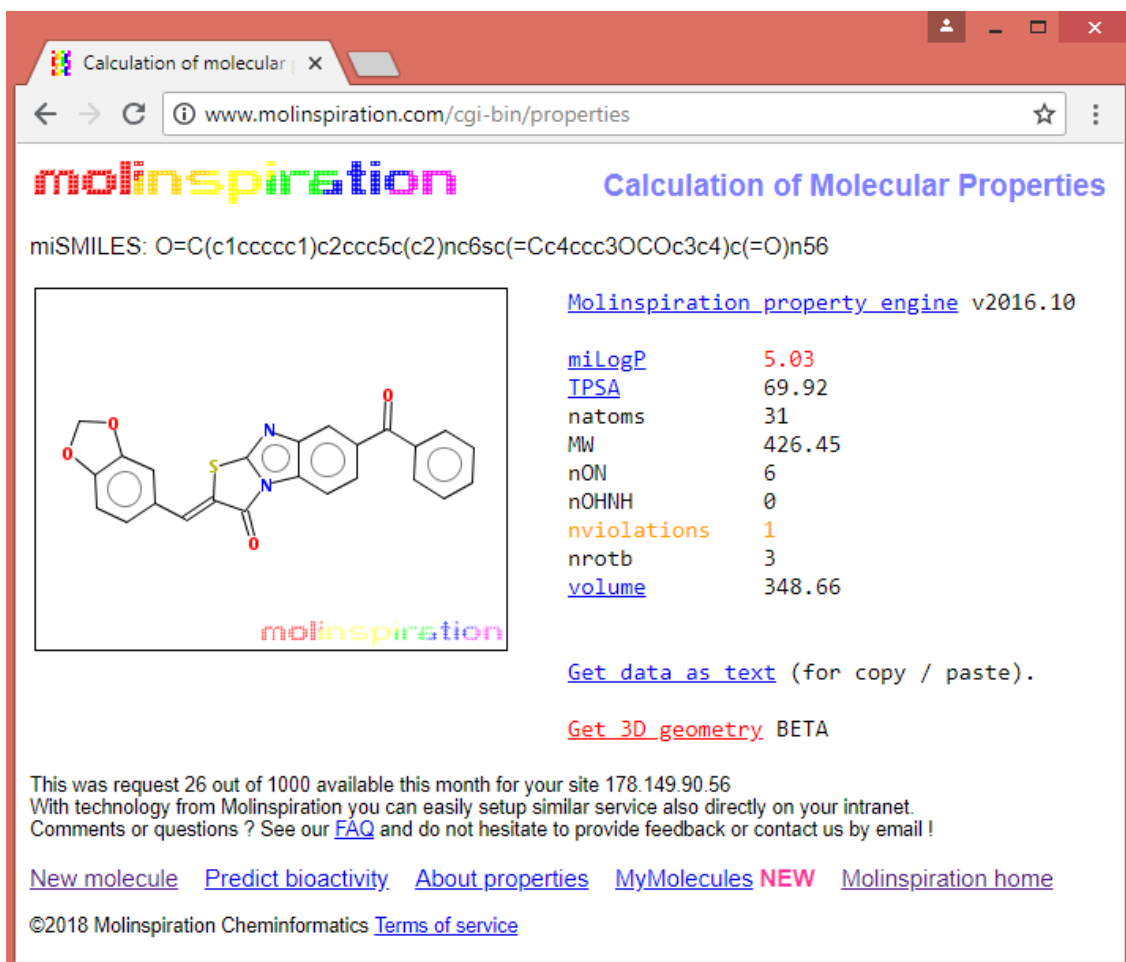
4.5. Predviđanje fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina inhibitora DNaze I *in silico* metodama

Fizičko-hemijske osobine inhibitora DNaze I predviđene su primenom kompjuterskog programa *Molinspiration* [<http://www.molinspiration.com/>].

Biofarmaceutske osobine inhibitora DNaze I predviđene su primenom kompjuterskih programa *Molinspiration* [<http://www.molinspiration.com/>], *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>] i *ADMET Predictor™ 9.0* [ADMET Predictor v9.0. Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA].

Farmakokinetičke osobine inhibitora DNaze I predviđene su primenom kompjuterskog programa *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>].

Toksikološke osobine inhibitora DNaze I predviđene su primenom kompjuterskih programa *DataWarrior* [<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>] i *Toxtree* [Toxtree, v.2.6.13].



Calculation of molecular properties

www.molinspiration.com/cgi-bin/properties

molinspiration Calculation of Molecular Properties

miSMILES: O=C(c1ccccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=Cc4ccc3OCOc3c4)c(=O)n56

[Molinspiration_property_engine](#) v2016.10

miLogP	5.03
TPSA	69.92
natoms	31
MW	426.45
nON	6
nOHNH	0
nviolations	1
nrotb	3
volume	348.66

[Get data as text](#) (for copy / paste).

[Get 3D geometry](#) BETA

This was request 26 out of 1000 available this month for your site 178.149.90.56
With technology from Molinspiration you can easily setup similar service also directly on your intranet.
Comments or questions ? See our [FAQ](#) and do not hesitate to provide feedback or contact us by email !

[New molecule](#) [Predict bioactivity](#) [About properties](#) [MyMolecules](#) **NEW** [Molinspiration home](#)

©2018 Molinspiration Cheminformatics [Terms of service](#)

Slika 20. Primer predviđanja fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih karakteristika jedinjenja **62** korišćenjem softvera *Molinspiration* [<http://www.molinspiration.com/>].

Predictive Result | admetSAR

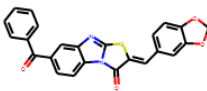
Not secure | Immd.ecust.edu.cn/admetSar2/result/?tid=1278

admetSAR Old version is still available [Predict](#) | [Optimize](#) | [Download](#) | [About](#)

Home > predict > **Predict result**

Compound List

compound1



SMILES: O=C(c1ccccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=Cc4ccc3OCoc3c4)c(=O)n56

[Download the results](#) [Optimize](#)

Property	Value
Molecular Weight	426.45
AlogP	3.42
H-Bond Acceptor	7
H-Bond Donor	0
Rotatable Bonds	3
Applicability Domain	In domain

ADMET predicted profile --- Classifications

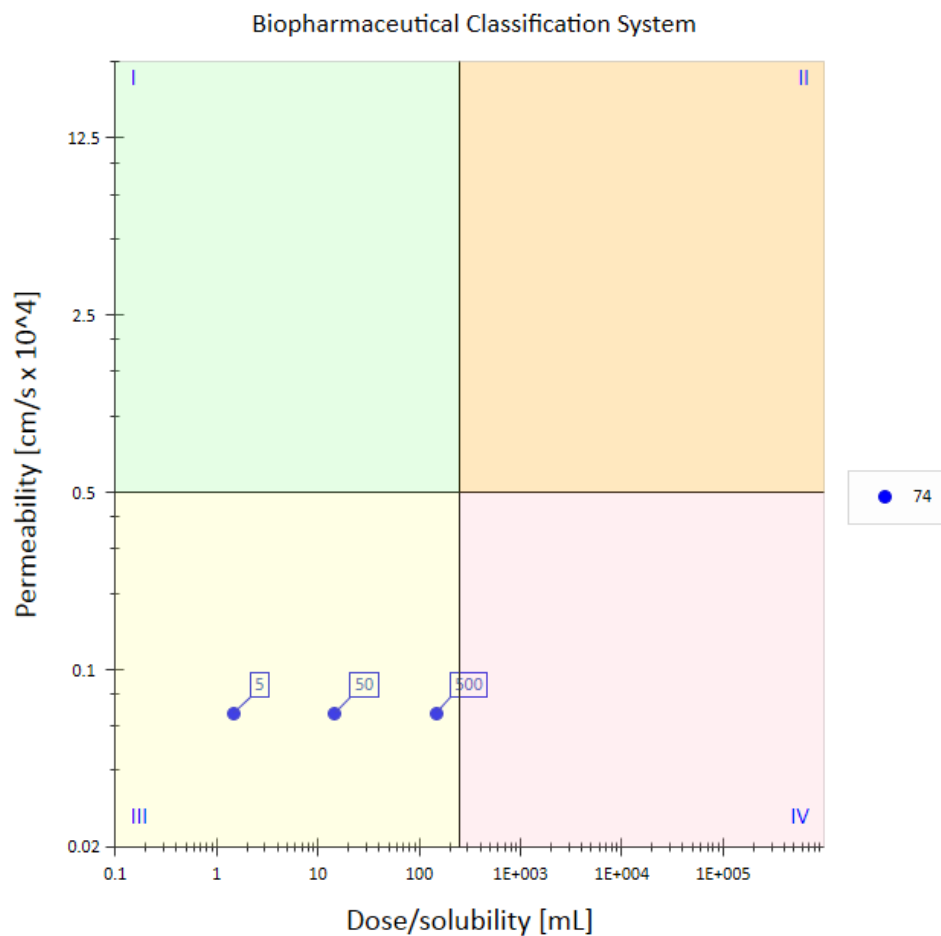
	Value	Probability
Human Intestinal Absorption	+	0.9730
Caco-2	-	0.7925
Blood Brain Barrier	+	0.9709

Predictive Result | admetSAR

Not secure | Immd.ecust.edu.cn/admetSar2/result/?tid=1278

OATP2B1 inhibitor	-	1.0000
OATP1B1 inhibitor	+	0.9177
OATP1B3 inhibitor	+	0.9371
MATE1 inhibitor	-	0.8400
OCT2 inhibitor	-	0.7664
BSEP inhibitor	+	0.9364
P-glycoprotein inhibitor	+	0.7498
P-glycoprotein substrate	-	0.8092
CYP3A4 substrate	+	0.5209
CYP2C9 substrate	+	0.6126
CYP2D6 substrate	-	0.8406
CYP3A4 inhibition	+	0.9562
CYP2C9 inhibition	+	0.5685

Slika 21. Primer predviđanja biofarmaceutskih i farmakokinetičkih karakteristika jedinjenja **62** korišćenjem softvera *admetSAR* [<http://Immd.ecust.edu.cn/admetSar2>].



Slika 22. Primer predviđanja biofarmaceutskog sistema klasifikacije za jedinjenje **74** korišćenjem softvera *ADMET Predictor*TM 9.0 [ADMET Predictor v9.0. Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA].

Endpoint	Prediction	Score
Carcinogenicity (binary)	-	0.9286
Carcinogenicity (trinary)	Non-required	0.5682
Eye corrosion	-	0.9835
Eye irritation	-	0.9310
Ames mutagenesis	-	0.6300
Human either-a-go-go inhibition	+	0.8194
micronuclear	+	0.8400
Hepatotoxicity	+	0.9250
Acute Oral Toxicity (c)	III	0.6372

Estrogen receptor binding	+	0.9025
Thyroid receptor binding	+	0.6297
Glucocorticoid receptor binding	+	0.8396
Aromatase binding	+	0.6503
PPAR gamma	+	0.6906
Honey bee toxicity	+	0.6033
Biodegradation	-	0.9250
crustacea aquatic toxicity	-	0.5300
Fish aquatic toxicity	+	0.9886

Slika 23. Primer predviđanja toksikoloških karakteristika jedinjenja **62** korišćenjem softvera *admetSAR* [<http://lmmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>].

Data From Clipboard

File Edit Data Chemistry Database List Macro Help

Table	Structure of Column 1	Column 1	Mutagenic	Tumorigenic	Reproductive Effective	Irritant
54		CCOC(=O)Cr	high	low	none	none
62		O=C(c1ccccc	high	low	high	none
67		COC(=O)CCr	high	low	none	none
72		NNC(=O)CCr	high	high	none	none

Selected: Visible:4 Total:4

Slika 24. Primer predviđanja toksikoloških karakteristika derivata benzimidazola (**54**, **62**, **67** i **72**) korišćenjem softvera *DataWarrior* [<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>].

Toxtree (Estimation of Toxic Hazard - A Decision Tree Approach) v2.6.13

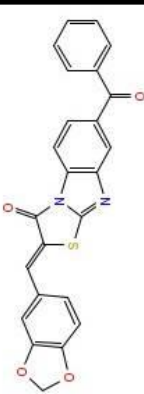
File Edit Chemical Compounds Toxic Hazard Method Help

Chemical identifier: O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOc3e4)c(=O)n56

Available structure attributes

Alert for Acyl Transfer age...	NO
Alert for Michael Acceptor i...	YES
Alert for SN1 Identified...	NO
Alert for SN2 Identified...	NO
Alert for Schiff base forma...	NO
No DNA binding alerts iden...	NO
SMILES	<chem>O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)...</chem>
cdk:Comment	Created from SMILES

Structure diagram



by DNA binding Alerts

Estimate

Toxic Hazard

Alert for SN1 Identified.

Alert for Schiff base formation identified.

Alert for Michael Acceptor identified.

Alert for Acyl Transfer agent identified.

Alert for SN2 identified.

No DNA binding alerts identified.

Verbose explanation

DNA binding Alerts

- QSN1.SN1 No O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOc3e4)c(=O)n56
- QSB.Schiff Base Formation No O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOc3e4)c(=O)n56
- QMA.Michael Acceptor Yes Class Alert for Michael Acceptor identified. O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOc3e4)c(=O)n56
- Qacyl.Acyl Transfer Agents No O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOc3e4)c(=O)n56
- QSN2.SN2-Nucleophilic Aliphatic Substitution No O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOc3e4)c(=O)n56
- Q6.At least one alert for DNA binding? Yes O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOc3e4)c(=O)n56

First Prev 1 / 1 Next Last

Completed.

Slika 25. Primer predviđanja mogućnosti vezivanja jedinjenja 62 za DNK korišćenjem softvera Toxtree [Toxtree, v.2.6.13].

Toxtree (Estimation of Toxic Hazard - A Decision Tree Approach) v2.6.13

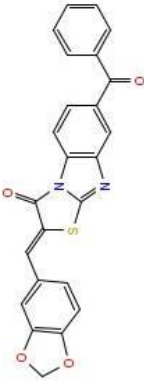
File Edit Chemical Compounds Toxic Hazard Method Help

Chemical identifier O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56

Available structure attributes

Alert for Acyl Transfer age...	NO
Alert for Michael Acceptor 1...	YES
Alert for SN1 Identified.	NO
Alert for SN2 Identified.	NO
Alert for SNAr Identified.	NO
Alert for Schiff base forma...	NO
No DNA binding alerts iden...	NO
No protein binding alerts id...	NO
SMILES	<chem>O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56</chem>
cdk:Comment	Created from SMILES

Structure diagram



Toxic Hazard

by Protein binding Alerts Estimate

Alert for SNAr Identified.

Alert for Schiff base formation identified.

Alert for Michael Acceptor identified.

Alert for Acyl Transfer agent identified.

Alert for SN2 identified.

No protein binding alerts identified.

Verbose explanation

Protein binding Alerts

- QSNAR_SNAr-Nucleophilic Aromatic Substitution **No** O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56
- QSB_Schiff Base Formation **No** O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56
- QMA_Michael Acceptor **Yes** Class **Alert for Michael Acceptor identified.** O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56
- Qacyl_Acyl Transfer Agents **No** O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56
- QSN2_SN2-Nucleophilic Aliphatic Substitution **No** O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56
- Q6_At least one alert for protein binding? **Yes** O=C(c1cccc1)c2ccc5c(c2)nc6sc(=C4ccc3OCOC3c4)c(=O)n56

First Prev 1 / 1 Next Last

Completed.

Slika 26. Primer predviđanja mogućnosti vezivanja jedinjenja **62** za proteine korišćenjem softvera *Toxtree* [Toxtree, v.2.6.13].

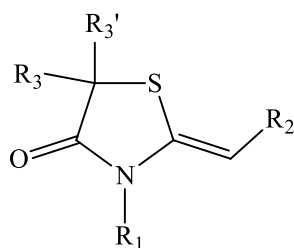
5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Inhibicija DNaze I derivatima tiazolidina

Inhibitorna aktivnost 53 derivata tiazolidina ispitivana je u *in vitro* uslovima prema komercijalnoj DNazi I. Deset jedinjenja, uključujući sedam 2-alkiliden-4-oksotiazolidina (**4**, **11**, **13**, **18**, **27**, **29** i **31**) (tabela 4, slike 27-33) i tri 2-alkiliden-4-oksotiazolidin-*S*-oksida (**38**, **40** i **41**) (tabela 6, slike 34-36), inhibirali su komercijalnu DNazu I iz goveđeg pankreasa sa IC₅₀ vrednostima ispod 200 µM. Svih deset jedinjenja je inhibiralo DNazu I sa nižim IC₅₀ vrednostima u odnosu na kristal violet (IC₅₀ = 365,90 ± 47,33 µM) (slika 37) koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Kao najefikasniji inhibitori DNaze I pokazala su se jedinjenja **41** (IC₅₀ = 115,96 ± 11,70 µM) i **31** (IC₅₀ = 120,04 ± 19,14 µM), dok se jedinjenje **29** pokazalo kao najmanje efikasan inhibitor DNaze I (IC₅₀ = 193,77 ± 20,66 µM). Ispitivani derivati 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina (tabela 5), 6,7-dihidro-2*H*-tiazolo[3,2-*a*]piridin-3(5*H*)-ona (tabela 7), 2-alkiliden-7*a*-metilheksahidro-2*H*-pirano[2,3-*d*]tiazola (tabela 8), kao i 4*a*-metil-2,3,4,4*a*,7,8,9,10*a*-oktahidropirano[2',3':4,5]tiazolo[3,2-*a*]piridina (tabela 9) nisu inhibirali DNazu I u ispitivanoj koncentraciji (IC₅₀ > 200 µM) [Kolarević i sar., 2019].

Analizom struktura 2-alkiliden-4-oksotiazolidina koji su inhibirali DNazu I sa IC₅₀ vrednostima ispod 200 µM (tabela 4), može se zapaziti da jedino jedinjenje **31**, koje se u ovoj grupi pokazalo kao najefikasniji inhibitor DNaze I, poseduje hidroksilnu grupu u poziciji R₃, dok ostali inhibitori DNaze I iz ove grupe u istoj poziciji poseduju estarsku grupu ili vodonikove atome. Sa druge strane, derivati 2-alkiliden-4-oksotiazolidin-*S*-oksida koji su inhibirali DNazu I sa IC₅₀ vrednostima ispod 200 µM (tabela 6), razlikuju se međusobno samo po supstituentima u poziciji R₂. Jedinjenja **40** i **41** u ovoj poziciji poseduju amidnu grupu, ali jedinjenje **41**, kao najaktivnije, pokazuje nešto veću konformacionu fleksibilnost (veći broj rotirajućih veza), pa je prilagodljivije za interakciju sa enzimom u odnosu na jedinjenje **40**.

Tabela 4. Inhibicija DNaze I derivatima 2-alkiliden-4-oksotiazolidina **1-35** [Kolarević i sar., 2019].



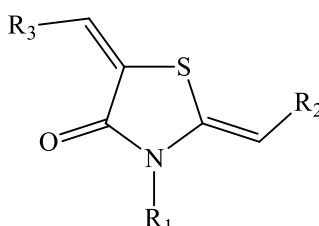
Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₃ '	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ ± SD (μM)
1	H	CO ₂ Et	H	H	> 200
2	H	CONH(CH ₂) ₂ Ph	H	H	> 200
3	Me	CO ₂ Et	H	H	> 200
4	Me	COPh	H	H	191,30 ± 18,13
5	Me	CONHPh	H	H	> 200
6	Me	CONH(CH ₂) ₂ Ph	H	H	> 200
7	H	CO ₂ Et	Me	H	> 200
8	H	COPh	Me	H	> 200
9	H	CONH(CH ₂) ₂ Ph	Me	H	> 200
10	H	CO ₂ Et	CH ₂ CO ₂ Et	H	> 200
11	H	COPh	CH ₂ CO ₂ Et	H	191,84 ± 16,04
12	H	CONHPh	CH ₂ CO ₂ Et	H	> 200
13	H	CONH(CH ₂) ₂ Ph	CH ₂ CO ₂ Et	H	190,59 ± 22,35
14	H	CN	CH ₂ CO ₂ Et	H	> 200
15	Me	CO ₂ Et	Me	H	> 200
16	Me	CONHPh	Me	H	> 200
17	Bn	COPh	H	H	> 200
18	Bn	COPh	CH ₂ CO ₂ Et	H	162,87 ± 25,05
19	Bn	CONHPh	CH ₂ CO ₂ Et	H	> 200
20	(CH ₂) ₃ Br	CO ₂ Et	H	H	> 200
21	(CH ₂) ₃ Br	COPh	H	H	> 200
22	(CH ₂) ₂ Br	CO ₂ Et	Me	H	> 200
23	(CH ₂) ₃ Br	CO ₂ Et	Me	H	> 200
24	(CH ₂) ₃ Br	CO ₂ Et	CH ₂ CO ₂ Et	H	> 200
25	(CH ₂) ₃ Br	COPh	CH ₂ CO ₂ Et	H	> 200
26	(CH ₂) ₃ Br	CN	Me	(CH ₂) ₂ CHO	> 200
27	H	COPh	H	H	167,90 ± 32,49
28	H	CONHPh	H	H	> 200

Tabela 4. (nastavak)

Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₃ '	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ ± SD (μM)
29	H	CN	H	H	193,77 ± 20,66
30	H	CONHPh	Me	H	> 200
31	Me	COPh	OH	H	120,04 ± 19,14
32	Me	CONH(CH ₂) ₂ Ph	OH	H	> 200
33	<i>o</i> -BrBn	CO ₂ Et	H	H	> 200
34	(CH ₂) ₄ Br	COPh	Me	H	> 200
35	(CH ₂) ₄ Br	CO ₂ Et	Me	(CH ₂) ₂ CHO	> 200

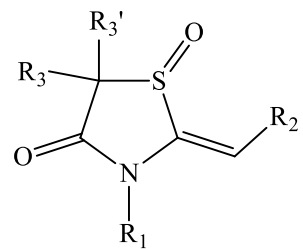
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 365,90 ± 47,33 μM

Tabela 5. Inhibicija DNaze I derivatima 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina **36** i **37** [Kolarević i sar., 2019].

	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ ± SD (μM)
	36	Me	COPh	N(CH ₃) ₂	> 200
37	Me	CONH(CH ₂) ₂ Ph	N(CH ₃) ₂	> 200	

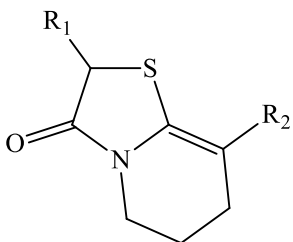
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 365,90 ± 47,33 μM

Tabela 6. Inhibicija DNaze I derivatima 2-alkiliden-4-oksotiazolidin-*S*-oksida **38-41** [Kolarević i sar., 2019].

	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₃ '	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ ± SD (μM)
	38	Me	CO ₂ Et	H	H	141,53 ± 11,66
39	Me	COPh	H	H	> 200	
40	Me	CONHPh	H	H	173,66 ± 17,86	
41	Me	CONH(CH ₂) ₂ Ph	H	H	115,96 ± 11,70	

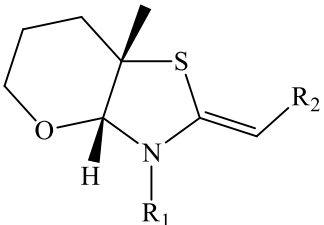
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 365,90 ± 47,33 μM

Tabela 7. Inhibicija DNaze I derivatima 6,7-dihidro-2*H*-tiazolo[3,2-*a*]piridin-3(5*H*)-ona **42-48** [Kolarević i sar., 2019].

	Jedinjenje	R ₁	R ₂	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ ± SD (μM)
	42	H	COPh	> 200
43	Me	CO ₂ Et	> 200	
44	Me	COPh	> 200	
45	Me	CONHPh	> 200	
46	Me	CONH(CH ₂) ₂ Ph	> 200	
47	CH ₂ CO ₂ Et	CO ₂ Et	> 200	
48	CH ₂ CO ₂ Et	COPh	> 200	

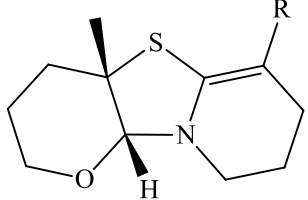
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 365,90 ± 47,33 μM

Tabela 8. Inhibicija DNaze I derivatima 2-alkiliden-7*a*-metilheksahidro-2*H*-pirano[2,3-*d*]tiazola **49-51** [Kolarević i sar., 2019].

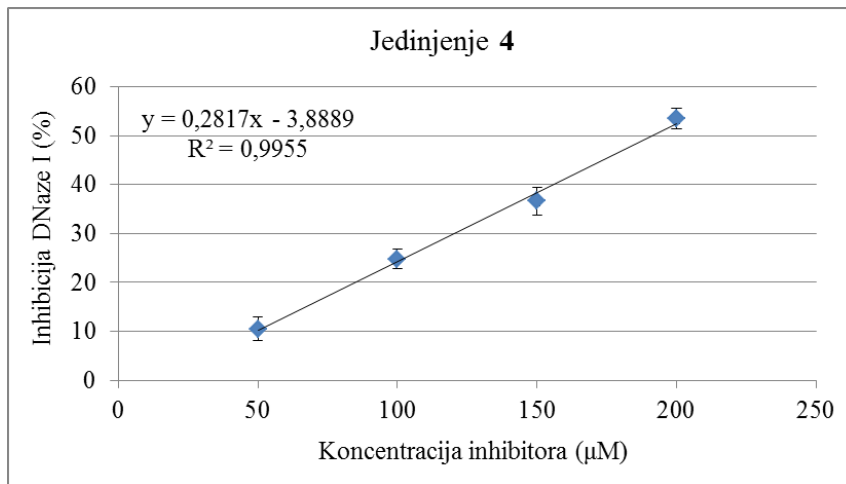
	Jedinjenje	R ₁	R ₂	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ ± SD (μM)
	49	(CH ₂) ₃ Br	COPh	> 200
50	(CH ₂) ₃ Br	CONHPh	> 200	
51	(CH ₂) ₄ Br	CO ₂ Et	> 200	

Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 365,90 ± 47,33 μM

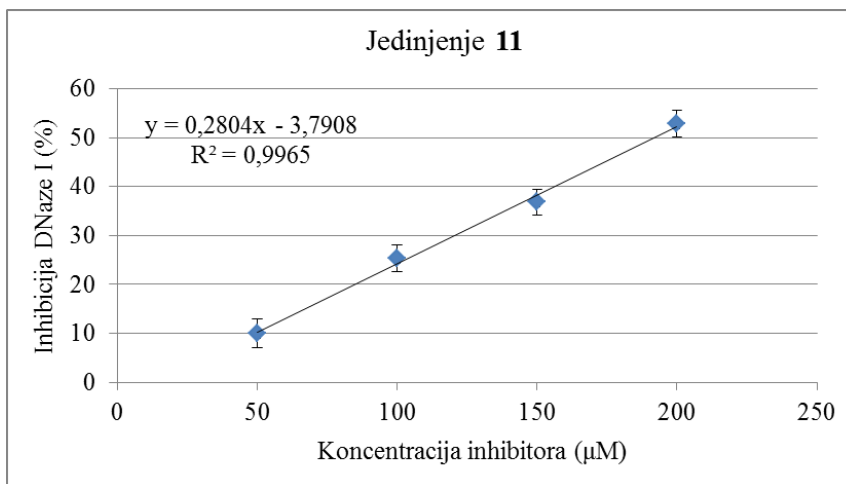
Tabela 9. Inhibicija DNaze I derivatima 4*a*-metil-2,3,4,4*a*,7,8,9,10*a*-oktahidropirano[2',3':4,5]tiazolo[3,2-*a*]piridina **52 i 53** [Kolarević i sar., 2019].

	Jedinjenje	R	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ ± SD (μM)
	52	COPh	> 200
53	CN	> 200	

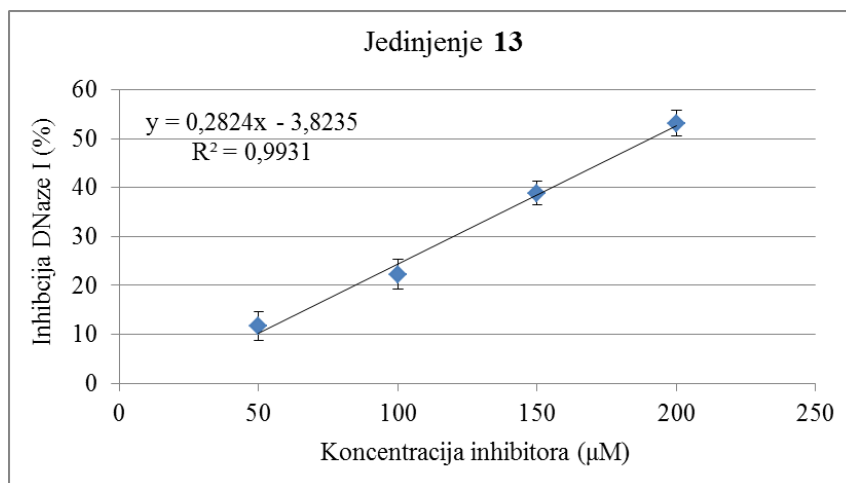
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 365,90 ± 47,33 μM



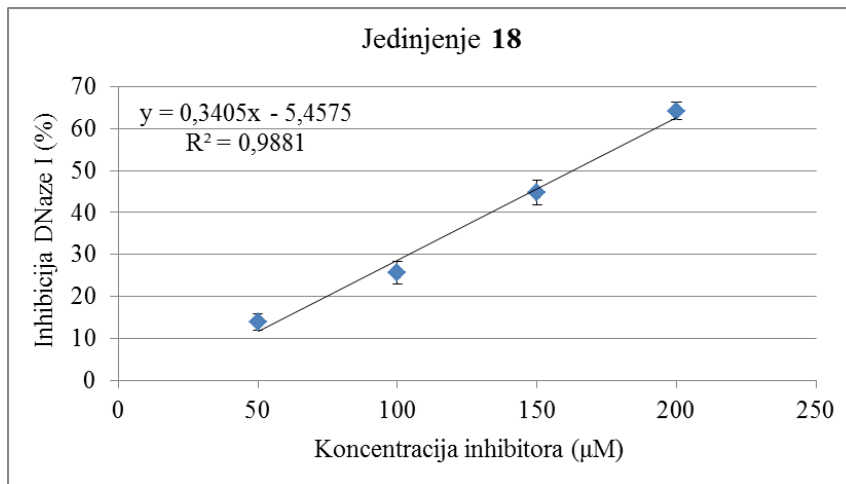
Slika 27. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 4.



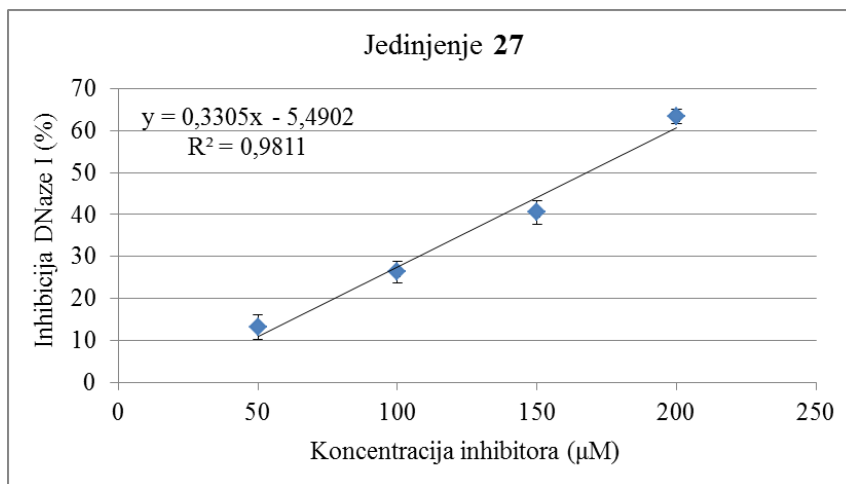
Slika 28. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 11.



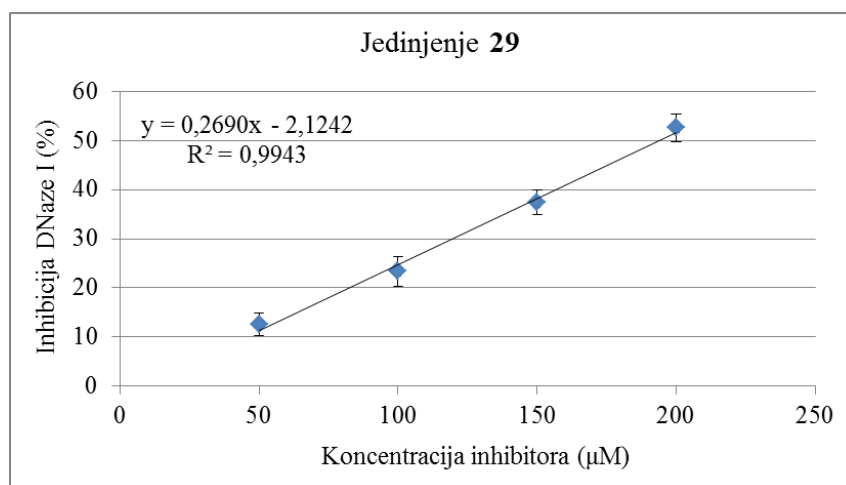
Slika 29. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 13.



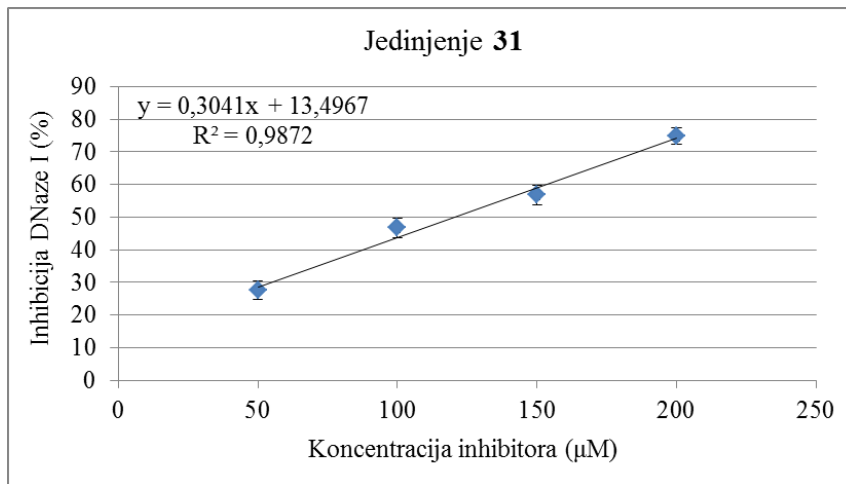
Slika 30. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **18**.



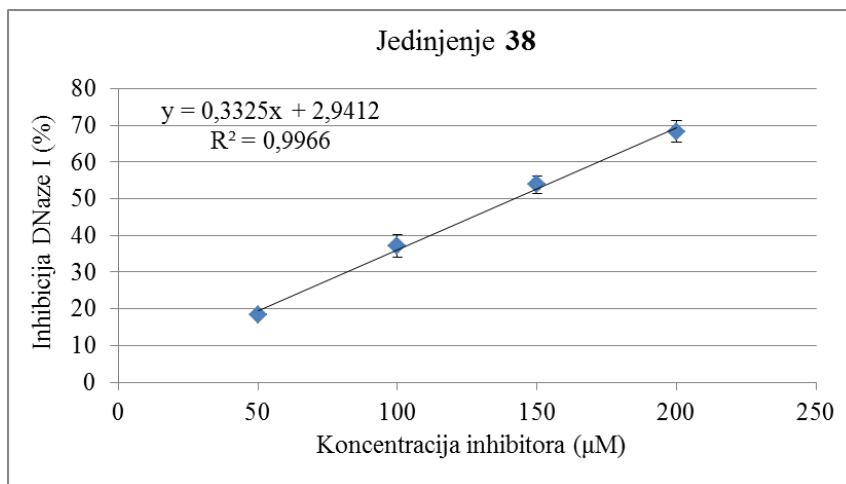
Slika 31. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **27**.



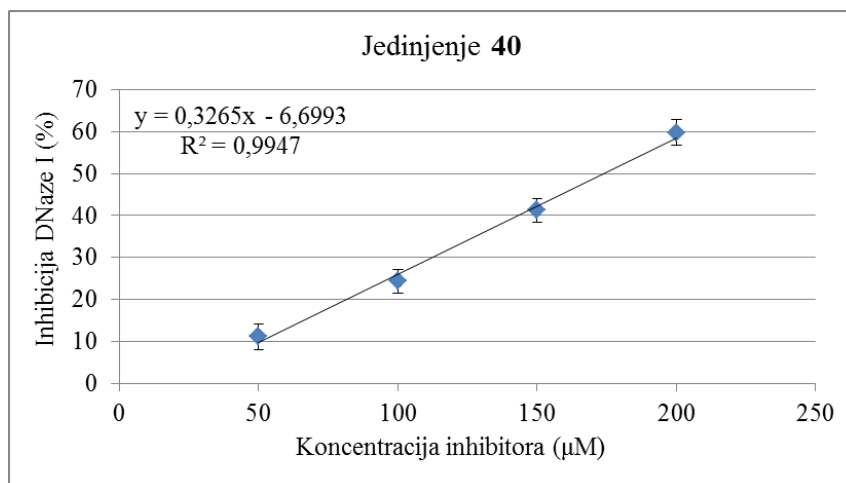
Slika 32. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **29**.



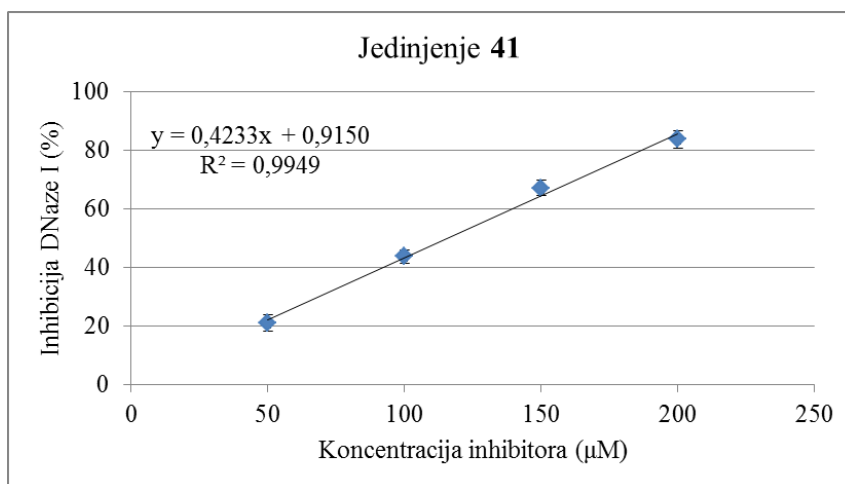
Slika 33. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **31**.



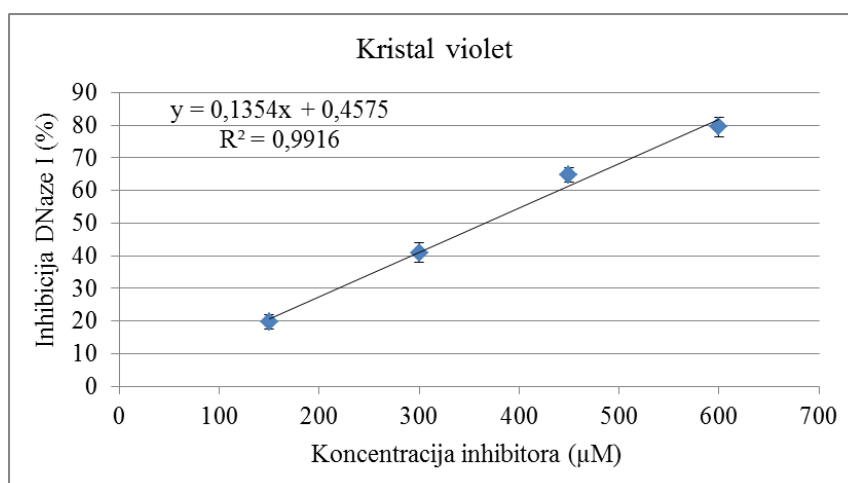
Slika 34. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **38**.



Slika 35. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **40**.

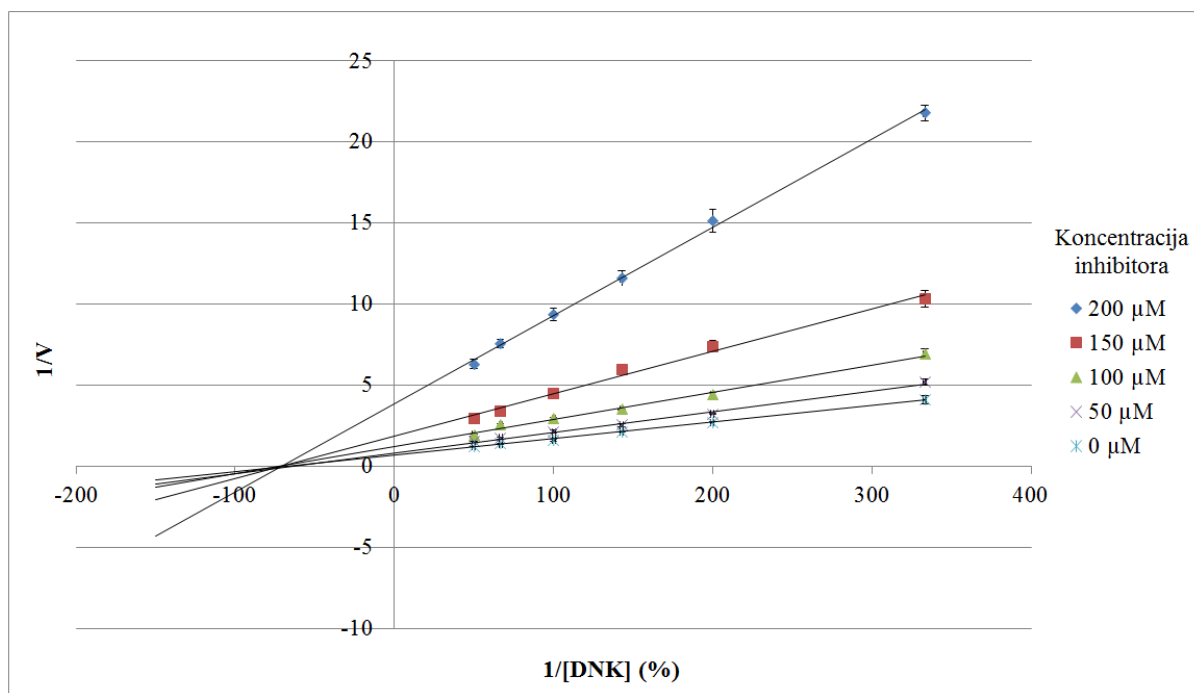


Slika 36. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **41**.



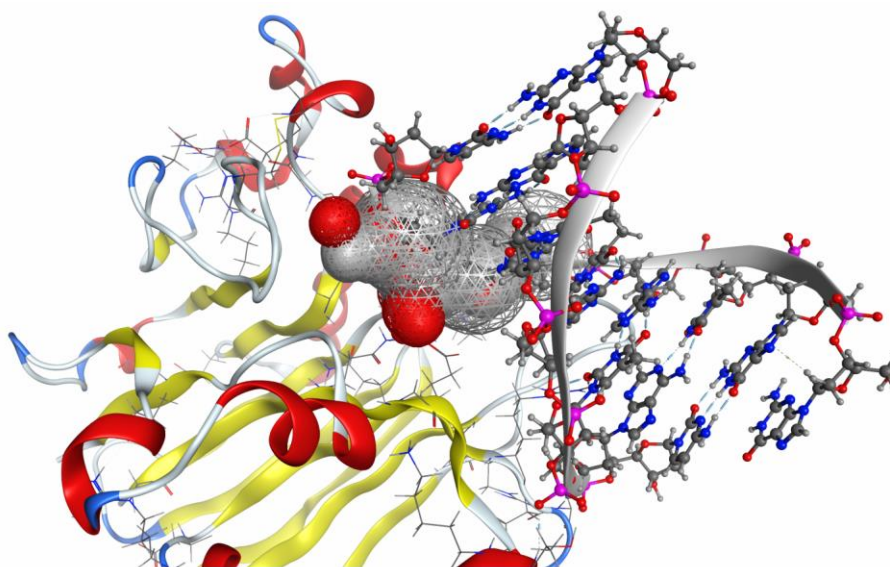
Slika 37. Inhibicija DNaze I kristal violetom.

Za jedinjenje **41**, koje se u ovoj seriji pokazalo kao najefikasniji inhibitor DNaze I ($IC_{50} = 115,96 \pm 11,70 \mu\text{M}$) određena je kinetika enzimske inhibicije na osnovu Lajnviver-Berkovog dijagrama (slika 38). Rezultati ukazuju da jedinjenje **41** deluje kao nekonkurentan inhibitor DNaze I.



Slika 38. Lajniver-Berkov dijagram za jedinjenje **41**.

Primenom softvera MOE, utvrđeno je da ostaci 17 aminokiselina, Asn 7, Arg 9, Glu 39, Tyr 76, Glu 78, Arg 111, His 134, Ala 136, Pro 137, Asp 168, Asn 170, Thr 203, Thr 205, Thr 207, Tyr 211, Asp 251 i His 252, čine sastavni deo vezujućeg mesta u strukturi DNaze I [Ilić i sar., 2018]. Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjem koje su sprovedi Guérout i sar. (2010) i koji su ustanovili da interfejs (mesto interakcije) goveđe pankreasne DNaze I i DNK obuhvata ukupno 24 aminokiselinska ostatka (Arg 9, Thr 10, Gly 12, Glu 13, Thr 14, Glu 39, Arg 41, Asp 42, Ser 43, Asn 74, Ser 75, Tyr 76, Arg 111, Ala 136, Pro 137, Asp 168, Asn 170, Tyr 175, Thr 203, Thr 205, Thr 207, Tyr 211, His 134 i His 252). Takođe je važno napomenuti da se vezujuće mesto DNaze I, prikazano sivo-crvenom površinom, nalazi unutar regiona koji interaguje sa DNK oktamerom d(GGTATACC)₂ (slika 39) [Ilić i sar., 2018].



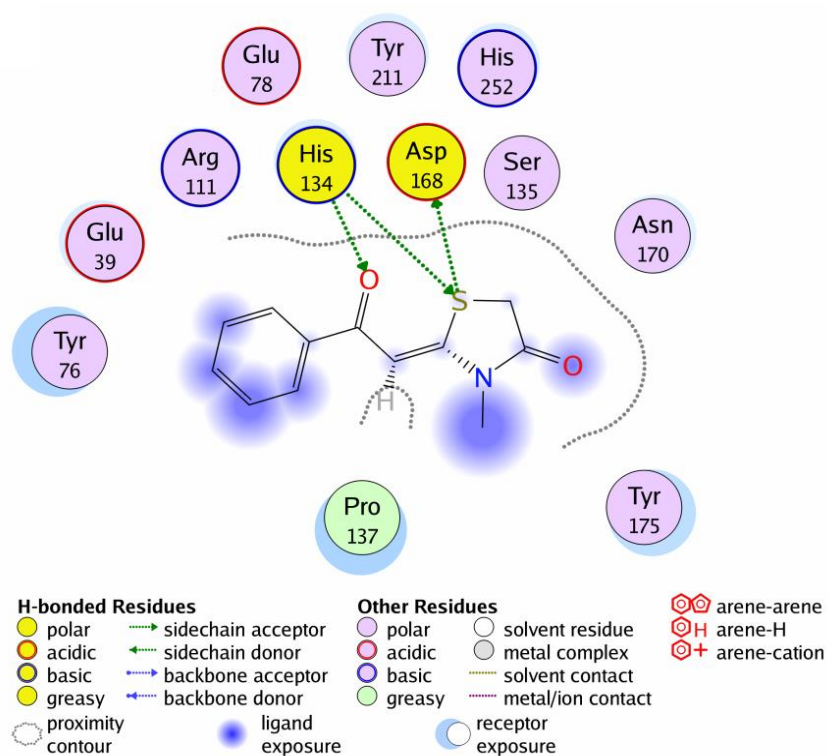
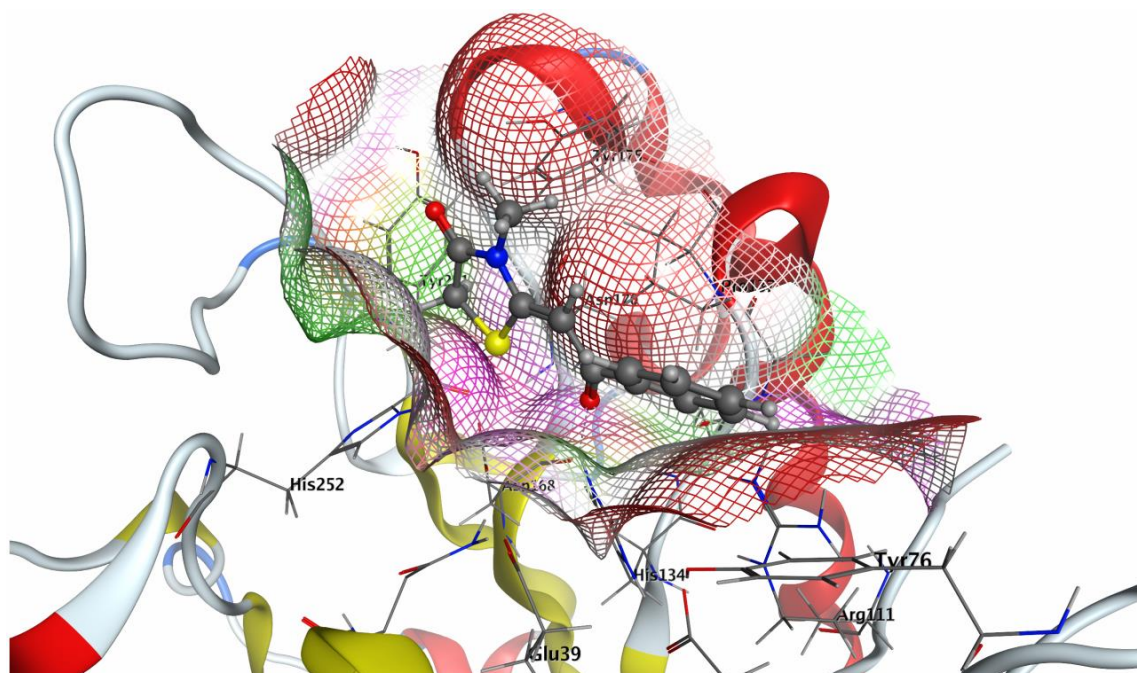
Slika 39. Vezujuće mesto DNaze I prikazano sivo-crvenom površinom [Ilić i sar., 2018].

Međumolekulske interakcije između ispitivanih derivata tiazolidina i DNaze I predviđene su korišćenjem MOE softvera (tabela 10, slike 40-49). Jedinjenje **41**, koje je ispoljilo najefikasniju inhibiciju DNaze I u ovoj seriji, pokazuje moguće vodonične interakcije sa dva katalitička histidina, His 134 i His 252 (tabela 10, slika 49). Vodonične interakcije sa His 134 primećene su i za jedinjenja **4**, **13**, **18** i **27** (tabela 10, slike 40, 42-44), dok su vodonične interakcije sa His 252 primećene i za jedinjenja **31** i **38** (tabela 10, slike 46 i 47). Pored toga, jedinjenje **4** može ostvariti i vodonične interakcije sa Asp 168, a jedinjenje **27** i vodonične interakcije sa Glu 39, koji takođe učestvuju u raskidanju fosfodiesterne veze. Sa druge strane, tiazolidini **11**, **29** i **40** ne pokazuju slične interakcije kao prethodno navedena jedinjenja, ali su predviđene njihove interakcije sa aminokiselinskim ostacima koji se nalaze u neposrednoj blizini aktivnog mesta, Tyr 211 (jedinjenje **11**), Asn 170 (jedinjenje **29**), Arg 111 i Tyr 76 (jedinjenje **40**) (tabela 10, slike 41, 45 i 48). Može se zaključiti da bi prisustvo interakcija sa najvažnijim katalitičkim ostacima aktivnog mesta DNaze I moglo doprineti većoj inhibitornoj efikasnosti ispitivanih tiazolidina [Kolarević i sar., 2019].

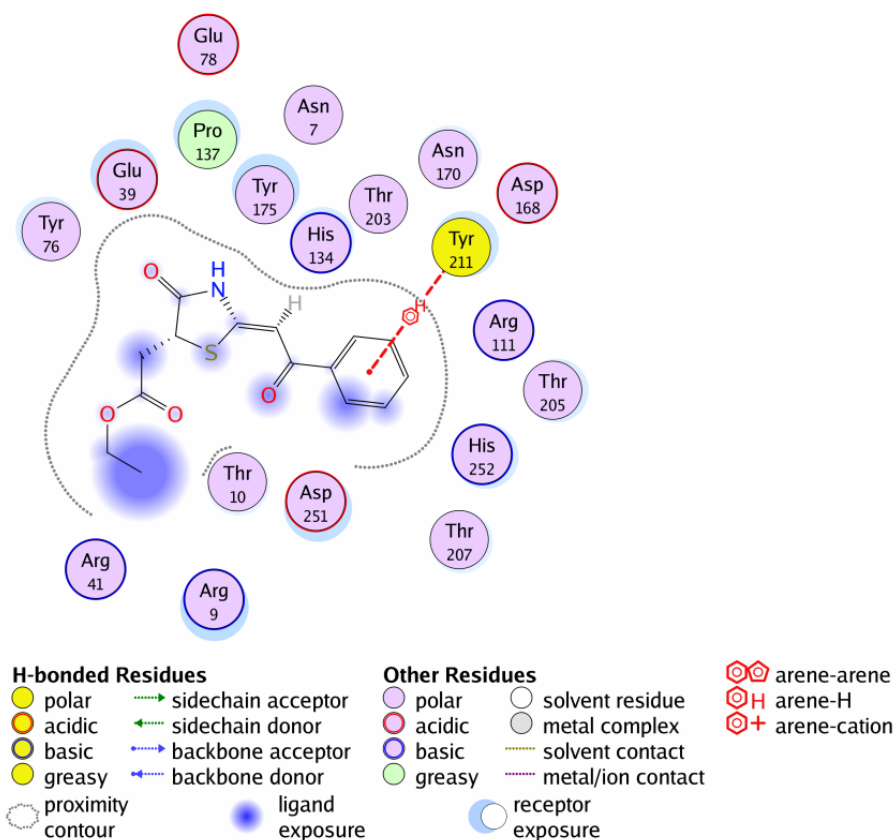
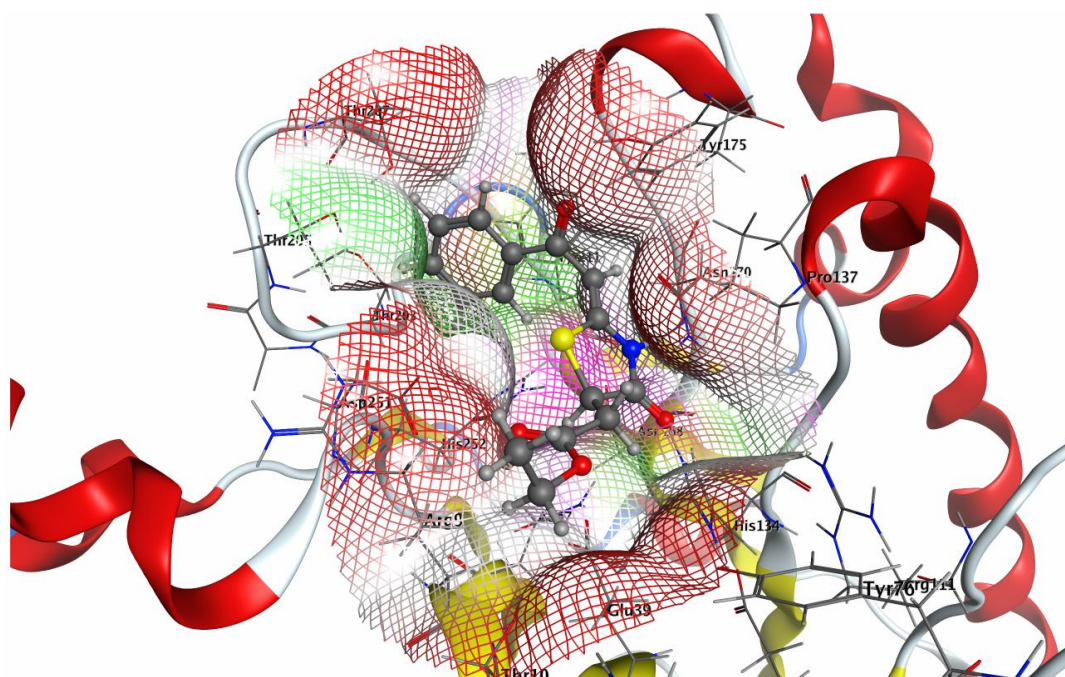
Tabela 10. Predviđene interakcije tiazolidina sa aminokiselinskim ostacima DNaze I [Kolarević i sar., 2019].

Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
4	S5	Asp 168	H-donor	4,62	-0,1	-4,47
	S5	Asp 168	H-donor	4,10	-0,9	
	S5	His 134	H-akceptor	4,69	-0,4	
	O10	His 134	H-akceptor	2,92	-5,9	
11	6-prsten	Tyr 211	π -H	3,77	-0,7	-5,15
	N3	Asp 251	H-donor	3,33	-0,4	
13	S5	Asn 170	H-donor	3,77	0,1	-5,50
	O10	His 134	H-akceptor	3,13	-2,5	
	O10	Asn 170	H-akceptor	3,73	-0,3	
	O22	Tyr 175	H-akceptor	3,01	-0,9	
	C1	Tyr 211	H- π	5,01	-0,3	
	6-prsten	Pro 137	π -H	4,27	-0,2	
18	S5	His 134	H-akceptor	3,79	-0,8	-5,87
	6-prsten	Arg 9	π -H	4,41	-0,4	
27	C1	Glu 39	H-donor	3,48	-0,3	-4,46
	N3	Asn 170	H-donor	3,28	-2,8	
	S5	Asp 251	H-donor	3,72	-0,7	
	O6	His 134	H-akceptor	2,91	-2,5	
	O6	Asn 170	H-akceptor	3,72	-0,1	
	6-prsten	Tyr 211	π -H	4,49	-0,3	
29	S5	Asn 170	H-donor	3,56	-0,7	-3,70
	N9	Thr 203	H-akceptor	3,58	-0,4	
31	O10	His 252	H-akceptor	3,09	-4,9	-4,58
38	O9	His 252	H-akceptor	3,20	-0,4	-4,39
	O14	Tyr 175	H-akceptor	2,75	-2,4	
	C7	His 252	H- π	4,74	-0,5	
40	O10	Arg 111	H-akceptor	3,31	-1,2	-4,81
	O18	Ser 110	H-akceptor	3,07	-2,2	
	O18	Arg 111	H-akceptor	2,88	-5,4	
	O18	Arg 111	H-akceptor	3,36	-0,9	
	C17	Tyr 76	H- π	4,90	-0,4	
41	O10	His 134	H-akceptor	3,32	-5,0	-5,61
	O10	Asn 170	H-akceptor	3,15	-3,2	
	O20	His 252	H-akceptor	3,35	-0,6	
	6-prsten	Tyr 211	π -H	3,84	-0,5	

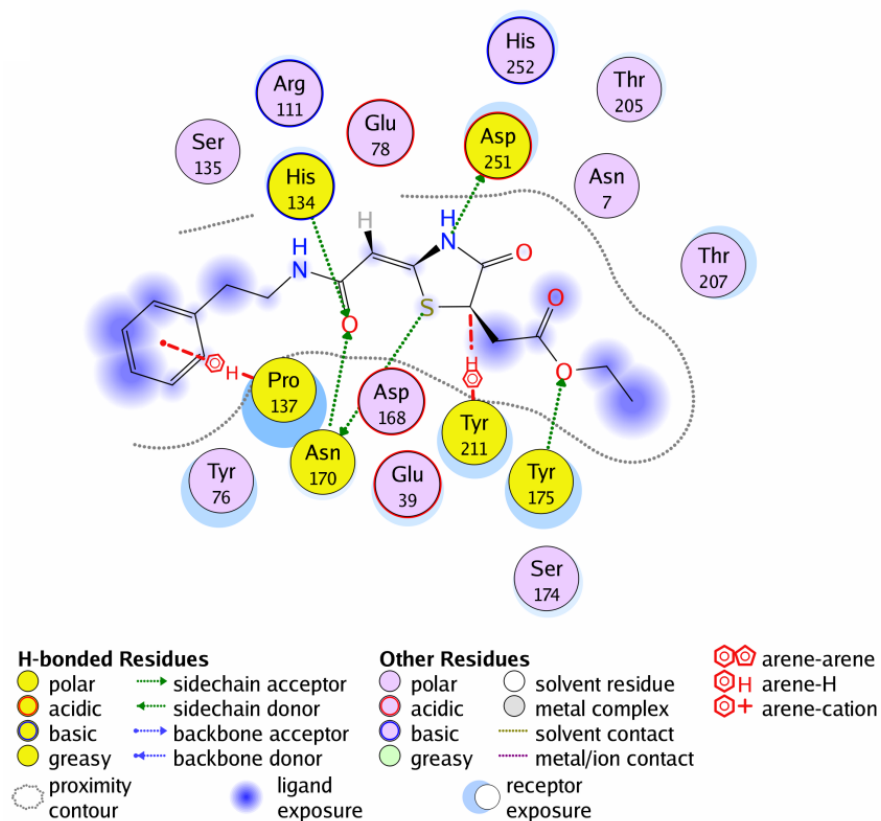
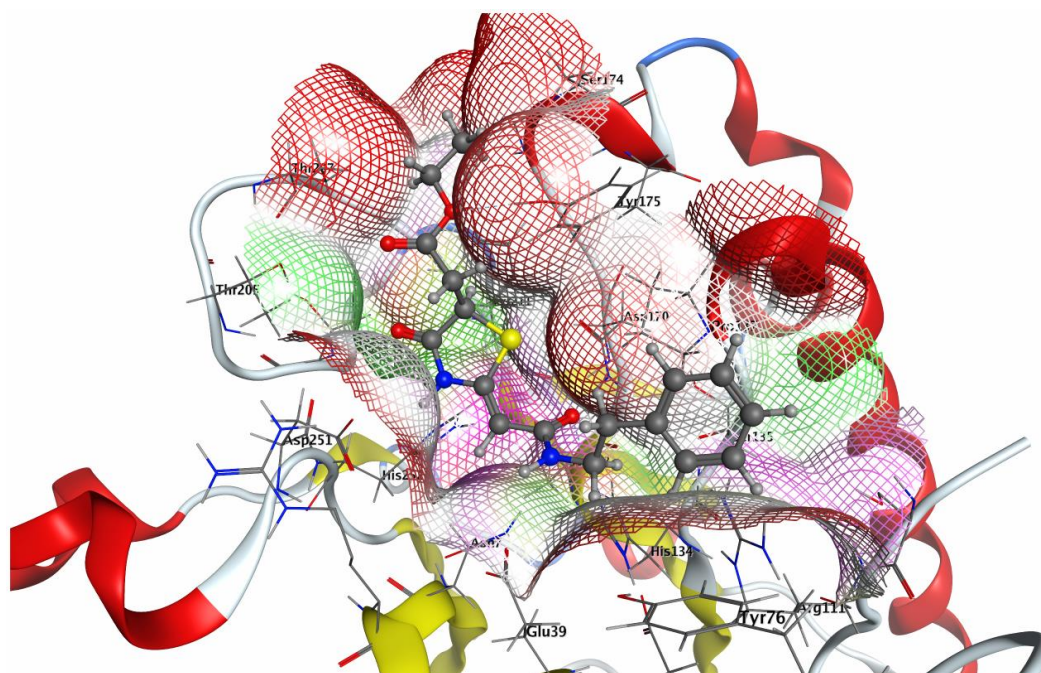
* ΔG – Gibsova slobodna energija



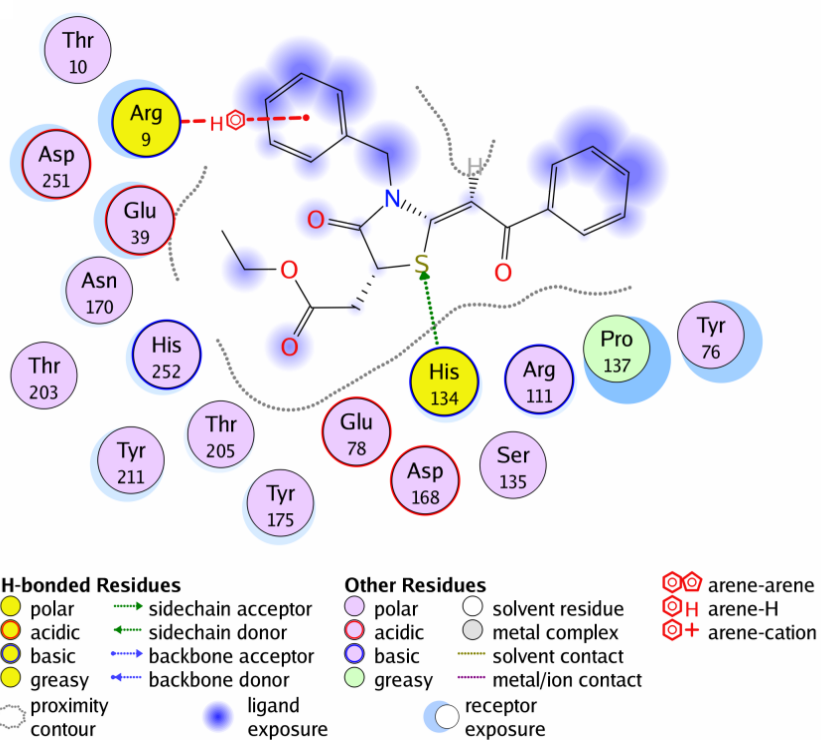
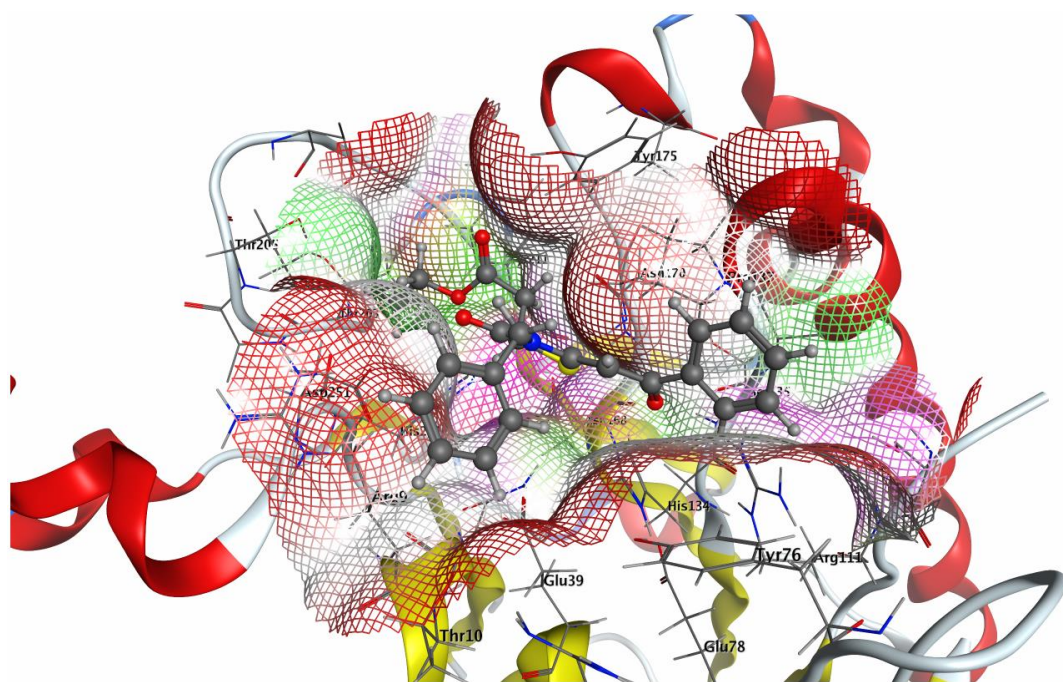
Slika 40. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja 4 sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



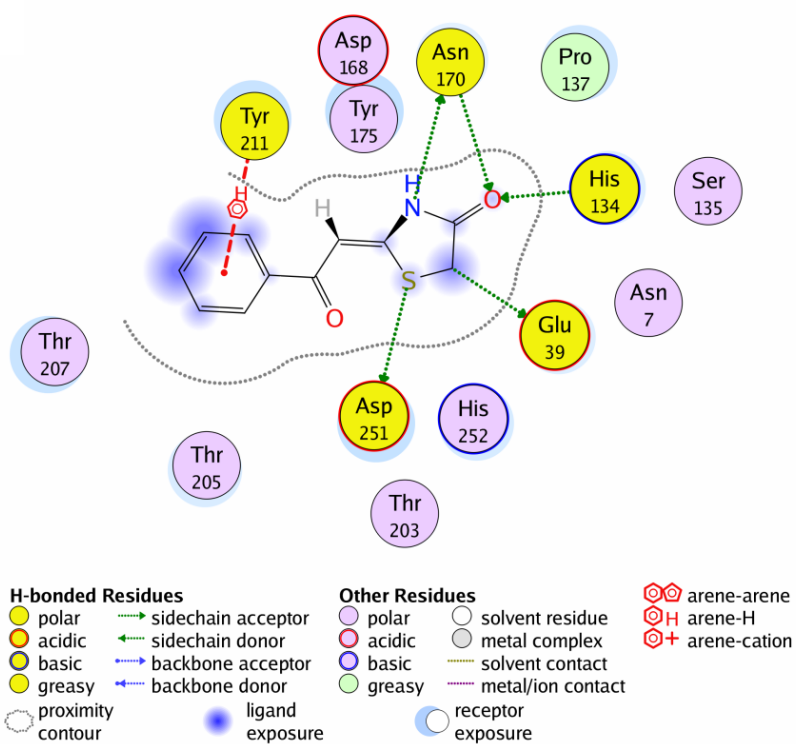
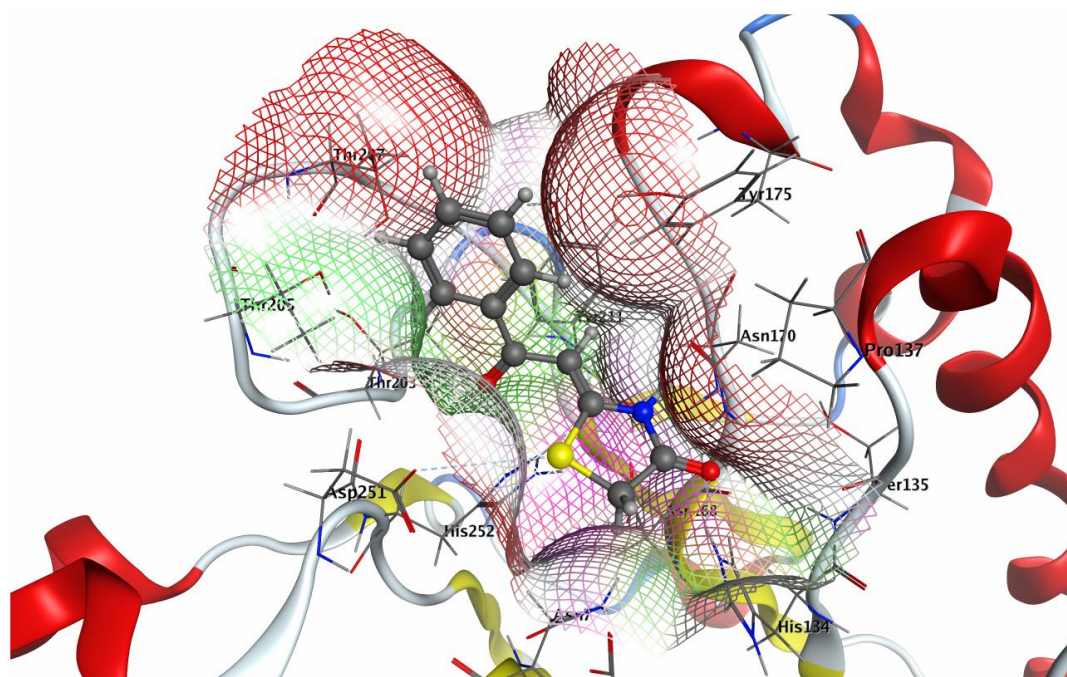
Slika 41. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **11** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



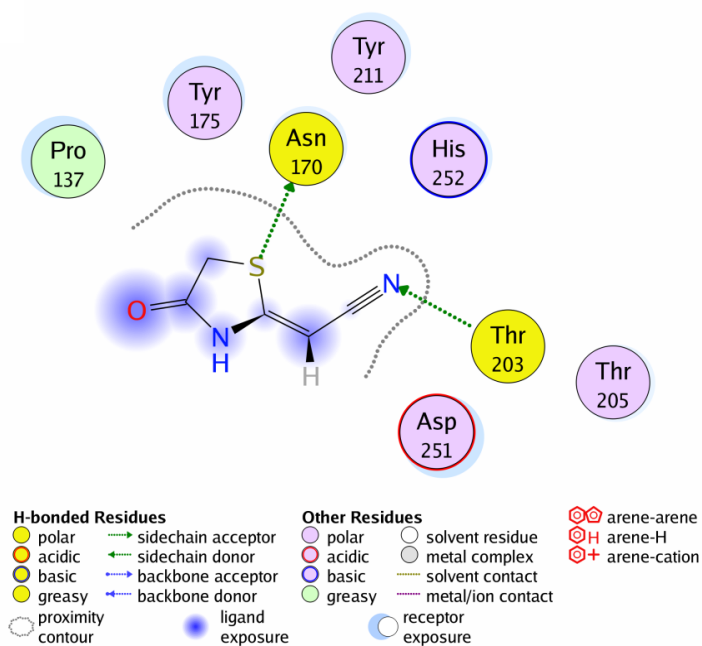
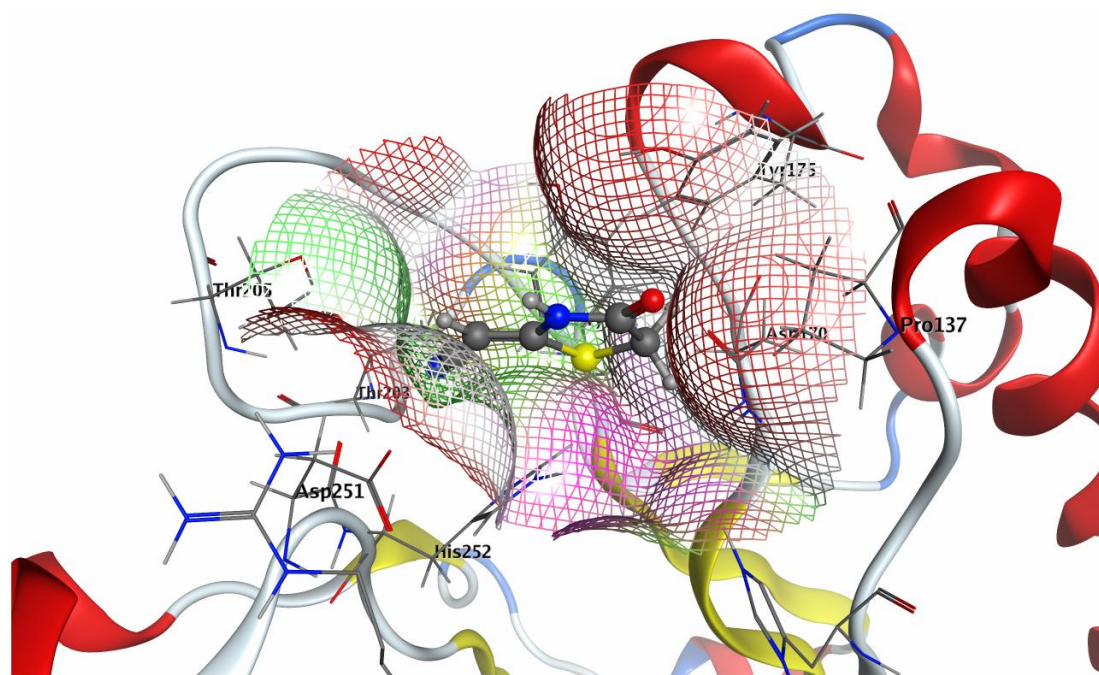
Slika 42. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **13** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



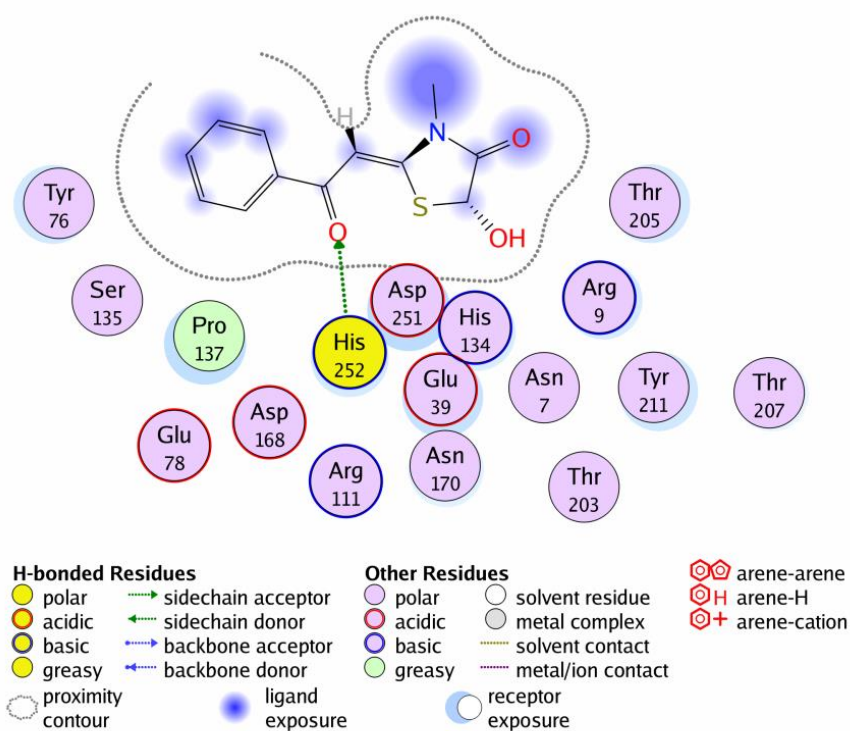
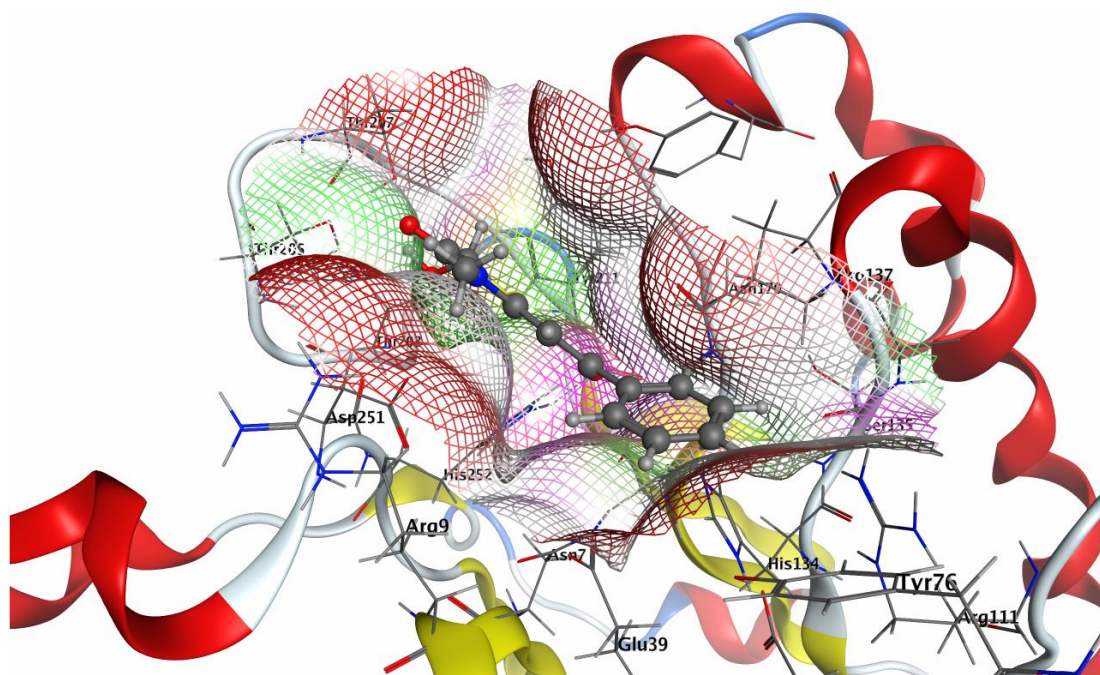
Slika 43. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **18** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



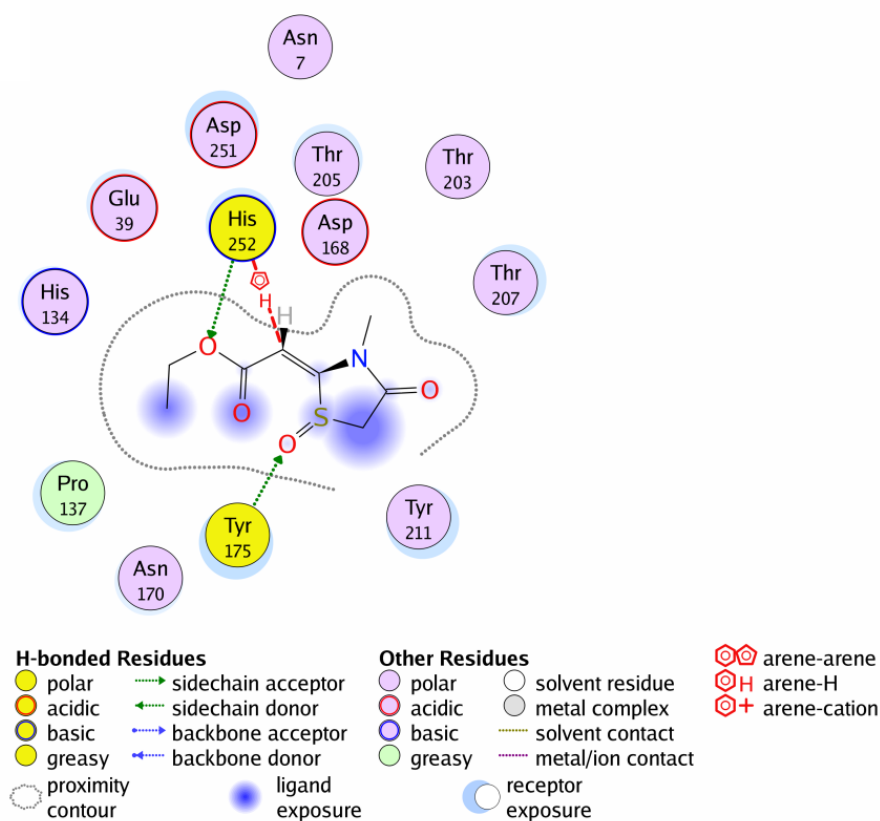
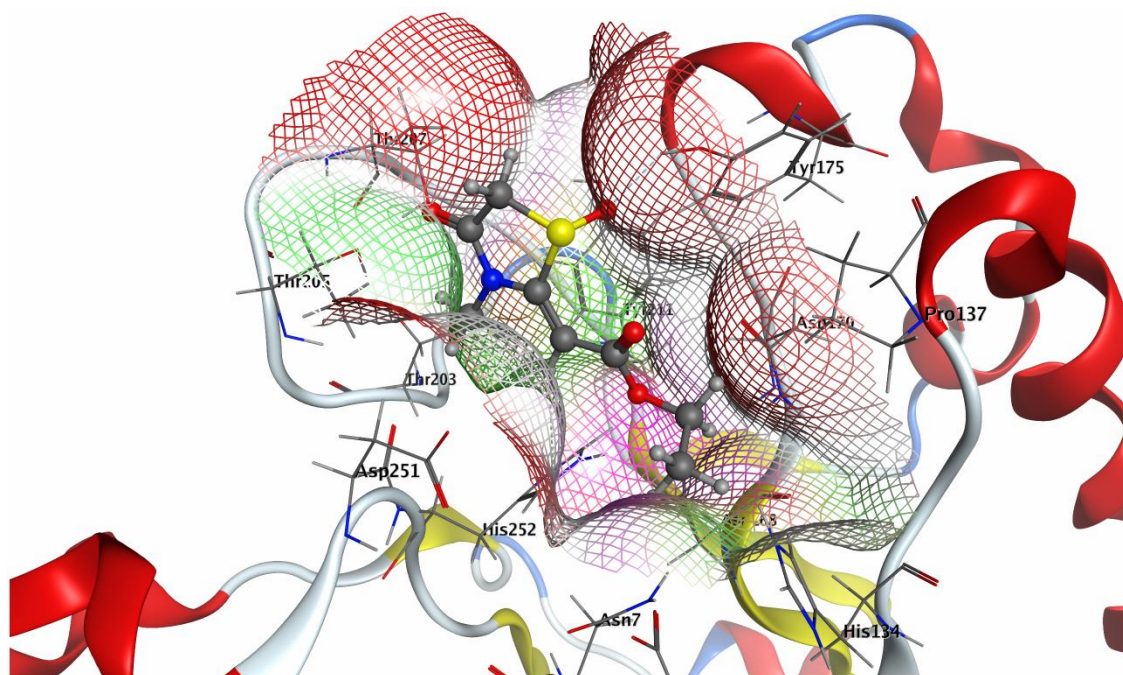
Slika 44. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **27** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



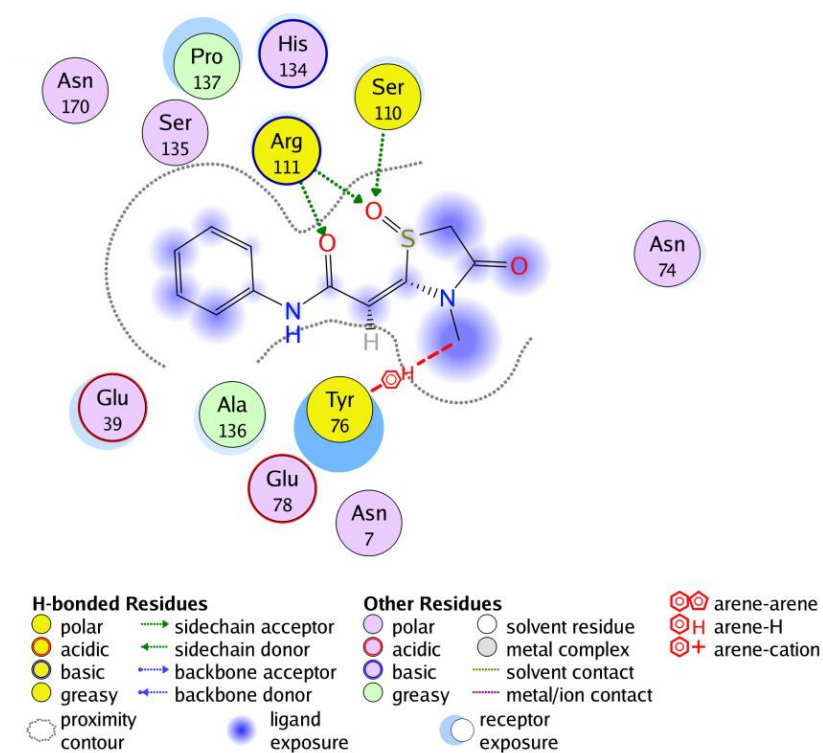
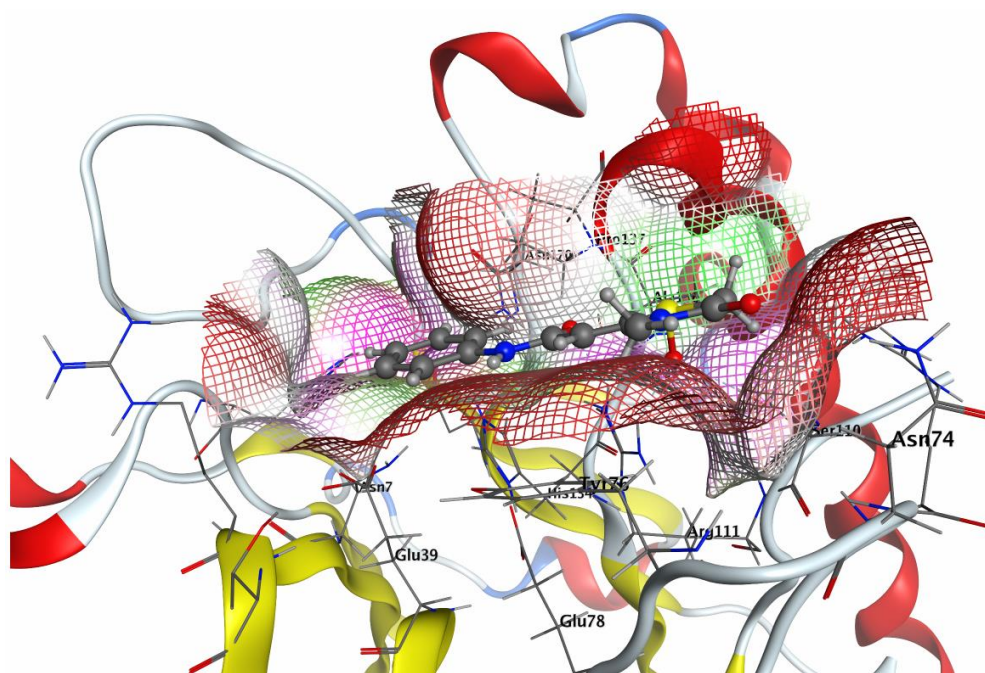
Slika 45. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **29** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



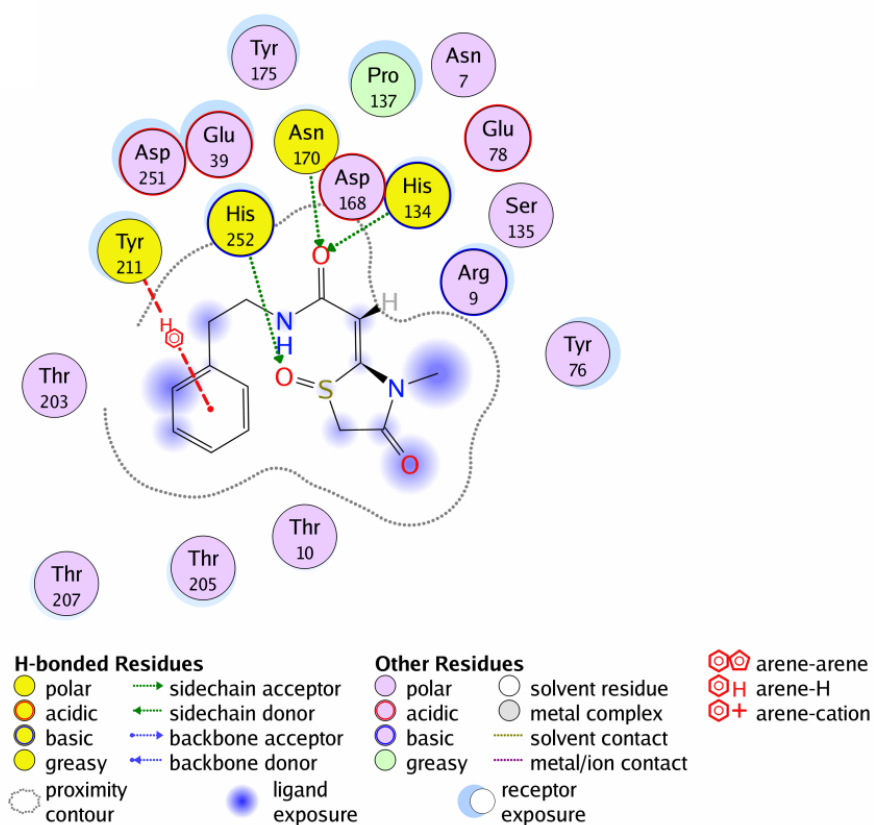
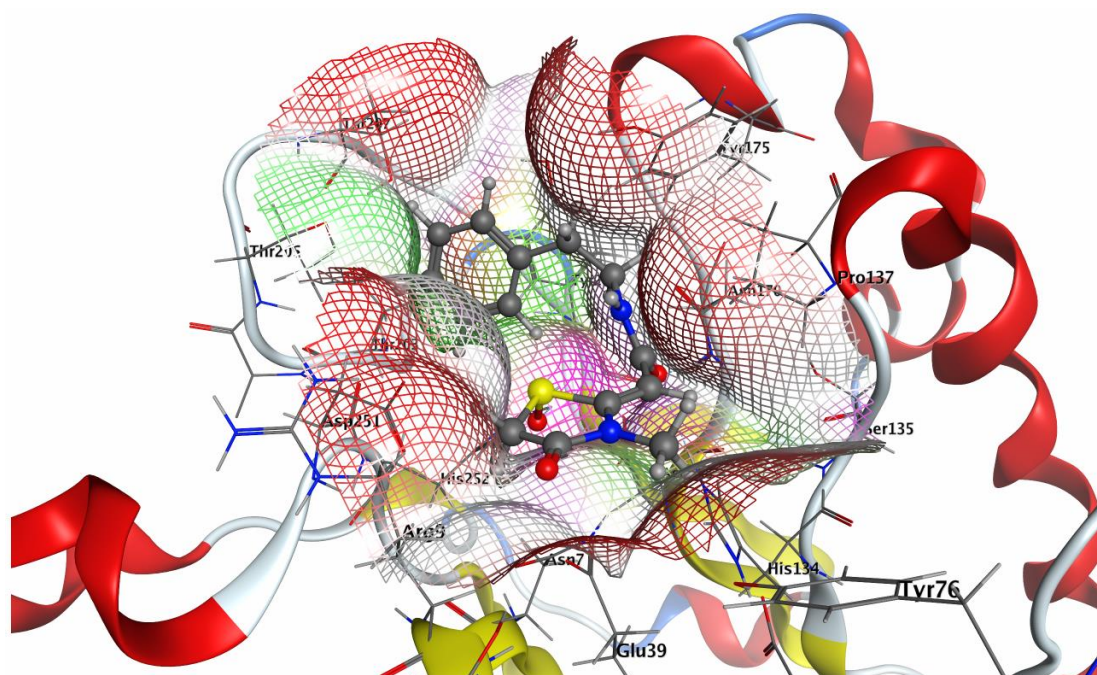
Slika 46. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **31** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



Slika 47. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **38** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].



Slika 48. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **40** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].

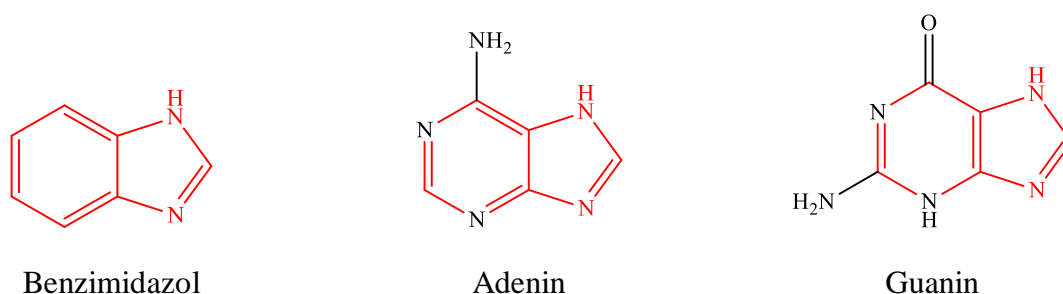


Slika 49. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **41** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2019].

5.2. Inhibicija DNaze I derivatima benzimidazola

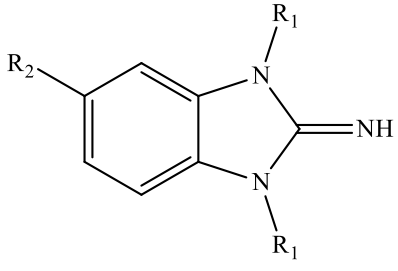
Inhibicija komercijalne DNaze I iz goveđeg pankreasa ispitivana je u *in vitro* uslovima grupom od 19 derivata benzimidazola. Heterociklus benzimidazola predstavlja strukturni izoster purinskih baza, komponenti nukleotida (slika 50). Među ispitivanim benzimidazolima, jedno jedinjenje iz grupe 1,3-disupstituisanih-benzimidazol-2-imina (**54**), jedno jedinjenje iz grupe 2-supstituisanih-1,3-tiazolo[3,2-*a*]benzimidazolona (**62**) i dva jedinjenja iz grupe 1,3-disupstituisanih-benzimidazol-2-tiona (**67** i **72**) inhibirala su DNazu I sa IC₅₀ vrednostima ispod 200 μM, od kojih čak tri jedinjenja (**62**, **67** i **72**) sa IC₅₀ vrednostima ispod 100 μM (tabele 11-13, slike 51-54). Jedinjenje **62** se pokazalo kao najefikasniji inhibitor DNaze I (IC₅₀ = 79,46 ± 11,75 μM). Sva četiri jedinjenja (**54**, **62**, **67** i **72**) ispoljila su jači inhibitorski efekat prema DNazi I u odnosu na kristal violet (IC₅₀ = 351,82 ± 29,41 μM) (slika 55) koji je korišćen kao pozitivna kontrola [Kolarević i sar., 2018].

Analizom odnosa strukture ispitivanih benzimidazola i njihove inhibitorne aktivnosti prema DNazi I, može se zaključiti da među jedinjenjima iz grupe 1,3-disupstituisanih-benzimidazol-2-imina (tabela 11) i jedinjenjima iz grupe 1,3-disupstituisanih-benzimidazol-2-tiona (tabela 13) prisustvo benzoil grupe u poziciji R₂ ima povoljan uticaj na njihovu inhibitornu aktivnost prema DNazi I. Sa druge strane, kako sva četiri jedinjenja iz grupe 2-supstituisanih-1,3-tiazolo[3,2-*a*]benzimidazolona (tabela 12) u poziciji R₂ sadrže benzoil grupu, može se videti da je mnogo veći uticaj supstituenta u poziciji R₁, kao i da je prisustvo 1,3-dioksolil grupe u poziciji R₁ (koje poseduje jedinjenje **62**) povoljnije u smislu inhibicije DNaze I od prisustva *o*-Me, *o*-F ili *p*-F grupe (strukturne karakteristike jedinjenja **59-61**).



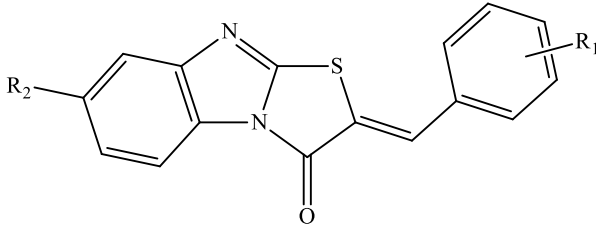
Slika 50. Strukturna sličnost heterociklusa benzimidazola i purinskih baza adenina i guanina.

Tabela 11. Inhibicija DNaze I 1,3-disupstiuisanim-benzimidazol-2-iminima **54-58** [Kolarević i sar., 2018].

	Jedinjenje	R ₁	R ₂	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ (μM) ± SD
	54	CH ₂ CO ₂ Et	COPh	151,19 ± 14,80
55	CH ₂ CO ₂ Et	Me	> 200	
56	(CH ₂) ₃ Ph	Me	> 200	
57	CH ₂ COPh	Me	> 200	
58	CH ₂ COPh	NO ₂	> 200	

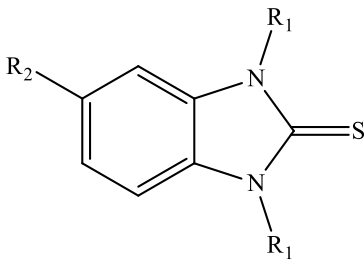
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 351,82 ± 29,41 μM

Tabela 12. Inhibicija DNaze I 2-supstiuisanim-1,3-tiazolo[3,2-*a*]benzimidazonima **59-62** [Kolarević i sar., 2018].

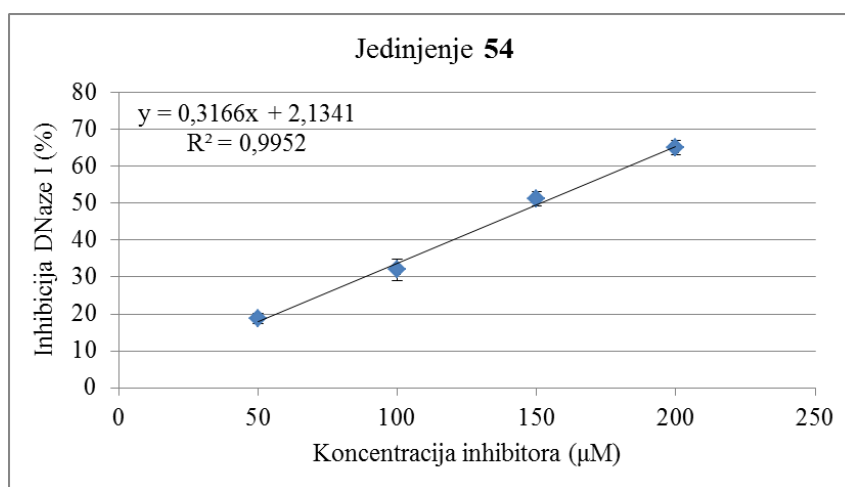
	Jedinjenje	R ₁	R ₂	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ (μM) ± SD
	59	<i>o</i> -Me	COPh	> 200
60	<i>o</i> -F	COPh	> 200	
61	<i>p</i> -F	COPh	> 200	
62	1,3-Dioksolil	COPh	79,46 ± 11,75	

Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 351,82 ± 29,41 μM

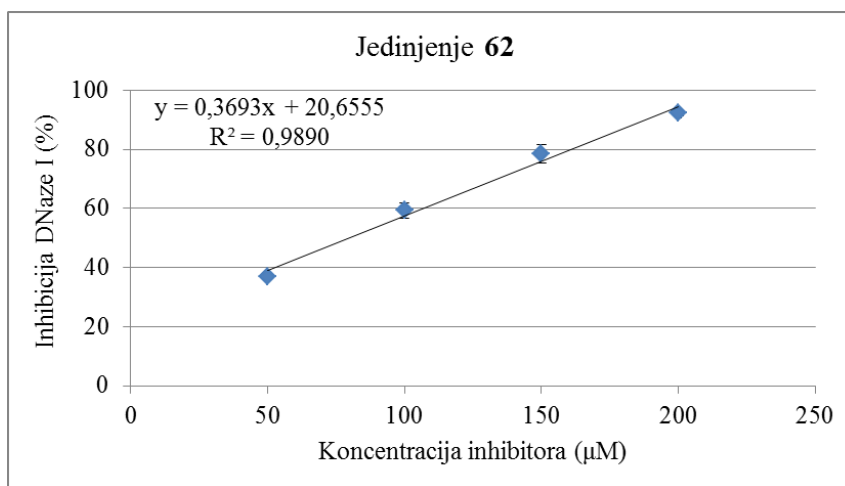
Tabela 13. Inhibicija DNaze I 1,3-disupstituisanim-benzimidazol-2-tionima **63-72** [Kolarević i sar., 2018].

	Jedinjenje	R ₁	R ₂	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ (μM) ± SD
	63	(CH ₂) ₂ CO ₂ Me	H	H
64	(CH ₂) ₂ CO ₂ Me	Me	H	> 200
65	(CH ₂) ₂ CO ₂ Me	NO ₂	H	> 200
66	(CH ₂) ₂ CO ₂ Me	Cl	H	> 200
67	(CH ₂) ₂ CO ₂ Me	COPh	COPh	89,85 ± 17,20
68	(CH ₂) ₂ CONHNH ₂	H	H	> 200
69	(CH ₂) ₂ CONHNH ₂	Me	H	> 200
70	(CH ₂) ₂ CONHNH ₂	NO ₂	H	> 200
71	(CH ₂) ₂ CONHNH ₂	Cl	H	> 200
72	(CH ₂) ₂ CONHNH ₂	COPh	COPh	96,38 ± 19,27

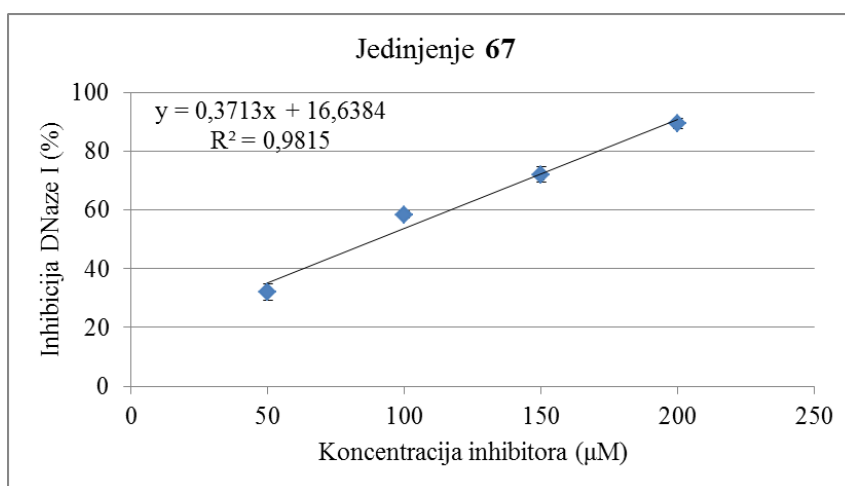
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 351,82 ± 29,41 μM



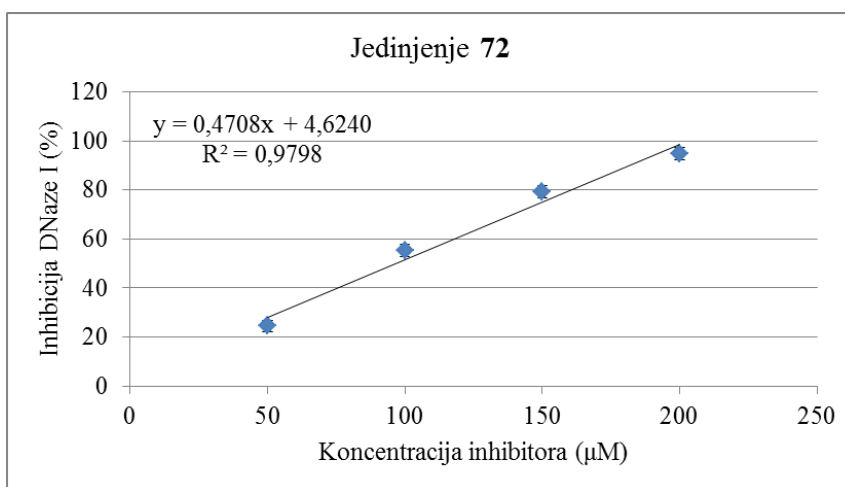
Slika 51. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **54**.



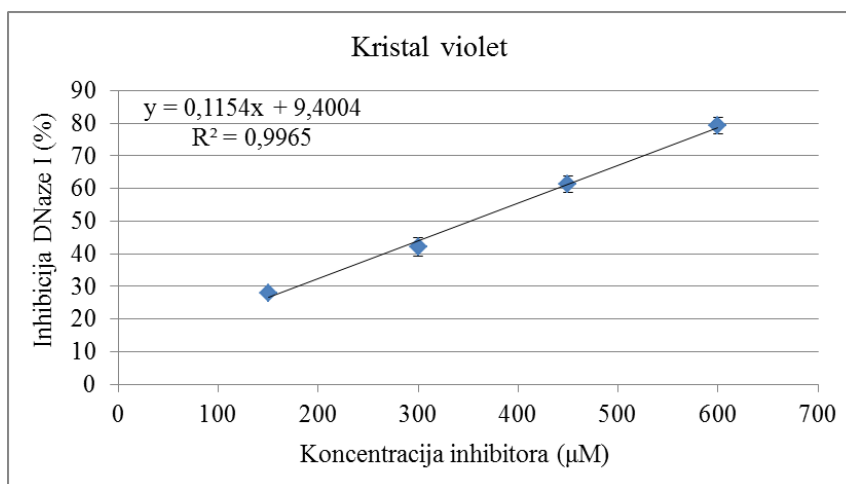
Slika 52. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **62**.



Slika 53. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **67**.



Slika 54. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **72**.



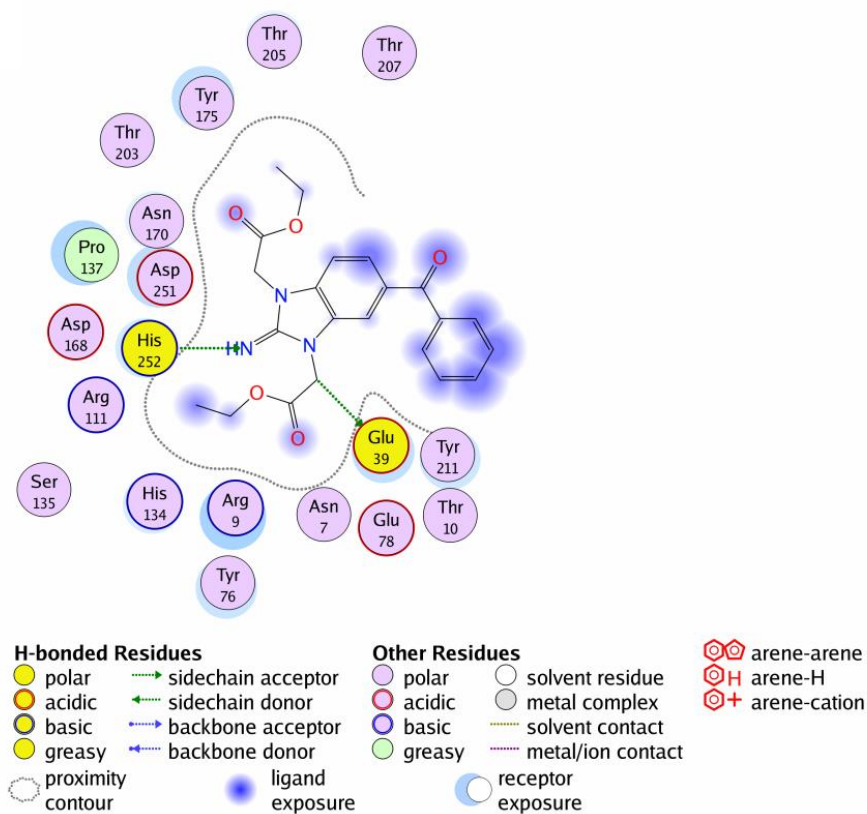
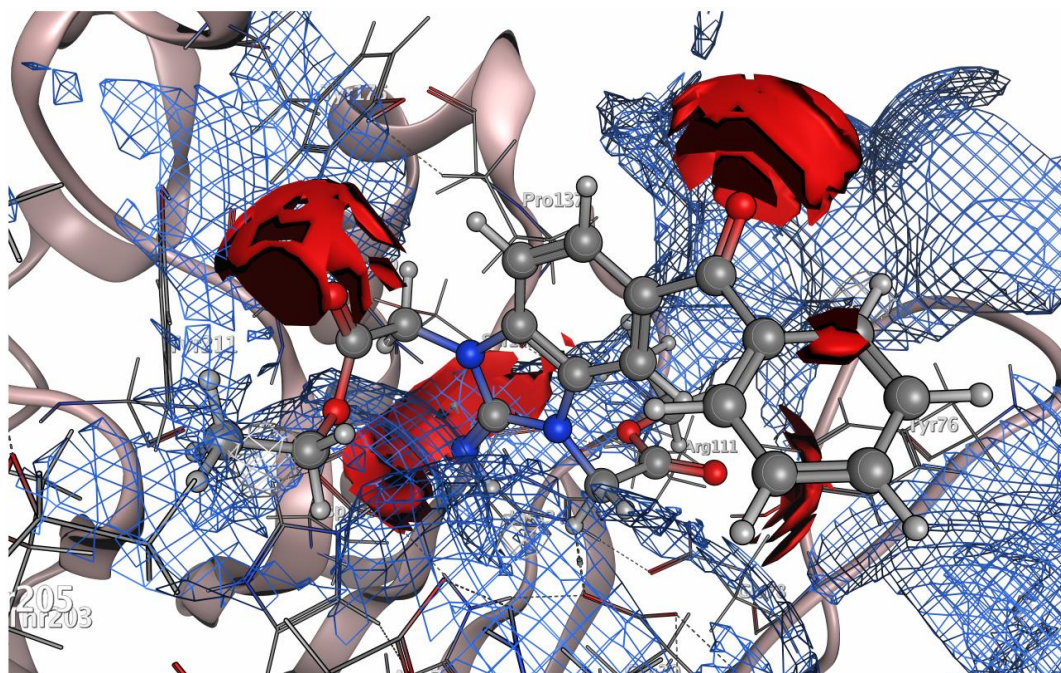
Slika 55. Inhibicija DNaze I kristal violetom.

Međumolekulske interakcije između ispitivanih derivata benzimidazola i DNaze I predviđene su korišćenjem MOE softvera (tabela 14, slike 56-59). Jedinjenja **62** i **67**, kao najefikasniji inhibitori DNaze I u datoj seriji, pokazuju moguće vodonične interakcije sa His 134 (tabela 14, slike 57 i 58), aminokiselinom ključnom za katalitičku aktivnost DNaze I. Jedinjenje **62** može ostvariti interakcije i sa aminokiselinama oko aktivnog mesta, Tyr 211 i Arg 111 (tabela 14, slika 57). Sa druge strane, za jedinjenje **54** su predviđene interakcije sa katalitičkim His 252, kao i sa jednako značajnim Glu 39 (tabela 14, slika 56), dok su za jedinjenje **72** takođe predviđene interakcije sa Glu 39, ali i manje značajne interakcije sa Tyr 76 i Arg 111 (tabela 14, slika 59) [Kolarević i sar., 2018].

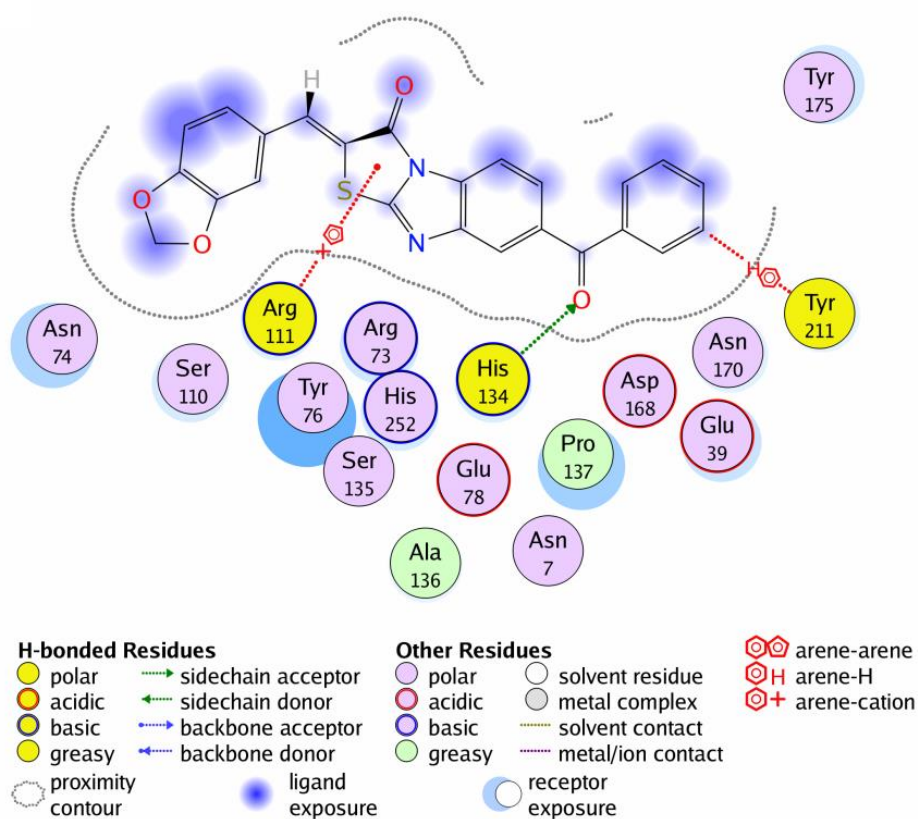
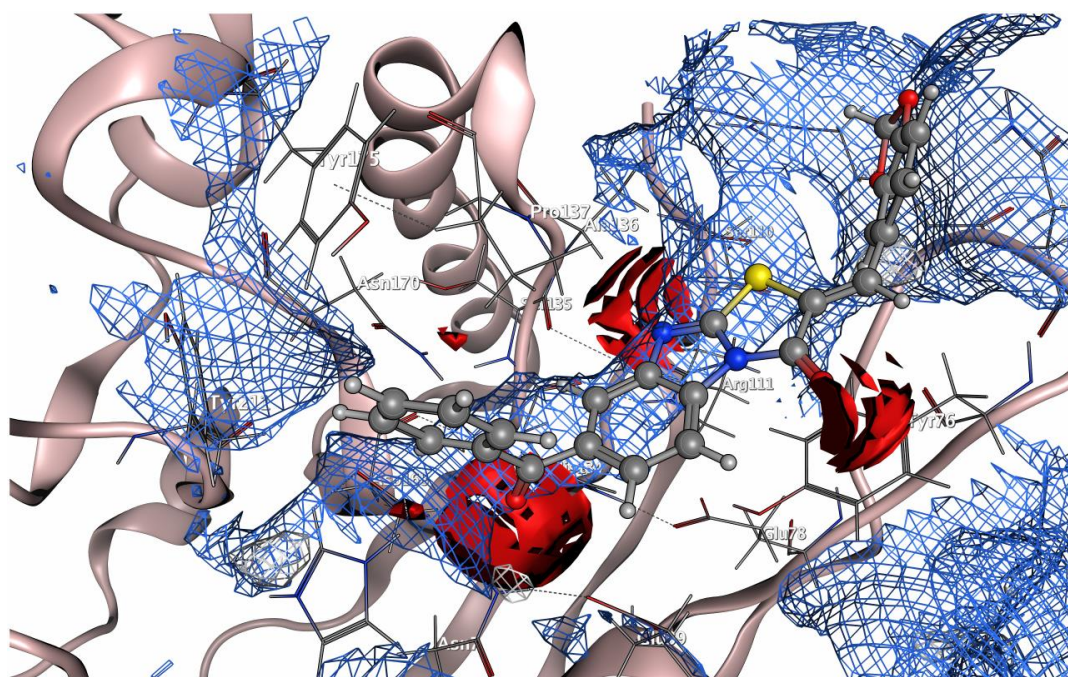
Tabela 14. Predviđene interakcije benzimidazola sa aminokiselinskim ostacima DNaze I [Kolarević i sar., 2018].

Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
54	C18	Glu 39	H-donor	3,40	-0,8	-5,49
	N20	His 252	H-akceptor	3,11	-1,2	
62	O8	His 134	H-akceptor	2,99	-0,9	-6,05
	C4	Tyr 211	H- π	4,74	-0,2	
	5-prsten	Arg 111	π -katjon	4,45	-0,4	
67	C17	Asp 251	H-donor	3,40	-0,2	-5,90
	O24	His 134	H-akceptor	3,27	-1,0	
72	N17	Tyr 76	H-donor	3,49	-0,4	-5,86
	N17	Ser 110	H-donor	3,13	0,0	
	N22	Glu 39	H-donor	3,27	-1,6	
	S10	Ser 110	H-akceptor	4,15	-1,3	
	S10	Arg 111	H-akceptor	4,01	-2,4	
	S10	Arg 111	H-akceptor	4,21	-3,2	
	S10	Ala 136	H-akceptor	4,29	-0,3	
S10	Pro 137	H-akceptor	4,74	-0,2		

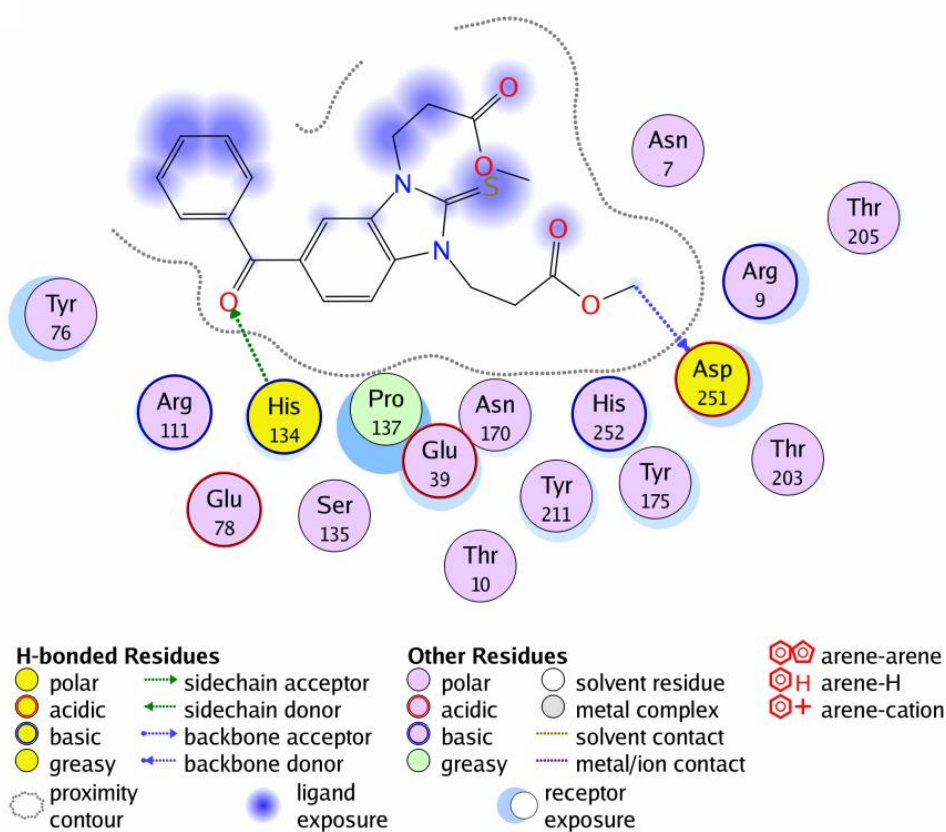
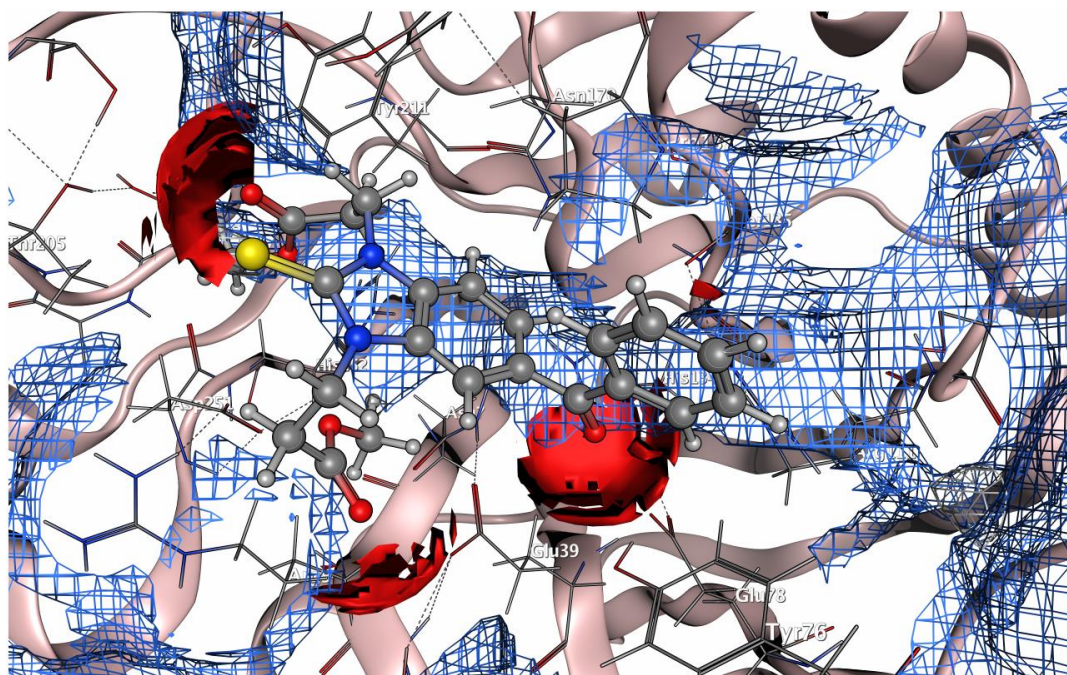
* ΔG – Gibsova slobodna energija



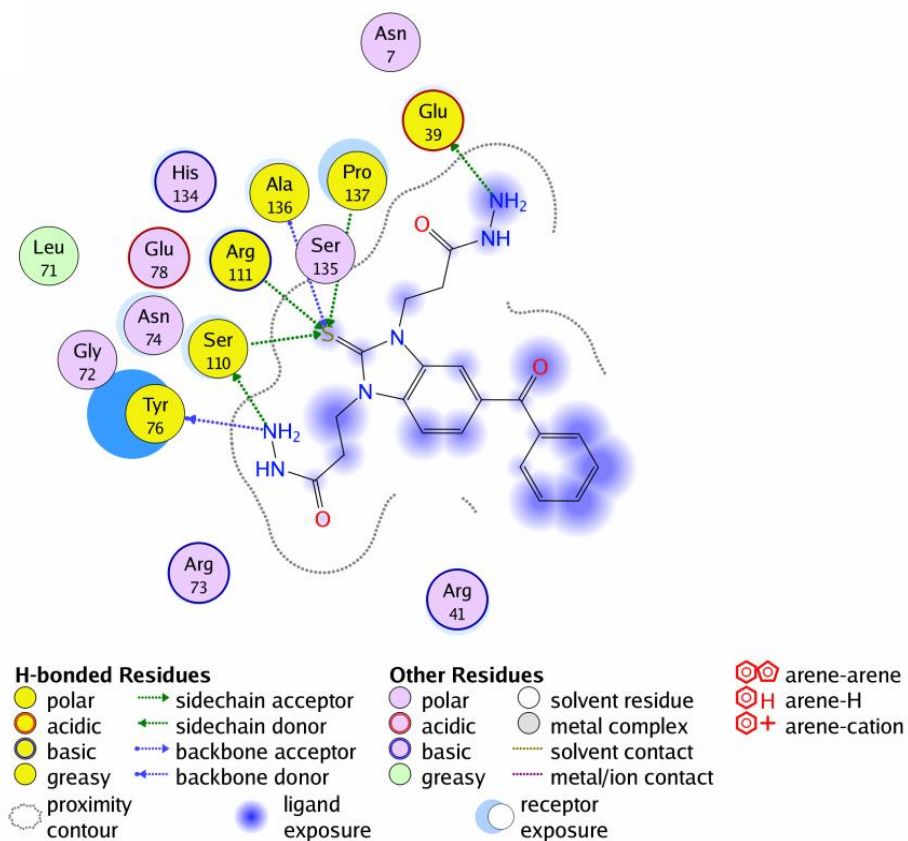
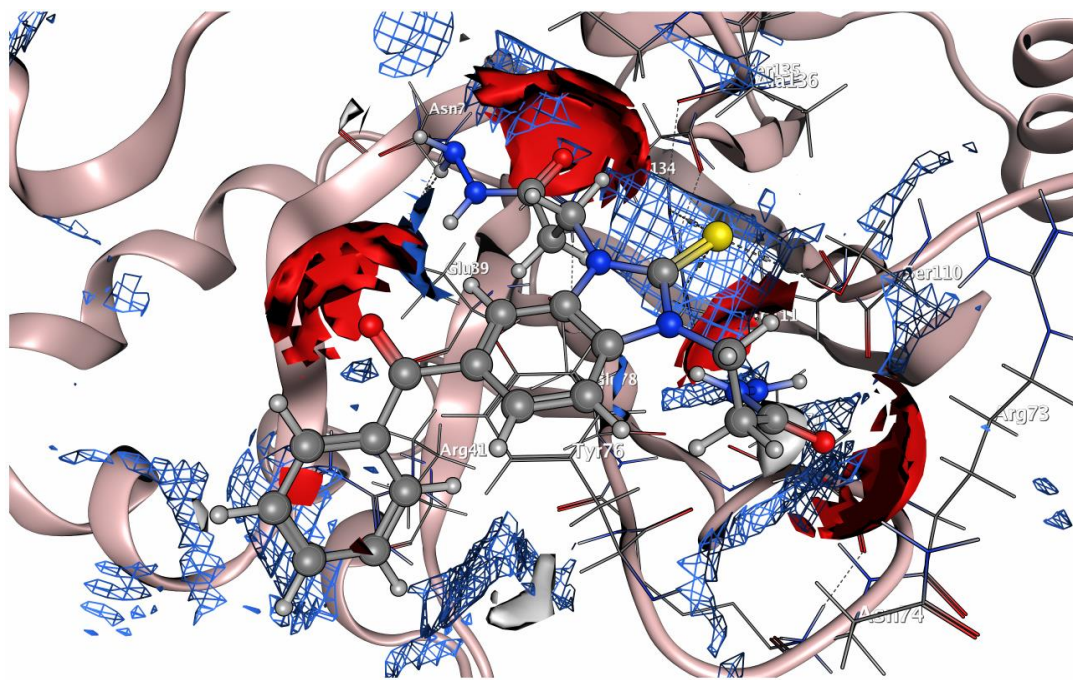
Slika 56. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **54** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2018].



Slika 57. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **62** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2018].



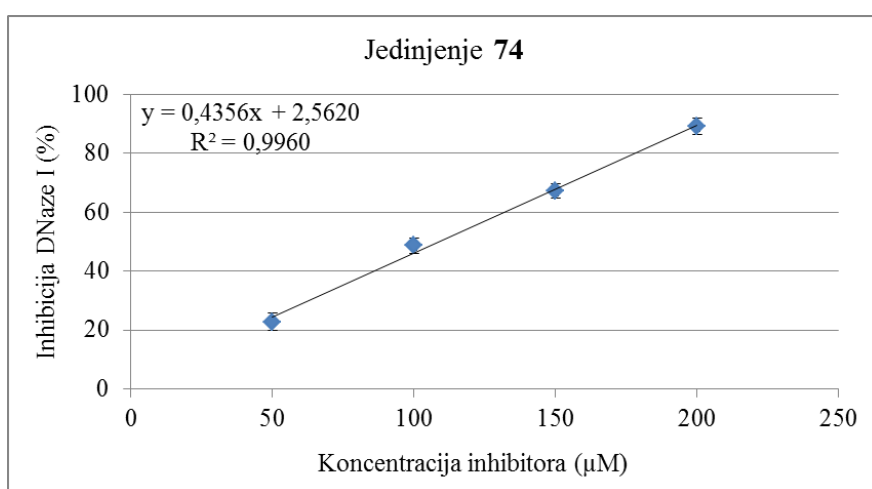
Slika 58. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **67** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2018].



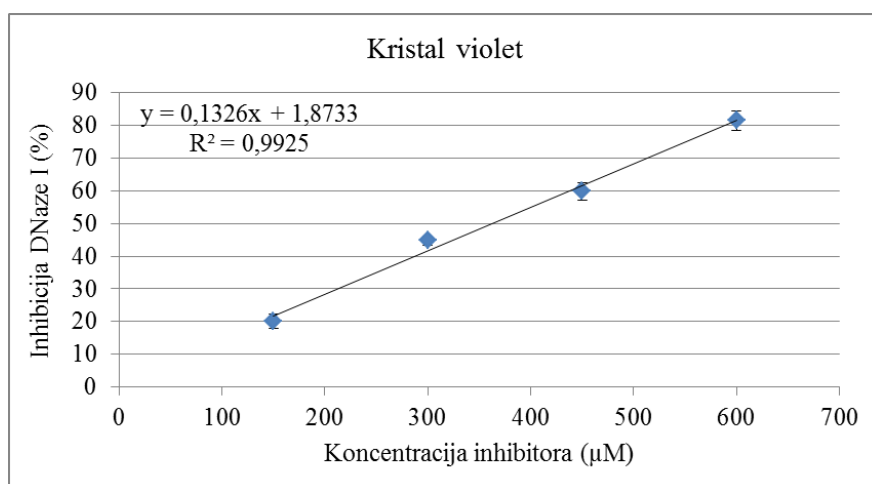
Slika 59. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **72** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Kolarević i sar., 2018].

5.3. Inhibicija DNaze I derivatima 4H-hromena

Inhibitorna aktivnost dva derivata 4H-hromena, kvercetina (**73**) i rutina (**74**), prema goveđoj pankreasnoj DNazi I ispitivana je u *in vitro* uslovima. Rutin (**74**), koji se sastoji od aglikona kvercetina (**73**) i disaharida rutinoze (slika 19), inhibirao je DNazu I sa IC_{50} vrednošću od $108,90 \pm 9,73 \mu\text{M}$ (slika 60) i ujedno se pokazao efikasnijim inhibitorom u odnosu na kristal violet ($IC_{50} = 362,95 \pm 44,37 \mu\text{M}$) (slika 61) koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Sam kvercetin (**73**), međutim, nije pokazao inhibitornu aktivnost prema DNazi I u ispitivanoj koncentraciji ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$).

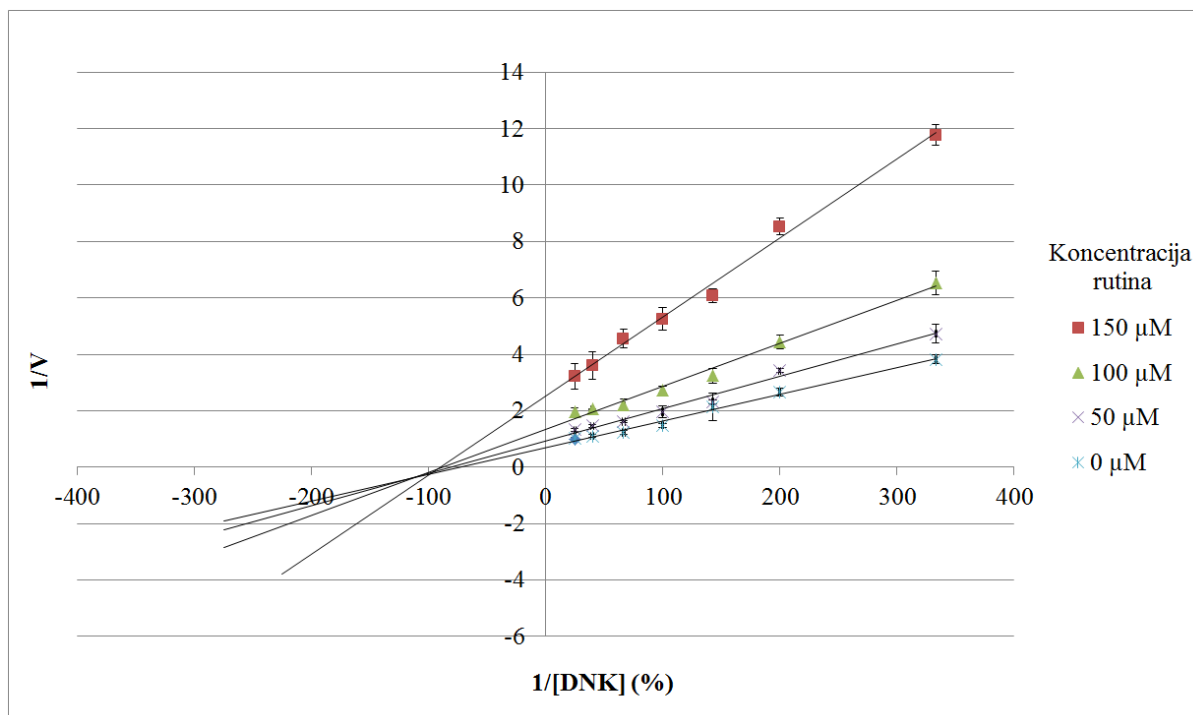


Slika 60. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **74**.



Slika 61. Inhibicija DNaze I kristal violetom.

Na osnovu Lajnriver-Berkovog dijagrama (slika 62) utvrđeno je da jedinjenje **74** deluje kao nekonkurentan inhibitor DNaze I.



Slika 62. Lajnriver-Berkov dijagram za jedinjenje **74**.

Kao inhibitor DNaze I, rutin može biti koristan u terapiji bolesti uzrokovanih oslobađanjem HMGB1 proteina, kao što su sepsa, septični šok, cerebralna i miokardna ishemija, i predstavlja dobru osnovu za razvoj novih farmaceutika za terapiju ovakvih patoloških stanja. Naime, Yamada i sar. (2011) su utvrdili da je oslobađanje HMGB1 proteina posledica apoptozom indukovane nukleozomalne fragmentacije DNK koja je katalizovana enzimom DNaza γ , članom DNaza I familije, dok su Yoo i sar. (2014) otkrili da rutin snažno inhibira oslobađanje HMGB1 proteina. Može se, dakle, zaključiti da je najverovatniji mehanizam delovanja rutina inhibicija DNaze I, čime se dalje sprečava fragmentacija DNK, oslobađanje HMGB1 proteina, nastanak inflamatornih reakcija i razvoj određenih bolesti.

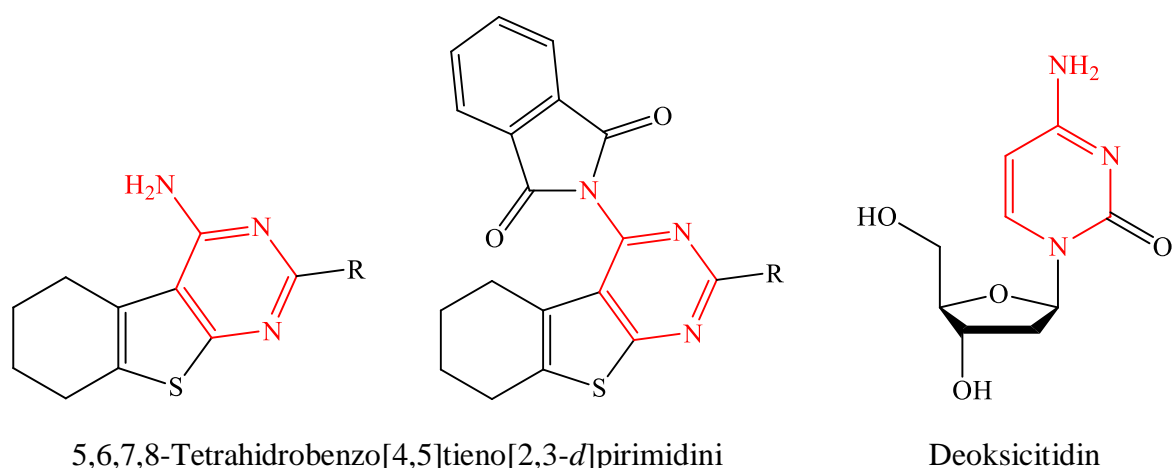
Rutin bi mogao biti koristan i u prevenciji muške neplodnosti, i to svojim dvostrukim mehanizmom zaštite DNK ćelija sperme: antioksidantnom aktivnošću i inhibicijom DNaze I. Kako se oksidativni stres smatra jednim od glavnih faktora koji doprinosi razvoju muške

neplodnosti, antioksidansi, među kojima je i rutin [Yang i sar., 2008; Moretti i sar., 2012], mogu imati značajnu ulogu u prevenciji i terapiji ovakvog stanja [Bisht i sar., 2017]. Budući da i apoptotska fragmentacija DNK u ćelijama sperme može doprineti razvoju muške neplodnosti, inhibicija DNaze I, jedne od glavnih endonukleaza uključenih u fragmentaciju DNK tokom apoptoze, predstavlja još jedan mogući mehanizam prevencije muške neplodnosti [Ilić i sar., 2018]. Pored askorbinske kiseline [Ilić i sar., 2018], rutin predstavlja još jedan prirodan antioksidans sposoban da inhibira DNazu I. Štaviše, rutin se pokazao efikasnijim od askorbinske kiseline i u inhibiciji DNaze I (IC_{50} (rutin) = $108,90 \pm 9,73 \mu M$, IC_{50} (askorbinska kiselina) = $330,74 \pm 29,92 \mu M$ [Ilić i sar., 2018]) i u inhibiciji lipidne peroksidacije (rutin = 68,8%, askorbinska kiselina = 26,2%) [Yang i sar., 2008].

Navedeni rezultati ukazuju na značaj redovne konzumacije rutina u svakodnevnoj ljudskoj ishrani.

5.4. Inhibicija DNaze I derivatima 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina

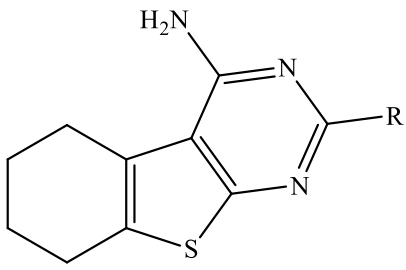
Uzimajući u obzir bioizosterijski odnos između tieno[2,3-*d*]pirimidina i pirimidinskih nukleozida, kao i njihovu strukturnu sličnost (slika 63), ispitivana je inhibicija goveđe pankreasne DNaze I grupom od 17 derivata tieno[2,3-*d*]pirimidina (**75-91**) u *in vitro* uslovima (tabele 15 i 16).



Slika 63. Strukturna sličnost ispitivanih 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina i pirimidinskog nukleozida deoksicitidina [Mavrova i sar., 2018].

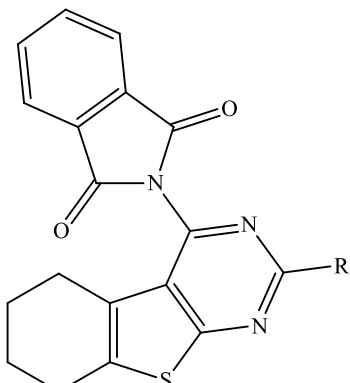
Osam jedinjenja, od kojih pet amino (**75**, **79**, **82**, **83** i **85**) i tri ftalimidna (**87-89**) derivata, inhibiralo je govedu pankreasnu DNazu I sa IC_{50} vrednostima ispod $200 \mu\text{M}$ (tabele 15 i 16, slike 64-71). Ftalimidni derivat **89** i njegov amski prekursor **83** pokazali su najjaču inhibitornu aktivnost prema DNazi I, sa IC_{50} vrednostima od $106,15 \pm 16,46 \mu\text{M}$, odnosno $127,69 \pm 17,00 \mu\text{M}$. Ovaj afinitet se, sa strukturne tačke gledišta, može objasniti prisustvom *p*-NO₂ grupe u bočnom lancu koja može doprineti boljem vezivanju za aktivni centar enzima. Može se zapaziti da su se neki od ftalimidnih derivata (**87-89**) pokazali efikasnijim u inhibiciji DNaze I nego njihovi amski prekursori (**79**, **82** i **83**). Sa druge strane, ispitivani ftalimidi **86** i **91** ispoljili su slabiju inhibiciju DNaze I u odnosu na odgovarajuće tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amine **75** i **85**, dok u inhibiciji DNaze I 3-hlorobenzil derivatima **84** i **90** nema razlike. Kristal violet, korišćen kao pozitivna kontrola, pokazao se manje efikasnim inhibitorom DNaze I ($IC_{50} = 383,16 \pm 48,97 \mu\text{M}$) (slika 72) u poređenju sa ispitivanim tieno[2,3-*d*]pirimidinima [Mavrova i sar., 2018].

Tabela 15. Inhibicija DNaze I 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-aminima [Mavrova i sar., 2018].

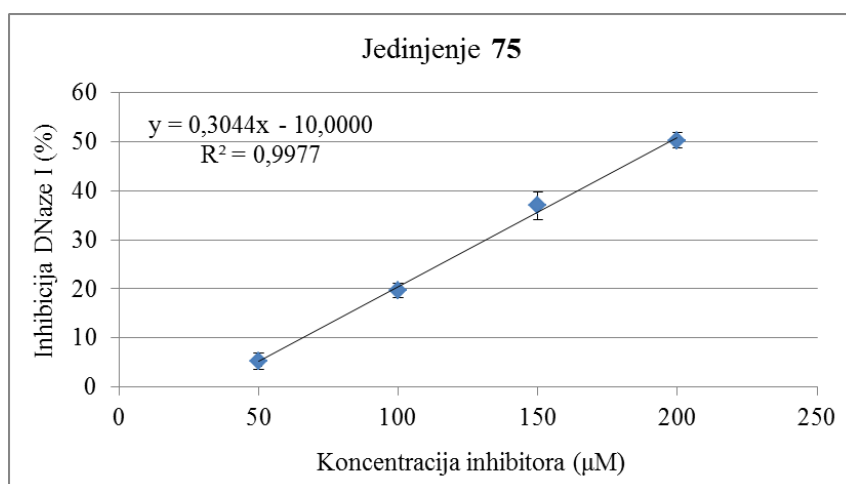
	Jedinjenje	R	Inhibicija DNaze I $IC_{50} (\mu\text{M}) \pm \text{SD}$
	75	Bn	$197,11 \pm 13,36$
	76	CH ₂ CO ₂ Et	> 200
	77	CH ₂ -Morfolin	> 200
	78	3,4,5-(OMe) ₃ Ph	> 200
	79	2-Piridil	$155,83 \pm 28,53$
	80	(CH ₂) ₂ Cl	> 200
	81	Me	> 200
	82	Et	$194,64 \pm 14,03$
	83	<i>p</i> -NO ₂ Bn	$127,69 \pm 17,00$
	84	<i>m</i> -ClBn	> 200
	85	<i>m</i> -CF ₃ Ph	$148,29 \pm 26,83$

Pozitivna kontrola kristal violet, $IC_{50} = 383,16 \pm 48,97 \mu\text{M}$

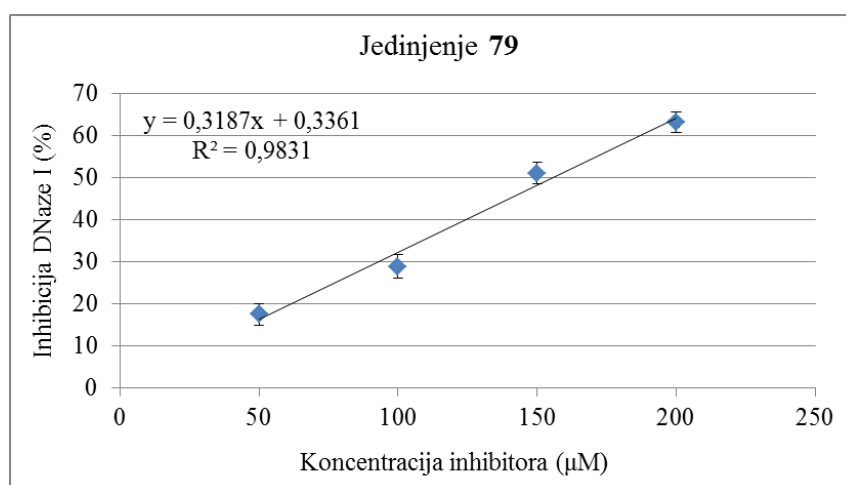
Tabela 16. Inhibicija DNaze I 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ftalimidima [Mavrova i sar., 2018].

	Jedinjenje	R	Inhibicija DNaze I IC ₅₀ (μM) ± SD
	86		Bn
87		2-Piridil	134,06 ± 14,66
88		Et	148,42 ± 19,31
89		<i>p</i> -NO ₂ Bn	106,15 ± 16,46
90		<i>m</i> -ClBn	> 200
91		<i>m</i> -CF ₃ Ph	> 200

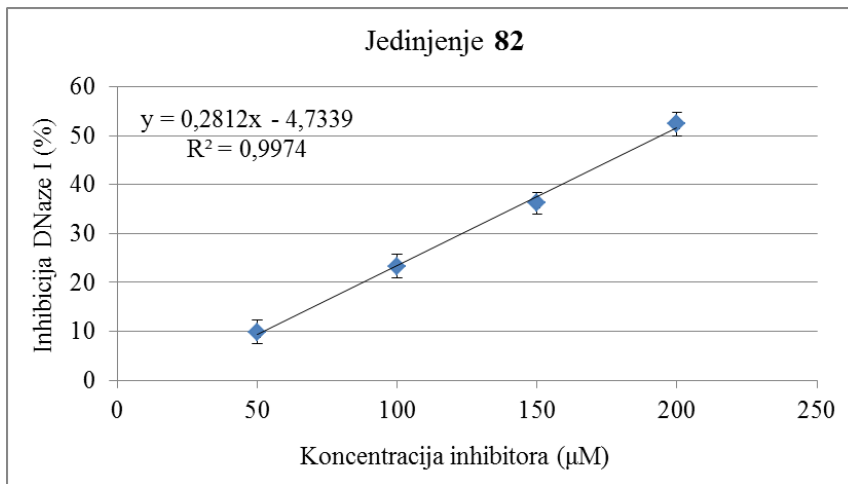
Pozitivna kontrola kristal violet, IC₅₀ = 383,16 ± 48,97 μM



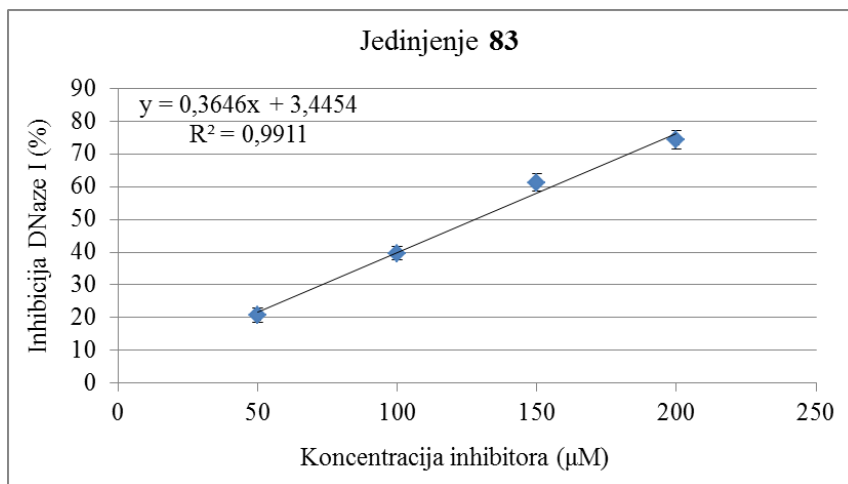
Slika 64. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **75**.



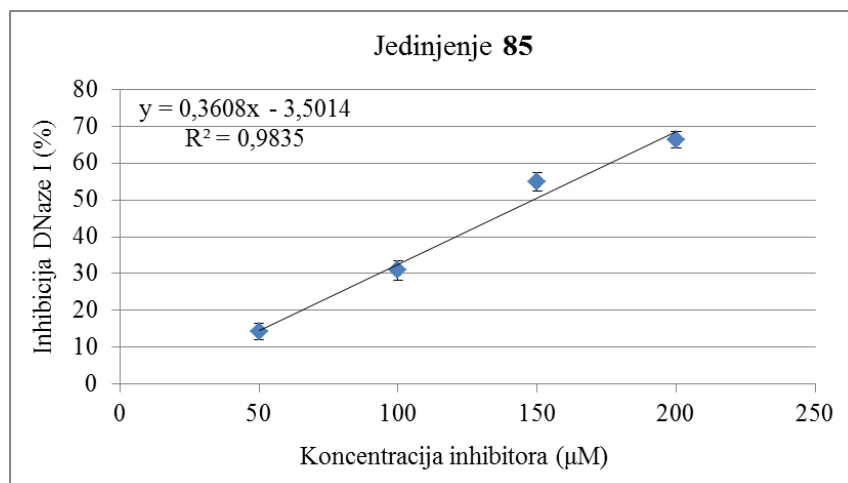
Slika 65. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **79**.



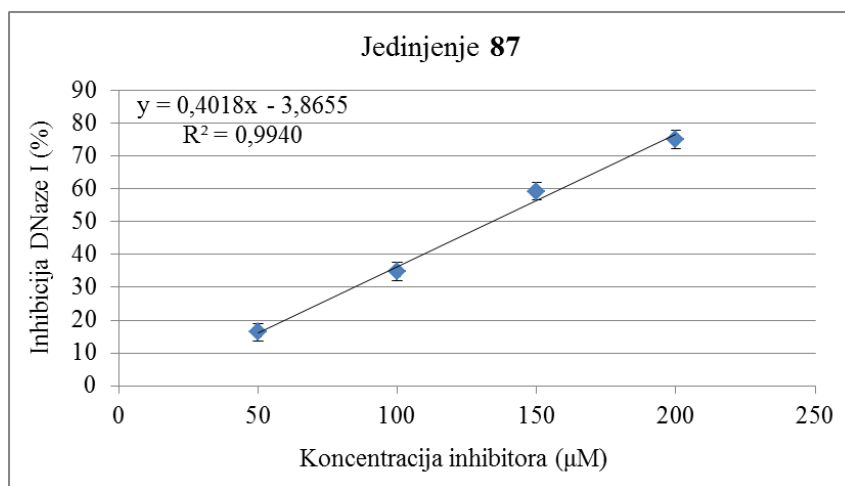
Slika 66. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **82**.



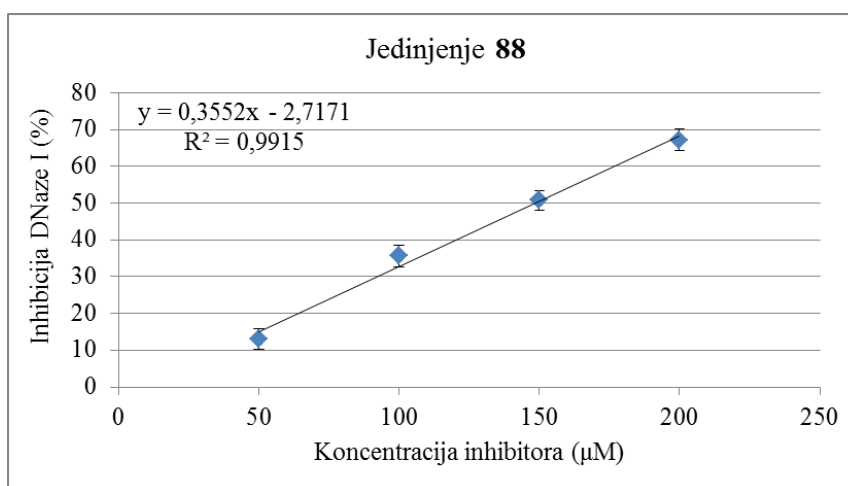
Slika 67. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **83**.



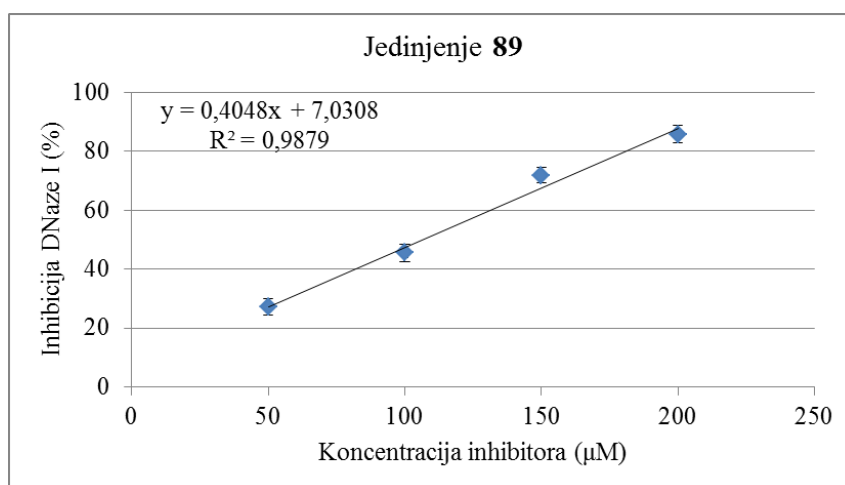
Slika 68. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **85**.



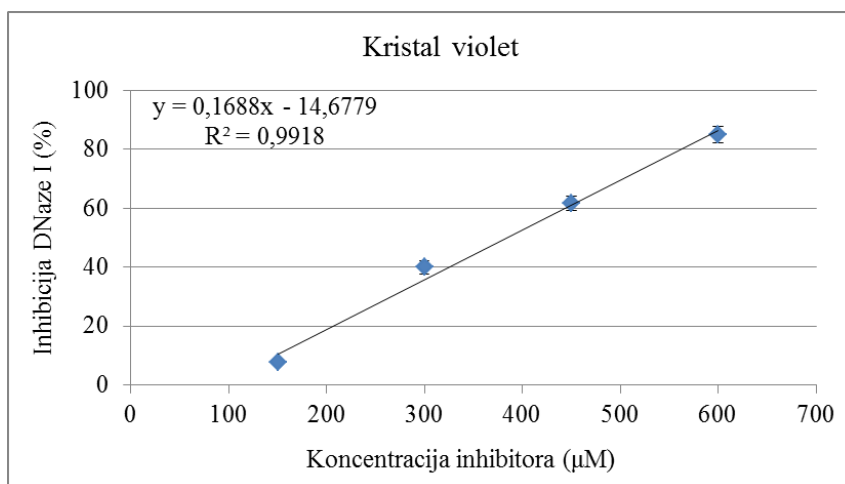
Slika 69. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **87**.



Slika 70. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **88**.

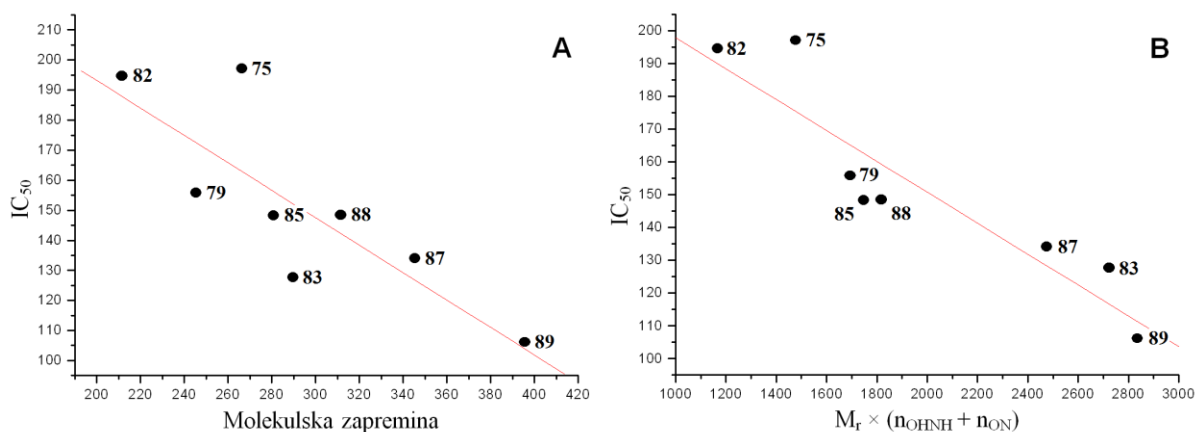


Slika 71. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **89**.



Slika 72. Inhibicija DNaze I jedinjenjem kristal violetom.

Analizom odnosa struktura i aktivnosti ispitivanih derivata 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina, utvrđeno je da porast molekulske zapremine dovodi do efikasnije inhibicije DNaze I (slika 73A). Isti efekat primećen je i pri povećanju sume donora (n_{OHNH}) i akceptora (n_{ON}) vodoničnih veza pomnožene molekulskom težinom (M_r) (slika 73B) [Mavrova i sar., 2018].



Slika 73. Odnos struktura-aktivnost 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina koji inhibiraju DNazu I sa IC_{50} ispod 200 μM [Mavrova i sar., 2018].

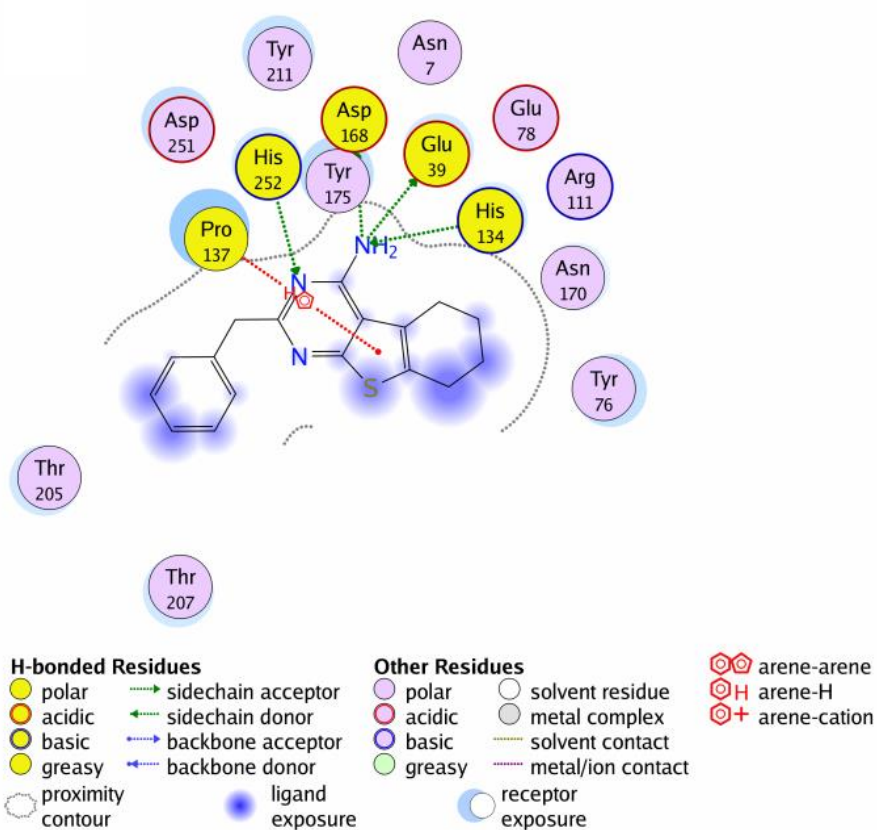
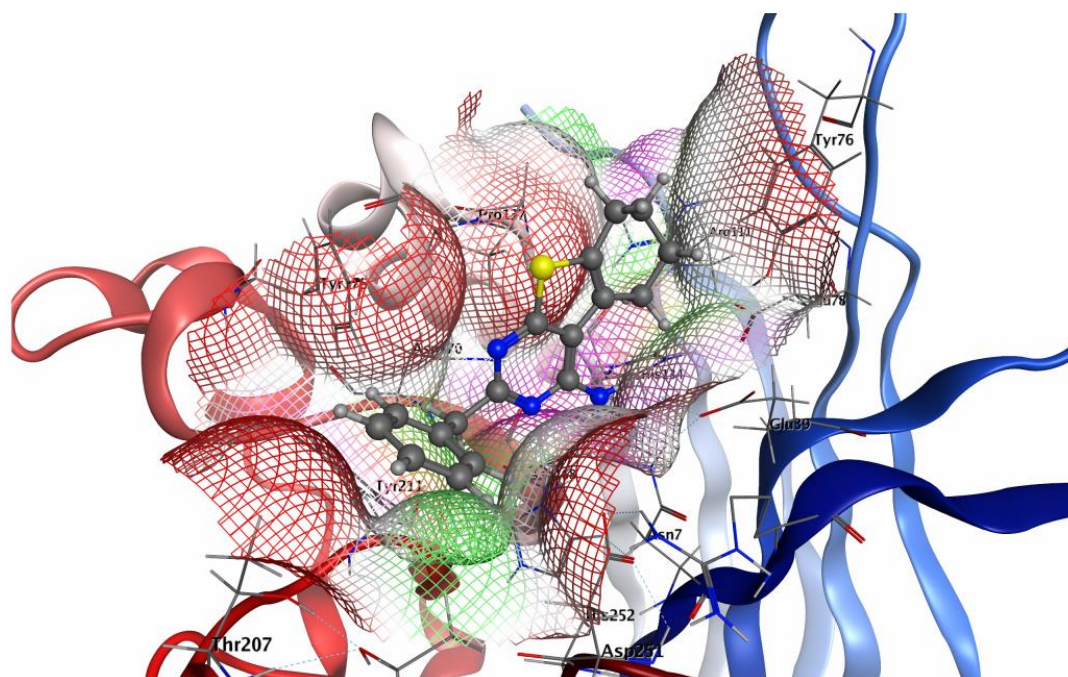
Međumolekulske interakcije između ispitivanih derivata 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina i DNaze I predviđene su korišćenjem MOE softvera (tabela 17, slike 74-81). Jedinjenje **83**, koje je, među ispitivanim tieno[2,3-

d]pirimidin-4-aminima, ispoljilo najefikasniju inhibiciju DNaze I, pokazalo je vodonične interakcije sa dva katalitička histidina, His 134 i His 252 (tabela 17, slika 77). Slične interakcije sa His 134 i/ili His 252 uočene su i za jedinjenja **75**, **82** i **85**. Pored toga, ova jedinjenja pokazuju i moguće vodonične interakcije sa Glu 39 (jedinjenja **75** i **85**) i Asp 168 (jedinjenja **75** i **82**), koje su takođe značajne za katalitičku aktivnost DNaze I (tabela 17, slike 74, 76 i 78). Sa druge strane, slične interakcije nisu zapažene za 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidine **79**, **87-89**. Naime, pokazalo se da oni ispoljavaju interakcije samo sa aminokiselinama koje se nalaze u neposrednoj blizini aktivnog mesta, Arg 111 (jedinjenja **79**, **87** i **88**), Tyr 76 i Tyr 175 (jedinjenje **89**) (tabela 17, slike 75, 79-81) [Mavrova i sar., 2018].

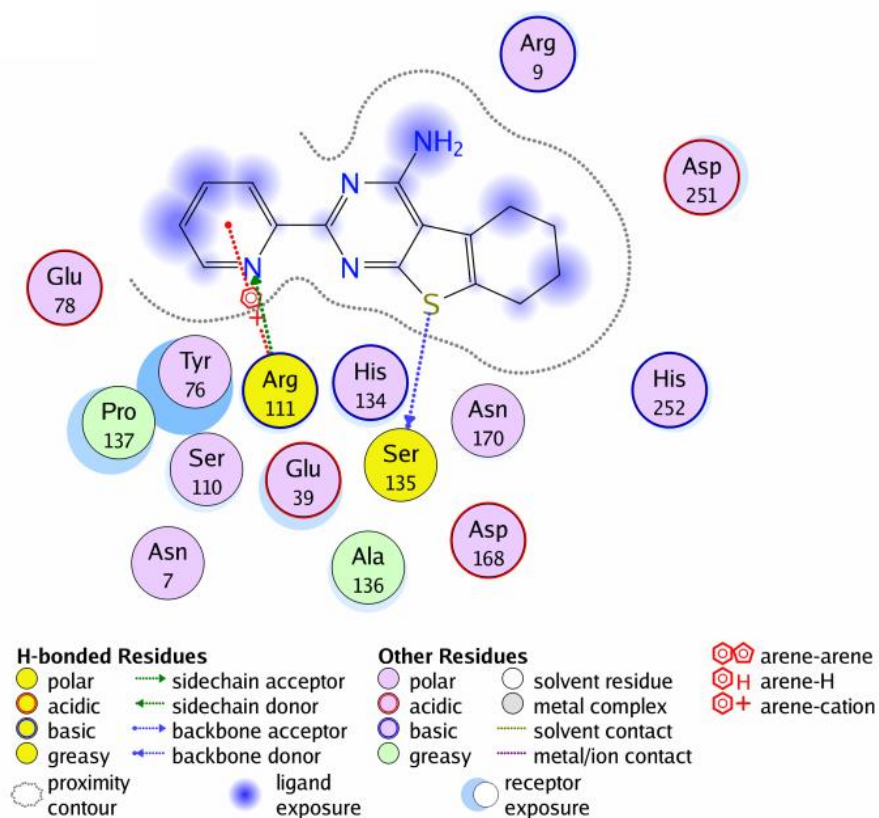
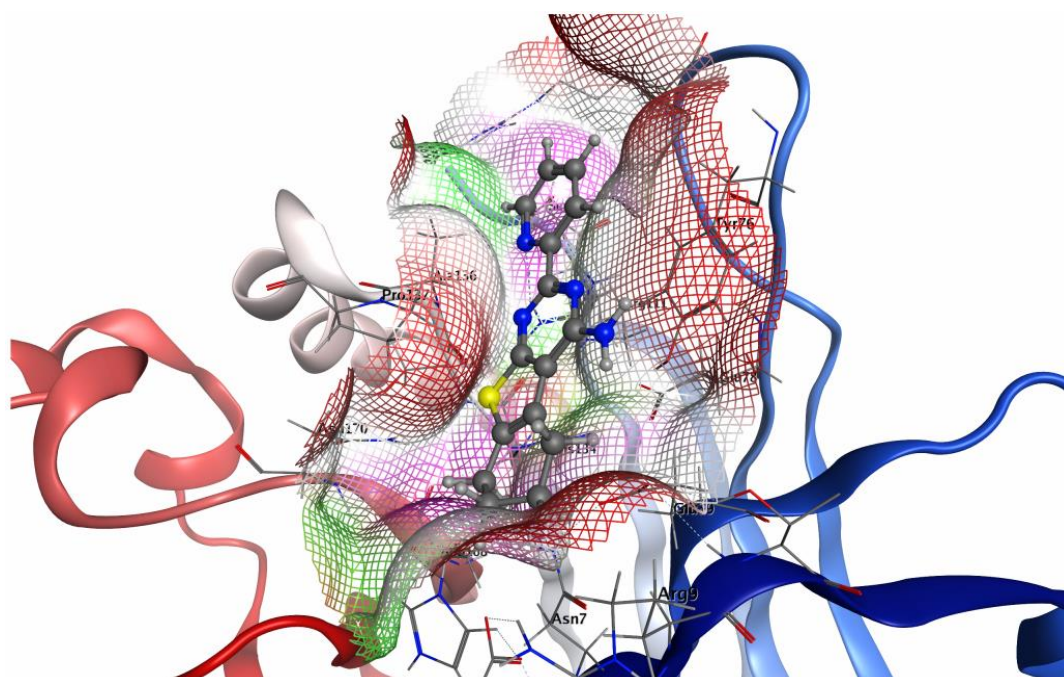
Tabela 17. Predviđene interakcije 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina sa aminokiselinskim ostacima DNaze I [Mavrova i sar., 2018].

Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
75	N14	Glu 39	H-donor	3,17	-0,7	-4,90
	N14	Asp 168	H-donor	3,45	-0,9	
	N12	His 252	H-akceptor	3,23	-5,8	
	N14	His 134	H-akceptor	3,20	2,8	
	5-prsten	Pro 137	π -H	3,89	-0,7	
79	S7	Ser 135	H-donor	4,53	-0,3	-5,17
	N16	Arg 111	H-akceptor	3,48	-0,7	
	6-prsten	Arg 111	π -katjon	3,99	-0,6	
82	S7	Asp 168	H-donor	4,59	-0,1	-4,54
	S7	Asp 168	H-donor	3,94	0,0	
	S7	Asn 170	H-donor	3,41	0,0	
	N10	His 134	H-akceptor	3,22	-0,6	
	5-prsten	His 252	π -katjon	4,38	-0,3	
83	S7	Asp 251	H-donor	3,65	-3,3	-5,25
	C15	Asn 170	H-donor	3,45	-0,3	
	C21	His 252	H- π	4,44	-0,7	
	6-prsten	His 134	π -katjon	4,65	-1,0	
	6-prsten	His 252	π -katjon	4,71	-0,7	
85	N14	Glu 39	H-donor	3,02	-0,7	-5,15
	N12	His 252	H-akceptor	3,32	-2,2	
	F23	Tyr 211	H-akceptor	3,02	-0,5	
	C16	His 252	H- π	4,38	-0,4	
	5-prsten	Pro 137	π -H	4,02	-1,0	
	6-prsten	Tyr 211	π -H	3,97	-0,4	
87	S7	Ser 135	H-donor	4,69	-0,2	-5,54
	N26	Arg 111	H-akceptor	3,52	-0,8	
	6-prsten	Arg 111	π -katjon	4,07	-0,6	
88	S7	Asp 251	H-donor	3,98	-1,6	-5,10
	O24	Arg 111	H-akceptor	3,05	-0,3	
89	O34	Tyr 175	H-akceptor	3,11	-1,3	-5,87
	C2	Tyr 76	H- π	4,25	-0,2	

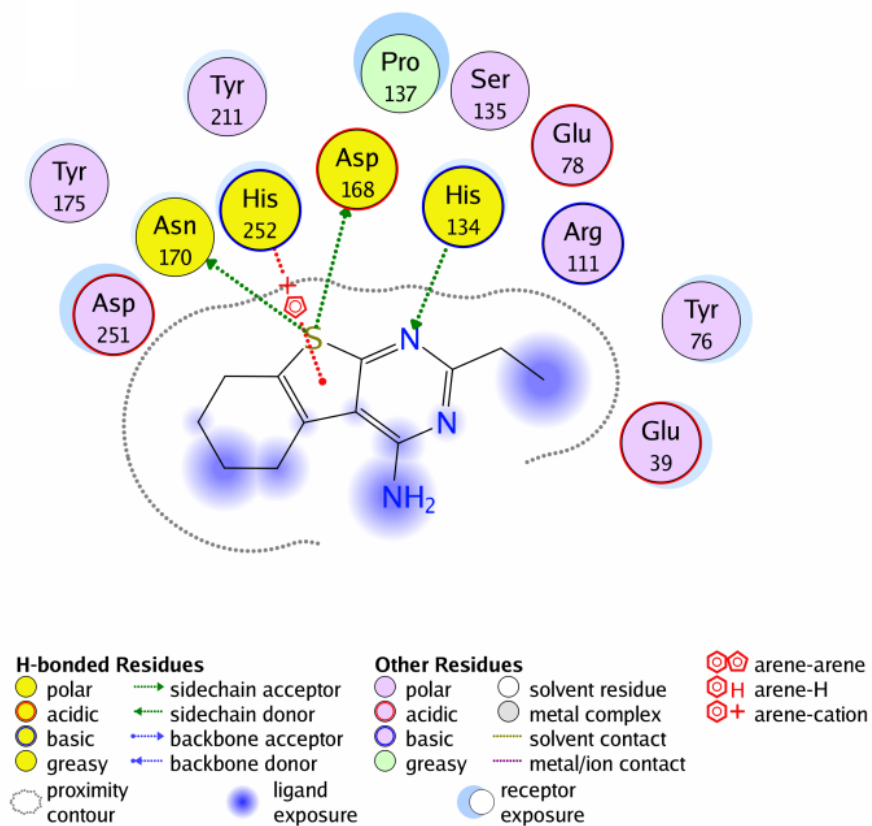
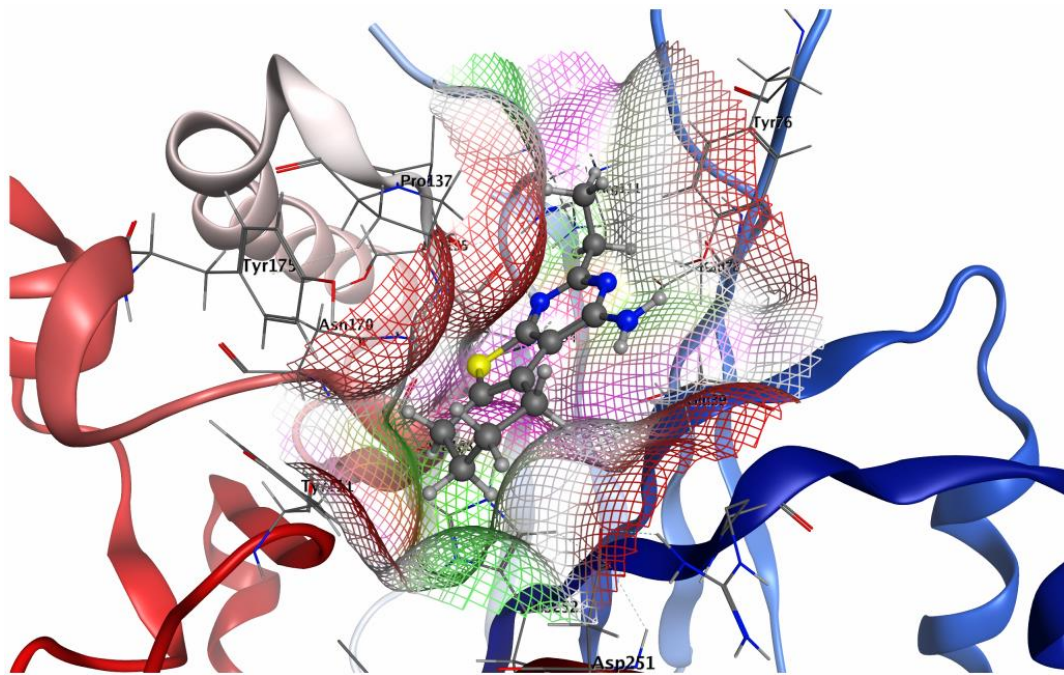
* ΔG – Gibsova slobodna energija



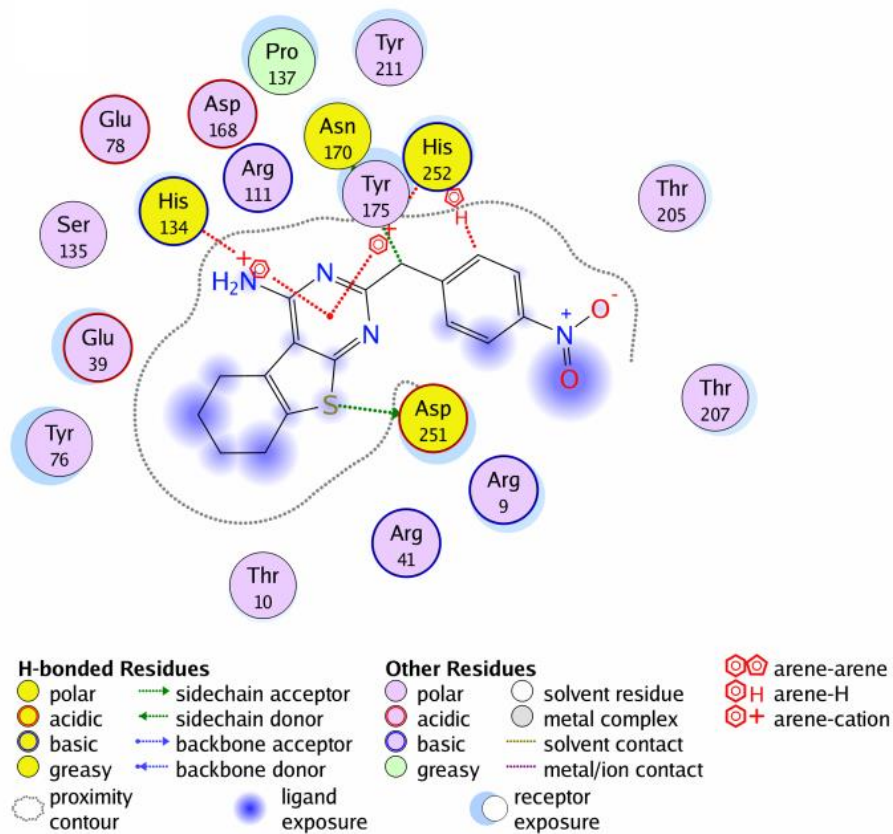
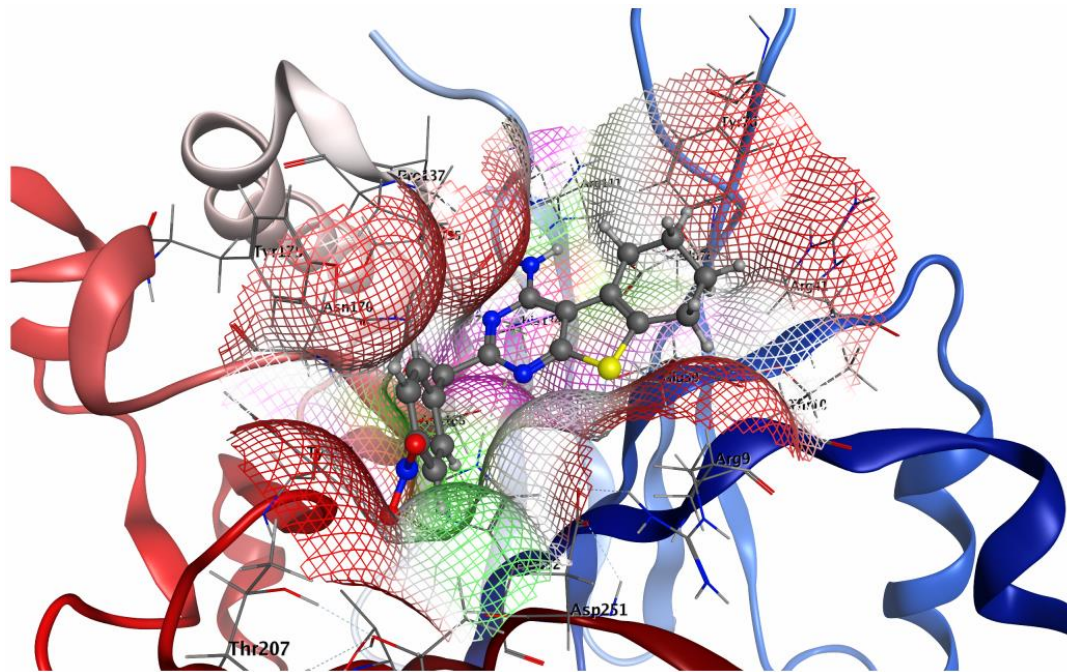
Slika 74. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **75** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].



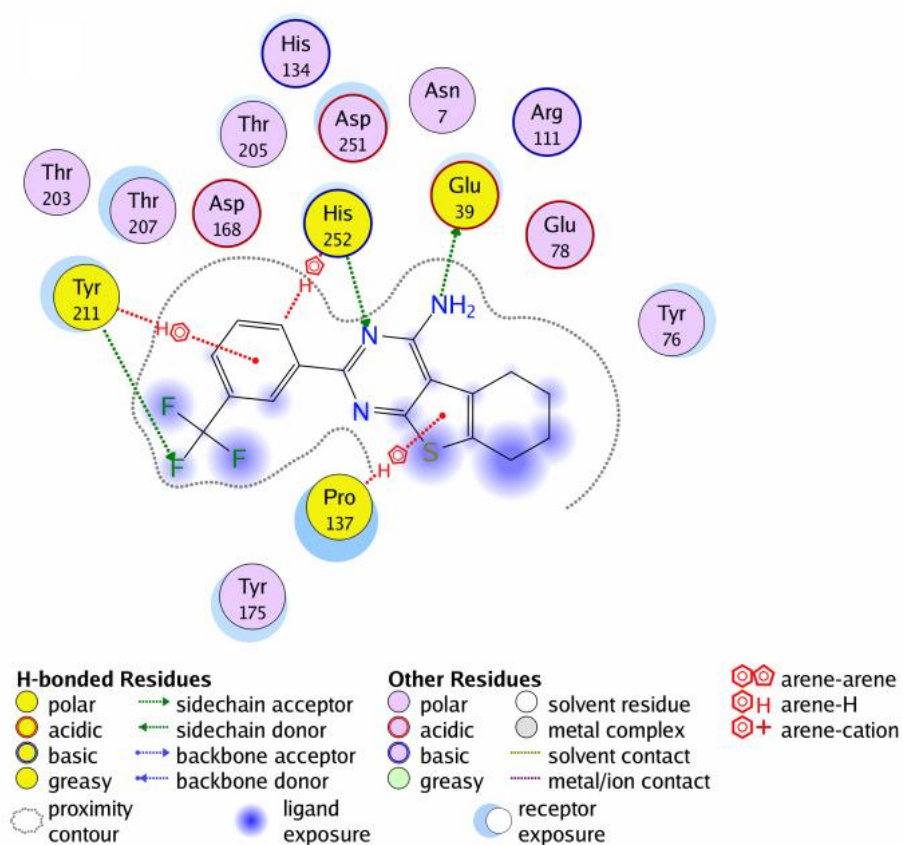
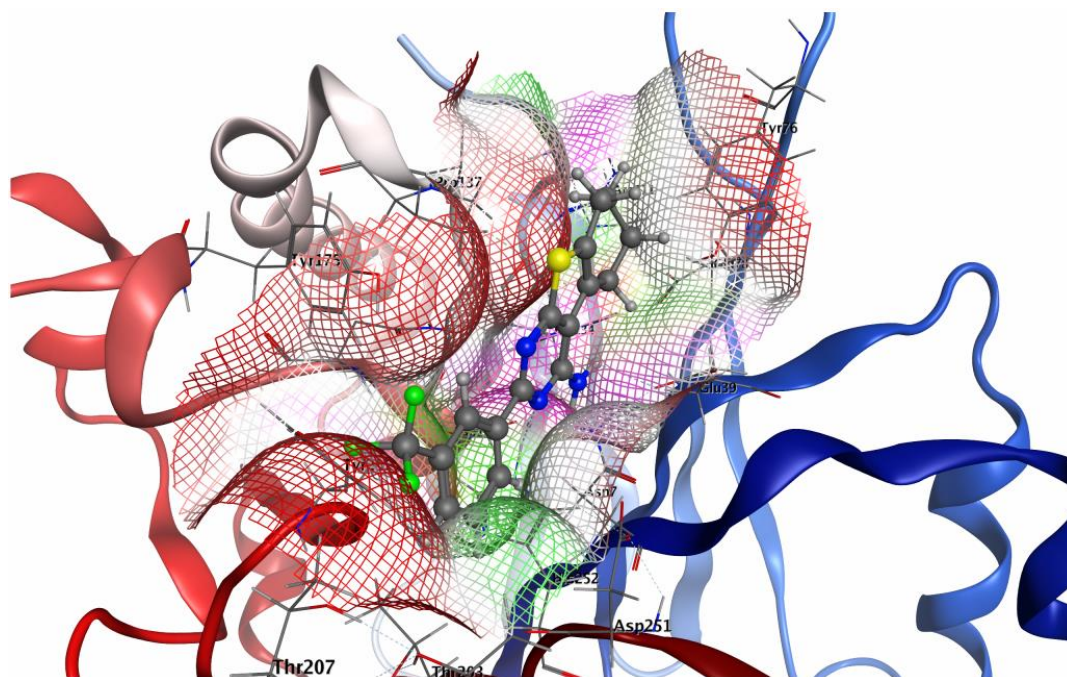
Slika 75. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **79** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].



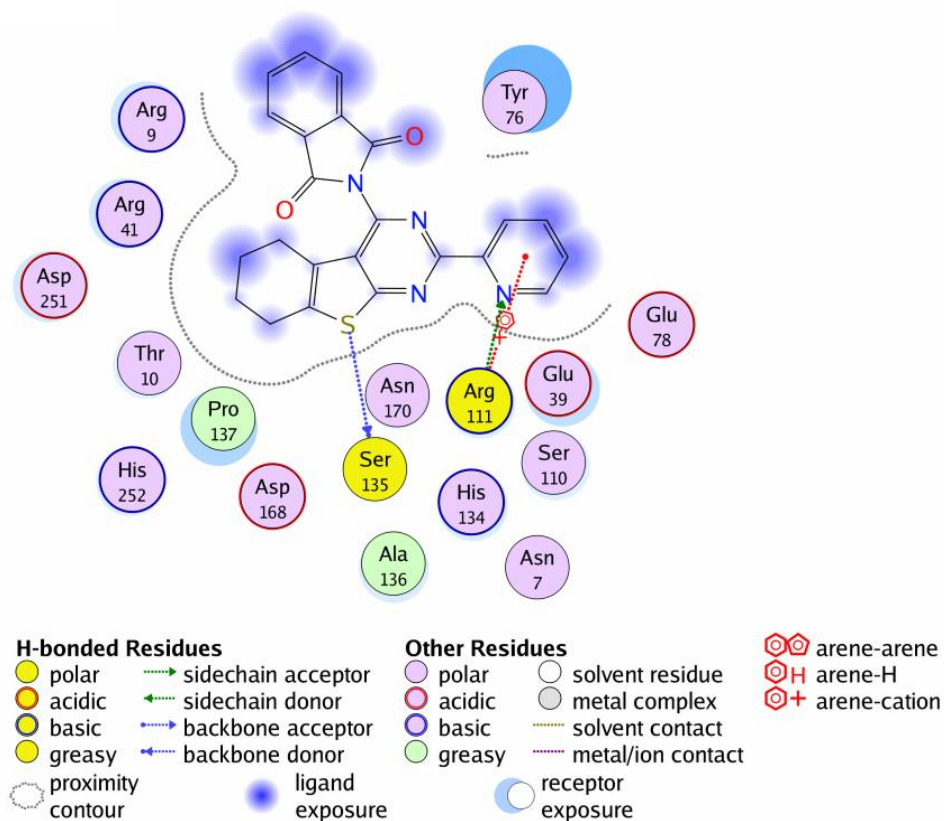
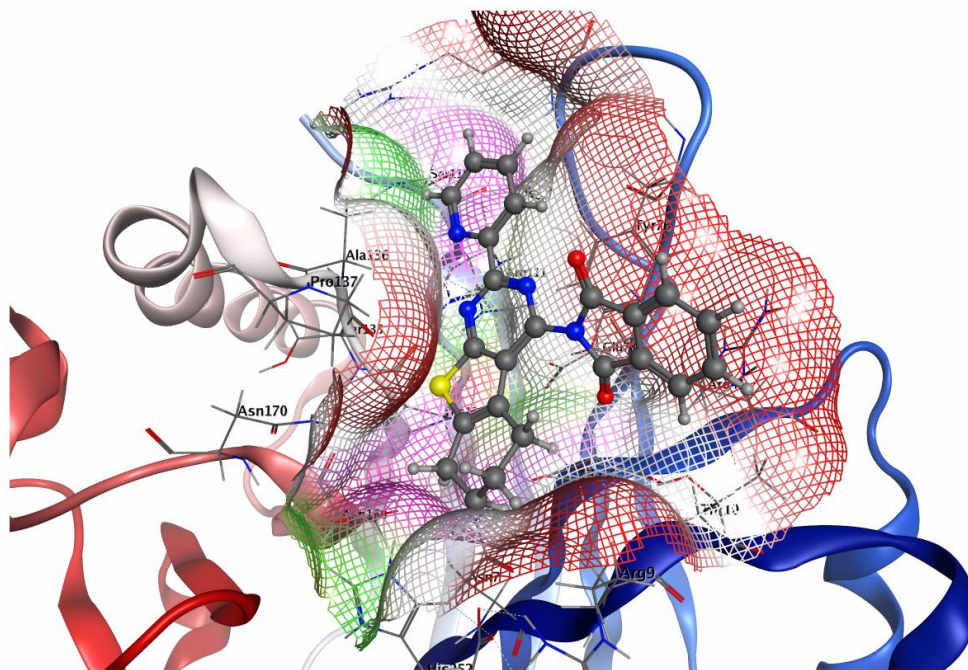
Slika 76. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **82** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].



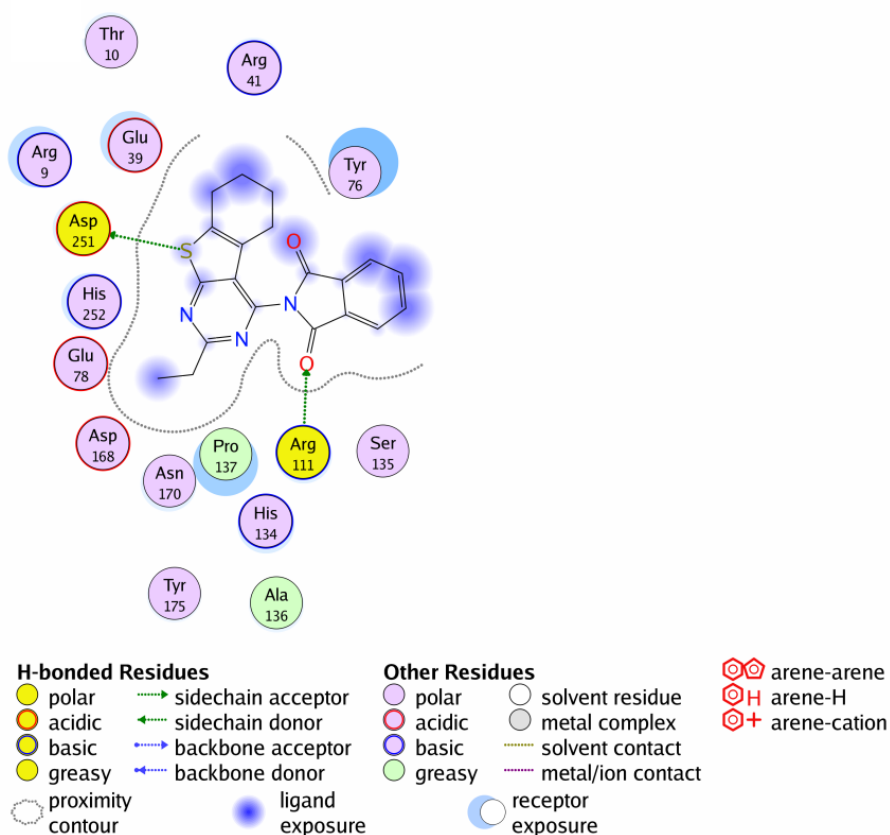
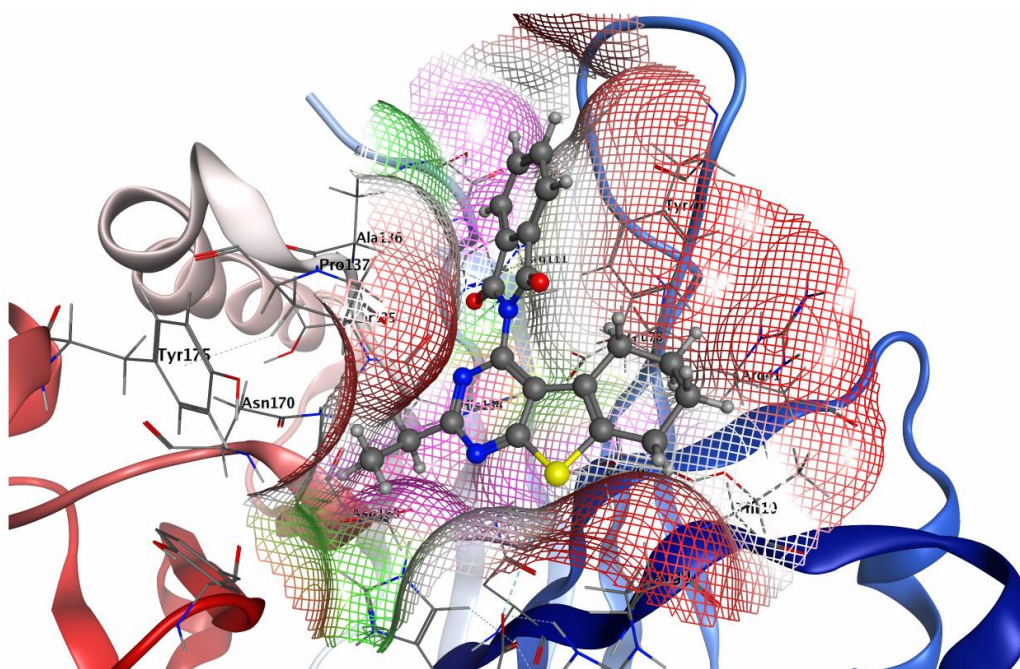
Slika 77. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **83** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].



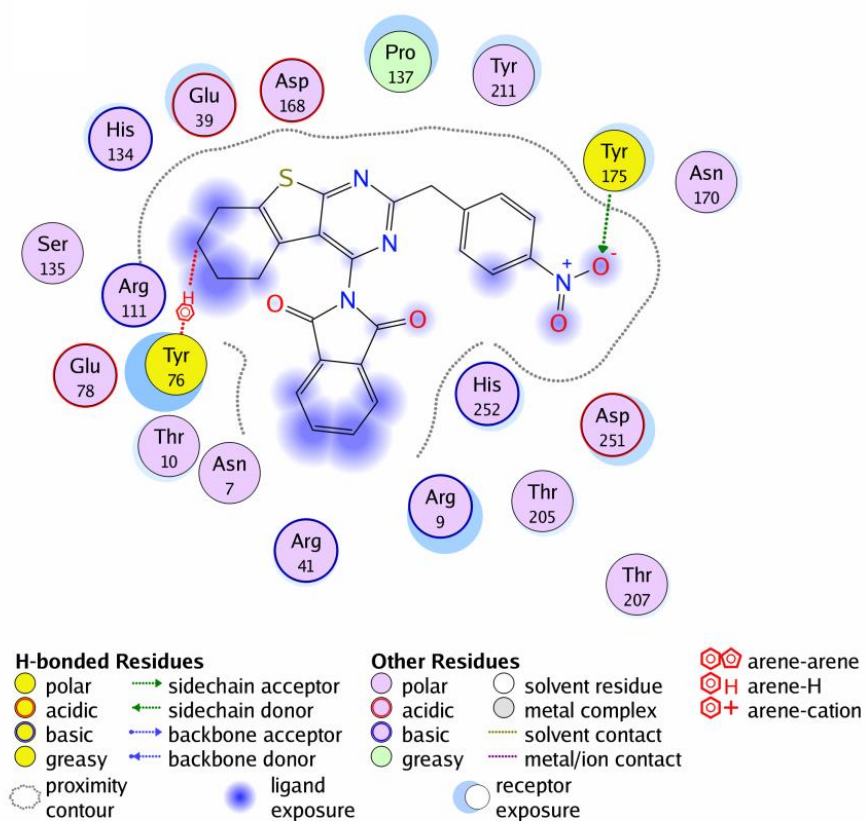
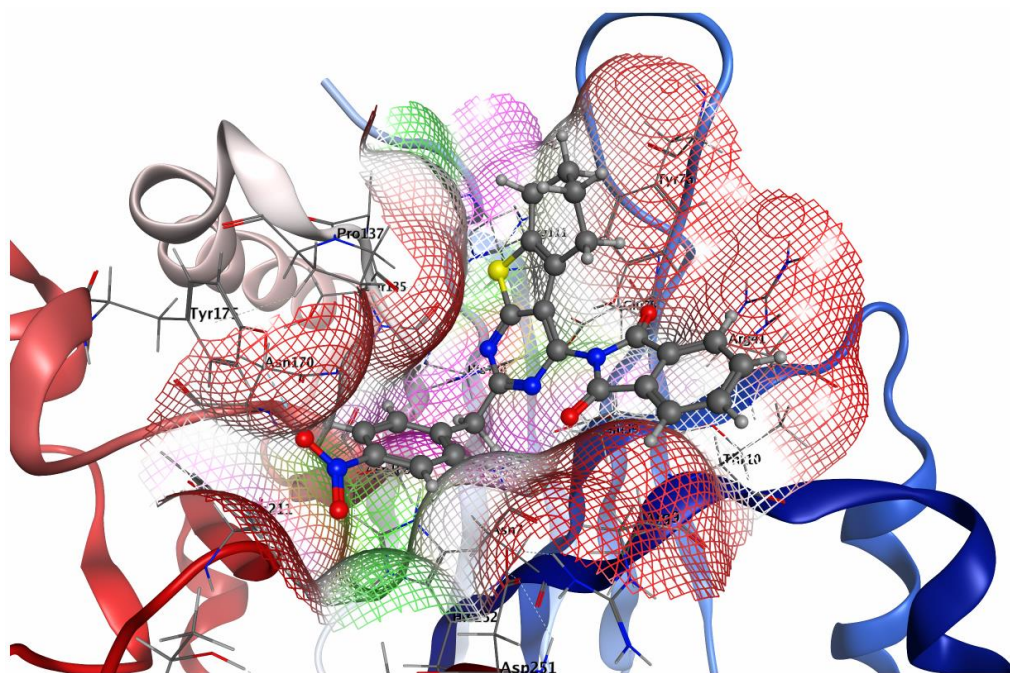
Slika 78. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **85** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].



Slika 79. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **87** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].



Slika 80. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **88** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].



Slika 81. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **89** sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni deo aktivnog mesta je prikazan ružičastom površinom, hidrofobni deo zelenom površinom, dok je deo izložen rastvaraču prikazan crvenom površinom [Mavrova i sar., 2018].

5.5. Fizičko-hemijske, biofarmaceutske, farmakokinetičke i toksikološke osobine inhibitora DNaze I predviđene *in silico* metodama

5.5.1. Fizičko-hemijske i biofarmaceutske osobine inhibitora DNaze I

Fizičko-hemijske osobine jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μM predviđene softverom *Molinspiration* [<http://www.molinspiration.com/>] prikazane su u tabeli 18. Na osnovu dobijenih rezultata se može pretpostaviti biološka raspoloživost ispitivanih jedinjenja u *in vitro* i/ili *in vivo* uslovima. Vrednosti oktanol/voda particionog koeficijenta ($m_i\text{LogP}$) ukazuju na lipofilnost ispitivanih jedinjenja. Naime, jedinjenja koja imaju $m_i\text{LogP}$ vrednosti manje od 5 smatraju se hidrofilnim, odnosno predviđa se da takva jedinjenja pokazuju dovoljno dobru oralnu bioraspoloživost. Suprotno, predviđa se da su jedinjenja sa $m_i\text{LogP}$ vrednostima iznad 5 lipofilna, odnosno da pokazuju slabu (lošu) oralnu bioraspoloživost [Lipinski i sar., 2012]. Oralna bioraspoloživost se može predvideti i na osnovu polarne površine koja je ovde izražena kao topološka polarna površina (TPSA – *topological polar surface area*). Polarna površina molekula se definiše kao zbir površina svih polarnih atoma, odnosno atoma kiseonika i azota, kao i atoma vodonika koji su vezani za njih, i predstavlja sposobnost (kapacitet) ispitivanih jedinjenja da formiraju vodonične veze. Smatra se da jedinjenja koja imaju vrednosti TPSA ispod 140 \AA^2 pokazuju dovoljno dobru oralnu bioraspoloživost [Veber i sar., 2002; Ertl i sar., 2000; Prasanna i Doerksen, 2009]. Kapacitet formiranja vodoničnih veza se može predstaviti brojem donora vodoničnih veza (n_{OHNH}) i brojem akceptora vodoničnih veza (n_{ON}). Broj veza sa mogućnošću rotacije (n_{rot}) ukazuje na konformacionu fleksibilnost koja predstavlja još jedan važan faktor za optimalnu bioraspoloživost. Za jedinjenja sa manje od 10 akceptora vodoničnih veza, manje od 5 donora vodoničnih veza i manje od 10 veza sa mogućnošću rotacije se predviđa dobra oralna bioraspoloživost [Veber i sar., 2002].

Sumirajući *in silico* predviđene fizičko-hemijske parametre (tabela 18), 18 od 23 jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u ispitivanim koncentracijama ($\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{M}$), i to svih deset derivata tiazolidina (**4**, **11**, **13**, **18**, **27**, **29**, **31**, **38**, **40** i **41**), dva od četiri derivata benzimidazola (**54** i **67**) i šest od osam derivata 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina (**75**, **79**, **82**, **83**, **87** i **88**), ispunjavaju „Pravilo pet Lipinskog” i „Pravilo Vebera” ($m_i\text{LogP} \leq 5$, $\text{TPSA} \leq 140 \text{ \AA}^2$, $n_{\text{ON}} \leq 10$, $n_{\text{OHNH}} \leq 5$, $n_{\text{rot}} \leq 10$, $M_r \leq 500$) čime se predviđa njihova dobra oralna bioraspoloživost. Dobijeni rezultati su slični fizičko-hemijskim osobinama predviđenim za poznate organske inhibitore DNaze I (NTCB, NTSB, kristal violet i azotni iperit) [Kolarevic i sar., 2014]. Sa druge strane, pet jedinjenja, odnosno dva derivata

benzimidazola (**62** i **72**), derivat 4*H*-hromena (**74**) i dva derivata 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina (**85** i **89**) pokazuju najmanje jedno odstupanje od dozvoljenih graničnih vrednosti, te im se predviđa slabija oralna bioraspodivnost (tabela 18).

Tabela 18. Fizičko-hemijske osobine jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 µM predviđene softverom *Molinspiration* [<http://www.molinspiration.com/>].

Jedinjenje*	m _i LogP ^a	TPSA ^b	M _r ^c	n _{ON} ^d	n _{OHNH} ^e	n _{rot} ^f	MV ^g	
I	4	1,43	37,38	233,29	3	0	2	202,86
	11	1,38	72,47	305,36	5	1	6	264,08
	13	1,14	84,50	348,42	6	2	8	310,08
	18	3,02	63,69	395,48	5	0	8	352,67
	27	1,19	46,17	219,26	3	1	2	185,92
	29	-0,17	52,89	140,17	3	1	0	112,39
	31	0,78	57,61	249,29	4	1	2	210,90
	38	-1,00	63,69	217,25	5	0	3	181,35
	40	-0,44	66,48	264,31	5	1	2	222,81
	41	-0,33	66,48	292,36	5	1	4	256,42
II	54	2,02	103,40	409,44	8	1	10	367,73
	62	5,03	69,92	426,45	6	0	3	348,66
	67	2,63	79,55	426,49	7	0	10	373,29
	72	-1,16	137,18	426,50	9	6	8	369,58
III	74	-1,06	269,43	610,52	16	10	6	496,07
IV	75	4,14	51,81	295,41	3	2	2	266,30
	79	3,05	64,70	282,37	4	2	1	245,34
	82	2,74	51,81	233,34	3	2	1	211,45
	83	4,10	97,63	340,41	6	2	3	289,63
	85	5,02	51,81	363,41	3	2	3	297,60
	87	4,85	77,75	412,47	6	0	2	345,37
	88	4,54	64,86	363,44	5	0	2	311,48
	89	5,91	110,68	470,51	8	0	4	389,66

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

^aparticioni koeficijent oktanol/voda izračunat metodologijom koju je razvio *Molinspiration*; ^btopološka polarna površina molekula [Å²]; ^cmolekulska masa; ^dbroj akceptora vodoničnih veza (O i N atomi); ^ebroj donora vodoničnih veza (OH i NH grupe); ^fbroj veza sa mogućnošću rotacije; ^gmolekulska zapremina [Å³]

5.5.2. Biofarmaceutske i farmakokinetičke osobine inhibitora DNaze I

Apsorpcione osobine inhibitora DNaze I

Pri razvoju potencijalno novih biološki aktivnih jedinjenja, od izuzetnog je značaja razmatranje njihovih apsorpcionih osobina koje predstavljaju predmet proučavanja kako farmakokinetike, tako i biofarmacije. Apsorpcione osobine jedinjenja koja su u ispitivanim koncentracijama ($IC_{50} < 200 \mu M$) inhibirala DNazu I, predviđene softverom *admetSAR* [<http://lmmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>], prikazane su u tabeli 19. Za sva jedinjenja je predviđena mogućnost intestinalne apsorpcije, a za skoro sva, osim jedinjenja **74**, i mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) i penetracije u centralni nervni sistem (CNS). Sposobnost inhibitora DNaze I da prođu kroz KMB i ispolje svoju aktivnost u CNS-u moguće je predvideti i na osnovu prethodno izračunatih fizičko-hemijskih parametara (tabela 18). U tom slučaju, rezultati pokazuju da nešto više od polovine ispitivanih inhibitora DNaze I (12) ispunjava sve zahteve ($m_i \text{LogP} \leq 5$, $TPSA \leq 60-70 \text{ \AA}^2$, $n_{\text{O}N} \leq 7$, $n_{\text{O}HNH} \leq 3$ i $n_{\text{rot}} \leq 8$ i $M_r \leq 450$) neophodne da bi se jedinjenje moglo smatrati potencijalno uspešnim CNS lekom, odnosno sposobnim za prolazak kroz KMB i aktivnim u CNS-u [Pajouhesh i Lenz, 2005]. Ovakvi inhibitori DNaze I bi mogli imati potencijalnu primenu u terapiji neurodegenerativnih bolesti, kao što je Alchajmerova bolest, s obzirom na već navedenu ulogu DNaze I u patogenezi ovakvih patoloških stanja.

Među ispitivanim inhibitorima DNaze I, predviđeno je da veći broj (13 od 23) nema sposobnost permeacije kroz *Caco-2* ćelije (epitelne kancerske ćelije debelog creva čoveka) (tabela 19) koje se koriste kao *in vitro* model ljudskog tankog creva, odnosno kao model za procenu humane intestinalne permeabilnosti [Hidalgo i sar., 1989; Van Breemen i Li, 2005]. Većina inhibitora DNaze I potencijalno nisu supstrati i/ili inhibitori P-glikoproteina, efluksnog membranskog transportera koji posreduje u prenosu strukturno raznovrsnih supstrata kroz ćelijsku membranu, iz intracelularnog u ekstracelularni prostor (tabela 19). Ovaj transmembranski protein je važan za apsorpciju lekova koji se primenjuju oralno, kao i za penetraciju kroz KMB [Fromm, 2000; Chen i sar., 2011; Broccatelli i sar., 2011; Amin, 2013].

Dobijeni rezultati (tabela 19) ukazuju na povoljnije apsorpcione osobine 23 ispitivana inhibitora DNaze I u odnosu na apsorpcione osobine predviđene za poznate organske inhibitore DNaze I [Kolarević i sar., 2016].

Tabela 19. Apsorpcione osobine jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M predviđene softverom *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>].

Jedinjenje*	Caco-2 ćelije	Intestinalna apsorpcija	KMB ^a	P-gp ^b inhibitor	P-gp supstrat	
I	4	da	da	da	ne	ne
	11	da	da	da	ne	ne
	13	ne	da	da	ne	da
	18	da	da	da	da	ne
	27	da	da	da	ne	ne
	29	ne	da	da	ne	ne
	31	da	da	da	ne	ne
	38	da	da	da	ne	ne
	40	da	da	da	ne	ne
	41	da	da	da	ne	da
II	54	ne	da	da	da	ne
	62	ne	da	da	da	ne
	67	ne	da	da	da	ne
	72	ne	da	da	da	ne
III	74	ne	da	ne	ne	ne
	75	ne	da	da	ne	ne
	79	da	da	da	ne	ne
	82	ne	da	da	ne	ne
IV	83	ne	da	da	ne	ne
	85	ne	da	da	ne	ne
	87	ne	da	da	da	ne
	88	da	da	da	da	ne
	89	ne	da	da	da	ne

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

^akrvno-moždana barijera; ^bP-glikoprotein

Metaboličke osobine inhibitora DNaze I

Metaboličke osobine jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M predviđene softverom *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>] prikazane su u tabeli 20. Dobijeni rezultati pokazuju da se inhibitori DNaze I međusobno razlikuju po svojim metaboličkim osobinama, u zavisnosti od toga da li su potencijalni supstrati i/ili inhibitori određenih CYP450 izoenzima. Zajedničko za sve inhibitore DNaze I je da nijedno jedinjenje nije predviđeno ni kao supstrat ni kao inhibitor CYP450 2D6 izoenzima (tabela

20). Slične metaboličke osobine su predviđene i za poznate organske inhibitore DNaze I [Kolarević i sar., 2016].

Tabela 20. Metaboličke osobine jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M predviđene softverom *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>].

Jedinjenje*	CYP450 supstrat			CYP450 inhibitor					
	2C9	2D6	3A4	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4	
I	4	ne	ne	ne	da	ne	da	ne	ne
	11	da	ne	da	da	da	da	ne	ne
	13	ne	ne	da	da	ne	da	ne	ne
	18	ne	ne	da	da	da	da	ne	ne
	27	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne
	29	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne
	31	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	38	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	40	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
	41	da	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne
II	54	ne	ne	ne	da	da	da	ne	da
	62	da	ne	da	da	da	da	ne	da
	67	ne	ne	ne	da	da	da	ne	da
	72	ne	ne	ne	ne	da	da	ne	da
III	74	ne	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne
IV	75	ne	ne	ne	da	da	da	ne	ne
	79	ne	ne	ne	da	da	da	ne	ne
	82	ne	ne	ne	da	da	da	ne	ne
	83	ne	ne	da	da	da	da	ne	da
	85	ne	ne	ne	da	da	da	ne	ne
	87	ne	ne	da	ne	da	da	ne	ne
	88	ne	ne	da	ne	da	da	ne	ne
89	ne	ne	da	ne	da	da	ne	da	

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

Primenom kompjuterskog programa *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>] moguće je predvideti i sposobnost jedinjenja da inhibiraju određene farmakokinetičke transportere. Rezultati prikazani u tabeli 21 pokazuju da ispitivani inhibitori DNaze I ne bi trebalo da deluju kao BCRP (*breast cancer resistance protein* – protein rezistencije raka dojke), MATE1 (*multidrug and toxin extrusion 1*) i OATP (*organic anion-transporting polypeptide* – organski anjonski transportni polipeptid) 2B1 inhibitori, a većina njih ni kao

OCT (*organic cation transporter* – organski katjonski transporter) inhibitori. Sa druge strane, ispitivana jedinjenja mogu delovati kao OATP 1B1 i 1B3 inhibitori, a nešto više od polovine njih i kao BSEP (*bile salt export pump* – eksportna pumpa za žučne soli) inhibitori.

Tabela 21. Mogućnost inhibicije farmakokinetičkih transportera jedinjenjima koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M predviđena softverom *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>].

Jedinjenje*	BCRP ^a	BSEP ^b	MATE1 ^c	OATP ^d			OCT ^e		
				1B1	1B3	2B1	1	2	
I	4	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	11	ne	da	ne	da	da	ne	ne	ne
	13	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	18	ne	da	ne	da	da	ne	ne	ne
	27	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	29	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	31	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	38	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	40	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	41	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
II	54	ne	da	ne	da	da	ne	ne	ne
	62	ne	da	ne	da	da	ne	ne	ne
	67	ne	da	ne	da	da	ne	ne	ne
	72	ne	da	ne	da	da	ne	ne	ne
III	74	ne	da	ne	da	da	ne	ne	ne
IV	75	ne	da	ne	da	da	ne	ne	da
	79	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	da
	82	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	da
	83	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	ne
	85	ne	da	ne	da	da	ne	da	da
	87	ne	da	ne	da	da	ne	ne	da
	88	ne	da	ne	da	da	ne	ne	da
	89	ne	da	ne	da	da	ne	ne	da

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

^aBCRP – protein rezistencije raka dojke (*breast cancer resistance protein*); ^bBSEP – eksportna pumpa za žučne soli (*bile salt export pump*); ^cMATE (*multidrug and toxin extrusion*); ^dOATP – organski anjonski transportni polipeptid (*organic anion-transporting polypeptide*); ^eOCT – organski katjonski transporter (*organic cation transporter*)

5.5.3. Biofarmaceutski sistem klasifikacije

Prema biofarmaceutskom sistemu klasifikacije (BSK) supstance se, u zavisnosti od njihove rastvorljivosti i permeabilnosti, osnovnih parametara koji određuju brzinu i stepen apsorpcije nakon oralne primene, mogu svrstati u jednu od četiri biofarmaceutske klase [Amidon i sar., 1995]:

klasa I – supstance sa visokom permeabilnošću i visokom rastvorljivošću;

klasa II – supstance sa visokom permeabilnošću i niskom rastvorljivošću;

klasa III – supstance sa niskom permeabilnošću i visokom rastvorljivošću;

klasa IV – supstance sa niskom permeabilnošću i niskom rastvorljivošću.

Poželjno je da se još u ranim fazama razvoja leka, ispitivana supstanca svrsta u određenu grupu BSK, kako bi se, eventualno, predvidela mogućnost apsorpcije te supstance u *in vivo* uslovima i olakšao rad na razvoju odgovarajuće formulacije lekovitog preparata [Parojčić i sar., 2006].

Pored utvrđenih *in vitro* i *in vivo* testova koji se koriste za određivanje rastvorljivosti i permeabilnosti [FDA, 2000; Elder i Holm, 2013; Batchelor i sar., 2013], *in silico* metode dobijaju sve veći značaj u biofarmaceutskoj karakterizaciji ispitivanih supstanci. Tako je primenom kompjuterskog programa *ADMET Predictor™ 9.0* [ADMET Predictor v9.0. Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA] predviđena rastvorljivost i permeabilnost jedinjenja koja su u ispitivanim koncentracijama ($IC_{50} < 200 \mu M$) pokazala mogućnost inhibicije DNaze I, a na osnovu toga i izvršena njihova preliminarna biofarmaceutska klasifikacija. Rezultati pokazuju da se inhibitori DNaze I, u zavisnosti od doze u kojoj bi se primenjivali, preliminarno mogu svrstati u biofarmaceutsku klasu I ili II, osim jedinjenja **72** i **74** koja bi mogla pripadati klasi III ili IV (tabela 22). Ovi rezultati mogu biti od koristi u kasnijim fazama razvoja lekova koja uključuju *in vitro* i *in vivo* ispitivanja, kao i u uspostavljanju *in silico-in vitro-in vivo* korelacije.

Tabela 22. BSK jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M predviđen softverom *ADMET Predictor*TM 9.0 [ADMET Predictor v9.0. Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA].

Tiazolidini	BSK	Benzimidazoli	BSK	Tienopirimidini	BSK
4	I/II	54	I/II	75	I/II
11	I/II	62	II	79	I/II
13	I/II	67	I/II	82	I/II
18	I/II	72	III/IV	83	I/II
27	I/II			85	I/II
29	I	<i>4H</i> -Hromeni	BSK	87	I/II
31	I/II	74	III	88	I/II
38	I			89	I/II
40	I				
41	I				

5.5.4. Toksikološke osobine inhibitora DNaze I predviđene softverom *admetSAR*

Za jedinjenja koja su u ispitivanim koncentracijama ($IC_{50} < 200 \mu$ M) pokazala mogućnost inhibicije DNaze I predviđene su toksikološke osobine korišćenjem softvera *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>] (tabele 23-26).

Toksični efekti inhibitora DNaze I na organe i organske sisteme

Skoro sva jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M, osim jedinjenja **29** i **38**, procenjena su kao potencijalno hepatotoksična, ali i kao jedinjenja bez rizika od izazivanja očne korozije i/ili iritacije, osim jedinjenja **29** koje može dovesti do iritacije oka (tabela 23).

Pri razvoju novih lekova jako je važno predvideti sposobnost jedinjenja da inhibira kalijumske kanale, proteinske proizvode humanog *ether-à-go-go-related* gena (hERG) neophodne za normalnu električnu aktivnost srca, s obzirom na to da njihova inhibicija može dovesti do ozbiljnih srčanih aritmija [Ekins i sar., 2002]. Procenjeno je da većina ispitivanih jedinjenja (16 od 23) ne bi trebalo da inhibira hERG kanale (tabela 23).

Prema riziku od akutne oralne toksičnosti, četiri 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina (**75**, **82**, **83** i **85**) su predviđena kao kategorija II, odnosno kao umereno toksična jedinjenja, sa LD_{50} (srednja letalna doza) vrednostima od 50 mg/kg do 500 mg/kg. Ostalih 19

inhibitora DNaze I su predviđeni kao kategorija III, odnosno kao neznatno toksična jedinjenja, sa LD₅₀ vrednostima od 500 mg/kg do 5000 mg/kg (tabela 23).

Primenom softvera *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>] procenjena je mogućnost ispitivanih inhibitora DNaze I da stupaju u interakciju sa hormonskim sistemom (tabela 24). Rezultati pokazuju da inhibitori DNaze I imaju velike predispozicije za vezivanje za estrogene, glukokortikoidne, tiroidne i/ili peroksizom proliferatorom-aktivirane receptore, kao i za aromatazu (estrogen sintetazu), što ukazuje na njihovu mogućnost delovanja kao endokrinih disruptora [Diamanti-Kandarakis i sar., 2009].

Tabela 23. Toksikološke osobine jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 µM predviđene softverom *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>].

Jedinjenje*	Hepatotoksičnost	hERG inhibitor	Akutna oralna toksičnost (kategorija)	Očna korozija	Očna iritacija	
I	4	da	ne	III	ne	ne
	11	da	ne	III	ne	ne
	13	da	da	III	ne	ne
	18	da	da	III	ne	ne
	27	da	ne	III	ne	ne
	29	ne	ne	III	ne	da
	31	da	ne	III	ne	ne
	38	ne	ne	III	ne	ne
	40	da	ne	III	ne	ne
	41	da	ne	III	ne	ne
II	54	da	ne	III	ne	ne
	62	da	da	III	ne	ne
	67	da	ne	III	ne	ne
	72	da	ne	III	ne	ne
III	74	da	ne	III	ne	ne
IV	75	da	da	II	ne	ne
	79	da	da	III	ne	ne
	82	da	ne	II	ne	ne
	83	da	ne	II	ne	ne
	85	da	da	II	ne	ne
	87	da	ne	III	ne	ne
	88	da	ne	III	ne	ne
	89	da	da	III	ne	ne

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

Tabela 24. Mogućnost vezivanja jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M za potencijalne mete endokrinih disruptora predviđena softverom *admetSAR* [<http://lmmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>].

Jedinjenje*	Estrogeni receptori	Aromataza	Glukokortikoidni receptori	PPAR γ^a	Tiroidni receptori
4	da	da	ne	ne	ne
11	da	da	da	da	ne
13	da	ne	da	da	ne
18	da	ne	da	da	ne
27	da	da	ne	da	ne
29	ne	ne	ne	ne	ne
31	da	da	ne	ne	ne
38	ne	ne	ne	ne	ne
40	da	da	ne	ne	ne
41	da	da	da	ne	ne
54	da	da	da	da	da
62	da	da	da	da	da
67	da	da	da	da	da
72	da	da	da	da	da
74	da	da	da	da	da
75	da	da	da	da	da
79	da	da	da	da	da
82	da	ne	da	ne	ne
83	da	da	da	da	da
85	da	da	da	da	da
87	da	da	da	da	ne
88	da	da	da	da	da
89	da	da	da	da	da

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

^aperoksizom proliferatorom-aktivirani receptor γ

Genotoksičnost inhibitora DNaze I

AMES test je kratkotrajni test bakterijske reverzne mutacije koji je dizajniran sa ciljem otkrivanja širokog spektra jedinjenja koja mogu da izazovu genetska oštećenja i posledično genske mutacije [Mortelmans i Zeiger, 2000]. Među jedinjenjima koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M, svi derivati tiazolidina i benzimidazola su predviđeni kao AMES negativni, dok su derivat 4*H*-hromena i svi derivati 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina predviđeni kao AMES pozitivni (tabela 25).

Skoro svi inhibitori DNaze I (21 od 23) su, na osnovu srednje toksične doze (TD₅₀), predviđeni kao nekancerogena jedinjenja. Izuzetak predstavljaju dva 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina (**83** i **89**) koja su procenjena kao potencijalno kancerogena jedinjenja, sa TD₅₀ vrednostima manjim od 10 mg/kg telesne težine dnevno (tabela 25).

Mikronukleus test je test koji se u toksikološkim ispitivanjima koristi za procenu potencijalno genotoksičnih jedinjenja [Fan i sar., 2018]. Osim jedinjenja **4**, svi ostali inhibitori DNaze I su potencijalno genotoksična jedinjenja (tabela 25).

Tabela 25. Genotoksičnost jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 µM predviđena softverom *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2>].

Jedinjenje*	AMES toksičnost	Kancerogenost (TD ₅₀)	Mikronukleus test
4	ne	ne	ne
11	ne	ne	da
13	ne	ne	da
18	ne	ne	da
I 27	ne	ne	da
29	ne	ne	da
31	ne	ne	da
38	ne	ne	da
40	ne	ne	da
41	ne	ne	da
54	ne	ne	da
II 62	ne	ne	da
67	ne	ne	da
72	ne	ne	da
III 74	da	ne	da
75	da	ne	da
79	da	ne	da
82	da	ne	da
IV 83	da	da	da
85	da	ne	da
87	da	ne	da
88	da	ne	da
89	da	da	da

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

Ekotoksičnost inhibitora DNaze I

Primenom softvera *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>] procenjeni su toksični efekti jedinjenja, koja su u ispitivanim koncentracijama ($IC_{50} < 200 \mu M$) inhibirala DNazu I, na ekosistem (tabela 26). Većina inhibitora DNaze I (20 od 23) je procenjena kao visokotoksična za ribe, manji je broj (13 od 23) onih koji bi mogli biti toksični za rakove, dok je najmanji broj (6 od 23) procenjen kao toksičan za pčele. Od 23 inhibitora DNaze I, jedino je jedinjenje **29** procenjeno kao biorazgradivo. Pored toga, svi inhibitori DNaze I su predviđeni kao netoksični za ptice, ali visokotoksični za *Tetrahymena pyriformis* koji, među protozoama, predstavlja najčešće korišćen model u toksikološkim ispitivanjima [Sauvant i sar., 1999].

Tabela 26. Ekotoksičnost jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μM predviđena softverom *admetSAR* [<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>].

Jedinjenje*	Rakovi	Ptice	Ribe	Pčele	<i>T. pyriformis</i>	Biorazgradivost
4	ne	ne	da	ne	da	ne
11	da	ne	da	da	da	ne
13	da	ne	da	ne	da	ne
18	da	ne	da	ne	da	ne
27	ne	ne	ne	ne	da	ne
29	ne	ne	ne	da	da	da
31	ne	ne	da	ne	da	ne
38	ne	ne	da	da	da	ne
40	da	ne	da	ne	da	ne
41	ne	ne	ne	ne	da	ne
54	da	ne	da	ne	da	ne
62	ne	ne	da	da	da	ne
67	da	ne	da	da	da	ne
72	da	ne	da	ne	da	ne
74	ne	ne	da	da	da	ne
75	da	ne	da	ne	da	ne
79	da	ne	da	ne	da	ne
82	da	ne	da	ne	da	ne
83	ne	ne	da	ne	da	ne
85	da	ne	da	ne	da	ne
87	da	ne	da	ne	da	ne
88	da	ne	da	ne	da	ne
89	ne	ne	da	ne	da	ne

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

5.5.5. Toksikološke osobine inhibitora DNaze I predviđene softverom DataWarrior

Toksikološke osobine jedinjenja koja su u ispitivanim koncentracijama ($IC_{50} < 200 \mu M$) pokazala mogućnost inhibicije DNaze I, predviđene softverom *DataWarrior* [<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>], prikazane su u tabeli 27. Rezultati pokazuju da je bez rizika od pojave mutagenih, tumorogenih, reproduktivnih i iritacionih efekata predviđeno ukupno 13 inhibitora DNaze I, i to svih osam derivata 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina, derivat 4*H*-hromena (**74**) i četiri (od deset) derivata tiazolidina (**11**, **13**, **27** i **29**). Naime, svi tiazolidini su predviđeni kao jedinjenja bez rizika od pojave mutagenih, tumorogenih i iritacionih efekata. Međutim, šest (od deset) derivata tiazolidina predstavljaju visokorizična jedinjenja za pojavu negativnih efekata po reproduktivne organe. Sva četiri derivata benzimidazola nose visok rizik od pojave mutagenih efekata, a neki i od pojave tumorogenih efekata (jedinjenje **72**) ili negativnih reproduktivnih efekata (jedinjenje **62**). Slične toksikološke osobine su predviđene i za poznate organske inhibitore DNaze I [Kolarević i sar., 2016].

5.5.6. Mogućnost vezivanja inhibitora DNaze I za DNK i proteine

Identifikacija jedinjenja sa mogućnošću kovalentnog vezivanja za proteine i/ili DNK je od izuzetnog značaja u proceni toksičnosti. Naime, formiranje kovalentnog adukta sa biološkim makromolekulom (proteinom i/ili DNK) predstavlja inicijalni događaj, odnosno prvi korak u seriji koji može rezultovati toksičnim efektima [Enoch i Cronin, 2010; Enoch i sar., 2011]. Za 23 jedinjenja koja su u ispitivanim koncentracijama ($IC_{50} < 200 \mu M$) pokazala mogućnost inhibicije DNaze I, korišćenjem softvera *Toxtree* [Toxtree, v.2.6.13], procenjene su strukturne predispozicije za kovalentno vezivanje za DNK i/ili proteine, kao što su mogućnost acilacije, *Michael*-ove adicije, formiranja *Schiff*-ovih baza, aromatične i alifatične nukleofilne supstitucije (tabele 28 i 29). Date predispozicije se odnose na hemijski mehanizam kojim određeno jedinjenje može kovalentno interagovati sa biološkim makromolekulom, ali ne ukazuju nužno na to da je određeno jedinjenje toksično, jer drugi faktori, kao što su toksikokinetički ili toksikodinamički profili jedinjenja ili biološki reparacioni mehanizmi, mogu sprečiti negativne ishode [Enoch i Cronin, 2010; Enoch i sar., 2011]. Rezultati pokazuju da, osim tiazolidina **29**, svi ostali inhibitori DNaze I pokazuju najmanje jednu strukturnu predispoziciju za vezivanje za DNK i/ili proteine (tabele 28 i 29)

što je u skladu sa rezultatima predviđenim za poznate organske inhibitore DNaze I [Kolarević i sar., 2016].

Tabela 27. Toksikološke osobine jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M predviđene softverom *DataWarrior* [<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>].

Jedinjenje*	Rizik od mutagenih efekata	Rizik od tumorogenih efekata	Rizik od reproduktivnih efekata	Rizik od iritacionih efekata	
I	4	nema	nema	visok	nema
	11	nema	nema	nema	nema
	13	nema	nema	nema	nema
	18	nema	nema	visok	nema
	27	nema	nema	nema	nema
	29	nema	nema	nema	nema
	31	nema	nema	visok	nema
	38	nema	nizak	visok	nema
	40	nema	nema	visok	nema
	41	nema	nema	visok	nema
II	54	visok	nizak	nema	nema
	62	visok	nizak	visok	nema
	67	visok	nizak	nema	nema
	72	visok	visok	nema	nema
III	74	nema	nema	nema	nema
IV	75	nema	nema	nema	nema
	79	nema	nema	nema	nema
	82	nema	nema	nema	nema
	83	nema	nema	nema	nema
	85	nema	nema	nema	nema
	87	nema	nema	nema	nema
	88	nema	nema	nema	nema
	89	nema	nema	nema	nema

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

Tabela 28. Mogućnost vezivanja jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M za DNK predviđena softverom *Toxtree* [Toxtree, v.2.6.13].

Jedinjenje*	S _N 1 ^a	Schiff-ove baze ^b	Michael-ova adicija ^c	Acilacija ^d	S _N 2 ^e	
I	4	da	ne	da	ne	ne
	11	ne	ne	da	ne	ne
	13	ne	ne	da	ne	ne
	18	da	ne	da	ne	ne
	27	ne	ne	da	ne	ne
	29	ne	ne	ne	ne	ne
	31	da	ne	da	ne	ne
	38	da	ne	ne	ne	ne
	40	da	ne	da	ne	ne
	41	da	ne	da	ne	ne
II	54	ne	ne	da	ne	ne
	62	ne	ne	da	ne	ne
	67	ne	ne	da	ne	ne
	72	da	ne	da	ne	ne
III	74	ne	ne	da	ne	ne
IV	75	da	ne	da	ne	ne
	79	da	ne	ne	ne	ne
	82	da	ne	ne	ne	ne
	83	da	ne	da	ne	ne
	85	da	ne	da	ne	ne
	87	ne	ne	da	ne	ne
	88	ne	ne	da	ne	ne
	89	da	ne	da	ne	ne

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

^amogućnost S_N1 alifatične nukleofilne supstitucije; ^bmogućnost formiranja Schiff-ovih baza;

^cmogućnost Michael-ove adicije; ^dmogućnost acilacije; ^emogućnost S_N2 alifatične nukleofilne supstitucije

Tabela 29. Mogućnost vezivanja jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μ M za proteine predviđena softverom *Toxtree* [Toxtree, v.2.6.13].

Jedinjenje*	S _N Ar ^a	Schiff-ove baze ^b	Michael-ova adicija ^c	Acilacija ^d	S _N 2 ^e	
I	4	ne	ne	da	da	ne
	11	ne	ne	da	da	ne
	13	ne	ne	da	da	da
	18	ne	ne	da	da	da
	27	ne	ne	da	da	ne
	29	ne	ne	ne	da	ne
	31	ne	ne	da	da	ne
	38	ne	ne	ne	da	ne
	40	ne	ne	da	da	ne
	41	ne	ne	da	da	da
II	54	ne	ne	da	ne	ne
	62	ne	ne	da	ne	ne
	67	ne	ne	da	ne	ne
	72	ne	ne	da	ne	ne
III	74	ne	ne	da	ne	ne
IV	75	ne	ne	da	ne	da
	79	da	ne	ne	ne	da
	82	ne	ne	ne	ne	da
	83	ne	ne	da	ne	da
	85	ne	ne	da	ne	da
	87	da	ne	da	da	da
	88	ne	ne	da	da	da
	89	ne	ne	da	da	da

*I – tiazolidini; II – benzimidazoli; III – 4*H*-hromeni; IV – 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidini

^amogućnost aromatične nukleofilne supstitucije; ^bmogućnost formiranja *Schiff*-ovih baza; ^cmogućnost *Michael*-ove adicije; ^dmogućnost acilacije; ^emogućnost S_N2 alifatične nukleofilne supstitucije

6. ZAKLJUČAK

Ciljevi doktorske disertacije „Inhibicija dezoksiribonukleaze I derivatima tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina u *in vitro* uslovima” ostvareni su:

- razvojem metode kojom je vršeno ispitivanje inhibicije komercijalne DNaze I u *in vitro* uslovima;
- ispitivanjem inhibicije goveđe pankreasne DNaze I derivatima tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina u *in vitro* uslovima;
- razjašnjavanjem mehanizama inhibicije DNaze I ispitivanim jedinjenjima (analizom odnosa njihovih struktura i aktivnosti, određivanjem kinetike enzimske inhibicije za neke od najefikasnijih inhibitora DNaze I i predviđanjem njihovih najznačajnijih interakcija sa DNazom I);
- predviđanjem najznačajnijih fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina ispitivanih inhibitora DNaze I *in silico* metodama.

Najznačajniji rezultati koji su dobijeni ispitivanjem inhibicije DNaze I derivatima tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina u *in vitro* uslovima su sledeći:

- Od 53 ispitivana derivata tiazolidina, deset jedinjenja je inhibiralo komercijalnu DNazu I sa IC_{50} vrednostima ispod 200 μM , pri čemu se jedinjenje **41** pokazalo najefikasnijim inhibitorom DNaze I ($IC_{50} = 115,96 \pm 11,70 \mu\text{M}$). Na osnovu Lajnviver-Berkovog dijagrama utvrđeno je da jedinjenje **41** deluje kao nekonkurentan inhibitor DNaze I.
- Četiri od 19 ispitivanih derivata benzimidazola je inhibiralo DNazu I sa IC_{50} vrednostima ispod 200 μM , od kojih čak tri sa IC_{50} vrednostima ispod 100 μM . Jedinjenje **62** se pokazalo najefikasnijim u inhibiciji DNaze I ($IC_{50} = 79,46 \pm 11,75 \mu\text{M}$).
- Među ispitivanim derivatima 4*H*-hromena, jedinjenje **74** je inhibiralo DNazu I sa IC_{50} vrednošću od $108,90 \pm 9,73 \mu\text{M}$. Na osnovu Lajnviver-Berkovog dijagrama utvrđeno je da jedinjenje **74** deluje kao nekonkurentan inhibitor DNaze I.
- Od 17 ispitivanih 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina osam jedinjenja je inhibiralo goveđu pankreasnu DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μM . Jedinjenje **89** je ispoljilo najjaču inhibitornu aktivnost prema DNazi I ($IC_{50} = 106,15 \pm 16,46 \mu\text{M}$).

- Svi derivati tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina koji su inhibirali DNazu I u ispitivanim koncentracijama ($IC_{50} < 200 \mu\text{M}$) pokazali su se efikasnijim inhibitorima DNaze I u odnosu na kristal violet ($IC_{50} > 300 \mu\text{M}$) koji je korišćen kao pozitivna kontrola.
- Za jedinjenja koja su inhibirala DNazu I u koncentraciji manjoj od 200 μM , predviđene su, metodom molekuskog *docking*-a, međumolekulske interakcije sa najznačajnijim katalitičkim ostacima u aktivnom centru DNaze I, kao što su His 134, His 252, Glu 39 i Asp 168.

Sumirajući *in silico* predviđene fizičko-hemijske, biofarmaceutske, farmakokinetičke i toksikološke parametre derivata tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina koji su inhibirali DNazu I sa IC_{50} vrednostima ispod 200 μM može se zaključiti sledeće:

- Većina inhibitora DNaze I ispunjava pravila „Lipinskog” i „Vebera” što ukazuje na to da bi u *in vitro/in vivo* uslovima mogli ispoljiti zadovoljavajući stepen oralne bioraspoloživosti.
- Predviđeno je da bi sva jedinjenja mogla imati mogućnost intestinalne apsorpcije, a skoro sva, osim jedinjenja **74**, i mogućnost prolaska kroz KMB i penetracije u CNS.
- Najveći broj ispitivanih derivata se preliminarno može svrstati u biofarmaceutsku klasu I i/ili II.
- Inhibitori DNaze I se međusobno razlikuju po svojim predviđenim metaboličkim osobinama.
- Na osnovu srednje letalne doze, inhibitori DNaze I su uglavnom predviđeni kao neznatno toksična jedinjenja ($LD_{50} = 500\text{-}5000 \text{ mg/kg}$).
- Skoro svi inhibitori DNaze I, osim tiazolidina **29** i **38**, su potencijalno hepatotoksični i pokazuju predispozicije za najmanje jednu interakciju sa hormonskim sistemom. Međutim, pretpostavlja se da većina njih ne inhibira hERG kanale, niti nosi rizik od izazivanja očne korozije i/ili iritacije.
- Derivati tiazolidina i benzimidazola su predviđeni kao AMES negativni, a skoro svi inhibitori DNaze I, osim tienopirimidina **83** i **89** su, na osnovu srednje toksične doze, predviđeni kao nekancerogena jedinjenja.

- Derivati tiazolidina, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina su predviđeni kao jedinjenja bez rizika od pojave mutagenih, tumorogenih i iritacionih efekata, pri čemu su derivati 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina predviđeni i kao jedinjenja bez rizika od negativnih reproduktivnih efekata.
- Svi inhibitori DNaze I, osim tiazolidina **29**, pokazuju najmanje jednu strukturnu predispoziciju za vezivanje za DNK i/ili proteine.

Generalni zaključak ove doktorske disertacije je da najefikasniji inhibitori DNaze I iz grupa ispitivanih tiazolidina, benzimidazola, 4*H*-hromena i 5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidina predstavljaju dobru osnovu za dizajn novih i efikasnijih inhibitora DNaze I koji mogu imati potencijalnu terapijsku primenu, imajući u vidu značaj DNaze I u patofiziologiji brojnih bolesti i poremećaja. S obzirom na činjenicu da ne postoji inhibitor DNaze I definisan kao „zlatni standard”, ove strukture mogu predstavljati i nove standarde u budućim ispitivanjima.

7. LITERATURA

Abbas SE, Gawad NMA, George RF, Akar YA. Synthesis, antitumor and antibacterial activities of some novel tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives. *Eur J Med Chem* 2013; 65: 195-204.

ADMET Predictor v9.0. Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA (pristupljeno oktobra 2018)

admetSAR, <http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSar2> (pristupljeno septembra 2018)

Akhtar J, Khan AA, Ali Z, Haider R, Yar MS. Structure-activity relationship (SAR) study and design strategies of nitrogen-containing heterocyclic moieties for their anticancer activities. *Eur J Med Chem* 2017; 125: 143-189.

Alagarsamy V, Meena S, Ramseshu KV, Solomon VR, Thirumurugan K, Dhanabal K, Murugan M. Synthesis, analgesic, anti-inflammatory, ulcerogenic index and antibacterial activities of novel 2-methylthio-3-substituted-5,6,7,8-tetrahydrobenzo (*b*) thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones. *Eur J Med Chem* 2006; 41: 1293-1300.

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12: 413-420.

Amin ML. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insights* 2013; 7: 27-34.

Anastassova NO, Mavrova AT, Yancheva DY, Kondeva-Burdina MS, Tzankova VI, Stoyanov SS, Shivachev BL, Nikolova RP. Hepatotoxicity and antioxidant activity of some new N,N'-disubstituted benzimidazole-2-thiones, radical scavenging mechanism and structure-activity relationship. *Arab J Chem* 2018; 11: 353-369.

Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SRC. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 1365-1374.

Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res* 1990; 67: 871-885.

Apostolov EO, Soultanova I, Savenka A, Bagandov OO, Yin X, Stewart AG, Walker RB, Basnakian AG. Deoxyribonuclease I is essential for DNA fragmentation induced by gamma radiation in mice. *Radiat Res* 2009; 172: 481-492.

Bach MK. The inhibition of deoxyribonucleotidyl transferase, DNAase and RNAase by sodium poly ethenesulfonic acid. Effect of the molecular weight of the inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1964; 91: 619-626.

Bansal Y, Silakari O. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 6208-6236.

Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human deoxyribonucleases. *Biochem (Mosc)* 2004; 69: 587-601.

Basnakian AG, Apostolov EO, Yin X, Napirei M, Mannherz HG, Shah SV. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by deoxyribonuclease I. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 697-702.

Batchelor HK, Kendall R, Desset-Brethes S, Alex R, Ernest TB, European Paediatric Formulation Initiative. Application of *in vitro* biopharmaceutical methods in development of immediate release oral dosage forms intended for paediatric patients. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85: 833-842.

Bickler SW, Heinrich MC, Bagby GC. Magnesium-dependent thermostability of DNase I. *BioTechniques* 1992; 13: 64-66.

Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol* 2017; 14: 470-485.

Blat Y. Non-competitive inhibition by active site binders. *Chem Biol Drug Des* 2010; 75: 535-540.

Blikstad I, Markey F, Carlsson L, Persson T, Lindberg U. Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I. *Cell* 1978; 15: 935-943.

Bondžić BP, Džambaski Z, Bondžić AM, Marković R. π -Annulation reactions of 4-thiazolidinone enamines in the synthesis of fused bi- and tri-cyclic compounds. *Tetrahedron* 2012; 68: 9556-9565.

Broccatelli F, Carosati E, Neri A, Frosini M, Goracci L, Oprea TI, Cruciani G. A novel approach for predicting P-glycoprotein (ABCB1) inhibition using molecular interaction fields. *J Med Chem* 2011; 54: 1740-1751.

Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 245-251.

Chen L, Li Y, Zhao Q, Peng H, Hou T. ADME evaluation in drug discovery. 10. Predictions of P-glycoprotein inhibitors using recursive partitioning and naive Bayesian classification techniques. *Mol Pharm* 2011; 8: 889-900.

Chen WJ, Liao TH. 2-Nitro-5-thiosulfobenzoic acid as a novel inhibitor specific for deoxyribonuclease I. *Protein J* 2008; 27: 240-246.

DataWarrior, <http://www.openmolecules.org/datawarrior/> (pristupljeno avgusta 2018)

Di Fruscia P, Zacharioudakis E, Liu C, Moniot S, Laohasinnarong S, Khongkow M, Harrison IF, Koltsida K, Reynolds CR, Schmidtkunz K, Jung M, Chapman KL, Steegborn C, Dexter DT, Sternberg MJE, Lam EWF, Fuchter MJ. The discovery of a highly selective 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one SIRT2 inhibitor that is neuroprotective in an *in vitro* Parkinson's disease model. *ChemMedChem* 2015; 10: 69-82.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2009; 30: 293-342.

Doctor VM. Inhibition of deoxyribonuclease I of human serum *in vitro* by nitrogen mustard or leucocyte extracts. *Arch Biochem Biophys* 1962; 96: 475-478.

Donovan JL, Meyer AS, Waterhouse AL. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *J Agric Food Chem* 1998; 46: 1247-1252.

Drew HR. Structural specificities of five commonly used DNA nucleases. *J Mol Biol* 1984; 176: 535-557.

Džambaski Z, Marković R, Kleinpeter E, Baranac-Stojanović M. 2-Alkylidene-4-oxothiazolidine *S*-oxides: synthesis and stereochemistry. *Tetrahedron* 2013; 69: 6436-6447.

Ekins S, Crumb WJ, Sarazan RD, Wikel JH, Wrighton SA. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship for inhibition of human *ether-a-go-go*-related gene potassium channel. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 427-434.

Elder D, Holm R. Aqueous solubility: simple predictive methods (*in silico*, *in vitro* and bio-relevant approaches). *Int J Pharm* 2013; 453: 3-11.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.

Enoch SJ, Cronin MTD. A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent DNA binding. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40: 728-748.

Enoch SJ, Ellison CM, Schultz TW, Cronin MTD. A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent protein binding relevant to toxicity. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41: 783-802.

Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface areas as a sum of fragment-based contribution and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* 2000; 43: 3714-3717.

Eulitz D, Mannherz HG. Inhibition of deoxyribonuclease I by actin is to protect cells from premature cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 1511-1521.

Eun HM. Nucleases, in: *Enzymology primer for recombinant DNA technology*. Elsevier 1996; 145-232.

Fan D, Yang H, Li F, Sun L, Di P, Li W, Tang Y, Liu G. *In silico* prediction of chemical genotoxicity using machine learning methods and structural alerts. *Toxicol Res* 2018; 7: 211-220.

Food and Drug Administration. Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Food and Drug Administration, Rockville, MD 2000.

Fromm MF. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmac Ther* 2000; 38: 69-74.

Funakoshi A, Tsubota Y, Wakasugi H, Ibayashi H, Takagi Y. Purification and properties of human pancreatic deoxyribonuclease I. *J Biochem* 1977; 82: 1771-1777.

Funakoshi A, Wakasugi H, Nakamura M, Takagi Y, Ibayashi H. Biochemical and clinical studies on human pancreatic deoxyribonuclease I inhibitor. *Gastroenterol Jpn* 1980; 15: 592-599.

Gilbert LM, Overend WG, Webb M. The inhibition of pancreas deoxyribonuclease. *Exp Cell Res* 1951; 2: 349-365.

Goldin RD, Hunt NC, Clark J, Wickramasinghe SN. Apoptotic bodies in a murine model of alcoholic liver disease: reversibility of ethanol-induced changes. *J Pathol* 1993; 171: 73-76.

Gottesfeld JM, Adams NH, El-Badry AM, Moses V, Calvin M. The inhibition of deoxyribonuclease I by hydroxybiphenyls. *Biochim Biophys Acta* 1971; 228: 365-386.

Grbic S, Parojcic J, Djuric Z. Computer-aided biopharmaceutical characterization: gastrointestinal absorption simulation, in: *Computer-aided applications in pharmaceutical technology* 2013; 177-232.

Guérout M, Picot D, Abi-Ghanem J, Hartmann B, Baaden M. How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol* 2010; 6: e1001000.

Ha CE, Bhagavan NV. Enzymes and enzyme regulation, in: *Essentials of medical biochemistry: with clinical cases*. Academic Press 2011; 47-58.

Hallick RB, Chelm BK, Gray PW, Orozco Jr EM. Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res* 1977; 4: 3055-3064.

Heintz N. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 157-159.

Hendriks BS. Functional pathway pharmacology: chemical tools, pathway knowledge and mechanistic model-based interpretation of experimental data. *Curr Opin Chem Biol* 2010; 14: 489-497.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96: 736-749.

Higami Y, Shimokawa I. Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 125-132.

Hu QH, Wang C, Li JM, Zhang DM, Kong LD. Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake: renal organic ion transporter involvement. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: F1080-F1091.

Ilić BS, Kolarević A, Kocić G, Šmelcerović A. Ascorbic acid as DNase I inhibitor in prevention of male infertility. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 498: 1073-1077.

Inocencio C, Rivera D, Alcaraz F, Tomás-Barberán FA. Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in mediterranean countries. *Eur Food Res Technol* 2000; 212: 70-74.

Isacson O. On neuronal health. *Trends Neurosci* 1993; 16: 306-308.

Iwamori M, Suzuki H, Kimura T, Iwamori Y. Shedding of sulfated lipids into gastric fluid and inhibition of pancreatic DNase I by cholesterol sulfate in concert with bile acids. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1487: 268-274.

Jain AK, Vaidya A, Ravichandran V, Kashaw SK, Agrawal RK. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 3378-3395.

Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME, Khan A, Ashafaq M, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 2012; 210: 340-352.

Jones SJ, Worrall AF, Connolly BA. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues of bovine pancreatic deoxyribonuclease I. *J Mol Biol* 1996; 264: 1154-1163.

Jung CH, Lee JY, Cho CH, Kim CJ. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1599-1607.

Kenakin TP. Enzymes as drug targets, in: *Pharmacology in drug discovery*, First edition. Elsevier 2012; 105-124.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.

Khan RA, Khan MR, Sahreen S. CCl₄-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 178-183.

Kolarevic A, Yancheva D, Kocić G, Smelcerovic A. Deoxyribonuclease inhibitors. *Eur J Med Chem* 2014; 88: 101-111.

Kolarević A, Ilić BS, Anastassova N, Mavrova AT, Yancheva D, Kocić G, Šmelcerović A. Benzimidazoles as novel deoxyribonuclease I inhibitors. *J Cell Biochem* 2018; 119: 8937-8948.

Kolarević A, Ilić BS, Kocić G, Džambaski Z, Šmelcerović A, Bondžić BP. Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 4-thiazolidinone derivatives. *J Cell Biochem* 2019; 120: 264-274.

Kolarević A, Kocić G, Yancheva D, Šmelcerović A. *In silico* pharmacokinetic and toxicological study of DNase inhibitors. *Acta Med Median* 2016; 55: 5-13.

Kreuder V, Dieckhoff J, Sittig M, Mannherz HG. Isolation, characterisation and crystallization of deoxyribonuclease I from bovine and rat parotid gland and its interaction with rabbit skeletal muscle actin. *Eur J Biochem* 1984; 139: 389-400.

Kroemer RT. Structure-based drug design: Docking and scoring. *Curr Protein Pept Sci* 2007; 8: 312-328.

Kurnick NB, Schwartz LI, Pariser S, Lee SL. A specific inhibitor for human deoxyribonuclease and an inhibitor of the lupus erythematosus cell phenomenon from leucocytes. *J Clin Invest* 1953; 32: 193-201.

Lahm A, Suck D. DNase I-induced DNA conformation: 2 Å structure of a DNase I-octamer complex. *J Mol Biol* 1991; 222: 645-667.

Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; 71: 4742-4746.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95-99.

Liao TH, McKenzie LJ. Inactivation of bovine pancreatic DNase by 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid. I. A novel inhibitor for DNase I. *J Biol Chem* 1979; 254: 9598-9601.

Lindberg MU, Skoog L. Purification from calf thymus of an inhibitor of deoxyribonuclease I. *Eur J Biochem* 1970; 13: 326-335.

Lindberg MU. Crystallization from calf spleen of two inhibitors of deoxyribonuclease I. *J Biol Chem* 1966; 241: 1246-1249.

Lindberg U. Purification from calf spleen of two inhibitors of deoxyribonuclease I. Physical and chemical characterization of the inhibitor II. *Biochemistry* 1967; 6: 323-335.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 4-17.

Liu L, Azhar G, Gao W, Zhang X, Wei JY. Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: age-associated differences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 275: R315-R322.

Love JD, Hewitt RR. The relationship between human serum and human pancreatic DNase I. *J Biol Chem* 1979; 254: 12588-12594.

Määttä KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: *Ribes* species. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 6736-6744.

Makris DP, Rossiter JT. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3216-3222.

Marković R, Baranac M, Džambaski Z, Stojanović M, Steel PJ. High regioselectivity in the heterocyclization of β -oxonitriles to 4-oxothiazolidines: X-ray structure proof. *Tetrahedron* 2003; 59: 7803-7810.

Marković R, Pergal MM, Baranac M, Stanisavljev D, Stojanović M. An expedient solvent-free synthesis of (Z)-2-alkylidene-4-oxothiazolidine derivatives under microwave irradiation. *Arkivoc* 2006; 2: 83-90.

Maruyama T, Sonokawa S, Matsushita H, Goto M. Inhibitory effects of gold(III) ions on ribonuclease and deoxyribonuclease. *J Inorg Biochem* 2007; 101: 180-186.

Mavrova AT, Dimov S, Yancheva D, Kolarević A, Ilić BS, Kocić G, Šmelcerović A. Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidines. *Bioorg Chem* 2018; 80: 693-705.

Mavrova AT, Yancheva D, Anastassova N, Anichina K, Zvezdanovic J, Djordjevic A, Markovic D, Smelcerovic A. Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles. *Bioorg Med Chem* 2015; 23: 6317-6326.

Molecular Operating Environment (MOE) 2014.0901; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2014.

Molinspiration, <http://www.molinspiration.com/> (pristupljeno avgusta 2018)

Moretti E, Mazzi L, Terzuoli G, Bonechi C, Iacoponi F, Martini S, Rossi C, Collodel G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod Toxicol* 2012; 34: 651-657.

Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 2000; 455: 29-60.

Napirei M, Basnakian AG, Apostolov EO, Mannherz HG. Deoxyribonuclease 1 aggravates acetaminophen-induced liver necrosis in male CD-1 mice. *Hepatology* 2006; 43: 297-305.

Narasimhan B, Sharma D, Kumar P. Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety. *Med Chem Res* 2012; 21: 269-283.

Nass K, Frenkel GD. A deoxyribonucleic acid binding protein from KB cells which inhibits deoxyribonuclease activity on single-stranded DNA. *J Biol Chem* 1979; 254: 3407-3410.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*, fourth edition, 2004.

Nishimuro H, Ohnishi H, Sato M, Ohnishi-Kameyama M, Matsunaga I, Naito S, Ippoushi K, Oike H, Nagata T, Akasaka H, Saitoh S, Shimamoto K, Kobori M. Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients* 2015; 7: 2345-2358.

Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, Li B, Leri A, Li P, Mogul D, Gambert SR, Kajstura J, Anversa P. Intracellular calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 519-535.

Ogawara H, Horikawa S, Yanagida T, Nakano MM, Andoh T, Ishii K, Hori M, Goto TA, Hamada M, Umezawa H. A novel deoxyribonuclease inhibitor from *Micromonospora*. *J Antibiot* 1982; 35: 248-250.

Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R, Puccetti A. DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2001; 31: 743-751.

Oliveri M, Daga A, Lunardi C, Navone R, Millo R, Puccetti A. DNase I behaves as a transcription factor which modulates Fas expression in human cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 273-279.

Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res* 1991; 68: 1560-1568.

Oomah BD, Mazza G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 1746-1750.

Ostrakhovitch EA, Afanas'ev IB. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 743-746.

Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx* 2005; 2: 541-553.

Pan CQ, Ulmer JS, Herzka A, Lazarus RA. Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: Implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci* 1998; 7: 628-636.

Parojčić J, Ibrić S, Đurić Z. *Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom, priručnik za praktičnu nastavu*. Beograd, 2006.

Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 1993; 12: 371-377.

Pohl FM, Thomae R, Karst A. Temperature dependence of the activity of DNA-modifying enzymes: endonucleases and DNA ligase. *Eur J Biochem* 1982; 123: 141-152.

Polzar B, Peitsch MC, Loos R, Tschopp J, Mannherz HG. Overexpression of deoxyribonuclease I (DNase I) transfected into COS-cells: its distribution during apoptotic cell death. *Eur J Cell Biol* 1993; 62: 397-405.

Potter JL, Laurila UR, Laskowski M. Studies of the specificity of deoxyribonuclease I I. Hydrolysis of a trinucleotide. *J Biol Chem* 1958; 233: 915-916.

Prasanna S, Doerksen RJ. Topological polar surface area: a useful descriptor in 2D-QSAR. *Curr Med Chem* 2009; 16: 21-41.

Price KR, Rhodes MJC, Barnes KA. Flavonol glycoside content and composition of tea infusions made from commercially available teas and tea products. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 2517-2522.

Price PA. Characterization of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ binding to bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J Biol Chem* 1972; 247: 2895-2899.

Price PA. The essential role of Ca^{2+} in the activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J Biol Chem* 1975; 250: 1981-1986.

Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. *Molecules* 2017; 22: 1192.

Rauch F, Polzar B, Stephan H, Zanotti S, Paddenberg R, Mannherz HG. Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J Cell Biol* 1997; 137: 909-923.

Romani A, Mulinacci N, Pinelli P, Vincieri FF, Cimato A. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 964-967.

Rosenbaum DM, Kalberg J, Kessler JA. Superoxide dismutase ameliorates neuronal death from hypoxia in culture. *Stroke* 1994; 25: 857-862.

Rudnitskaya A, Török B, Török M. Molecular docking of enzyme inhibitors: a computational tool for structure-based drug design. *Biochem Mol Biol Educ* 2010; 38: 261-265.

Salahuddin, Shaharyar M, Mazumder A. Benzimidazoles: a biologically active compounds. *Arab J Chem* 2017; 10: S157-S173.

Salnikow J, Moore S, Stein WH. Comparison of the multiple forms of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J Biol Chem* 1970; 245: 5685-5690.

Samejima K, Earnshaw WC. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 677-688.

Sanyal A, O'Driscoll SW, Bolander ME, Sarkar G. An effective method of completely removing contaminating genomic DNA from an RNA sample to be used for PCR. *Mol Biotechnol* 1997; 8: 135-137.

Sauvant MP, Pepin D, Piccinni E. *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere* 1999; 38: 1631-1669.

Schildkraut I. Nuclease, in: *Encyclopedia of genetics* 2001; 1357-1358.

Shiokawa D, Tanuma SI. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase γ during apoptosis. *Biochemistry* 2001; 40: 143-152.

Spitzer S, Eckstein F. Inhibition of deoxyribonucleases by phosphorothioate groups in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 11691-11704.

Stojanović M, Marković R, Kleinpeter E, Baranac-Stojanović M. *endo*-Mode cyclizations of vinylogous *N*-acyliminium ions as a route to the synthesis of condensed thiazolidines. *Tetrahedron* 2011; 67: 9541-9554.

Suck D, Oefner C. Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature* 1986; 321: 620-625.

Szopa J, Wagner KG. Purification and properties of a DNase inhibitor from *Nicotiana tabacum* cell cultures. *Eur J Biochem* 1980; 111: 211-215.

Takeda M, Fukuoka K, Endou H. Cisplatin-induced apoptosis in mouse proximal tubular cell line, in: Koide H, Ichikawa I (eds) *Progression of chronic renal diseases*. Contrib Nephrol, Basel, Karger 1996; 118: 24-28.

Takeda M, Kobayashi M, Shirato I, Endou H. Involvement of macromolecule synthesis, endonuclease activation and *c-fos* expression in cisplatin-induced apoptosis of mouse proximal tubule cells. *Toxicol Lett* 1998; 94: 83-92.

Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 426-433.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.

Toxtree, v.2.6.13 (pristupljeno avgusta 2018)

Tunis M, Regelson W. A comparative study of the inhibiting effects of anionic polyelectrolytes on deoxyribonucleases. *Arch Biochem Biophys* 1963; 101: 448-455.

Van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; 1: 175-185.

Vanecko S, Laskowski M. Studies of the specificity of deoxyribonuclease I III. Hydrolysis of chains carrying a monoesterified phosphate on carbon 5'. *J Biol Chem* 1961; 236: 3312-3316.

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.

Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3495-3500.

Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, Gao Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: a review. *Trends Food Sci Technol* 2016; 56: 21-38.

Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Lett* 1996; 109: 185-191.

Woegerbauer M, Burgmann H, Davies J, Graninger W. DNase I induced DNA degradation is inhibited by neomycin. *J Antibiot* 2000; 53: 276-285.

Yamada Y, Fujii T, Ishijima R, Tachibana H, Yokoue N, Takasawa R, Tanuma SI. DR396, an apoptotic DNase γ inhibitor, attenuates high mobility group box 1 release from apoptotic cells. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 168-171.

Yang J, Guo J, Yuan J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci Technol* 2008; 41: 1060-1066.

Yao M, Keogh A, Spratt P, dos Remedios CG, Kießling PC. Elevated DNase I levels in human idiopathic dilated cardiomyopathy: an indicator of apoptosis? *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 95-101.

Yasuda T, Takeshita H, Ueki M, Iida R, Nakajima T, Mori S, Mogi K, Kaneko Y, Kishi K. Tissue-specific *in vivo* inhibition of DNase I gene expression by somatostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 287-291.

Yin X, Apostolov EO, Shah SV, Wang X, Bogdanov KV, Buzder T, Stewart AG, Basnakian AG. Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2544-2553.

Yoo H, Ku SK, Baek YD, Bae JS. Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. *Inflamm Res* 2014; 63: 197-206.

Zeleznick LD, Sweeney CM. Inhibition of deoxyribonuclease action by nogalamycin and U-12241 by their interaction with DNA. *Arc Biochem Biophys* 1967; 120: 292-295.

Zhou Z, Zhu C, Ren J, Dong S. A graphene-based real-time fluorescent assay of deoxyribonuclease I activity and inhibition. *Anal Chim Acta* 2012; 740: 88-92.

Zhu B, Gong Y, Chen P, Zhang H, Zhao T, Li P. Increased DNase I activity in diabetes might be associated with injury of pancreas. *Mol Cell Biochem* 2014; 393: 23-32.

BIOGRAFIJA AUTORA

Lični podaci

Ana Kolarević je rođena 02.04.1989. godine u Nišu.

Podaci o dosadašnjem obrazovanju

Osnovnu školu „Učitelj Tasa” i srednju medicinsku školu „Dr Milenko Hadžić”, smer farmaceutski tehničar, završila je u Nišu sa Vukovom diplomom.

Integrisane akademske studije farmacije na Medicinskom fakultetu u Nišu upisala je 2008. godine, a završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,81 i time stekla akademski naziv magistar farmacije.

Doktorske akademske studije, odsek farmaceutske nauke, na Medicinskom fakultetu u Nišu upisala je 2013. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10.

Nagrade i stipendije

Proglašena je za najboljeg diplomiranog studenta integrisanih akademskih studija farmacije na Medicinskom fakultetu u Nišu u akademskoj 2012/2013. godini.

Bila je korisnik stipendije Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka za školsku 2010/2011. i 2011/2012. godinu, stipendije Fonda za mlade talente Republike Srbije za najbolje studente završnih godina za školsku 2012/2013. godinu, i stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja za studente doktorskih akademskih studija od 2014. do 2016. godine.

Profesionalna karijera

Od 01.06.2016. godine je zaposlena na Medicinskom fakultetu u Nišu, najpre kao saradnik u nastavi, a zatim kao asistent, za užu naučnu oblast Farmacija – Osnovi farmaceutske biotehnologije i Biofarmacija.

Učešće u naučno-istraživačkim projektima

Od 2017. godine je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Dobijanje, fizičko-hemijska karakterizacija, analitika i biološka aktivnost farmakološki aktivnih supstanci” (evidencioni broj projekta: OI 172044; rukovodilac projekta prof. dr Andrija Šmelcerović), kao i na internom projektu Medicinskog fakulteta u Nišu pod nazivom „Dizajn, sinteza i biološka evaluacija novih inhibitora medicinski značajnih enzima” broj 4 čiji je rukovodilac doc. dr Jelena Lazarević.

BIBLIOGRAFIJA AUTORA

Ana Kolarević je publikovala dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorija M21), četiri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorija M22), dva rada u međunarodnim časopisima (kategorija M23) i jedan rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (kategorija M51). Zvezdicom su označeni radovi iz doktorske disertacije.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu – M21

1. * Anelia Ts. Mavrova, Stefan Dimov, Denitsa Yancheva, **Ana Kolarević**, Budimir S. Ilić, Gordana Kocić, Andrija Šmelcerović (2018). Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidines. *Bioorganic Chemistry*, 80, 693-705. (IF₂₀₁₇=3,929; IF₅=3,390)
2. * **Ana Kolarevic**, Denitsa Yancheva, Gordana Kocic, Andrija Smelcerovic (2014). Deoxyribonuclease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 88, 101-111. (IF₂₀₁₄=3,447; IF₅=3,946)

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu – M22

1. * **Ana Kolarević**, Budimir S. Ilić, Gordana Kocić, Zdravko Džambaski, Andrija Šmelcerović, Bojan P. Bondžić (2019). Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 4-thiazolidinone derivatives. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(1), 264-274. (IF₂₀₁₇=2,959; IF₅=3,132)
2. * **Ana Kolarević**, Budimir S. Ilić, Neda Anastassova, Anelia Ts. Mavrova, Denitsa Yancheva, Gordana Kocić, Andrija Šmelcerović (2018). Benzimidazoles as novel deoxyribonuclease I inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(11), 8937-8948. (IF₂₀₁₇=2,959; IF₅=3,132)
3. * Budimir S. Ilić, **Ana Kolarević**, Gordana Kocić, Andrija Šmelcerović (2018). Ascorbic acid as DNase I inhibitor in prevention of male infertility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 1073-1077. (IF₂₀₁₇=2,559; IF₅=2,455)

4. Andrija Smelcerovic, Filip Miljkovic, **Ana Kolarevic**, Jelena Lazarevic, Aleksandra Djordjevic, Gordana Kocic, Marko Anderluh (2015). An overview of recent dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: Linking their structure and physico-chemical properties with SAR, pharmacokinetics and toxicity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(23), 2342-2372. (IF₂₀₁₅=2,900; IF₅=2,998)

Rad u međunarodnom časopisu – M23

1. Jelena Lazarević, **Ana Kolarević**, Aleksandra Đorđević, Gordana Stojanović, Andrija Šmelcerović, Pierangela Ciuffreda, Enzo Santaniello (2017). Synthesis, antimicrobial activity and *in silico* studies on thymol esters. *Acta Chimica Slovenica*, 64(3), 603-612. (IF₂₀₁₇=1,104; IF₅=0,990)
2. Marija Vukelić-Nikolić, **Ana Kolarević**, Katarina Tomović, Denitsa Yancheva, Emiliya Cherneva, Stevo Najman, Andrija Šmelcerović (2015). Effects on MC3T3-E1 cells and *in silico* toxicological study of two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones. *Natural Product Communications*, 10(8), 1423-1426. (IF₂₀₁₅=0,884; IF₅=0,927)

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja – M51

1. * **Ana Kolarević**, Gordana Kocić, Denitsa Yancheva, Andrija Šmelcerović (2016). *In silico* pharmacokinetic and toxicological study of DNase inhibitors. *Acta Medica Medianae*, 55(4), 5-13.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**ИНХИБИЦИЈА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЕ I ДЕРИВАТИМА ТИАЗОЛИДИНА,
БЕНЗИМИДАЗОЛА, 4*H*-ХРОМЕНА И 5,6,7,8-
ТЕТРАХИДРОБЕНЗО[4,5]ТИЕНО[2,3-*d*]ПИРИМИДИНА У *IN VITRO*
УСЛОВИМА**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Ана Коларевић

Ана Н. Коларевић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ
ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ИНХИБИЦИЈА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЕ I ДЕРИВАТИМА ТИАЗОЛИДИНА,
БЕНЗИМИДАЗОЛА, 4*H*-ХРОМЕНА И 5,6,7,8-
ТЕТРАХИДРОБЕНЗО[4,5]ТИЕНО[2,3-*d*]ПИРИМИДИНА У *IN VITRO*
УСЛОВИМА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Ана Н. Коларевић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИНХИБИЦИЈА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЕ I ДЕРИВАТИМА ТИАЗОЛИДИНА, БЕНЗИМИДАЗОЛА, 4*H*-ХРОМЕНА И 5,6,7,8- ТЕТРАХИДРОБЕНЗО[4,5]ТИЕНО[2,3-*d*]ПИРИМИДИНА У *IN VITRO* УСЛОВИМА

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Ана Н. Коларевић