

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Nikola R. Stevanović

**POLIDENTATNE ŠIFOVE BAZE I
NJIHOVI Cu(II) KOMPLEKSI:
LIPOFILNOST I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Nikola R. Stevanović

**POLYDENTATE SCHIFF BASES AND
THEIR Cu(II) COMPLEXES:
LIPOPHILICITY AND BIOLOGICAL
ACTIVITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor:

dr **Rada Baošić**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr **Živoslav Tešić**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr **Mario Zlatović**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr **Danijela Apostolović**, naučni saradnik,

researcher, Department of Medicine,

Solna Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

dr **Slaviša Stanković**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr **Sandra Arandelović**, viši naučni saradnik

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane:

U Beogradu, _____2018.

ZAHVALNICA

Ova teza je urađena na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Rade Baošić.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr Radi Baošić za strpljenje, pomoć i podršku, kako tokom eksperimentalnog rada, tako i tokom pisanja ove disertacije.

Zahvalan sam dr Sandri Arandjelović, prof. dr Živoslavu Tešiću i prof. dr Slaviši Stankoviću na pažljivom čitanju i analizi ove teze.

Zahvaljujem se dr Danijeli Apostolović i prof. dr Mariu Zlatoviću koji su mi dali dragocene smernice i praktične savete tokom eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se kolegama sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, posebno Danici Perušković, dr Urošu Gašiću, prof. dr Aleksandru Loliću, prof. dr Milošu Milčiću i svima onima koji su mi pomagali tokom doktorskih studija.

Polidentatne Šifove baze i njihovi Cu(II) kompleksi: lipofilnost i biološka aktivnost

Šifove baze i njihovi kompleksi pokazuju različitu biološku aktivnost poput antiviralne, antimikrobne, antimalarijske i antikancerske. Zbog činjenice da biološka aktivnost jedinjenja zavisi prvenstveno od lipofilnosti molekula, što je posledica strukture jedinjenja, određivanje i korelacija lipofilnosti sa hemijskom strukturom, kao i određivanje biološke aktivnosti su postali nezaobilazni u sintezi novih lekova.

Primenom reverzno-fazne tankoslojne hromatografije određivana je lipofilnost za 21 Šifovu bazu (12 tetradentatnih i 9 aromatičnih baza). Primenom jedno- i dvokomponentnih organskih modifikatora kao mobilnih faza određeni su retencioni parametri kao mere lipofilnosti. Ispitivan je uticaj primenjenog organskog modifikatora na postupak određivanja. Molekulski deskriptori i parametri lipofilnosti su podvrgnuti multivarijantnoj statističkoj analizi za svaki sistem rastvarača. Analiza glavnih komponenata je urađena za određivanje faktora koji ima najveći uticaj na lipofilnost. Najbolje odvajanje strukturno sličnih jedinjenja je dobijeno primenom metanola kao organskog modifikatora. Primenom tetrahidrofurana kao organskog modifikatora u mobilnoj fazi utvrđeno je da se strukturno različita jedinjenja mogu smatrati homolozima. Tako određena lipofilnost najviše odgovara lipofilnosti u realnim sistemima, npr. pri prolasku molekula kroz ćelijsku membranu.

Uticaj različitih supstituenata na lipofilnost je ispitivan na 36 jedinjenja (12 Šifovih baza i njihovi Cu(II) i Ni(II) kompleksi). U cilju određivanja odnosa strukture i retencije rađena je i normalno-fazna i reverzno-fazna tankoslojna hromatografija. Molekulski deskriptori, koji opisuju promene u molekulskoj strukturi i njihov uticaj na lipofilnost, podvrgnuti su višestrukoj regresionoj analizi. Utvrđeno je da voluminoznije grupe i grupe sa jače izraženim induktivnim efektom povećavaju lipofilnost. Takođe, diaminski most, sa propilenskom grupom, doprinosi povećanju hidrofobnosti ispitivanih jedinjenja. Na osnovu molekulskih deskriptora, parametara retencije i lipofilnosti postavljeni su modeli kvantitativnog odnosa strukture i retencije (QSRR) i kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (QSAR).

Atimikrobna aktivnost tetradentatnih Šifovih baza i njihovih Cu(II) kompleksa je određena u odnosu na *S. Cerevisiae*, *C. Albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Cu(II) kompleksi su pokazali veću antimikrobnu aktivnost u

odnosu na odgovarajuće Šifove baze. Citotoksični efekat prema Caco-2 ćelijama je ispitivan za komplekse [Cu(*acac*₂ en)], [Cu(*phacac*₂ en)], [Cu(*acac*₂ pn)] i [Cu(*tfacac*₂ pn)], koji su pokazali nižu minimalnu inhibitornu koncentraciju za antimikrobnu aktivnost u poređenju sa ostalim jedinjenjima. Antikancerska aktivnost ovih kompleksa je ispitana pomoću MTT i Aneksin V eseja. Svi posmatrani kompleksi imaju antikancersku aktivnost i ne utiču na zdrave ćelije u koncentraciji u kojoj ispoljavaju citotoksičnost prema ćelijama raka. Kompleks [Cu(*acac*₂ pn)] je pokazao da ima i stabilizujući efekat na zdrave ćelije.

Afinitet vezivanja kompleksa [Cu(*acac*₂ en)], [Cu(*phacac*₂ en)] i [Cu(*acac*₂ pn)] za humani serum albumin (HSA) je ispitan pomoću cirkularnog dihroizma i fluorescentne spektroskopije. Svi kompleksi su pokazali visok afinitet vezivanja prema HSA, pokazujući da ova jedinjenja grade nekovalentne komplekse sa HSA uz manje promene u sekundarnoj strukturi HSA. Rezultati molekuskog dokinga za kompleks [Cu(*acac*₂ pn)] ukazuje da se vezivno mesto nalazi na poddomenu IB HSA, gde dolazi do vezivanja pomoću Van der Valsovih i π -alkil interakcija. S obzirom na lipofilnost, antimikrobnu aktivnost, citotoksičnost i afinitet vezivanja za HSA ispitivani kompleksi [Cu(*acac*₂ en)], [Cu(*phacac*₂ en)] i [Cu(*acac*₂ pn)] se mogu transportovati do ciljanih ćelija, zbog čega bi mogli da se koriste kao potencijalne aktivne supstance u razvoju novih lekova.

Ključne reči: Šifove baze; lipofilnost; antimikrobna aktivnost; antikancerska aktivnost; citotoksičnost; molekulski doking; HSA.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

Polydentate Schiff Bases And Their Cu(II) Complexes: Lipophilicity And Biological Activity

Schiff bases and their complexes are versatile compounds which have various biological activities such as antiviral, antimicrobial, antimalarial, and anticancer activity. Biological activity of compounds depends on their molecular structure, especially lipophilic character. Determination of lipophilicity, its correlation with chemical structure, and biological activity is very important in drug design.

Retention parameter, as measure of lipophilicity, of 21 Schiff base (9 aromatic and 12 tetradentate Schiff bases) was determined by reversed-phased thin-layer chromatography (TLC), with application of mono- and two-component organic modifiers in a mixture with water as mobile phases. Influence of applied organic modifier on determination of lipophilicity was investigated. Molecular descriptors and lipophilicity parameters, for all solvent systems, were subjected to multivariate statistical analysis. Also, principal component analysis was done in order to determine the most influential factors regarding lipophilicity. The best separation of structurally similar compounds was obtained with methanol, as organic modifier. When tetrahydrofuran is used, as organic modifier in mobile phase, all the investigated compounds can be regarded as homologues. Lipophilicity, determined in this way, is adequate to lipophilicity in real environment, such as passing through the cell membrane.

The lipophilicity of tetradentate Schiff bases and their Copper(II) and Nickel(II) complexes, and its changes caused by successive substitution in compounds, was investigated to gain insight into structure-retention relationships and to propose a model for estimating their retention. Chromatographic investigation of 36 compounds (12 tetradentate Schiff bases and their Copper(II) and Nickel(II) complexes), was performed by both normal-phased and reverse-phased TLC. Molecular descriptors, which describe change in molecular structure caused by successive substitution of groups in compound, and their influence on lipophilicity were determined by multiple regression analysis. More voluminous groups with stronger inductive effect increase lipophilicity. Also, diamine bridge with propylene group contributes to hydrophobicity of investigated compounds. Based on molecular descriptors, retention and lipophilicity parameters, quantitative-structure-retention-relationship (QSRR) and quantitative-structure-activity-relationship (QSAR) models were established.

Furthermore, antimicrobial activity of tetradentate Schiff bases and their Copper(II)

complexes was determined against *S. Cerevisiae*, *C. Albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Copper(II) complexes showed wider range and stronger antimicrobial activity compared to corresponding Schiff bases. Complexes [Cu(*acac*₂ en)], [Cu(*phacac*₂ en)], [Cu(*acac*₂ pn)], and [Cu(*tfacac*₂ pn)] had lower minimal inhibitory concentration than other compounds and furthermore, their cytotoxic effect towards human colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) was investigated. Anticancer activity of these complexes was evaluated by MTT assay and Annexin V assay. All complexes showed anticancer activity and didn't affect healthy cells in the same concentration as for cancer cells. Complex [Cu(*acac*₂ pn)] show stabilizing effect on healthy cells.

The binding affinity of complexes [Cu(*acac*₂ en)], [Cu(*phacac*₂ en)] and [Cu(*acac*₂ pn)] to human serum albumin (HSA), as drug delivery system, was investigated by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. All complexes showed high binding affinity toward HSA, revealing that these compounds formed non-covalent complex with HSA with minor changes in secondary structure of HSA. Molecular docking results for complex [Cu(*acac*₂ pn)] indicated that binding site is located in subdomain IB of HSA where the binding is occurring with Van der Waals and π -alkyl interactions.

According to the lipophilicity, antimicrobial activity, cytotoxicity, and binding affinity to HSA, complexes [Cu(*acac*₂ en)], [Cu(*phacac*₂ en)], and [Cu(*acac*₂ pn)] could be delivered to the target cells, showing that they are suitable for further investigations as potential drugs.

Keywords: Schiff base; lipophilicity; antimicrobial activity; anticancer activity; cytotoxicity; binding affinity; molecular docking; HSA.

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

UDC Number: 543

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ciljevi	2
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Šifove baze	3
2.2. Kompleksi Šifovih baza sa jonima metala	5
2.3. Primena Šifovih baza i njihovih kompleksa sa jonima metala	6
2.3.1. Primena Šifovih baza u biološkim procesima	9
2.3.2. Primena Šifovih baza i njihovih kompleksa sa metalima u farmaciji	10
2.3.2.1. Antibakterijska aktivnost	10
2.3.2.2. Antifungalna aktivnost	11
2.3.2.3. Antimalarici	13
2.3.2.4. Antiviralni terapeutici	13
2.3.2.5. Antikancerska aktivnost	14
2.4. Hromatografija	15
2.5. Lipofilnost i njen značaj u dizajnu novih lekova	18
2.5.1. Određivanje lipofilnosti	20
2.6. Kvantitativna veza između strukture, aktivnosti i retencije molekula	23
2.7. Eseji za merenje vijabilnosti i proliferacije ćelija kao i evaluaciju apoptoze	27
2.8. Metode za proučavanje protein-ligand interakcija	30
2.8.1. Spektrofluorimetrija	30
2.8.2. CD spektroskopija	31
2.8.3. Molekulski doking	31
3. NAŠI RADOVI	33
3.1. Ispitivanje uticaja organskog modifikatora na određivanje lipofilnosti	33
3.1.1. Materijal i metode	33
3.1.1.1. Ispitivana jedinjenja	33
3.1.1.2. Hromatografija	36
3.1.1.3. Izračunavanja	37
3.1.2. Rezultati i diskusija	38
3.1.2.1. Šifove baze derivati β -diketona	40
3.1.2.1.1. Korelacija eksperimentalno određenih i izračunatih parametara lipofilnosti	46

3.1.2.2. Šifove baze derivati aromatičnih karbonilnih jedinje	48
3.1.2.2.1. Korelacija eksperimentalno određenih i izračunatih parametara lipofilnosti	54
3.2. Ispitivanje uticaja supstituenata na predviđanje retencije	57
3.2.1. Materijal i metode	57
3.2.1.1. Ispitivana jedinjenja	57
3.2.1.2. Hromatografija	58
3.2.1.3. Izračunavanja	59
3.2.2. Rezultati i diskusija	59
3.2.2.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)	59
3.2.2.1.1. PCA kompleksnih jedinjenja	60
3.2.2.1.2. PCA Šifovih baza	62
3.2.2.2. Kvantitativni odnos strukture i retencije (QSSR)	64
3.2.2.2.1. QSRR kompleksa	65
3.2.2.2.2. QSRR Šifovih baza	65
3.2.2.2.3. QSRR/QSAR kompleksa	66
3.3. Ispitivanje biološke aktivnosti	68
3.3.1. Antimikrobna aktivnost	68
3.3.1.1. Materijal i metode	68
3.3.1.2. Rezultati i diskusija	69
3.3.2. Citotoksični efekat Cu(II) kompleksa Šifovih baza	70
3.3.2.1. Materijal i metode	71
3.3.2.1.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija iz periferne krvi	71
3.3.2.1.2. Aneksin V esej (esej vijabilnosti i apoptoze)	72
3.3.2.1.3. MTT esej	72
3.3.2.2. Rezultati	73
3.3.2.2.1. Uticaj Cu(II) kompleksa Šifovih baza na citotoksičnost Caco-2 ćelija	73
3.3.2.2.2. Apoptotski efekat Cu(II) kompleksa Šifovih baza i poređenje uticaja na zdrave i kancerske ćelije	74
3.3.2.2. Diskusija	79
3.4. Vezujući afinitet Cu(II) kompleksa Šifovih baza za humani serum albumin: Eksperimentalni i teorijski pristup	83
3.4.1. Materijal i metode	84

3.4.1.1. Određivanje koncentracije proteina	84
3.4.1.2. Fluorescentna spektroskopija	84
3.4.1.3. Analiza gašenja fluorescencije HSA sa Cu(II) kompleksima Šifovih baza	85
3.4.1.4. CD spektroskopija	85
3.4.1.5. Molekulsko modelovanje i molekularni doking	86
3.4.2. Rezultati	87
3.4.2.1. Interakcije Cu(II) kompleksa Šifovih baza sa HSA	87
3.4.2.2. Uticaj vezivanja Cu(II) kompleksa Šifovih baza na sekundarne strukture HSA	89
3.4.2.3. Molekulski doking [Cu(acac ₂ pn)] za HSA protein	91
3.4.3. Diskusija	93
4. ZAKLJUČCI	96
5. LITERATURA	97
6. PRILOG	123

1. UVOD

Šifove baze ili imini su analozi aldehida i ketona kod kojih je karbonilna zamenjena iminskom grupom. Nastaju kondenzacijom primarnih amina i karbonilnih jedinjenja (aldehida ili ketona). Šifove baze su bidentatni, tridentatni ili polidentatni ligandi koji mogu da formiraju vrlo stabilne komplekse sa prelaznim metalima. Šifove baze i njihovi kompleksi imaju veliku primenu u organskoj i analitičkoj hemiji, industriji hrane i boja, biološkim procesima kao i u farmaciji. Postoje brojna istraživanja koja ispituju primenu Šifovih baza kao terapeutika, potencijalnih lekova, dijagnostičkih proba i analitičkih oruđa. Postoje brojna istraživanja koja ispituju primenu Šifovih baza kao potencijalnih lekova. Aktivnost Šifovih baza kao antikancerskih, antibakterijskih i antiviralnih terapeutika je intenzivno proučavana.

Direktna veza fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja i pasivnog prolaska jedinjenja kroz biološke membrane je lipofilnost. Pored toga lipofilnost utiče i na uspostavljanje interakcija biološki aktivnog jedinjenja i aktivnog mesta receptora. Biološka aktivnost molekula je uslovljena procesima njegove farmakokinetike i farmakodinamike, koji zavise od ponašanja molekula u nevodenoj i vodenoj sredini. Veza između strukture i aktivnosti jedinjenja se ispituje QSAR studijama (*Quantitative Structure-Activity Relationships*). QSAR omogućava da se na osnovu strukture jedinjenja i ispitanih bioloških aktivnosti, postavi model po kome može da se predvidi biološka aktivnost strukturno sličnih jedinjenja. Struktura je opisana brojnim molekulskim deskriptorima koji mogu biti strukturni (elektronski, topološki i geometrijski) i fizičko-hemijski (hidrofobni, sterni i elektronski).

Nekovalentne, reverzibilne interakcije molekula sa proteinima utiču na transport nekog leka do ciljnog mesta. Tehnike koje se primenjuju za detaljnu termodinamičku i kinetičku karakterizaciju protein-ligand interakcija su UV/VIS spektrofotometrija, CD spektroskopija, spektrofluorimetrija, termoforeza na mikroskali, izotermalna titraciona mikrokalorimetrija, rezonancija površinskog plazmona i molekulski doking.

Računarska metoda za *in silico* predviđanje afiniteta i načina vezivanja molekula, uglavnom liganada za biomolekule je molekulski doking koji na osnovu poznate 3D strukture proteina i liganada može da predvidi strukturu nastalog kompleksa, kao i mesto vezivanja. Zbog

možnosti pretraživanja velikih biblioteka molekula, u cilju pronalaska mogućih lekova, doking je našao primenu u dizajnu novih lekova.

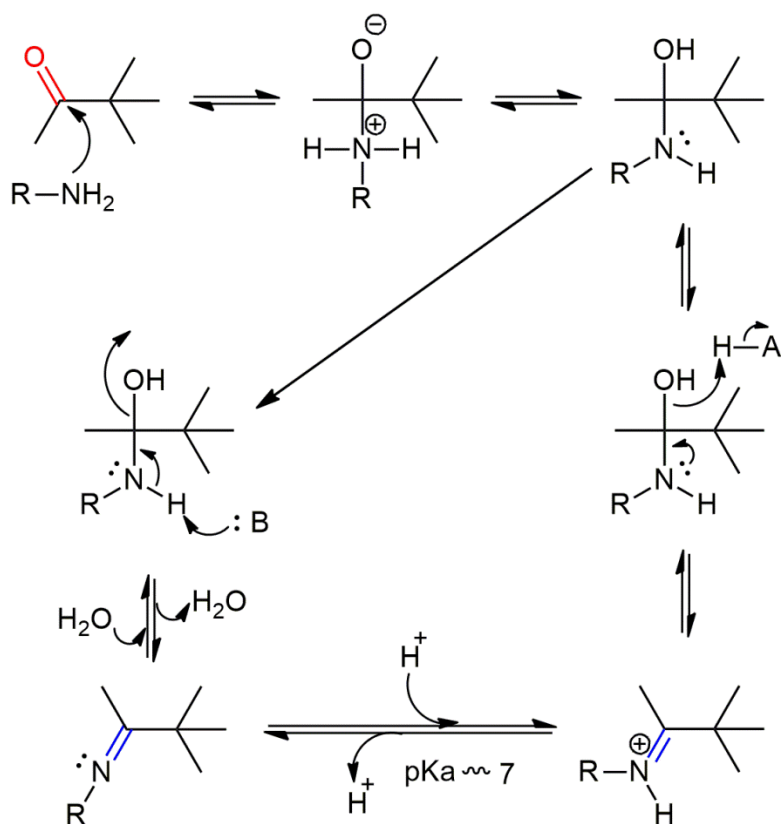
1.1. Ciljevi

- Ispitivanje uticaja primenjene mobilne faze na određivanje lipofilnosti ispitivanih jedinjenja. Pronalaska pogodnog organskog modifikatora, za strukturno različita i strukturno slična jedinjenja, u kojem će biti moguće odrediti lipofilnost ispitivanih jedinjenja.
- Ispitivanje uticaja strukture, na lipofilnost. Pronalaska deskriptora koji najbolje opisuju osobine molekula i kako sukcesivna supstitucija grupa i fine promene u strukturi dovode do promene lipofilnosti.
- Ispitivanje antimikrobne, antikancerske i antiproliferativne aktivnosti na različitim bakterijama i kvascima, kao i zdravim i kancerskim ćelijama. Uticaj strukture jedinjenja na određene biološke aktivnosti.
- Ispitivanje afiniteta vezivanja, kao i određivanje tipa interakcija ispitivanih jedinjenja sa humanim serum albuminom.

2. OPŠTI DEO

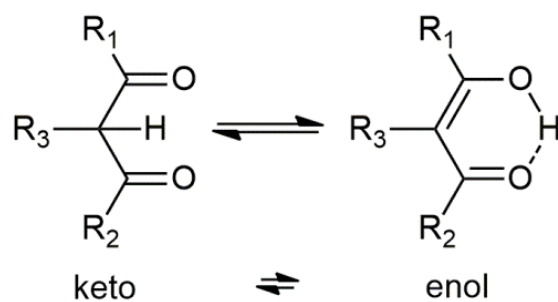
2.1. Šifove baze

Šifove baze su jedinjenja kod kojih je karbonilna grupa aldehida ili ketona zamenjena iminskom grupom, a dvostruka veza između atoma ugljenika i azota, u iminskoj grupi, preko atoma azota povezana sa alkil- ili aril- grupom, što ova jedinjenja čini izuzetno stabilnim (Garnovskii, Nivorozhkin, & Minkin, 1993; Layer, 1963; W. Qin, Long, Panunzio, & Biondi, 2013; Vollhardt & Schore, 2011). Šifove baze se još nazivaju anili i azometini. Nastaju kondenzacijom primarnih amina i karbonilnih jedinjenja (aldehida ili ketona) u prisustvu kiselog ili baznog katalizatora (**Slika 2.1**).



Slika 2.1. Sinteza Šifovih baza.

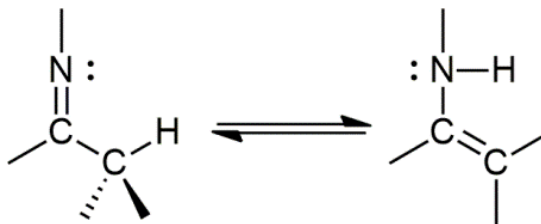
Svojstva dobijenog N-supstituisanog imina zavise kako od prirode amina, tako i od prirode karbonilnog jedinjenja primenjenog za sintezu. β -diketoni ($R_1COCHR_3COR_2$) su važna klasa karbonilnih jedinjenja pogodna za sintezu imina (Joshi & Pathak, 1977; Mehrotra, Bohra, & Gaur, 1978). Uticaj različitih supstituenata na osobine β -diketona je ispitivan od strane više autora (R. Baošić et al., 2008; R. M. Baošić, Milojković-Opsenica, & Tešić, 2003; Tešić, Janjić, Tošić, & Čelap, 1993). Za β -diketone, takođe je karakteristična keto-enolna tautomerizacija tipa prototropije (**Slika 2.2**).



Slika 2.2. Keto-enolna tautomerizacija β -diketona.

Atom vodonika CHR_3 grupe je aktiviran odgovarajućom $C=O$ grupom, što dovodi do premeštanja protona i stvaranja konjugovanog sistema. Prisustvo grupe sa negativnim induktivnim efektom u položaju R_1 i/ili R_2 pomera ravnotežu u korist enolnog oblika (Burdett & Rogers, 1964, 1966). Tautomerne forme β -diketona mogu se identifikovati primenom IR i NMR tehnika (Rogers & Burdett, 1965). Ukoliko je α -C atom u β -diketonu disupstituisan, enolizacija molekula nije moguća i shodno tome je nemoguće formiranje helatnih kompleksa sa jonima metala. Enolni tautomer je stabilizovan intramolekulskim vodoničnim vezama, pa je manje polaran od keto tautomera. Generalno, enolni tautomer reaguje sa odgovarajućim jonima metala formirajući helatne komplekse. Visoka stabilnost ovih kompleksa je posledica prisustva rezonance, slične onoj u benzenovom prstenu. Zbog čega se oni mogu posmatrati kao aromatični sistemi (Calvin & Wilson, 1945; P. Singh & Sahai, 1967a, 1967b).

Za Šifove baze, sintetisane iz primarnih amina i β -diketona takođe je karakteristična keto-enolna tautomerizacija (**Slika 2.3**). Keto tautomeri ovih jedinjenja nazivaju se i β -ketoamini ($R_1COR_3C=CR_2NHR_4$). Prisustvo karbonilne i imino grupe daje sposobnost β -ketoaminima da reaguju kao slabe baze i kao slabe kiseline.

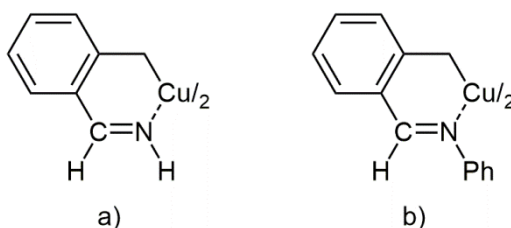


Slika 2.3. Keto-enolna tautomerizacija Šifovih baza.

2.2. Kompleksi Šifovih baza sa jonima metala

Šifove baze su generalno bidentatni, tridentatni ili polidentatni ligandi koji mogu da formiraju vrlo stabilne komplekse sa prelaznim metalima. Prisustvo slobodnog elektronskog para u sp^2 hibridizovanoj orbitali atoma azota iminske grupe, doprinosi izuzetnoj helirajućoj sposobnosti, naročito kada se u blizini nalazi još jedan donorni atom, pa je moguće formiranje peto- ili šestočlanih helatnih prstenova. Promenom vrste i položaja donornog atoma ili donorne grupe moguće je kontrolisati veličinu helatnog prstena (Sharma, Cabrera, Singh, & Jha, 1997).

Jørgensen i saradnici su među prvima sintetisali bis(salicilaldimino) kompleks bakra(II) (**Slika 2.4 a**) kao kristalno zeleni proizvod reakcije bakar(II)-acetata, salicilaldehida i vodenog rastvora amonijaka (Schmitz-DuMont, 1964). Schiff je zatim sintetisao odgovarajuće fenil- i aril-derivate (**Slika 2.4 b**) tako što je kompleks salicilaldehida refluksovao sa viškom amina u različitim rastvaračima (etanol, hloroform ili dihlormetan) u toku jednog časa ili manje, pri čemu je utvrdio i stehiometrijski odnos metal:ligand = 1:2 (Schiff, 1869). Jednostavna sinteza kompleksa Šifovih baza sa jonima metala, kao i njihova raznovrsna primena čine ovu grupu jedinjenja interesantnim za proučavanje u različitim oblastima.



Slika 2.4. Kompleksi Šifovih baza sa jonima metala: a) bis(salicilaldimino) kompleks bakra(II); b) fenil-derivat bis(salicilaldimino) kompleksa bakra(II).

2.3. Primena Šifovih baza i njihovih kompleksa sa jonima metala

Šifove baze i njihovi kompleksi imaju veliku primenu u organskoj i analitičkoj hemiji, industriji hrane i boja, biološkim procesima kao i u farmaciji.

Imini se upotrebljavaju kao jonofore u elektrohemijskim senzorima. Jon selektivne electrode sa modifikovanim PVC membranama se koriste za selektivno određivanje Pb(II), Co(II) i Hg(II) (Arida, El-Reefy, & El-Saied, 2003; Mahajan, Kaur, Kaur, Sharma, & Kumar, 2004; Mashhadizadeh & Sheikhshoaie, 2003). Imini salicilaldehida sa diaminima se koriste za pripremu jodid-selektivnih elektroda sa ugljeničnom pastom (Shamsipur, Soleymanpour, Akhond, Sharghi, & Naseri, 2001), dok se Šifove baze sintetisane iz 4,13-diaza-18-krunskog etra koriste kao neutralne jonofore u polivinil hloridnim membranama senzora za detekciju i kvantifikaciju Ag(I) jona (V. K. Gupta, Pal, & Singh, 2009).

U hromatografiji, pojedini kompleksi Ni(II) i Cu(II) sa β -ketoaminima (npr. bis(acetilaceton)etilendiimin i bis(acetilaceton)propilendiimin) se koriste kao stacionarne faze za odvajanje ugljovodonika, heteroaromatičnih jedinjenja, aldehida, ketona i alkohola. β -ketoamini, tipa N,N'-bis(salicilid)-1,2-cikloheksandiamina, se koriste kao derivatizacioni ligandi u gasnim hromatografskim odvajanjima nefluorisanih tetradentatnih β -ketoaminskih kompleksa Ni(II), Pd(II) i Cu(II) na nanogramskoj skali, bez degradacije (Khuhawar & Soomro, 1992; Uden, 1984; Uden & Henderson, 1974).

Mnogi komercijalni inhibitori korozije sadrže imine zbog njihove sposobnosti da spontano grade monosloj na površini koju štite, tako da se Šifove baze etilendiamina primenjuju kao inhibitori korozije (Agrawal, Talati, Shah, Desai, & Shah, 2004). Šifove baze i njihovi kompleksi sa metalima imaju primenu i u industriji hrane, industriji boja i katalizi (Abo Dena, 2014; Hassan, Arida, Montasser, & Abdel Latif, 2013). Pored toga, kompleksi Šifovih baza se često primenjuju kao model sistemi za ispitivanje prenosa kiseonika u biološkim sistemima (Carter, Rillema, & Basolo, n.d.; Neil J. Henson, P. Jeffrey Hay, & Redondo, 1999; Nishinaga & Tomita, 1980).

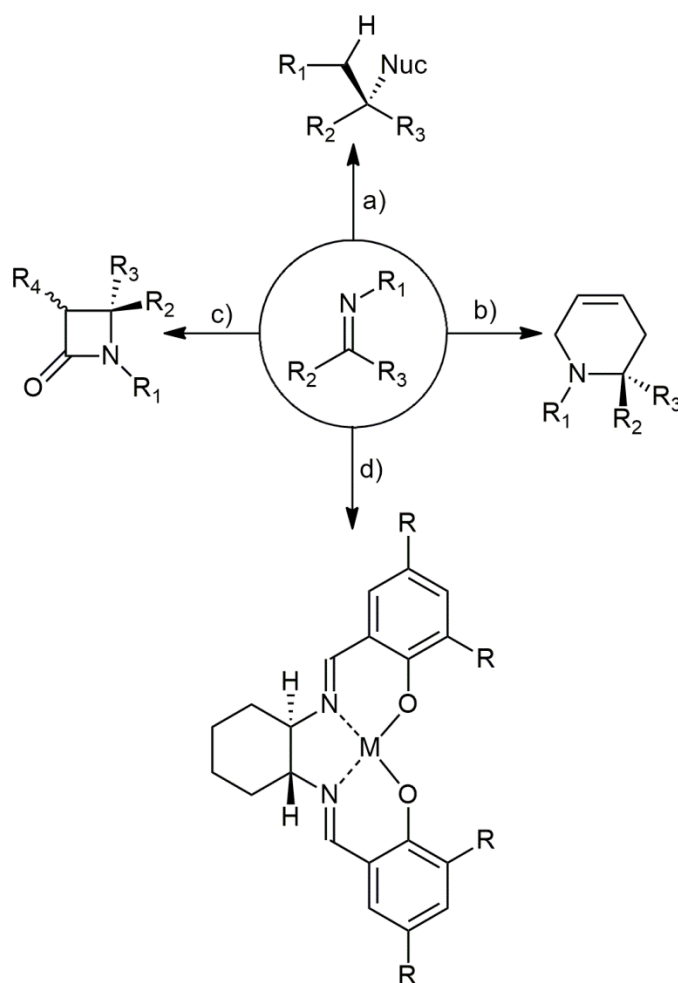
Šifove baze imaju veliku primenu kao prekursori u organskim sintezama. Razlikuju se četiri različita tipa reakcija u kojima je izuzetan značaj primene imina:

a) adicija organometalnih reagenasa ili hidrida na C=N vezu (Barluenga, Aznar, & Valdés, 2004; Kobayashi, Mori, Fossey, & Salter, 2011);

b) hetero Dils-Alder reakcija za dobijanje šestočlanih prstenova sa azotom (Masson, Lalli, Benohoud, & Dagousset, 2013; Smith, Gavriljuk, Lough, & Batey, 2010);

c) građenje odgovarajućih hiralnih kompleksa salena (Cozzi, 2004; Katsuki, 2004; Matsunaga & Shibasaki, 2013; Yoon & Jacobsen, 2003);

d) Staudinger reakcija sa ketenom u cilju dobijanja β -laktama (Allen & Tidwell, 2012; Palomo, Aizpurua, Ganboa, & Oiarbide, 2004) (**Slika 2.5**).



Slika 2.5. Šifove baze kao prekursori u organskim sintezama.

Mnogi kompleksi Šifovih baza sa jonima metala pokazuju visoku katalitičku aktivnost. Efikasni su u homogenim i heterogenim katalitičkim reakcijama i njihova aktivnost zavisi od tipa i broja liganda, jona metala i koordinacionih mesta (K. C. Gupta & Sutar, 2008). Kompleksi Šifovih baza katalizuju neke od sledećih reakcija:

a) *Reakcije polimerizacije*; Kompleksi Fe(III) i Co(II) sa piridin-bisiminskim ligandom pokazuju odličnu aktivnost u polimerizaciji etilena, kao i kopolimerizaciji etilena i 1-heksena (Souane, Isel, Peruch, & Lutz, 2002). Kompleksi salena katalizuju polimerizaciju epoksida (Mason & Perkins, 2000).

b) *Redukcija tionilhlorida*; Kompleksi Co(II), Cu(II) i Ni(II) sa 1,2-bis-(naftiliden-imino)etanom, 1,3-bis(naftiliden-imino)propanom, 1,2-bis-(naftiliden-imino)butanom i 1,2-bis-(naftiliden-imino)pentanom katalizuju redukciju tionil-hlorida na elektrodi od staklastog ugljenika (Choi, Kim, Chung, Chung, & Nam, 2000). (Choi et al., 2000)

c) *Oksidacija organskih jedinjenja*; Kompleksi Ru(II) katalizuju oksidaciju alkohola na sobnoj temperaturi (Muthu Tamizh, Mereiter, Kirchner, & Karvembu, 2012), dok su kompleksi Cu(II) ispitivani zbog svoje katalitičke aktivnosti pri oksidaciji stirena i ciklooktena (Heshmatpour, Rayati, Afghan Hajiabbas, Abdolalian, & Neumüller, 2012; Maurya, Kumar, & Kumar, 2007).

d) *Redukcija ketona*; Kompleks (RuCl₂(PPh₃)(oksazolinilferocenilfosfin)) znatno povećava efikasnost asimetrične redukcije dialkil ketona do alkohola (Fehring & Selke, 1998; Yoshiaki Nishibayashi, Izuru Takei, Sakae Uemura, & Masanobu Hidai*, 1999).

e) *Aldolne reakcije*; Kompleksi Šifovih baza Al(III) katalizuju reakciju između 5-metoksioksoazola i benzaldehida pri čemu se dobija optički aktivan *cis*-ozazolinski addukt (Evans, Janey, Magomedov, & Tedrow, 2001).

f) *Henrijeve reakcije*; Serija kompleksa Cu(II) sa hiralnim Šifovim bazama, dobijenih derivatizacijom *cinchona* alkaloida, je korišćena za asimetričnu Henrijevu reakciju, pri čemu je dobijena visoka enantioselektivnost (Wei, Yao, Zhang, He, & Zhang, 2011).

g) *Epoksidacija alkena*; Kompleksi V(IV) su poznati po tome da katalizuju epoksidaciju alkena (Grivani, Khalaji, Tahmasebi, Gotoh, & Ishida, 2012), dok kompleksi Ni(II)

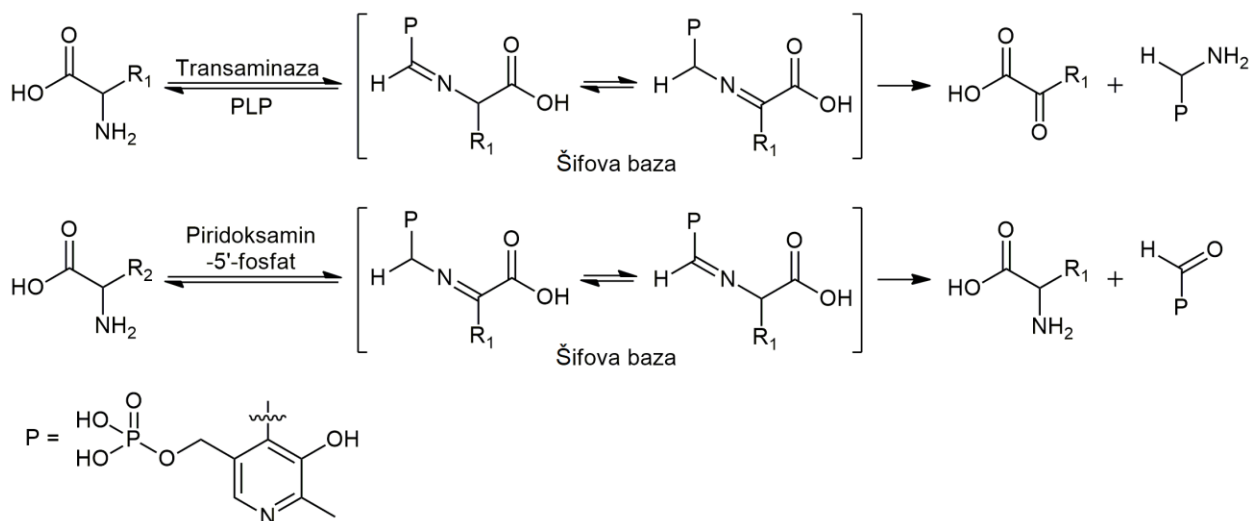
katalizuju epoksidaciju olefina, cikloheksena, 1-heksena, *cis*- i *trans*-stilbena (Kureshy et al., 2002).

h) *Hidroksilacija ketona*; Kompleksi Zn(II), sa α -amino kiselinama i 3,5-di-*tert*-butilsalicilaldehidom su korišćeni za asimetričnu hidroksilaciju ketona kao katalizatori (Liu et al., 2012).

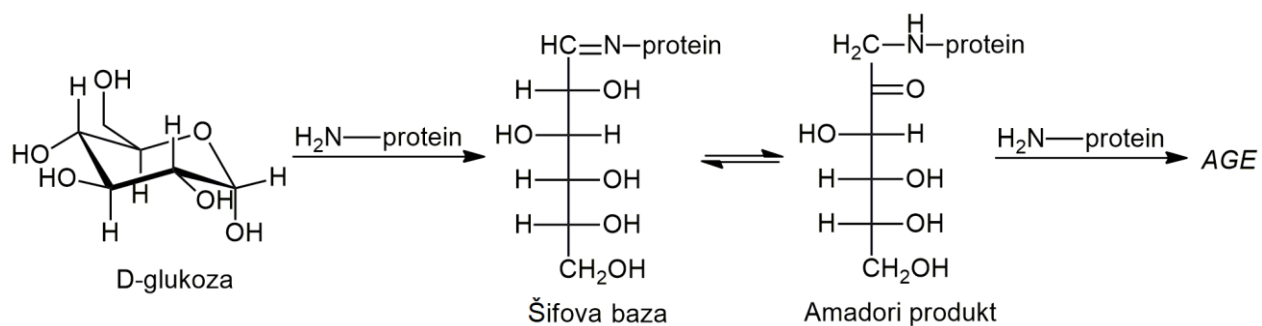
i) *Sinteza bis(indolil) metana*; Bis(indolil) metani i njihovi derivati su interesantni zbog biološke uloge. Cu(II) kompleksi Šifovih baza su se pokazali kao dobri katalizatori kod kondenzacionih reakcija indola sa aldehidima, uz korišćenje etanola kao rastvarača (Yang, Wan, Wang, Xie, & De Wang, 2011).

2.3.1 Primena Šifovih baza u biološkim procesima

Primena imina kao intermedijera u biološkom procesima je dobro poznata. Najčešće izučavana je transaminacija (**Slika 2.6**) i glikacija (neenzimska glikozilacija) albumina koja dovodi do stvaranja biomarkera za detekciju Diabetes melitusa tipa II (**Slika 2.7**) (Cohen, 2013; Snell & Jenkins, 1959).



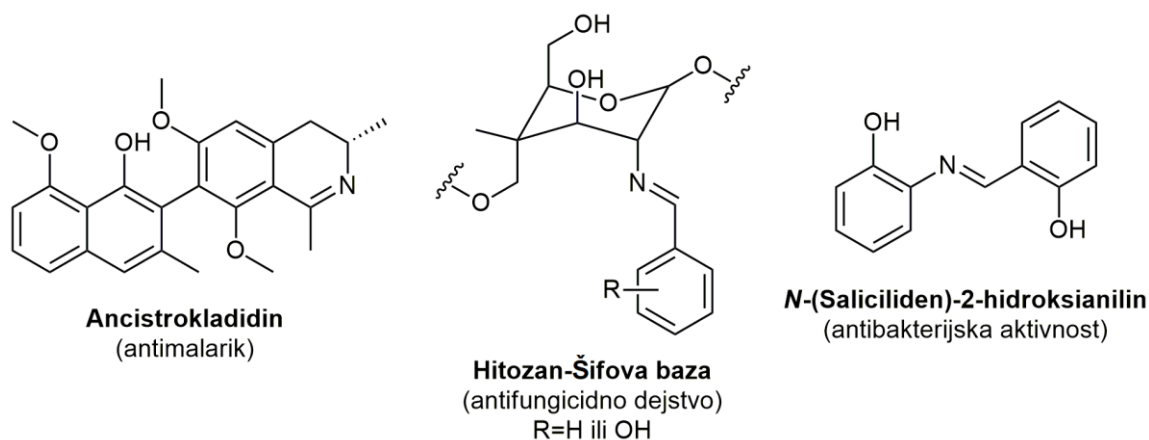
Slika 2.6. Transaminacija albumina.



Slika 2.7. Glikacija albumina.

2.3.2 Primena Šifovih baza i njihovih kompleksa sa metalima u farmaciji

Postoje brojna istraživanja koja ispituju primenu Šifovih baza kao terapeutika, potencijalnih lekova, dijagnostičkih proba i analitičkih oruđa. Aktivnost imina kao antikancerskih terapeutika (Desai, Desai, & Desai, 2001; Przybylski, Huczynski, Pyta, Brzezinski, & Bartl, 2009), antibakterijskih jedinjenja (Sinha et al., 2008; Vukovic, Sukdolak, Solujic, & Niciforovic, 2010), antiviralnih reagenasa (Jarrahpour, Khalili, De Clercq, Salmi, & Brunel, 2007; Marchand et al., 2008) je intenzivno proučavana. Na **Slici 2.8** prikazana su tri biološki aktivna imina i njihovo dejstvo.



Slika 2.8. Neki primeri biološki aktivnih imina.

2.3.2.1 Antibakterijska aktivnost

Imini i njihovi kompleksi, koji su derivati salicilidbenzilamina su često izučavani zbog biološke aktivnosti (David et al., 2003; Palomo et al., 2004; Snell & Jenkins, 1959). Serija

Šifovih baza, derivata 5-hlorosalicilaldehida, pokazuje antibakterijsku aktivnost protiv različitih sojeva *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (Shi et al., 2007).

Imini koji imaju 2,4-dihloro-5-fluorofenil grupu kompletno inhibiraju rast *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* sa MIC vrednostima od 6.3 do 12.5 $\mu\text{g/mL}$, koje odgovaraju vrednostima ciprofloksacina (Karthikeyan et al., 2006). Sekundarni metaboliti biljke *Actinomadura rubra*, madura hidroksi laktoni, transformisani u imine, inhibiraju *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea* i *Staphylococcus aureus* (MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) 0,2-3,1 $\mu\text{g/mL}$) (Heinisch et al., 1999).

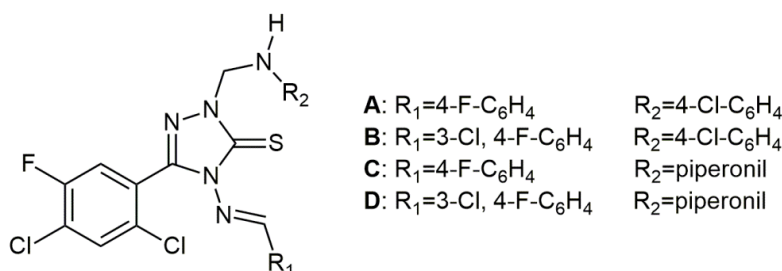
Šifove baze, sintetisane iz furilglioksala i *p*-toluidena pokazuju antibakterijsku aktivnost na sojevima *Bacillus Subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureu*. Kompleksi jona metala (Fe(II), Co(II), Ni(II)) i Šifovih baza (izvedenih iz 2-tiofenkarboksaldehida i 2-aminobenzojeve kiseline) pokazuju bakterijsku aktivnost prema sojevima *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus pyogenes*. Kompleksi Fe(III), Cu(II), Zn(II) i Šifovih baza zaustavljaju rast *Escherichia coli*, dok su kompleksi Fe(III), Co(II), Cu(II), Zn(II) pogodni za inhibiranje rasta Gram-pozitivnih sojeva bakterija (*Staphylococcus pyogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*). Ovi kompleksi mogu bezbedno da se koriste u tretmanu infekcija izazvanih gore pomenutim sojevima (Mohamed, Omar, & Hindy, 2005).

Kompleksi Cu(II) i imina, nastalih kondenzacijom 5-bromosalicilaldehida i α -amino kiselina (L-alanina, L-fenilalanina, L-asparaginske kiseline, L-histidina i L-arginina) su pokazali antibakterijsku aktivnost na dva soja Gram-pozitivnih (*Micrococcus luteus* i *Bacillus cereus*) i na jedan soj Gram-negativnih bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*).

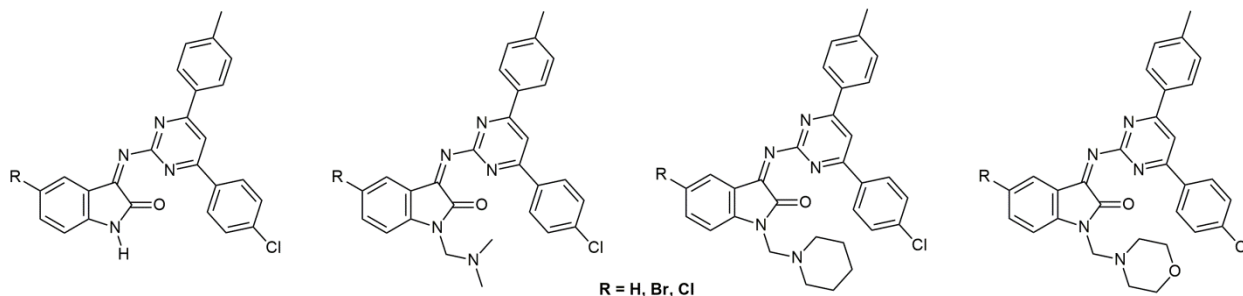
2.3.2.2 Antifungalna aktivnost

Šifove baze hitozana pokazuju antifungalnu aktivnost protiv *Botrytis cinerea* i *Colletotrichum lagenarium* (Guo et al., 2007). Iminski derivati 2,4-dihloro-5-fluorofenila inhibiraju rast kliničkih sojeva *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium marneffeii* i *Trichophyton mentagrophytes* (**Slika 2.9**). Njihove minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

variraju od 6.3–12.5 $\mu\text{g/mL}$ što odgovara aktivnosti flukonazola (Karthikeyan et al., 2006). Imini izvedeni iz izatina (**Slika 2.10**) pokazuju aktivnost protiv *Microsporium audouinii* (MIC 2.4–9.7 $\mu\text{g/mL}$) i *Microsporium gypseum* (MIC 1.2–9.7 $\mu\text{g/mL}$) (Nguyen & LARGERON, 2015), kao i protiv *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, i *Histoplasma capsulatum* (MIC 10–79 $\mu\text{g/mL}$) (Pandeya, Sriram, Nath, & De Clercq, 1999).



Slika 2.9. Šifove baze koje imaju antifungalnu aktivnost.



Slika 2.10. Iminski derivati isatina.

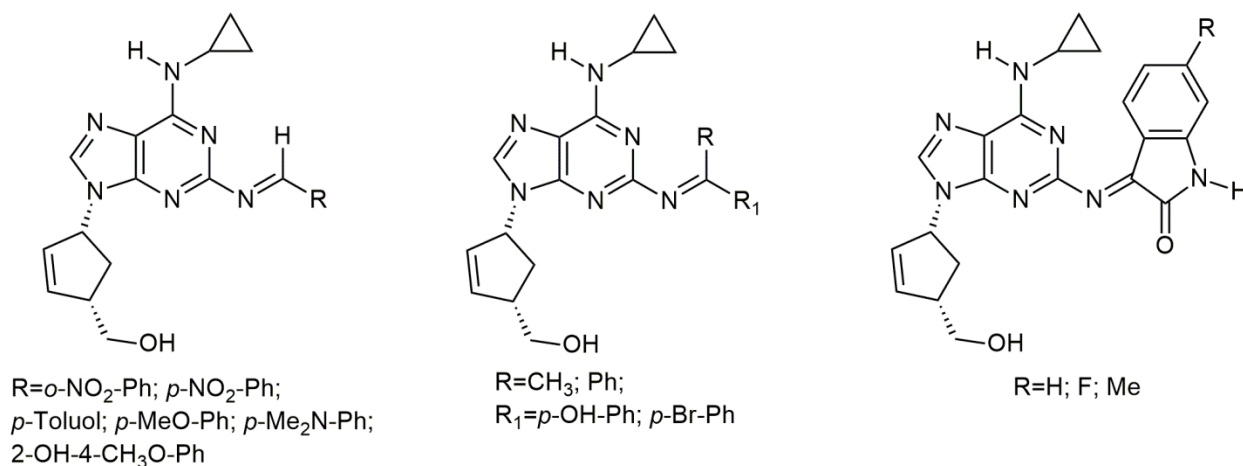
Ispitivana je antifungalna aktivnost kompleksa Šifovih baza (sintetisanih iz *o*-ftalalaldehida, L-glicina i L-fenilalanina) sa Cu(II), Ni(II), Mn(II) i Co(II). Kompleksi Cu(II) i Ni(II) su pokazali antifungalnu aktivnost prema svim ispitivanim sojevima različitih vrsta (*Candida*, *Aspergillus* i *Mucor*), dok su kompleksi Mn(II) i Co(II) pokazivali znatno manju aktivnost (Neelakantan et al., 2008).

2.3.2.3 Antimalarici

Pojedine šifove baze imaju primenu u antimalarijskoj terapiji. Ancistrokladidin je sekundarni metabolit biljaka iz familija *Ancistrocladaceae* i *Dioncophyllaceae* koji se pokazao kao potentan antimalarik za *Plasmodium falciparum* K1 soj malarije. Neki novosintetisani derivati aldimina i hidrazonizohinolina su pokazali aktivnost prema hlorokin rezistentnom *Plasmodium falciparum* soju (ACC Niger). Formil-5-nitroizohinolin ((E)-N-((5-nitroizohinolin-1-il)-metilen)-1-(2-(trifluorometil)-fenil)metanamin) ima IC50 (koncentracija koja je neophodna da ubije 50 % ćelija) vrednost od 0.7 µg/mL na soj *Plasmodium falciparum* (Rathelot et al., 1995).

2.3.2.4 Antiviralni terapeutici

Iminski derivati 3-hidroksiguanidina, pri koncentraciji od 3,2 µM, inhibiraju 50% virus mišijeg hepatitisa (Sriram, Yogeewari, Myneedu, & Saraswat, 2006; P. H. Wang, Keck, Lien, & Lai, 1990). Slično njima, iminski derivati abacavira (**Slika 2.11**) su testirani protiv HIV-1 virusa, pri čemu su pokazali zaštitu humanih leukocitarnih ćelija od 50% pri mikro- i nanomolarnim koncentracijama (Sriram et al., 2006).



Slika 2.11. Iminski derivati abacavira.

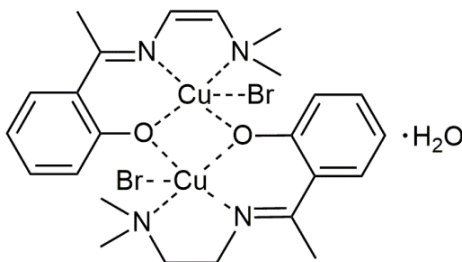
2.3.2.5 Antikancerska aktivnost

Serijski aril azo-šifovih baza izvedenih iz 4-N,N'-bis(2-cijanoetilaminobenzilidena) sa aromatičnim aminima pokazuje značajnu antikancersku aktivnost. Imini sintetisani iz S-benzilditiokarbamata takođe imaju jaku antikancersku aktivnost, posebno protiv melanoma (Tarafder, Ali, Elias, Crouse, & Silong, 2000). Kompleksi šifovih baza izvedenih iz 4-hidroksisalicilaldehida i amina pokazuju jaku antikancersku aktivnost na *Erlh ascit* karcinomu (EAC) (Ali, Jesmin, Salahuddin, Habib, & Khanam, 2008), dok je N-(saliciliden)-2-hidroksianilin aktivan protiv *Mycobacterium tuberculosis* soja H37Rv (Souza et al., 2007).

Na ćelijama kancera dojke (MDA-MB-231) ispitivana je antikancerska aktivnost kompleksa sa šifovom bazom koji je sintetisan kondenzacijom 2-acetilpiridina i triptofana ($\text{Cu}(\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$, $\text{Zn}(\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ i $\text{Cd}(\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$). Sva tri kompleksa inhibiraju proliferaciju ćelija. Pored toga što pokazuje najveću antiproliferativnu aktivnost, kompleks $\text{Cd}(\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ inhibira i aktivnost proteozomalnog himotripsina i indukuje apoptozu (N. Zhang et al., 2012).

Na seriji kompleksa Pt(II) sa šifovih bazama, rastvornim u vodi, je ispitivana *in vitro* antikancerska aktivnost na ćelije HL-60, KB, BGC-823, and Bel-7402. Jedan od kompleksa je pokazao bolje dejstvo u poređenju sa *cis*-platinom na ćelijskim linijama BGC-823 i HL-60, a sličnu na ćelijskoj liniji Bel-7402 (L.-J. Li et al., 2013).

Antikancerska aktivnost kompleksa Cu(II) sa šifovim bazama je ispitivana na HT-29 ćelijama raka debelog creva. Kompleks $\text{Cu}(\text{BrHAP})_2$, čija je struktura prikazana na **Slici 2.12**, je ispoljio potentan proliferativni efekat ($\text{IC}_{50} = 2.87 \text{ mg/mL}$ posle 72 h), pri čemu su HT-29 ćelije ušle u apoptozu.



Slika 2.12. Kompleks $\text{Cu}(\text{BrHAP})_2$.

Pri koncentraciji od 6.25 mg/ml zabeležena je hiperprodukcija ROS (*eng.* reactive oxygen species), perturbacija potencijala mitohondrijalne membrane i curenje citohroma *c*. Utvrđeno je da je mehanizam aktiviranja apoptoze kompleksom Cu(BrHAP)₂ aktivacija sistema kaspaza 3, 7 i 9, što ovaj kompleks svrstava u potencijalne kandidate za *in vivo* i klinička ispitivanja (Hajrezaie et al., 2014).

2.4. Hromatografija

Hromatografija je analitička metoda koja omogućava razdvajanje, izolovanje, identifikaciju i određivanje sastojaka smeše na osnovu procesa koji se dešavaju na granici dve faze koje se ne mešaju. Komponente se raspedeljuju između dve faze, stacionarne i mobilne. Stacionarna faza može biti neki čvrst, aktivan sorbent ili tanak film tečnosti koji je prevučen preko čvrstog nosača. U hromatografskom procesu uzorak u mobilnoj fazi (gas ili tečnost) se propušta kroz stacionarnu fazu, pri čemu dolazi do raspodele komponenti uzorka između mobilne i stacionarne faze. Ovaj prelazak komponente iz jedne u drugu fazu, dešava se sve dok odnos koncentracija komponente u stacionarnoj i mobilnoj fazi ne dostigne konstantnu, ravnotežnu vrednost. Ova vrednost se naziva koeficijent raspodele, a izražen je Nernst-ovim zakonom raspodele:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

gde je c_s – koncentracija komponente u stacionarnoj fazi, a c_m – koncentracija komponente u mobilnoj fazi.

Na osnovu primenjene tehnike hromatografija se deli na kolonsku i planarnu, a na osnovu razlike u polarnosti mobilne i stacionarne faze, hromatografija se može podeliti na:

- normalno-faznu (NP) – kod koje je stacionarna faza polarnija u odnosu na mobilnu fazu
- reverzno-faznu (RP) – kod koje je stacionarna faza nepolarnija u odnosu na mobilnu fazu.

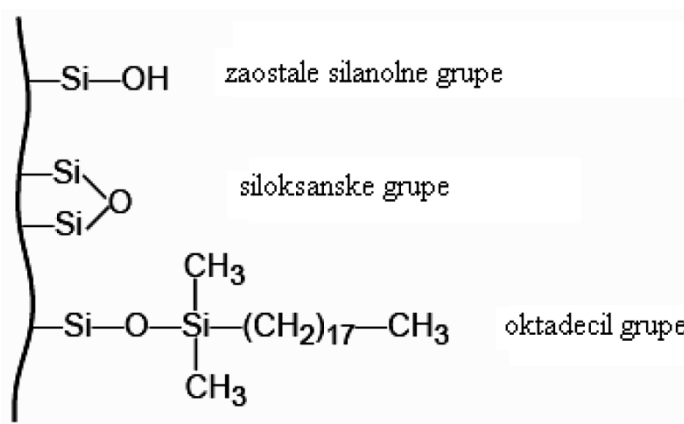
Tokom hromatografskog procesa komponente u uzorku ostvaruju različite vrste interakcija, u zavisnosti od svoje strukture i primenjenog hromatografskog sistema. Interakcije mogu biti specifične (dipol-dipol, jon-dipol, vodonične veze) i nespecifične (hidrofobne, disperzione)

(Ettre, 1993; Gault & McClenaghan, 2009; Manz, Pamme, & Iossifidis, 2004; Miller, 2005; R. Singh, 2002).

Planarna hromatografija je analitička metoda koja se primenjuje za kvalitativnu i kvantitativnu analizu različitih organskih i neorganskih supstanci. Zbog mogućnosti ostvarivanja velikog broja interakcija, pri razdvajanju, tankoslojnu hromatografiju karakteriše visoka selektivnost. Razdvajanje supstanci se zasniva na dvema silama koje su suprotne u svom delovanju: elucionoj moći mobilne faze i zadržavajućoj sposobnosti sorbenta. Vrste i jačina ovih interakcija su uslovljene hemijskom prirodom svake od komponenata hromatografskog sistema koga čine ispitivana supstanca, stacionarna i mobilna faza. Ukoliko su uslovi pri kojima se vrši hromatografija stalni ili se kontrolisano menjaju, na osnovu retencionih parametara ispitivanih supstanci, mogu da se dobiju brojne informacije o njihovoj strukturi i osobinama, kao i obrnuto (Lukasz Komsta, 2008; Sârbu, Casoni, Darabantu, & Maiereanu, 2004).

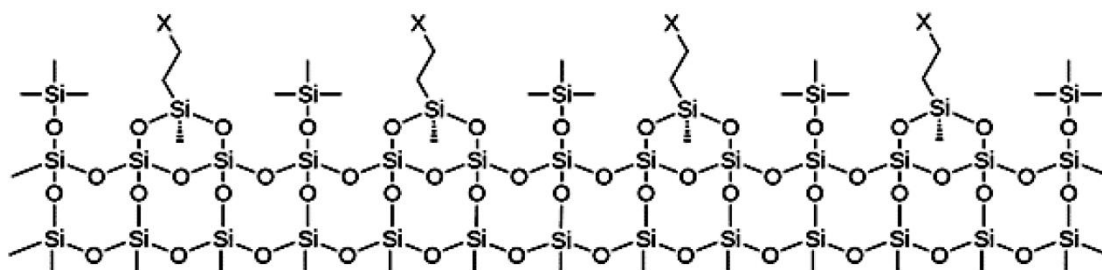
TLC nalazi primenu u mnogim granama nauke i tehnologije. Široko se primenjuje u farmaceutskoj industriji, industriji hrane, kozmetologiji, biohemiji, kliničkoj hemiji, ekologiji i zaštiti životne sredine (Krasikov, 2003; Nyireddy, 2001).

Nepolarni sorbenti se najčešće koriste u kombinaciji sa polarnijim mobilnim fazama što predstavlja RP hromatografiju (Grinberg, 1990; L. Komsta, Waksmundzka-Hajnos, & Sherma, n.d.; Sherma & Fried, 2003). Silika-gel se hemijskim reakcijama može vezati sa organosilanima različitih dužina (dimetil, etil, oktil, undecil, oktadecil i fenil) (**Slika 2.13**).



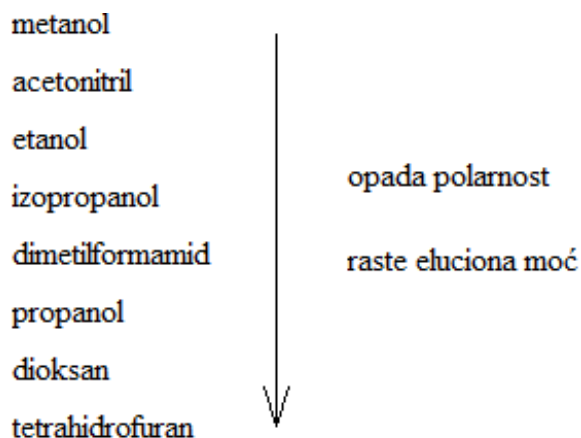
Slika 2.13. Strukturne formule grupa koje se nalaze na površini silika-gela C18.

Osobine modificovanih sorbenata zavise od postupka modifikacije, karakteristika modifikatora i fizičkih osobina upotrebljenog matriksa. Najčešće se kao osnova koristi silika-gel, zbog svoje postojanosti i visoke efikasnosti. Najčešći modifikator je oktadecil grupa i pri njenom vezivanju 40-50 % silanolnih grupa ostaje nepromenjeno. Shodno tome, ove stacionarne faze, najčešće, predstavljaju sorbente sa bifunkcionalnim grupama. U poslednje vreme modifikacije su mnogo kompletnije, što se postiže blokiranjem zaostalih silanolnih grupa trimetilsilil-hloridom (end-capping). Na ovaj način je omogućena monofunkcionalnost modificovanih sistema (**Slika 2.14**).



Slika 2.14. Blokiranje silanolnih grupa.

Mobilna faza je najčešće smeša vode i organskog rastvarača, mešljivog sa vodom. Eluciona moć mobilne faze raste sa udelom organskog modifikatora. Na **Slici 2.15** dati su organski modifikatori koji se najčešće primenjuju u RP hromatografiji.



Slika 2.15. Organski rastvarači koji se najčešći koriste kao modifikatori u RP hromatografiji.

Mehanizam odvajanja na alkil-modifikovanim silika-gelovima nije potpuno razjašnjen (Gilbert, n.d.). Značajan uticaj na retenciju odvajanih supstanci imaju sledeći procesi:

- a) Hidrofobne interakcije između ispitivane supstance i stacionarne faze;
- b) Silanofilne interakcije između ispitivane supstance i nemodifikovanih površinskih silanolnih grupa (ukoliko se ne koristi endcup sorbent);
- c) Solvatacija ispitivane supstance i/ili stacionarne faze organskom komponentom rastvarača.

Adsorbovani molekuli ispitivanih supstanci se zadržavaju na stacionarnoj fazi sve dok koncentracija organskog modifikatora u mobilnoj fazi ne bude dovoljno visoka da desorbuje molekule sa hidrofobne površine. Retencija u RP hromatografiji zavisi od hidrofobnih osobina molekula, što znači da prisustvo polarnih grupa smanjuje retenciju. Nemodifikovane silanolne grupe mogu da povećaju selektivnost pri odvajanju polarnih jedinjenja. Zbog prisustva silanolnih grupa na površini sorbenta moguća su dva retenciona mehanizma koja se zasnivaju na hidrofobnim i silanolnim interakcijama (Bij, Horváth, Melander, & Nahum, 1981; Nahum & Horváth, 1981).

2.5. Lipofilnost i njen značaj u dizajnu novih lekova

Lipofilnost je fizičko-hemijska karakteristika jedinjenja koja je u direktnoj vezi sa pasivnim prolaskom jedinjenja kroz biološke membrane, kao i njihovom rastvorljivošću. Takođe utiče i na uspostavljanje interakcija biološki aktivnog jedinjenja i aktivnog mesta receptora. Biološka aktivnost molekula je uslovljena procesima njegove farmakokinetike (put od mesta administracije leka do mesta dejstva) i njegove farmakodinamike tj. specifičnosti samog dejstva. Ova dva procesa zavise od ponašanja molekula u nevodenoj (npr. ćelijska membrana) i vodenoj sredini (npr. unutrašnjost ćelije) (Hansch & Fujita, 1964; Henchoz et al., 2009; Hill & Young, 2010; Waring, 2009).

Polarne i nepolarne interakcije nekog molekula u posmatranoj sredini određuju lipofilnost molekula. Londonove disperzione sile (nepolarne interakcije) mogu da se izraze preko parametara kao što su zapremina molekula, polarizabilnost i molarna refraktivnost. Ovi parametri predstavljaju hidrofobnost molekula koja pozitivno utiče na lipofilnost. Jon-jon, jon-dipol, dipol-dipol interakcije i vodonično vezivanje predstavljaju polarne interakcije i

predstavljaju se pomoću elektronskih konstanti, dipolnog momenta ili parametara vodoničnog vezivanja. Intramolekulske interakcije, određene strukturnim karakteristikama molekula (npr. supstitucija na aromatičnom ili heterocikličnom delu molekula, prisustvo π sistema i intramolekulske vodonične veze) takođe utiču na lipofilnost molekula. Priroda sredine u kojoj se molekul nalazi (polarna ili nepolarna, protična ili aprotična) utiču na konformacione promene u molekulu. Pri različitim konformacijama, dostupnost različitih grupa rastvaraču može molekul da učini hidrofilnijim ili lipofilnijim manje ili više od očekivanog. Takođe i jonizacija značajno menja gore navedene osobine molekula (Dellis, Giaginis, & Tsantili-Kakoulidou, 2007; Gaillard, Pierre-Alain, & Testa, 1994; Vrakas, Tsantili-Kakoulidou, & Hadjipavlou-Litina, 2003).

Iako je lipofilnost samo jedan od faktora koji utiču na biološku aktivnost supstance, najčešće ima najviše uticaja. Lipofilnost ima uticaja na transport supstance, njenu rastvorljivost, reaktivnost i degradaciju, kao i na njenu formulaciju. Uticaj lipofilnosti je najveći kada se posmatra prolazak molekula kroz ćelijsku membranu i građenje kompleksa sa receptorom. Ćelijska membrana je selektivno permeabilna i uglavnom se sastoji od fosfolipidnog dvosloja, pa zbog toga lipofilnost aktivne komponente supstance najviše utiče na njenu interakciju sa lipidnom strukturom (Rutkowska, Pajak, & Józwiak, 2013).

Lek-receptor interakcije se fundamentalno svode na iste međumolekulske sile koje učestvuju u raspodeli aktivne komponente leka između vode i nemešljive organske faze (Fattori, 2004). Vezivanje u aktivnom mestu proteina se svodi na otpuštanje vode iz šupljine aktivnog mesta i njenu zamenu komponentom leka. Stoga je proces prepoznavanja uglavnom vođen entropijom. Samo vezivanje ima entalpijski doprinos kao posledicu interakcija između lipofilnih grupa (disperzione interakcije) (Klebe & Böhm, 1997). Slobodna energija lipofilnih interakcija vezivanja je direktno proporcionalna lipofilnoj površini (Gao, Qiao, & Whitesides, 1995).

Kvantitativna procena lipofilnih osobina leka i receptora je efikasan deo računskih metoda koje se koriste u dizajnu lekova. Primena 3D molekularnog hidrofobnog potencijala omogućava detaljnu procenu lipofilnih i/ili hidrofilnih osobina različitih delova molekula i primenjuje se u molekularnom modelovanju ligand-receptor interakcija, najviše u *docking* studijama (Efremov et al., 2007). Pored uticaja na farmakodinamiku leka, lipofilnost značajno utiče i na ADMET osobine leka (eng. *Adsorption, Distribution, Methabolism, Extrecion, Toxicity*). Particioni koeficijenti determinišu mesto distribucije posle apsorpcije, brzinu

metabolisanja i eliminaciju leka. Ekskrecija leka je povezana sa njegovom toksičnošću (Kerns, 2001; A. P. Li, 2001; D. A. Smith & van de Waterbeemd, 1999; Thompson, 2001). Svako jedinjenje uneto u organizam je podložno biotransformaciji i hepatičnoj i/ili bubrežnoj eliminaciji. Metabolizam leka u fazi I uključuje oksidaciju, redukciju i hidrolizu, dok se faza II odnosi na konjukciju jedinjenja. U fazi I se ili otkrivaju lipofilne grupe ili uvode i tako se povećava eliminacija iz organizma (Kansy, Senner, & Gubernator, 1998; van de Waterbeemd, Smith, & Jones, 2001).

Apsorpcija leka u epidermi direktno je proporcionalna lipofilnosti. Međutim, molekuli koji su izrazito lipofilni mogu da se imobilisu unutar dermalne membrane (Cross, Magnusson, Winckle, Anissimov, & Roberts, 2003). Oralno uneti lekovi prolaze kroz lipidni dvosloj intestinalnog epitela. Lipofilniji molekuli lakše prolaze do citoplazme, a samim tim i do krvotoka. Intestinalna permeabilnost zavisi od više faktora koji treba da se uzmu u razmatranje (npr. jonizacija). Postoje model sistemi za njeno ispitivanje kao što su Caco-2-cell sistem i PAMPA (eng. *Parallel artificial membrane permeability assay*) (Borchardt, 2011; Kansy et al., 1998).

Najveći izazov u dizajnu lekova je prolazak kroz krvno-moždanu barijeru mozga (eng. *Blood Brain Barrier, BBB*). Ova barijera se sastoji iz mikrosudova endotelnih ćelija sa tesno vezanim ćelijama koje formiraju semipermeabilnu barijeru samo za molekule male veličine. Waterhouse je postavio vezu između lipofilnosti i mogućnosti prolaska kroz BBB. BBB pokazuje visoku permeabilnost za lekove sa umerenom lipofilnošću (Waterhouse, n.d.). Smanjena permeabilnost za neke lipofilne molekule je posledica nespecifičnih interakcija leka sa proteinima plazme. Posle apsorpcije, lek se reverzibilno vezuje za protein seruma i transportuje u krvotok. Protein-lek kompleks se ponaša kao depo leka, dok slobodan lek u krvotoku reaguje sa ciljnim receptorima i utiče na ekskreciju i eliminaciju. Vezivanje lekova za protein plazme i akumulacija u ćelijama krvi je zavisna od lipofilnosti (Lázníček & Láznícková, 1995).

2.5.1. Određivanje lipofilnosti

Najčešće se za izražavanje lipofilnosti koristi podeoni koeficijent ($\log P$), koji predstavlja količnik koncentracije rastvorene supstance u dve tečne faze u dodiru, koje se ne mešaju:

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_w}$$

Koncentracija supstance u vodenoj fazi je C_w , a C_o je koncentracija supstance u nepolarnom organskom rastvaraču, 1-oktanolu (Hansch & Fujita, 1964).

Kako lipofilnost predstavlja afinitet molekula, ili dela molekula, ka lipofilnom okruženju izražava se kao raspodela supstance u dvofaznom tečno-tečnom sistemu (oktanol-voda) ili čvrsto-tečnom sistemu (retencija u TLC ili HPLC sistemu u uslovima reverzno-fazne hromatografije). Eksperimentalno određivanje podeonog koeficijenta radi se metodom mućkanja (eng. *shake flask*) tako što se sistem od dva rastvarača (slabo mešljiva) mućka dok se u njemu nalazi ispitivana supstanca. Po uspostavljanju ravnoteže i razdvajanju slojeva rastvarača, određuje se koncentracija ispitivane supstance u svakoj od faza. Nedostatak ove klasične metode je što dugo traje, zahteva veliku količinu supstance i nemogućnost određivanja podeonog koeficijenta većeg od 6 (dolazi do stvaranja emulzije 1-oktanol/voda) (Danielsson & Zhang, 1996; Finizio, Vighi, & Sandroni, 1997).

Retencioni faktor, dobijen hromatografijom na tankom sloju, odlično se koreliše sa podeonim koeficijentom. Iako je korelacija između hromatografskih retencionih parametara i $\log P$ gotovo idealna, razlika je očigledna, jer u hromatografiji dolazi do više vrsta interakcija u zavisnosti od prirode stacionarne i mobilne faze, kao i posmatrane supstance (A. J. Martin & Synge, 1941).

Reverzno-fazna hromatografija na tankom sloju je najčešće primenjivana tehnika za indirektno određivanje lipofilnosti molekula. Upotreba binarnih sistema rastvarača kod kojih varira udeo organske komponente rastvarača, omogućava dobijanje informacija o fizičko-hemijskim i biohemijskim osobinama molekula. Najčešće korišćeni retencioni parametar u tankoslojnoj hromatografiji, za izražavanje lipofilnosti, je retenciona konstanta (R_M) koja predstavlja logaritamsku funkciju eksperimentalno određenog retencionog faktora, R_F (Bate-Smith & Westall, 1950a; Bradfield & Bate-Smith, 1950):

$$R_M = \log (1/R_F - 1)$$

Utvrđeno je da postoji bolja zavisnost i manja greška između strukture i R_M vrednosti u odnosu na R_F vrednost. R_M^0 tj. parametar lipofilnosti dobija se kao R_M vrednost ekstrapolirana na 0%

organskog rastvarača tj. kao R_M vrednost u čistoj vodi. Izračunava se na osnovu linearne zavisnosti R_M i koncentracije organske komponente u mobilnoj fazi (φ):

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

U slučajevima kada se posmatra širok opseg sastava mobilne faze, navedena linearnost se menja, što ukazuje na činjenicu da odnos između R_M vrednosti i udela organske komponente u mobilnoj fazi, u određenim slučajevima, nije linearan u širokom opsegu sadržaja organske faze (Gaica, Opsenica, Šolaja, Tešić, & Milojković-Opsenica, 2002; Soczewiński & Wachtmeister, 1962; Torres-Lapasió, Rosés, Bosch, & García-Alvarez-Coque, 2000).

Parametar lipofilnosti, R_M^0 , se može smatrati zamenom za podeoni koeficijent i predstavlja kvantitativni retencioni deskriptor u tankoslojnoj hromatografiji. Uvođenjem parametra lipofilnosti, sva jedinjenja čija je lipofilnost određena na ovaj način, mogu da se poredi. Vrednost nagiba (m) može da se primeni kao mera lipofilnosti, jer odgovara hidrofobnoj površini ispitivane supstance (Dabić et al., 2011; Sârbu, Djaković-Sekulić, & Perišić-Janjić, 2002; Trifković et al., 2010). Takođe, može da se odredi još jedan parameter lipofilnosti, C_0 . On se izračunava na osnovu retencionog parametra R_M^0 (odsečak) i hidrofobne specifične površine m (nagib):

$$C_0 = - \frac{R_M^0}{m}$$

Parametri lipofilnosti, takođe, mogu da se izračunaju primenom različitih programa. Ovako dobijeni parametri mogu da se poredi sa parametrima eksperimentalno dobijenim reverzno-faznom hromatografijom. Prva fizičko-hemijska karakteristika za koju su razvijene metode predviđanja je lipofilnost. Do danas je razvijeno preko dvadeset softverskih paketa za izračunavanje parametara lipofilnosti. Svi softveri koriste dva pristupa računanja:

1. Metode koje se zasnivaju na podstrukturama (eng. *Substructure-Based Methods*). Postoje dva pristupa ovoj metodi: atomski, gde se sabiraju doprinosi pojedinačnih atoma u molekulu, i fragmentacioni, gde se posmatra odnos fragmenata u molekulu i njihov korekcionni faktor usled intramolekulskih interakcija (Leo, 1993; Mannhold, 2008; Rekker, Mannhold, Bijloo, de Vries, & Dross, 1998).
2. Metode koje se zasnivaju na odgovarajućim osobinama molekula (eng. *Property-Based Methods*). Ove metode podrazumevaju korišćenje deskriptora koji opisuju ceo molekul

(trodimenzionalni i topološki deskriptori) i zasnivaju se na empirijskim zavisnostima ili na 3D strukturi molekula (Juranić, Drakulić, Petrović, Mijin, & Stanković, 2006; Mannhold, 2008).

Neki od softverskih paketa koji se zasnivaju na fragmentacionim metodama su npr. Fujita-Hansch-ova metoda (Fujita, Iwasa, & Hansch, 1964), Rekker-ova metoda (Rekker, 1977), Hansch-Leo-ova metoda (Flynn, 1980) kojima se izračunavaju $KlogP$, $ClogP$, KOWWIN i ACD/Log. Softverskim paketima sa atomskim pristupom mogu da se izračunaju TSAR, ALOGP98 PrologP, MOLCAD i XLOG.

Računske metode mogu izračunati logP čak i molekula velike lipofilnosti. Kod složenih molekula sa fragmentima koji se ne nalaze u bazama podataka ili kod molekula sa interaktivnim funkcionalnim grupama računске metode pokazuju izvesne nepreciznosti. Izračunavanja su najmanje precizna za tautomerne, cviter-jonske, naelektrisane molekulske strukture, tj. molekule koji grade jake vodonične veze.

2.6. Kvantitativna veza između strukture, aktivnosti i retencije molekula

Biološka aktivnost nekog jedinjenja zavisi od njegove strukture, kao i od fizičkih i hemijskih osobina. Veza između strukture i aktivnosti jedinjenja se ispituje QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) studijama. Parametri koji povezuju strukturu jedinjenja sa njegovom biološkom aktivnošću mogu biti strukturni (elektronski, topološki i geometrijski) i fizičko-hemijski (hidrofobni, sterni i elektronski) parametri. QSAR omogućava da se na osnovu strukture jedinjenja i ispitanih bioloških aktivnosti, postavi model po kome može da se predvidi biološka aktivnost strukturno sličnih jedinjenja (Cronin, 2010; Devillers, 1996; Roy et al., 2015).

Fiziološki efekat supstance u biološkom sistemu (Φ) je u funkciji njene hemijske strukture (C):

$$\Phi = f(C)$$

Promena u strukturi jedinjenja ΔC , utiče na promenu biološke aktivnosti, $\Delta\Phi$ (Royal Society of Edinburgh., 1966).

Meyer prvi sugerise da se narkotičko dejstvo grupe jedinjenja menja u saglasnosti sa njihovim particionih koeficijentom, određenom u sistemu maslinovo ulje/voda (Meyer, 1899).

Korelacije između strukture i aktivnosti nekih regulatora rasta biljaka kao i njihovu zavisnost od Hammetove konstante i hidrofobnosti utvrdili su Hansch i saradnici još 1962. godine (Hansch et al., 1963; Hansch, Maloney, Fujita, & Muir, 1962). Čitave serije partitionih koeficijenata određene su uvođenjem sistema oktanol/voda, na osnovu čega je uvedena nova skala hidrofobnosti. Relativna hidrofobnost supstituenata je okarakterisana parametrom π :

$$\pi = \log P_x - \log P_H$$

gde P_x i P_H predstavljaju particione koeficijente derivata i početnog molekula. Biološka aktivnost grupe srodnih jedinjenja primenom kombinovanog modela opisana je u daljim radovima Hansch i saradnika:

$$\text{Log } 1/C_{50} = a \pi + b \varepsilon + c S + d$$

gde je C_{50} , koncentracija supstance koja izaziva efekat smrtnosti bakterija i gljivica od 50%, π je parametar hidrofobnosti, ε elektronski parametar, dok S predstavlja sterne karakteristike (Hansch & Fujita, 1964). Obrazloženje ove jednačine dato je kroz hipotezu da relativna aktivnost biološki aktivnog molekula zavisi od verovatnoće da molekul priđe mestu akcije, verovatnoće da interaguje sa odgovarajućim centrom i njegove spoljašnje koncentracije i doze (McFarland, 1970).

Jedna od metodologija je i Free-Wilson pristup koji se definiše sledećom jednačinom:

$$BA = \sum a_i x_i + u$$

gde je BA biološka aktivnost, a_i je doprinos svake strukturne karakteristike, x_i označava prisustvo ($x_i=1$) ili odsustvo ($x_i=0$) pojedinih strukturnih fragmenata, dok je u srednja vrednost doprinosa početnog molekula (Kubinyi, 1988).

Ispitivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije (*Quantitative Structure-Retention Relationships*, QSRR) nastaje kao rezultat primene metodologije koja se koristi u ispitivanjima QSAR na analizu hromatografskih podataka (Cazes, 2010; DANIELSSON & ZHANG, 1996; Héberger, 2007; Put & Vander Heyden, 2007; Q. S. Wang & Zhang, 1999). Retencioni podaci za dovoljno veliku grupu jedinjenja i set različitih parametara koji opisuju strukturne karakteristike tih jedinjenja (deskriptori) su potrebni za QSRR analize. Pored ulaznog seta podataka, dobrog odabira ispitivanih jedinjenja i njihovih deskriptora, za dobar QSRR model neophodna je i

primena statističke analize (Kaliszan, 1999; Y. Polyakova, Jin, & Row, 2006; Y. L. Polyakova & Row, 2005).

Različite statističke tehnike se koriste za dobijanje i optimizaciju QSRR modela: Analiza osnovnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA), višestruka linearna regresija (Multiple Linear Regression, MLR), klsterska analiza (Cluster analysis), regresija glavnih komponenata (Principal Component Regression, PCR), regresija metodom delimičnih-najmanjih kvadrata (Partial Least Square, PLS), veštačke neuronske mreže (Artificial Neural Networks, ANN) (Varmuza & Filzmoser, 2009). Analiza glavne komponente (PCA, *Principal Component analysis*) je tehnika multivarijantne analize koja se koristi za redukovanje količine podataka, kada je prisutna korelacija.

QSRR modeli mogu da predvide retenciju novih, strukturno sličnih jedinjenja, identifikuju deskriptore koji utiču na ponašanje jedinjenja u ispitivanim hromatografskim uslovima objasne mehanizme razdvajanja u istim, kao i da predvide biološku aktivnost (Ahmad, Qasimullah, Muzaffar, Andrabi, & Qureshi, 1996; Tibor Cserháti, 1994; Koba, Bączek, & Marszałł, 2012; L.-T. Qin, Liu, Chen, Xiao, & Wu, 2013).

Molekulski deskriptori predstavljaju numeričku reprezentaciju hemijskih informacija sadržanih u molekulu. Izračunavanje ovih parametara se vrši na osnovu topologije, geometrije, hemijske strukture, površinske potencijalne energije i talasne funkcije ispitivanog jedinjenja. Podela deskriptora se vrši na osnovu prirode osobine koju opisuju: elektronske osobine molekula (naelektrisanje, polarizabilnost, dipolni momenat, različite vrste energija), sterne karakteristike molekula, topološke osobine molekula, sposobnost građenja vodoničnih veza i lipofilnost (Consonni & Todeschini, 2010; Ehresmann, Martin, Horn, & Clark, 2003; L. He & Jurs, 2005; Nagaosa, Kawabe, & Bond, 1991). U zavisnosti od načina na koji se izračunavaju, deskriptori se dela na: 1D deskriptore koji kvantifikuju neku osobinu u celini (npr. logP i molarna refraktivnost); 2D (topološki indeksi) ili 3D deskriptori (farmakokinetički deskriptori) (Bajorath, 2001; Todeschini, Lasagni, & Marengo, 1994). Noviji softveri mogu da izračunaju preko 2000 različitih molekulskih deskriptora (Gervasi et al., 2008). Jednostavnije molekulske deskriptore mogu da izračunaju i najjednostavniji softverski paketi za crtanje hemijskih struktura molekula. Najčešće korišćeni deskriptori dati su u **Tabeli 2.1**.

Tabela 2.1. Najčešće korišćeni deskriptori

Fizičko-hemijski deskriptori	Relativna molekulska masa, gustina, hidrofobne konstante, rastvorljivost, solvatohromni parametri, particioni koeficijenti, temperatura ključanja
Elektronski deskriptori	Hammet-Taftova konstanta, elektronska gustina, reaktivnost π -veze, elektronska polarizibilnost, dielektrična konstanta, dipolni moment, jonizacioni potencijal, elektronski afinitet
Topološki parametri	fragmenti atoma i hemijske veze, substrukture, okolina substrukture, broj ugljenikovih atoma, broj prstenova, molekularna povezanost
Geometrijski deskriptori	van der Waalsov volumen, površina van der Waalsove ovojnice, Taftov sterički parametar, Verloopova dužina, Verloopova širina

Deskriptori su našli primenu u više ispitivanja kao što su analiza odnosa strukture i osobina molekula (QSPR, *Quantitative Structure–Property Relationships*), kao i već pomenutim QSRR i QSAR ispitivanjima. Najčešće korišćena matematička tehnika za dobijanje QSAR modela je multilinearna regresiona analiza (MLR). Multilinearna regresiona analiza daje rezultate lake za interpretaciju i razumevanje, na osnovu kojih se dobijaju korelacije između zavisno promenljivih, Y, (eksperimentalno određena karakteristika, npr. biološka aktivnost) i X, (npr. molekulske deskriptori):

$$Y = b + aX_1 + cX_2 + \dots$$

Sledeće pretpostavke se primenjuju pri dobijanju korelacija (Y. C. Martin, 2010):

1. Nezavisno promenljive, koje u ovom slučaju obično predstavljaju fizičko-hemijske parametre, su merene bez ikakve greške.
2. Za svaku datu vrednost X, veličina Y je nezavisna i sledi normalnu distribuciju.
3. Očekivana srednja vrednost promenljive Y, za sve vrednosti X, leži na pravoj liniji.
4. Odstupanje od prave linije je konstantno.

Parametri kvaliteta fitovanja u MLR-u su r^2 (kvadratni korelacioni koeficijent), MSE (srednja kvadratna greška) i F vrednost (Fišerova vrednost značajnosti). Izračunavanjem unakrsnog-validacionog parametra r^2_{cv} proverava se sposobnost predviđanja dobijenog modela. Vrednost r^2_{cv} čija je definisana sledećom jednačinom:

$$r^2_{cv} = 1 - \text{PRESS} / \text{SSY}$$

gde je: PRESS akronim za sumu kvadrata predviđenih rezidua i pokazuje sposobnost predviđanja predloženog modela, dok je SSY suma vrednosti kvadratnih devijacija zavisnih promenljivih od njihovih srednjih vrednosti. U MLR metodi se svako merenje zasebno izostavlja, pa nema potrebe za izborom drugog seta uzoraka ili podele postojećeg seta na dva. Za izračunavanje regresija i procenu vrednosti izostavljenog merenja se koristi preostalih (n-1) merenja. Sve ovo se ponavlja po jednom za svako merenje (Y. C. Martin, 2010).

2.7. Eseji za merenje vijabilnosti i proliferacije ćelija kao i evaluaciju apoptoze

Vijabilnost ćelija se definiše kao broj zdravih ćelija u uzorku, dok ćelijska proliferacija predstavlja vitalni indikator razumevanja mehanizma delovanja određenih gena, proteina i signalnih puteva uključenih u ćelijski ciklus ili ćelijsku smrt nakon što se one izlože dejstvu nekog agensa. Eseji za ćelijsku citotoksičnost i proliferaciju su u generalnoj upotrebi za ispitivanje uticaja hemijskih supstanci na ćelijama, gde se može uočiti da li određena supstanca dovodi do proliferacije ćelija ili ima citotoksičan efekat na iste. Postoje varijacije eseja koji se razlikuju na osnovu toga da li se prati određena ćelijska funkcija kao npr., enzimska aktivnost, permeabilnost ćelijske membrane, ćelijske adherentnosti, produkcija ATPa, ko-enzimske produkcije itd. Na osnovu toga ovi eseji se mogu klasifikovati u različite kategorije: 1) metoda isključivanja boje; 2) metode bazirane na metaboličkim aktivnostima; 3) ATP esej; 4) sulforodamin B esej; 5) proteaza vijabilni marker esej; 6) esej klonogenog ćelijskog preživljavanja; 7) esej proliferacije ćelija sa DNK sintezom; i 8) Raman mikro-spektroskopija (Adan, Kiraz, & Baran, 2016; Prăbst, Engelhardt, Ringgeler, & Hübner, 2017). Bez obzira koji tip eseja se koristi, neophodno je da se zna koliko vijabilnih ili zdravih ćelija ostaje na kraju eksperimenta.

Jedna od najčešće korišćenih metoda, bazirana na metaboličkim aktivnostima, jeste tzv. MTT esej. U kulturi ćelija, prva i najčešće korišćena tetrazoliumova so je MTT (3-(4,5-

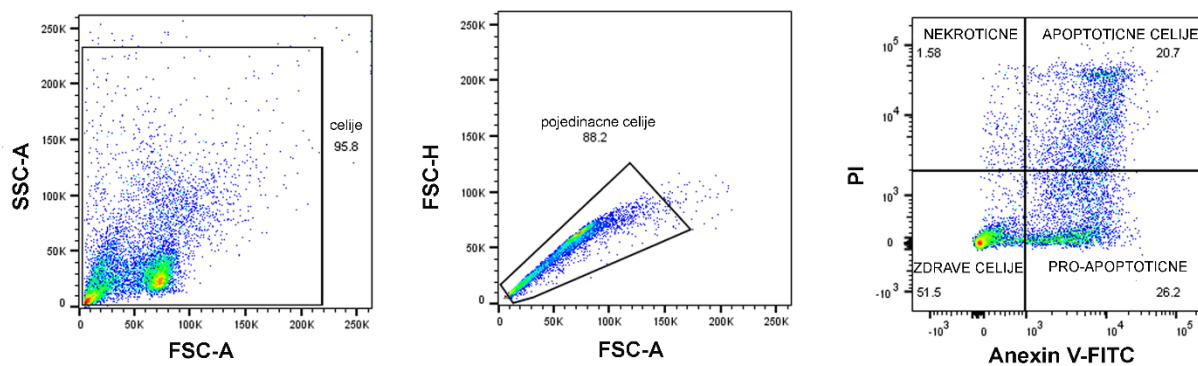
dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) koja je uvedena od strane Mosmann-a za merenje proliferacije i citotoksičnosti u savremenom pristupu korišćenjem pločice sa 96 bunara (Mosmann, 1983). Zbog lipofilnih bočnih grupa i ukupnog pozitivnog naelektrisanja MTT je sposoban da prođe kroz ćelijsku membranu. MTT se smanjuje u preživljavajućim ćelijama pomoću mitrohondrijalnih ili citoplazminih enzima kao sto su oksidoreduktaze, dehidrogenaze, oksidaze i perkosidaze, koristeći NADH, NADPH, sukcinat ili piruvat kao elektronski donor. Ovo rezultuje konverziom MTT u jedinjenje formazan (Berridge, Herst, & Tan, 2005). Na ovaj način, MTT esej određuje broj vijabilnih ćelija prateći aktivnost mitohondrija, što je povezano sa količinom formiranih kristala formazana. Ćelije koje se nalaze u bunarima se stimulišu određenim agensom u različitim koncentracijama, gde se nakon određenog perioda inkubacije (24, 48h) dodaje MTT i prati proliferacija i vijabilnost ćelija. Proliferativne ćelije sadrže visoku mogućnost konverzije MTTa, dok mrtve ćelije imaju manju mogućnost konverzije. Nakon aplikacije MTTa, kristali formazana se solibilizuju pomoću dimetilsulfoksida ili Na-dodecilsulfata. Merenje oslobođenog formazana se prati spektrofotometrijski na talasnim dužinama od 540-720 nm.

Ovaj esej se najčešće koristi za određivanje citotoksičnog efekta različitih agenasa pod različitim uslovima ili različitim koncentracijama. Takođe, moguće je odrediti IC50 vrednost aplicirane supstance (eng. *50% half maximal inhibitory concentration*), tako što se poredi vijabilnost kontrolne grupe (ne tretiranih ćelija) sa grupom ćelija koje su stimulisane supstancom. Esej je pogodan za testiranje potencijalnih supstanci za primenu u medicini. Sa druge strane esej nije pogodan za razlikovanje citotoksičnih od citostatičkih agenasa, jer rezultati ne bi bili ispravni zbog smanjivanja broja ćelija. Pri tome, ova metoda ne računa koji udeo ćelija ide u nekrozu, a koji u apoptozu. Ova dva parametra, kao i vijabilnost ćelija, mogu da se odrede pomoću pristupa protočne citometrije koristeći propidijum-jodid (PI) i fluorescein izocijanat obeležen Aneksin V.

Apoptoza kao programirana ćelijska smrt igra glavnu ulogu u homestazi ćelija i tkiva. Razumevanje bazičnog mehanizma apoptoze dovodi do potencijalnih targeta u razvoju tretmana za razne bolesti. Samim tim Aneksin V apoptoza esej je jedna od boljih metoda za određivanje biloške aktivnosti neke novosintetisane supstance. Vijabilne ćelije sadrže asimetričnu distribuciju različitih fosfolipida između unutrašnje i spoljašnje plazma membrane. Kada dođe do promene u asimetričnosti ćelijske membrane, ćelija može ući u programiranu ćelijsku smrt, tzv. apoptozu

(Homburg et al., 1995; van Engeland, Nieland, Ramaekers, Schutte, & Reutelingsperger, 1998; Vermes, Haanen, Steffens-Nakken, & Reutelingsperger, 1995).

Aneksin V (35-36 kDa) je Ca^{2+} zavisan fosfolipidno vezujući protein koji ima visoki afinitet vezivanja za negativna naelektrisanja fosfolipida najviše za fosfatidil-serin (sa konstantom vezivanja $K_d \sim 5 \times 10^{-2}$). Protein može biti konjugovan sa fluorohromom kao npr. FITC. S obzirom da se eksternalizacija fosfolipida dešava u ranoj fazi apoptoze, bojenje ćelija Aneksinom V-FITC može da identifikuje apoptozu u ranijem stadijumu, za razliku od eseja koji su bazirani na promenama DNK molekula. Međutim, u kasnijoj fazi apoptoze Aneksin V ne može da razlikuje koje su ćelije ušle u apoptozu, a koje su postale nekrotične. Moguće je da se ćelije boje i vijabilnom bojom propidijum jodida. Bojenjem propidijum-jodidom omogućava se detekcija rano apoptotičnih ćelija (pro-apoptotične ćelije) tako što se na protočnoj citometriji one ne boje sa PI već samo Aneksin V-om. Na primer, ćelije koje se razmatraju da su vijabilne su FITC Aneksin V i PI negativne, pro-apoptotične ćelije su FITC Aneksin V pozitivne dok PI negativne, apoptotične ćelije su duplo pozitivne ćelije (FITC Aneksin V i PI pozitivne), dok nekrotične ćelije su obojene isključivo PI (FITC Aneksin V negativne PI pozitivne). Princip metode je poprilično isti kao kod MTT eseja. Nakon inkubiranja ćelija sa određenom supstancom, ćelije se boje FITC Aneksinom V i PI, ispiraju i analiziraju na protočnoj citometriji. Kod zdravih ćelija i kancerskih ćelijskih linija uzimaju se sve ćelije u obzir. Nakon toga traže se ćelije koje nisu agregirale ili već umrle, tzv. „single cells“ kod kojih se potom prati obojenost gore navedenim bojama. Tipičan primer strategije za analizu apoptoze protočnom citometrijom na zdravim ćelijama iz krvi može se naći na **Slici 2.16**.



Slika 2.16. Primer strategije za analiziranje apoptoze protočnom citometrijom.

2.8. Metode za proučavanje protein-ligand interakcija

Razumevanje nekovalentnih, reverzibilnih interakcija malih molekula sa proteinima je od suštinskog značaja za proučavanje biohemijskih procesa, samim tim i transporta aktivne supstance do ciljnog mesta. Neke od tehnika za detaljnu termodinamičku i kinetičku karakterizaciju protein-ligand interakcija su UV/VIS spektrofotometrija, CD spektroskopija, spektrofluorimetrija, termoforeza na mikroskali, izotermalna titraciona mikrokalorimetrija, rezonancija površinskog plazmona i molekulski doking (Du et al., 2016; Jerabek-Willemsen, Wienken, Braun, Baaske, & Duhr, 2011; McDonnell, 2001; Nienhaus, 2005; Williams, 2013).

2.8.1. Spektrofluorimetrija

Jednostavnost i visoka osetljivost su razlozi zbog kojih je spektrofluorimetrija jedna od najviše primenjivanih metoda za proučavanje protein-ligand interakcija. Fluorescencija je fenomen emisije svetlosti pri prelasku ekscitovanih elektrona, u molekulima sa konjugovanim vezama, na osnovni nivo.

Spektrofluorimetrijski se najčešće prati fluorescencija proteina kada se vrši karakterizacija vezivanja liganada za proteine. Aromatični aminokiselinski ostaci pokazuju fluorescenciju, pa se na osnovu toga spektrofluorimetrijom mogu ispitivati protein-ligand interakcije. Zbog većeg apsorpcionog koeficijenta i većeg kvantnog prinosa fluorescencija triptofana dominira u odnosu na fluorescenciju tirozina i fenilalanina (Lakowicz, 2006; Williams, 2013).

Emisione karakteristike ostataka triptofana su osetljive na promene u okruženju, pa se promene u emisionom spektru javljaju i pri najmanjim konformacionim promenama, vezivanju supstrata, asocijaciji subjediničica ili denaturaciji proteina (Lakowicz, 2006). Fenomen gašenja fluorescencije (engl. fluorescence quenching) podrazumeva svaki proces koji dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije. On se koristi za određivanje konstanti vezivanja, kao i za lokalizaciju fluorofore u strukturi makromolekula. Transfer protona ili elektrona, transfer energije, intramolekulske reakcije i konformacione promene su mehanizmi koji dovode do gašenja fluorescencije. Dinamičko gašenje nastaje usled sudara fluorofore u ekscitovanom stanju sa drugim molekulom, a statičko usled formiranja nefluorescentnog kompleksa (Ghisaidoobe &

Chung, 2014a). Sa aspekta proučavanja protein-ligand interakcija, statičko gašenje fluorescencije ukazuje na postojanje protein-ligand kompleksa.

2.8.2. CD spektroskopija

Jedna od karakteristika proteina je njihova hiralnost. CD spektroskopija je nedestruktivna tehnika koja može dati informacije o vezama i strukturama unutar molekula koje su odgovorne za hiralnost molekula. Cirkularni dihiroizam (CD) je razlika u apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti u rastvoru ispitivane supstance. Hromofore u CD spektrometriji su peptidne veze (apsorpcija ispod 240 nm), aromatične aminokiseline (apsorpcija od 260-320 nm) i disulfidne veze (apsorpcija oko 260 nm) (Williams, 2013). Različite sekundarne strukture proteina imaju različit intenzitet i položaj pikova, kao i različit oblik traka u CD spektrima, stoga se cirkularni dihiroizam koristi za izučavanje sekundarnih struktura proteina. Brojni algoritmi, kao i neke jednostavne matematičke formule se koriste za procenu sekundarnih struktura u proteinima (Kelly, Jess, & Price, 2005).

Vezivanjem malog molekula (liganda) za protein dolazi do promene strukture, pa praćenjem sekundarnih struktura može da se ispita uticaj vezivanja liganda na konformaciju proteina (Greenfield, 2006). Signali između 260 i 320 nm uglavnom potiču od aromatičnih aminokiselinskih ostataka (triptofan oko 290 nm, tirozin između 275-282 nm, fenilalanin između 255-270 nm). Od broja aromatičnih aminokiselina, njihove mobilnosti, mikro-okruženja (u smislu polarnosti) i rasporeda u prostoru zavise oblik i intenziteti signala u CD spektru proteina, pa na osnovu njih se može utvrditi da li dolazi do konformacionih promena proteina vezivanjem liganda (Kelly et al., 2005).

2.8.3. Molekulski doking

Molekulski doking je računarska metoda za *in silico* predviđanje afiniteta i načina vezivanja molekula, uglavnom liganada za biomolekule (proteine i nukleinske kiseline). Koristeći poznate 3D strukture proteina i liganda, protein-ligand doking nastoji da predvidi strukturu kompleksa koji nastaje. Zbog mogućnosti pretraživanja velikih biblioteka molekula, u

cilju pronalaženja mogućih lekova, doking je našao primenu u dizajnu novih lekova. Poslednjih godina je razvijen veliki broj softverskih paketa za doking (Du et al., 2016).

Dve osnovne komponente doking metoda za izučavanje protein-ligand interakcija su algoritam za pretraživanje, i funkcija bodovanja (engl. scoring function). Prva komponenta podrazumeva pronalaženje konformacija i orijentacija u kojima se ligand vezuje za određeni protein, a druga komponenta se odnosi na identifikaciju mesta vezivanja, način vezivanja i procenu afiniteta vezivanja (Du et al., 2016; Halperin, Ma, Wolfson, & Nussinov, 2002).

Glavni izazov prilikom pronalaženja konformacije i orijentacije liganda je fleksibilnost sistema. Efikasnost dokinga je određen brojem stepeni slobode. Ukoliko bi u obzir uzeli sve moguće stepene slobode koji postoje u biloškim sistemima (fleksibilnost liganda i proteina, kretanje i orijentacija molekula rastvarača i okolnih jona), proračuni bi bili previše komplikovani i praktično neizvodljivi na današnjim računarskim sistemima. Čak i sistem, koji se sastoji samo iz liganda i proteina, sadrži prevelik broj stepeni slobode, pa su potrebne dodatne aproksimacije da bi se ovakvi proračuni efikasno izvodili. Ranije, kada su računari bili sporiji i manjeg kapaciteta memorije, korišćena je aproksimacija rigidnog tela koja je podrazumevala da i ligand i protein ne mogu da menjaju svoju konformaciju tokom samog proračuna. Danas se uglavnom koriste modeli u kojima se ispituju svi stepeni slobode liganda, dok je struktura proteina rigidna. Sa povećanjem brzine računara sve češće se primenjuju metode fleksibilnog dokinga u kojima su i ligand i bočni aminokiselinski ostaci u aktivnom mestu proteina potpuno fleksibilni (Huang, Grinter, & Zou, 2010; Kroemer, 2007; Sliwoski, Kothiwale, Meiler, & Lowe, 2013; Sousa, Fernandes, & Ramos, 2006). Da bi se ispitala fleksibilnost celog proteina i njen uticaj na afinitet vezivanja liganda uglavnom se uporedo sa doking metodom rade i molekulske dinamičke proračuni samog proteina i/ili protein-ligand sistema.

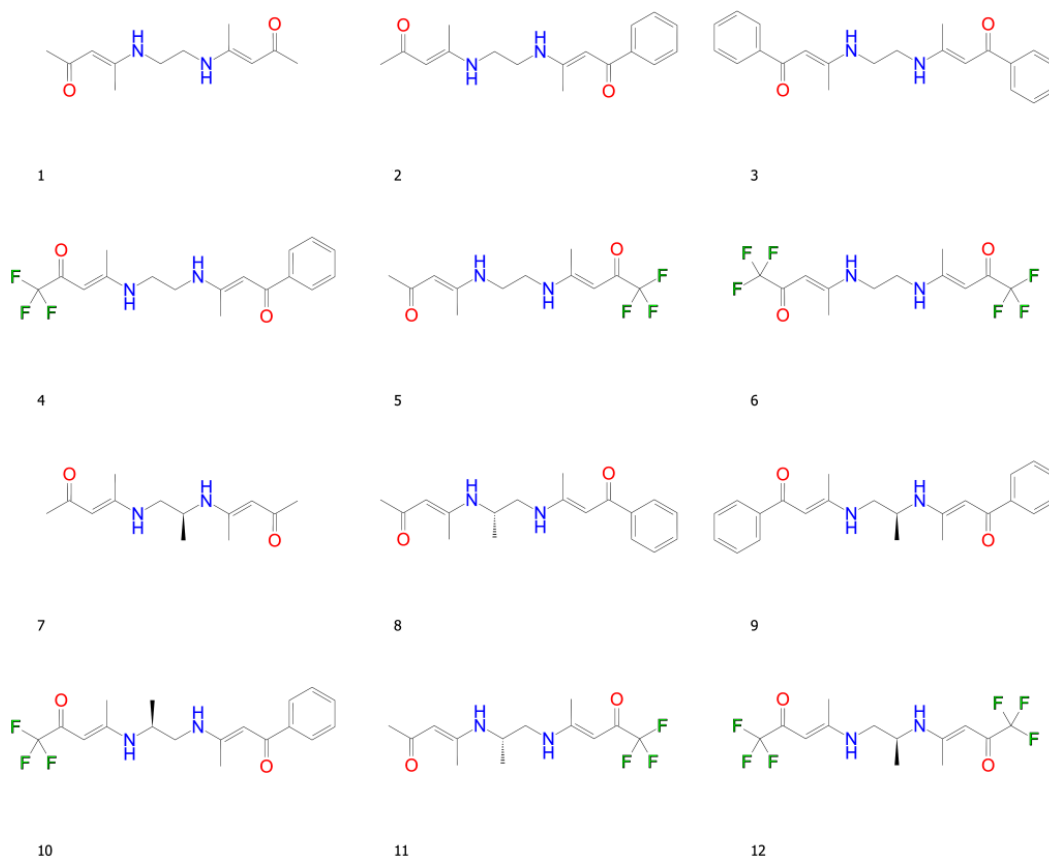
3. NAŠI RADOVI

3.1. Ispitivanje uticaja organskog modifikatora na određivanje lipofilnosti

3.1.1. Materijal i metode

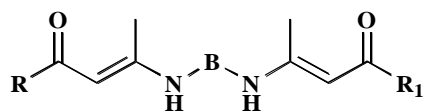
3.1.1.1. Ispitivana jedinjenja

Ispitivano je 12 Šifovih baza, derivata β -diketona (Tabela 3.1.1, Slika 3.1.1), kao i 9 Šifovih baza derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja (Slika 3.1.2, Tabela 3.1.2). Sinteze su urađene prema podacima datim u literaturi (Baošić, Milojković-Opsenica, & Tešić, 2007; Blagus, Cinić, Frišić, Kaitner, & Stilinović, 2010; Blagus & Kaitner, 2011a, 2011b, 2011c, 2011d, 2011e).



Slika 3.1.1. Struktura ispitivanih Šifovih baza derivata β -diketona.

Tabela 3.1.1. Strukture ispitivanih Šifovih baza derivata β -diketona

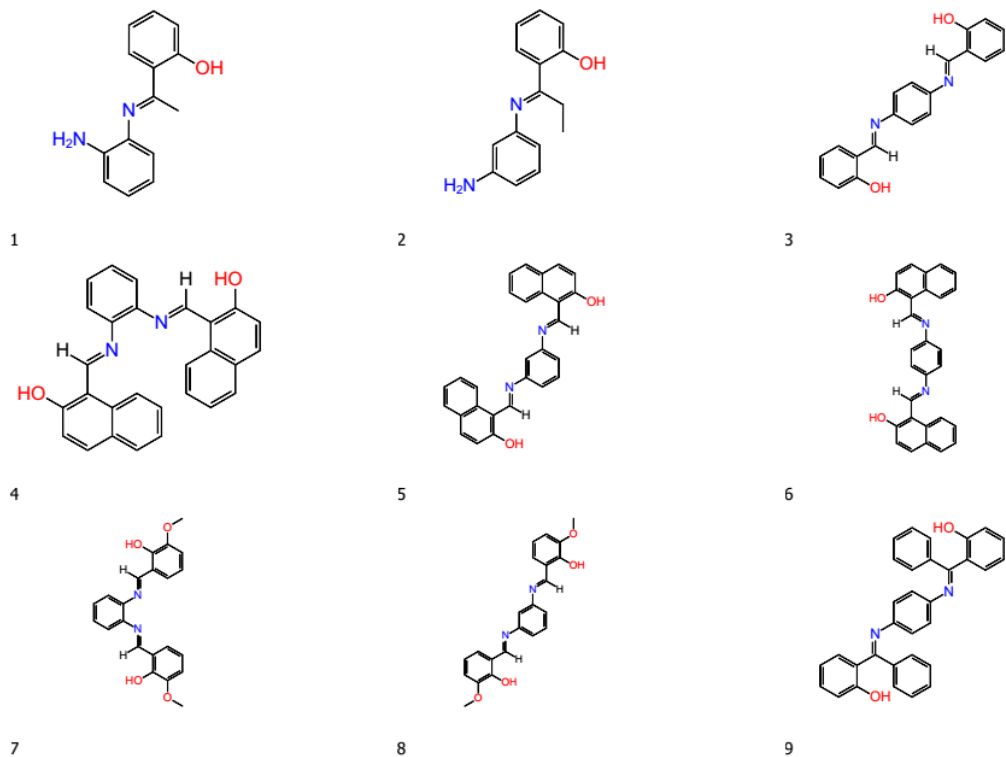


Br. jedinjenja	Šifova baza	R	R ₁	B
(1)	H ₂ (<i>acac</i> ₂ en) ^a	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₂
(2)	H ₂ (<i>acac phacac</i> en) ^b	CH ₃	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₂
(3)	H ₂ (<i>phacac</i> ₂ en)	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₂
(4)	H ₂ (<i>phacac tfacac</i> en) ^c	C ₆ H ₅	CF ₃	CH ₂ CH ₂
(5)	H ₂ (<i>acac tfacac</i> en)	CH ₃	CF ₃	CH ₂ CH ₂
(6)	H ₂ (<i>tfacac</i> ₂ en)	CF ₃	CF ₃	CH ₂ CH ₂
(7)	H ₂ (<i>acac</i> ₂ pn) ^d	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂
(8)	H ₂ (<i>acac phacac</i> pn)	CH ₃	C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂
(9)	H ₂ (<i>phacac</i> ₂ pn)	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂
(10)	H ₂ (<i>phacac tfacac</i> pn)	C ₆ H ₅	CF ₃	CH(CH ₃)CH ₂
(11)	H ₂ (<i>acac tfacac</i> pn)	CH ₃	CF ₃	CH(CH ₃)CH ₂
(12)	H ₂ (<i>tfacac</i> ₂ pn)	CF ₃	CF ₃	CH(CH ₃)CH ₂

^a*acac* = pentan-2,4-dion, en = etan-1,2-diamin; ^b*phacac* = 1-fenilbutan-1,3-dion;

^c*tfacac* = 1,1,1-trifluoropentan-2,4-dion; ^dpn = propan-1,2-diamin

Ispitivan set Šifovih baza, koji su derivati β -diketona (**Tabela 3.1.1**, **Slika 3.1.1**) sadrže etan-1,2-diamin ili propan-1,2-diamin kao amski deo i pentan-2,4-dion i/ili 1-fenilbutan-1,3-dion, pentan-2,4-dion i/ili 1,1,1-trifluoropentan-2,4-dion i 1,1,1-trifluoropentan-2,4-dion i/ili 1-fenilbutan-1,3-dion. Šifove baze, koje su derivati aromatičnih karbonilnih jedinjenja (**Slika 3.1.2**), su sintetisane iz *o*-, *m*- i *p*-fenilendiamina (kao diamina) i salicilaldehida, 2-hidroksinaftaldehida, vanilina, 2-hidroksiacetofenona i 2-hidroksibenzofenona.



Slika 3.1.2. Strukture ispitivanih Šifovih baza derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja

Tabela 3.1.2. Nazivi ispitivanih Šifovih baza derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja

Jedinjenje	IUPAC ime	Boja
1	2-[1-(2-Aminofenilimino)etil]fenol	Žuta
2	2-[1-(3-Aminofenilimino)etil]fenol	Braon-žuta
3	1,4-Bis(2-hidroksibenzilidenamino)benzen	Narandžasta
4	1,2-Bis(2-hidroksi-1-naftilmetilidenamino)benzen	Crna
5	1,3-Bis(2-hidroksi-1-naftilmetilidenamino)benzen	Oker
6	1,4-Bis(2-hidroksi-1-naftilmetilidenamino)benzen	Braon
7	1,2-Bis(2-hidroksi-3-metoksibenzilidenamino)benzen	Narandžasta
8	1,3-Bis(2-hidroksi-3-metoksibenzilidenamino)benzen	Narandžasto-crvena
9	1,4-Bis(2-hidroksifenilbenzilidenamino)benzen	Crvena

3.1.1.2. Hromatografija

Za proučavanje uticaja organskog modifikatora na hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja i određivanje parametara lipofilnosti primenjena je tehnika horizontalne tankoslojne hromatografije. Korišćene su komercijalno dostupne ploče RP-18 F₂₅₄ silika-gela (Merck, Darmstadt, Nemačka), veličine 10×10 cm. Kao mobilna faza je primenjena smeša organskih modifikatora i vode, u kojima je njihov odnos variran od 20:80 do 80:20 u inkrementima od 10 vol%. U **Tabeli 3.1.3** su dati korišćeni organski modifikatori i to 5 monokomponentnih i 4 dvokomponentna (zapreminski odnos 1:1).

Tabela 3.1.3. Primenjeni organski modifikatori u mobilnoj fazi

Br.	Sastav
1	metanol (MeOH)
2	tetrahidrofuran (THF)
3	acetonitril (ACN)
4	aceton (Ac)
5	<i>n</i> -propanol (nPrOH)
6	acetonitril : metanol (1:1)
7	acetonitril : tetrahidrofuran (1:1)
8	acetonitril : aceton (1:1)
9	metanol : tetrahidrofuran (1:1)

Na ploče je nanošeno po 1,0 µL sveže pripremljenih rastvora ispitivanih supstanci koncentracije 5 mg/mL. Posle sušenja nanetih zona, hromatografsko razvijanje je urađeno u kadi za horizontalnu hromatografiju (Camag horizontal HPTLC developmentchamber in the tank configuration). Pre razvijanja, ploče su 30 minuta ekvilibrisane parama rastvarača. Svi korišćeni rastvarači su bili analitičke čistoće. Posle razvijanja hromatograma, zone ispitivanih Šifovih baza, derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja, su bile obojene njihovom sopstvenom bojom (**Tabela 3.1.2**), dok su zone Šifovih baza, derivata β-diketona, detektovane pomoću UV lampe. Dobijeni retencioni parametri, R_F vrednosti, predstavljaju srednju vrednost tri merenja. Sva merenja su urađena na sobnoj temperaturi(22 ± 2°C).

3.1.1.3. Izračunavanja

Određivanje molekulskih deskriptora ispitivanih Šifovih baza je urađeno u programskom paketu Schrodinger Suite 2017-1 (Schrödinger Release 2017-1: Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017). Molekulske strukture su generisane koristeći Maestro 11.1. Potom je izvršena konformaciona analiza korišćenjem Conformational Search iz modula Macromodel V11.6. Za konformacionu analizu korišćeno je polje sila OPLS-2005, a kao rastvarač voda. Generisane strukture su energetske minimalizovane Polak-Ribiere konjugovanim gradijentom sa maksimalno 2500 koraka. Strukture su prečišćene tako što su odbačene one koje se ponavljaju.

Molekulski deskriptori ispitivanih jedinjenja su određeni upotrebom modula QikProp iz programa Schrödinger Suite. Za određivanje deskriptora, upotrebene su konformaciono najbolje strukture jedinjenja. Određeni su sledeći deskriptori: ukupna dostupna zapremina molekula (MV), površina (SA), energija najviše popunjene orbitale (E_{HOMO}), energija najniže nepopunjene orbitale (E_{LUMO}), energija hidratacije ($E_{\text{hydration}}$), dipolni moment (μ), ukupno dostupna površina (SASA), hidrofobna komponenta SASA (FISA), π komponenta SASA (PISA), slabo polarna komponenta SASA (WPSA), polarna površina (PSA), donori vodonične veze (donorHB), akceptori vodonične veze (acceptHB), polarizabilnost (R), heksadekan/gas particioni koeficijent ($\log P_{\text{C}_{16}}$), oktanol/gas particioni koeficijent ($\log P_{\text{oct}}$), voda/gas particioni koeficijent ($\log P_{\text{w}}$), oktanol/voda particioni koeficijent ($\log P_{\text{o/w}}$), rastvorljivost u vodi ($\log S$), rastvorljivost u vodi nezavisna od konformacije (CilogS), IC50 vrednost za blokiranje HERG K^+ kanala ($\log \text{HERG}$), predviđena očigledna Caco ćelijska propustljivost (PCaco), predviđeni mozak/krv podeoni koeficijent ($\log \text{BB}$), predviđena očigledna MDCK ćelijska propustljivost (PMDCK), predviđena propustljivost kože ($\log K_{\text{p}}$), vezivanje za humani serum albumin ($\log K_{\text{HSA}}$), humana oralna apsorpcija (HOA), vrednost za pravilo pet Lipinskog (Ruleof Five), vrednost za pravilo tri Jorgensena (RuleOfThree).

Statističke kalkulacije, korelacije, odabir varijabli i MLR modelovanja su urađena korišćenjem NCSS statističkog paketa (Hintze, J. (2001) NCSS and PASS Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah).

Analiza glavne komponente (PCA) je urađena u PLS Toolbox statističkom paketu (Eigenvector Research, Inc. v. 5.2.2.) u okviru MATLAB programa (verzija 7.4.0.287, R2007a, MathWorks INC, Natick, MA). Podaci su skalirani pre statističke obrade.

Bate-Smith i Westall jednačina je korišćena za izračunavanje R_M vrednosti (Bate-Smith & Westall, 1950b).

3.1.2. Rezultati i diskusija

Radi ispitivanja uticaja organskog modifikatora na eksperimentalno određivanje parametra lipofilnosti, dva seta jedinjenja tipa Šifovih baza su hromatografisana u uslovima reverzno-fazne tankoslojne hromatografije (RP-TLC). Mobilna faza u reverzno-faznoj tankoslojnoj hromatografiji je najšešće smeša vode i organskog modifikatora. Odabrani su organski modifikatori različitih osnovnih karakteristika koje definišu ponašanje u reverzno-faznom hromatografskom sistemu, u cilju ispitivanja njihovog efekta na određivanje parametara lipofilnosti ispitivanih jedinjenja. U **Tabeli 3.1.4** su date karakteristike primenjenih organskih modifikatora.

Tabela 3.1.4. Neke karakteristike primenjenih organskih modifikatora

Organski modifikator	ϵ	D	S	P	χ_d	χ_e	χ_n	η
tetrahidrofuran	7,5	1,75	4,4	4,0	0,38	0,20	0,42	0,46
<i>n</i> -propanol	22,8	1,68	4,1	4,0	0,54	0,19	0,27	2,30
acetone	21,5	2,88	3,4	5,1	0,35	0,23	0,42	0,32
metanol	31,2	1,70	3,0	5,1	0,48	0,22	0,31	0,60
acetonitril	37,1	3,92	3,1	5,8	0,31	0,27	0,42	0,37

ϵ –dielektrična konstanta; D–dipolni moment; S–eluciona moć za RP hromatografski sistem; P–Snyderov parametar polarnosti; χ_e –proton akceptorski doprinos; χ_d –proton donorski doprinos; χ_n –doprinos dipol interakcija; η –koeficijent viskoznosti (mPa·s)

Organski modifikator, kao komponenta mobilne faze hromatografskog sistema, ostvaruje specifične interakcije sa stacionarnom fazom, kao i molekuli analita (Zapała & Waksmondzka-Hajnos, 2005). Povećana koncentracija organske komponente u mobilnoj fazi dovodi do

smanjenja retencije molekula analita (Anderson et al., 1997; Blagus, Cinčić, Friščić, Kaitner, & Stilinović, 2010). Eluciona moć, kao jedna od najznačajnijih karakteristika rastvarača koji se primenjuje u hromatografiji, u velikoj meri zavisi od upotrebljenog sorbenta i predstavlja meru njegovog kapaciteta da stupi u međumolekulske interakcije tj. predstavlja energiju adsorpcije molekula analita po jedinici površine sorbenta. Eluciona moć smeše rastvarača izračunava se na osnovu elucione moći svakog pojedinačnog rastvarača (S) i njihovog udela u smeši. Neophodno je da mobilna faza ima odgovarajuću elucionu moć kako bi se dobile optimalne vrednosti retencionih parametara (R_F vrednosti u opsegu 0,2-0,8).

Eksperimentalno dobijeni retencioni parametri (R_M) direktno zavise od koncentracije organske faze u hromatografskom sistemu. Ekstrapolacijom na udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi od 0% dobija se parametar lipofilnosti R_M^0 . Ova linearna korelacija može biti izražena jednačinom $R_M = R_M^0 + m\phi$, gde je ϕ koncentracija organske komponente u mobilnoj fazi, dok je m nagib i predstavlja udeo hidrofobne površine ispitivanog jedinjenja. Retencija ispitivanih jedinjenja se smanjuje sa udelom organske komponente u mobilnoj fazi, koja poboljšava performanse mobilne faze, zbog činjenice da se parameter lipofilnosti određen na ovaj način teorijski dobija kao rezultat primene hromatografskog sistema u kome je mobilna faza čista voda.

Na hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja, pored nespecifičnih interakcija sa stacionarnom fazom, utiču i specifične interakcije ispitivanih jedinjenja sa mobilnom fazom. Različit stepen interakcija ispitivanih jedinjenja sa stacionarnom, odnosno mobilnom fazom, pri upotrebi različitih organskih rastvarača, uticaće na razlike u R_M vrednostima, pa samim tim i na R_M^0 vrednosti. Primenjeni organski modifikatori imaju različite proton-donorske i proton-akceptorske sposobnosti, kao i sklonost ka dipol-interakcijama, u zavisnosti od vrste i strukture posmatranih jedinjenja. Polarnost organskog modifikatora je, najčešće, najvažnija za njegov odabir kao komponente mobilne faze i predstavlja sposobnost rastvarača da ostvari interakcije sa analitom (dipol-dipol interakcijama ili polarizacijom). Navedene interakcije su jače izražene ukoliko je analit polarizabilan. Pored osnovnih karakteristika organskog modifikatora, kao što su različiti parametri koji izražavaju polarnost, veoma je važna i viskoznost koja je odgovorna za smanjenje disperzije u toku procesa hromatografskog odvajanja (Krasikov, 2003). Kiselost i baznost rastvarača definiše sposobnost organskih modifikatora da se ponašaju kao proton donori ili proton akceptori, pri građenju vodoničnih veza sa odgovarajućim sorbentima. Molekuli

mobilne faze (voda i organski modifikator) se u procesu hromatografskog odvajanja jednim delom sorbuju na površini stacionarne faze. Ovaj proces je kod RP sistema usmeren samo na konkurentnu reakciju organskog modifikatora u odnosu na molekule analita, zbog nepolarne površine stacionarne faze, pa je zbog toga primenjeni organski modifikator odgovaran i za pojavljivanje razlika u svojstvima stacionarne faze, usled promene organske komponente u mobilnoj fazi. Cserhati je upotrebljavajući silika-gel impregniran parafinom utvrdio postojanje značajnih razlika, u zavisnosti od upotrebljenog organskog modifikatora (metanol, aceton ili acetonitril). (T. Cserhádi, 1984).

U okviru ove doktorske disertacije ispitivan je uticaj organskog modifikatora na hromatografsko ponašanje i određivanje parametara lipofilnosti dve grupe Šifovih baza: 12 Šifovih baza derivata β -diketona i 9 Šifovih baza derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja. Upotrebljeni su monokomponentni organski modifikatori iz različitih grupa Snyder-ovog trougla, kao i njihove dvokomponentne smeše. Odabrani su tako da imaju različitu elucionu moć i da ispoljavaju različite sposobnosti da doniraju ili prime protone.

3.1.2.1. Šifove baze derivati β -diketona

Lipofilnost 12 Šifovih baza derivata β -diketona (**Tabela 3.1.1**) je određivana primenom 10 mobilnih faza na tankom sloju RP-18 silika-gela. Primenjeno je 5 mobilnih faza koje predstavljaju smešu organskog rastvarača (aceton, metanol, acetonitril, n-propanol ili tetrahidrofuran) i vode u sledećim zapreminskim odnosima 8:2, 6:4, 4:2 i 2:8. Pored toga primenjene su i 4 mobilne faze koje su u organskom delu mobilne faze sadržavale smešu dva organska rastvarača tj. modifikatora koji su pomešani u zapreminskom odnosu 1:1 i koja je zatim sa vodom mešana u zapreminskim odnosima 8:2, 6:4, 4:2 i 2:8. Korišćene su sledeće smeše organskih rastvarača: acetonitril i metanol, metanol i tetrahidrofuran, acetonitril i tetrahidrofuran i smeša acetonitrila i acetona. Na taj način je dobijeno 10 potpuno različitih reverzno-faznih hromatografskih sistema koji predstavljaju hromatografski model sistem u kome je ispitivan uticaj organskog dela mobilne faze na eksperimentalno određivanje parametra lipofilnosti ispitivanih jedinjenja. Takođe, ispitivan set jedinjenja pripada homologoj seriji koja je primenjena kao model sistem u kome može da se vrši ispitivanje uticaja supstituenta, kao i uticaja strukture diaminskog mosta na hromatografsko ponašanje, kao i na eksperimentalno

određivanje parametara lipofilnosti. Ovakvim pristupom se mogu dobiti značajne informacije o svim navedenim uticajima, kao i o različitim efektima koje može da ispolji organski modifikator u datom sistemu na celokupni molekul ispitivanog jedinjenja ili na pojedine njegove delove. Pomoću molekulskih deskriptora moguće je definisati deo molekula odgovoran za ispoljavanje lipofilnosti. Na taj način, utvrđena je strukturna karakteristika molekula odgovorna za ispoljavanje lipofilnosti i koja može da bude favorizovana ili suzbijena ukoliko ometa ili otežava neku primenu datog jedinjenja. Parametri lipofilnosti R_M^0 ispitivanih jedinjenja (**Tabela 3.1.1**) dobijeni primenom različitih organskih modifikatora, zajedno sa statističkim parametrima, su prikazani u **Tabelama 3.1.5-3.1.7**.

Tabela 3.1.5. Parametri lipofilnosti dobijeni primenom metanola, acetona i tetrahidrofurana kao organskih modifikatora.

Br.	MeOH				Ac				THF			
	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s
1	0.606	-1.341	0.958	0.155	0.503	-1.106	0.975	0.090	0.880	-2.060	0.987	0.132
2	1.598	-2.268	0.978	0.188	0.797	-1.616	0.993	0.075	1.153	-1.788	0.998	0.041
3	1.443	-2.114	0.997	0.059	1.268	-2.102	0.983	0.153	1.265	-1.528	0.996	0.055
4	1.273	-1.682	0.946	0.224	1.032	-2.232	0.991	0.115	1.527	-2.235	0.974	0.200
5	0.854	-1.802	0.991	0.094	0.733	-1.550	0.989	0.089	1.677	-2.600	0.999	0.037
6	1.305	-1.934	0.975	0.169	1.498	-2.492	0.971	0.237	1.586	-2.449	0.993	0.112
7	0.625	-1.217	0.990	0.193	0.472	-1.102	0.976	0.095	1.062	-2.164	0.978	0.180
8	1.001	-1.781	0.971	0.170	1.083	-1.941	0.976	0.168	1.141	-2.342	0.984	0.162
9	1.324	-1.510	0.992	0.076	1.069	-2.002	0.961	0.224	1.454	-2.474	0.996	0.091
10	1.425	-1.941	0.986	0.128	1.083	-1.941	0.976	0.168	1.443	-2.482	0.982	0.187
11	0.807	-1.434	0.964	0.154	0.997	-1.958	0.988	0.120	1.193	-2.269	0.995	0.084
12	1.620	-2.034	0.997	0.061	1.213	-2.381	0.972	0.222	1.766	-2.833	0.991	0.145

Tabela 3.1.6. Parametri lipofilnosti dobijeni primenom acetonitrila, *n*-propanola i smeše acetonitril/metanol kao organskih modifikatora.

Br.	ACN				nPrOH				ACN/MeOH			
	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s
1	0.844	-1.669	0.983	0.122	0.247	-1.179	0.971	0.112	0.740	-1.521	0.993	0.068
2	1.546	-2.392	0.985	0.160	1.312	-2.400	0.954	0.293	1.321	-2.079	0.994	0.086
3	1.523	-2.604	0.995	0.099	1.101	-2.212	0.974	0.199	1.422	-1.670	0.979	-1.521
4	1.423	-2.314	0.992	0.116	1.003	-1.853	0.993	0.083	1.056	-1.840	0.994	0.077
5	1.660	-3.044	0.989	0.173	0.813	-1.773	0.977	0.150	1.272	-2.109	0.978	0.174
6	1.834	-3.655	0.984	0.255	1.523	-2.801	0.998	0.062	1.530	-2.320	0.991	0.118
7	1.229	-2.050	0.997	0.059	0.750	-1.488	0.952	0.185	0.683	-1.240	0.946	0.165
8	0.779	-1.450	0.989	0.083	0.474	-1.848	0.988	0.111	0.745	-1.361	0.986	0.090
9	1.463	-2.470	0.991	0.126	1.138	-2.345	1.000	0.025	1.262	-2.088	0.932	0.315
10	1.429	-2.040	0.999	0.035	1.186	-2.026	0.987	0.130	1.174	-1.679	0.987	0.107
11	1.532	-2.400	0.985	0.165	1.405	-2.502	0.997	0.070	2.525	-3.828	0.956	0.457
12	1.326	-2.309	0.999	0.037	1.158	-2.600	0.973	0.240	0.984	-1.703	0.938	0.244

Tabela 3.1.7. Parametri lipofilnosti dobijeni primenom smeše metanol/tetrahidrofur, acetonitril/tetrahidrofur i acetonitril/acetone kao organskih modifikatora.

Br.	MeOH/THF				ACN/THF				ACN/Ac			
	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s
1	0.536	-1.144	0.934	0.170	0.408	-1.185	0.964	0.127	0.765	-1.586	0.996	0.056
2	1.002	-1.752	0.977	0.147	0.910	-1.708	0.966	0.177	0.962	-1.536	0.976	0.132
3	1.575	-2.482	0.982	0.184	1.025	-2.021	0.990	0.112	1.325	-2.061	0.977	0.173
4	1.063	-1.828	0.987	0.115	1.336	-2.222	0.992	0.110	1.045	-1.802	0.990	0.099
5	1.260	-2.137	0.990	0.117	0.959	-1.975	0.997	0.060	2.463	-3.880	0.951	0.490
6	1.533	-2.214	0.967	0.226	1.318	-2.369	0.996	0.087	1.656	-2.430	0.998	0.055
7	0.582	-1.258	0.985	0.086	0.840	-1.406	0.999	0.021	0.880	-1.791	0.999	0.032
8	0.840	-1.421	0.979	0.114	0.664	-1.504	0.994	0.062	1.064	-1.622	0.995	0.062
9	1.044	-1.772	0.997	0.051	1.326	-1.949	0.908	0.349	1.240	-2.017	0.999	0.037
10	1.141	-1.982	0.946	0.262	0.955	-1.740	0.992	0.087	1.273	-2.110	0.985	0.144
11	0.683	-1.436	0.930	0.220	0.856	-1.593	0.991	0.083	0.935	-1.830	0.995	0.071
12	1.157	-1.801	0.968	0.181	1.109	-1.767	0.965	0.185	1.376	-2.031	1.000	0.012

Dobijeni rezultati prikazani u **Tabelama 3.1.5-3.1.7** potvrđuju činjenicu da organski modifikatori utiču na određivanje parametara lipofilnosti, jer su primenom različitih organskih rastvarača kao modifikatora dobijene različite vrednosti parametra lipofilnosti za ista ispitivana jedinjenja. Poredeći karakteristike upotrebljenih organskih rastvarača, kao i njihovih smeša, vidi se da najznačajnije razlike postoje u elucionoj moći, proton-donorskim i proton akceptorskim sposobnostima. Eluciona moć organskog modifikatora predstavlja njegovu sposobnost da rastvori ispitivana jedinjenja, dok je selektivnost organskog modifikatora okarakterisana parametrima koji definišu njegove proton-donorske, proton-akceptorske osobine, kao i interakcije sa dipolima.

Apsolutne vrednosti nagiba krivih koje su dobijene korelacijom retencionog parametra R_M i udela organskog modifikatora u mobilnoj fazi (tj. njegove koncentracije) su najveće za THF, a najmanje za MeOH (**Tabela 3.1.8**).

Tabela 3.1.8. Vrednosti nagiba (m) kao parametra hidrofobnosti

	MeOH	Ac	THF	ACN	<i>n</i> -PrOH	ACN/MeOH	MeOH/THF	ACN/THF	ACN/Ac
1	-1.341	-1.106	-2.060	-1.669	-1.179	-1.521	-1.144	-1.185	-1.586
2	-2.268	-1.616	-1.788	-2.392	-2.400	-2.079	-1.752	-1.708	-1.536
3	-2.114	-2.102	-1.528	-2.604	-2.212	-1.670	-2.482	-2.021	-2.061
4	-1.682	-2.232	-2.235	-2.314	-1.853	-1.840	-1.828	-2.222	-1.802
5	-1.802	-1.550	-2.600	-3.044	-1.773	-2.109	-2.137	-1.975	-3.880
6	-1.934	-2.492	-2.449	-3.655	-2.801	-2.320	-2.214	-2.369	-2.430
7	-1.217	-1.102	-2.164	-2.050	-1.488	-1.240	-1.258	-1.406	-1.791
8	-1.781	-1.941	-2.342	-1.450	-1.848	-1.361	-1.421	-1.504	-1.622
9	-1.510	-2.002	-2.474	-2.470	-2.345	-2.088	-1.772	-1.949	-2.017
10	-1.941	-1.941	-2.482	-2.040	-2.026	-1.679	-1.982	-1.740	-2.110
11	-1.434	-1.958	-2.269	-2.400	-2.502	-3.828	-1.436	-1.593	-1.830
12	-2.034	-2.381	-2.833	-2.309	-2.600	-1.703	-1.801	-1.767	-2.031

Ovo je u skladu sa porastom elucione moći ovih organskih modifikatora. U odnosu na sve primenjene organske modifikatore THF ima najveću (4,4), dok MeOH ima najnižu elucionu moć (3,0). Eluciona moć raste sa porastom koncentracije organskog modifikatora u mobilnoj fazi.

Ova dva rastvarača se veoma razlikuju i po drugim osobinama. Metanol je u poređenju sa THF proton-donor i ne ostvaruje značajne interakcije sa stacionarnom RP fazom, dok je THF sklon da se adsorbuje nespecifičnim interakcijama na površinu sorbenta što može da ima pozitivan efekat na određivanje lipofilnosti ispitivanih jedinjenja, jer je cilj da ispitivana jedinjenja ispolje svoje lipofilne osobine koje bi odgovarale onima koje imaju u realnom okruženju, npr. pri prolasku kroz ćelijsku membranu.

Izražena sorpcija THF, pri čemu se na površini stacionarne faze formira monosloj organskog modifikatora, tako da je polarni deo molekula THF okrenut ka površini, tj. ka ispitivanim supstancama, što omogućava jače interakcije ispitivanih jedinjenja sa površinom stacionarne faze i samim tim dovodi do jače retencije. Način sorpcije na površini sorbenta je različit za različite organske modifikatore, tako da THF i ACN obrazuju tanak sloj multimolekulskog sloja na stacionarnoj fazi, dok se MeOH adsorbuje u obliku monomolekulskog sloja. Ovo dovodi do principijelno velike razlike u retencionom mehanizmu ispitivanih jedinjenja u primenjenim hidro-organskim hromatografskim sistemima. Retencija ispitivanih jedinjenja je posledica raspodele u tri različita procesa: analit se raspodeljuje između organskog modifikatora koji je u smeši sa vodom u mobilnoj fazi, organskog modifikatora koji se nalazi na stacionarnoj fazi i površine modifikovanog sorbenta. Uspostavljanje ravnoteže u ova tri procesa dovodi do različitog ponašanja ispitivanih jedinjenja u primenjenim hromatografskim sistemima u zavisnosti od osobina prisutnog organskog modifikatora. Ove ravnoteže direktno utiču na ispoljavanje osobine lipofilnosti posmatranih jedinjenja i daju mogućnost pronalaženja optimalnih organskih modifikatora tj. optimalnih hromatografskih sistema u kojima bi određivanje lipofilnosti odgovaralo realnom okruženju, čime bi dobijene vrednosti bile validne za nastavak ispitivanja biološke aktivnosti.

U cilju utvrđivanja uticaja prirode organskog modifikatora na eksperimentalno određivanje parametra lipofilnosti, R_M^0 , posmatran je Pearsonov korelacioni matriks parametara dobijenih primenom navedenih mono- i dvokomponentnih organskih modifikatora (**Tabela 3.1.9**). Ova korelacija može da pruži dodatno objašnjenje o sličnosti i razlikama primenjenih organskih modifikatora koje se ispoljavaju u interakcijama sa molekulima ispitivanih jedinjenja, kao i sa površinom stacionarne faze.

Tabela 3.1.9. Korelacioni matiks R_M^0 vrednosti dobijenih primenom različitih mono- i dvokomponentnih organskih modifikatora

	MeOH	Ac	THF	ACN	nPrOH	ACN/MeOH	MeOH/THF	ACN/THF
Ac	0.7044							
THF	0.5367	0.6307						
ACN	0.4228	0.5722	0.6005					
nPrOH	0.6208	0.7276	0.5018	0.8483				
ACN/MeOH	0.0843	0.4280	0.1368	0.6163	0.7016			
MeOH/THF	0.6759	0.7956	0.6816	0.6713	0.5412	0.1923		
ACN/THF	0.6069	0.7138	0.7603	0.7211	0.7039	0.2460	0.6557	
ACN/Ac	0.1259	0.2895	0.7242	0.5515	0.1868	0.1155	0.6507	0.3601

Dobijeni korelacioni koeficijenti ukazuju da postoje jasno definisane razlike između upotrebljenih organskih modifikatora koje su rezultat osobina koje oni mogu da ispolje u hromatografskom sistemu pri interakcijama sa stacionarnom fazom i sa ispitivanim jedinjenima. Znači, da je u primenjenom RP hromatografskom sistemu izražen uticaj vrste primenjenog organskog modifikatora na određivanje parametara lipofilnosti. U slučaju monokomponentnih organskih modifikatora najbolja korelacija je utvrđena između acetona i metanola, bez obzira na značajnu razliku u elucionoj moći (acetona 3,4; metanol 3,0) i činjenicu da je metanol protični, dok je aceton aprotični rastvarač. Naime, vrednosti njihovih parametara polarnosti P , koji je definisao Snyder, kao i vrednosti doprinosa χ_e (proton akceptorski doprinos), χ_d (proton donorski doprinos) i χ_n (doprinos dipol interakcija) su jako bliske, što za posledicu ima veoma slično ponašanje u posmatranom reverzno-faznom sistemu i ostvarivanje sličnih interakcija po vrsti i intenzitetu, kako sa površinom sorbenta, tako i sa ispitivanim jedinjenjima. Sa druge strane, tetrahidrofur koga karakteriše manja polarnost, ali jača eluciona moć u RP hromatografskom sistemu pokazuje zadovoljavajuću korelaciju sa acetonom i acetonitrilom, pri određivanju parametara lipofilnosti. Takođe, visoka korelacija utvrđena na osnovu parametara lipofilnosti dobijenih primenom *n*-propanola i acetonitrila je neočekivana, obzirom na njihovu veliku razliku u pojedinim osobinama, kao što je parametar polarnosti i položaj u Snyderovoj eluotropnoj seriji, suprotna protičnost i očigledna razlika u elucionoj moći u RP hromatografskom sistemu.

Verovatno da ispoljavajući svoje osobine, ovi organski modifikatori ostvaruju interakcije koje su međusobno suprotne po dejstvu. Naime, *n*-propanol ostvaruje jače interakcije sa stacionarnom fazom, dok acetonitril favorizuje interakcije sa ispitivanim jedinjenjima. Na taj način dovode do sličnog efekta. Alkohol, svojim interakcijama sa stacionarnom fazom, povećava njenu polarnost, dok acetonitril smanjuje polarnost ispitivanih jedinjenja. Iz podataka koji su dati u **Tabeli 3.1.9** vidi se da dvokomponentni organski modifikatori pokazuju zadovoljavajuću korelaciju sa organskim modifikatorima, bilo da su mono- ili dvokomponentni, samo u odnosu na vrednosti elucione moći koju ispoljavaju.

3.1.2.1.1. Korelacija eksperimentalno određenih i izračunatih parametara lipofilnosti

Eksperimentalno određeni parametri lipofilnosti ispitivanog seta polidentatnih Šifovih baza, derivata β -diketona, u hromatografskim RP sistemima primenom mono- i dvokomponentnih organskih modifikatora su korelisani sa izračunatim parametrima lipofilnosti u cilju sagledavanja efekta organskog modifikatora na eksperimentalno određivanje, kao i na saglasnost sa izračunatim parametrima. Poznato je da postoji statistički značajna povezanost između retencionih parametara dobijenih primenom reverzno-fazne hromatografije i kompjuterski izračunatih parametara lipofilnosti. Dobijeni Pearsonov korelacioni matriks je prikazan u **Tabeli 3.1.10**.

Dobijeni koeficijenti korelacije ukazuju na značajnu zavisnost ekperimentalno određenih parametara lipofilnosti od primenjenog organskog modifikatora koji znatno utiče na promene u monosloju na površini RP sorbenta, na samu orijentaciju molekula ispitivanih jedinjenja u mobilnoj fazi, kao i njihovo međusobno dejstvo u datom hromatografskom sistemu.

Koeficijenti korelacije parametara lipofilnosti ukazuje na činjenicu da primena THF, kao organskog modifikatora, omogućava takav hromatografski sistem u kome su favorizovane interakcije za koje je isključivo odgovorna lipofilnost samog jedinjenja. Parameter lipofilnosti $R_M^0(\text{THF})$ pokazuje najveću korelaciju u Pearsonovom korelacionom matriksu (0.782) sa $\log P_{\text{oct}}$ (predviđeni oktanol/gas podeoni koeficijent), kao i sa $\log P_{\text{o/w}}$ (predviđeni oktanol/voda podeoni koeficijent) (0,654), što samo predstavlja potvrdu svega navedenog tj. da je THF modifikator

koji predstavlja izbor za primenu u RP hromatografskom sistemu pri određivanju parametra lipofilnosti ispitivanih ili strukturno sličnih jedinjenja.

Tabela 3.1.10. Korelacioni matriks eksperimentalnih i izračunatih parametara lipofilnosti

R_M^0	polrz	logPC16	logPoct	logPw	logPo/w	logS	CIlogS	logHERG	PCaco	logBB	PMDCK	logKp
MeOH	0.588	0.411	0.741	0.525	0.719	-0.711	-0.794	-0.545	0.353	0.250	0.400	0.552
THF	0.424	0.172	0.782	0.273	0.654	-0.685	-0.788	-0.275	0.464	0.564	0.533	0.383
Ac	0.172	-0.109	0.547	0.031	0.447	-0.600	-0.556	-0.143	0.326	0.679	0.644	0.089
nPrOH	0.090	-0.055	0.430	0.050	0.253	-0.328	-0.377	-0.107	0.197	0.395	0.239	0.100
ACN/MeOH	0.264	0.043	0.561	0.129	0.468	-0.562	-0.537	-0.247	0.472	0.508	0.408	0.256
MeOH/ THF	0.027	-0.084	0.236	-0.067	0.149	-0.193	-0.187	0.018	0.340	0.345	0.125	0.063
ACN/THF	0.336	0.203	0.658	0.314	0.478	-0.431	-0.673	-0.202	0.131	0.313	0.296	0.326
ACN/Ac	0.486	0.259	0.779	0.382	0.665	-0.743	-0.723	-0.507	0.450	0.398	0.354	0.449

Najveći negativni koeficijent korelacije (-0.788) pokazuje sa logS (predviđena rastvorljivost u vodi). Parameter lipofilnosti R_M^0 (THF) je u saglasnosti sa logBB tj. predviđenim mozak/krv partitionim koeficijentom i PMDCK parametrom koji predviđa prolazak kroz ćelijsku membranu. Ovako dobru povezanost sa izračunatim parametrima lipofilnosti i to onima koji definišu prolazak kroz ćelijsku membranu tj. omogućavaju bolju distribuciju u organizmu, pokazuje i parametar lipofilnosti eksperimentalno dobijen u prisustvu acetona i metanola kao organskog modifikatora. Primena dvokomponentnih organskih modifikatora, bez obzira na dobijene parametre lipofilnosti, ne pokazuju značajnu korelaciju sa izračunatim, izuzev smeše acetonitrila i tetrahidrofurana, verovatno zbog toga što ova smeša, kao i pojedinačne komponente smeše imaju visoku elucionu moć i aprotične osobine. Dvokomponentni organski modifikatoripovećavaju broj interakcija kojima mogu da budu izložena ispitivana jedinjenja, kao i površina stacionarne faze. Na taj način se povećava i broj ravnoteža u kojima učestvuje ispitivano jedinjenje, pri čemu ne može da ispolji svoju lipofilnost koja odgovara onoj u realnom okruženju. Takođe, same komponente binarnog organskog modifikatora, međusobno

predstavljaju konkurenciju na površini sorbenta čime se najverovatnije ne postiže uniformnost stacionarne faze.

3.1.2.2. Šifove baze derivati aromatičnih karbonilnih jedinjenja

Retencioni parametri (R_F i R_M), za devet ispitivanih polidentatnih Šifovih baza, derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja su određeni primenom tri različite binarne mobilne faze: metanol-voda, acetonitril-voda i tetrahidrofuran-voda. Ispitivani set jedinjenja ne pripada homologoj seriji i predstavlja set strukturno različitih jedinjenja. Ispitivanje efekta organskog modifikatora na hromatografsko ponašanje i određivanje parametra lipofilnosti kod jedinjenja koja će se različito ponašati u svakom primenjenom hromatografskom sistemu, zbog svojih strukturnih različitosti, omogućava pronalaženje određene pravilnosti koja bi za takve serije jedinjenja bila primenjena, kako za ispitivanja strukturno različitih jedinjenja, tako i za ciljnu sintezu novih strukturno sličnih jedinjenja. Izabrani organski modifikatori, zbog svojih karakteristika (protičnost, dielektrična konstanta, dipolni moment, sposobnost građenja vodoničnih veza) omogućavaju ostvarivanje različitih vrsta interakcija u RP hromatografskom sistemu. Metanol i tetrahidrofuran su protični rastvarači, acetonitril je aprotičan, dok metanol jedini ima sposobnost građenja vodoničnih veza, slab je nuklofil i ostvaruje veze sa jakim elektrofilima. Eksperimentalno određeni parametri lipofilnosti, zajedno sa statističkim parametrima su prikazani u **Tabeli 3.1.11**.

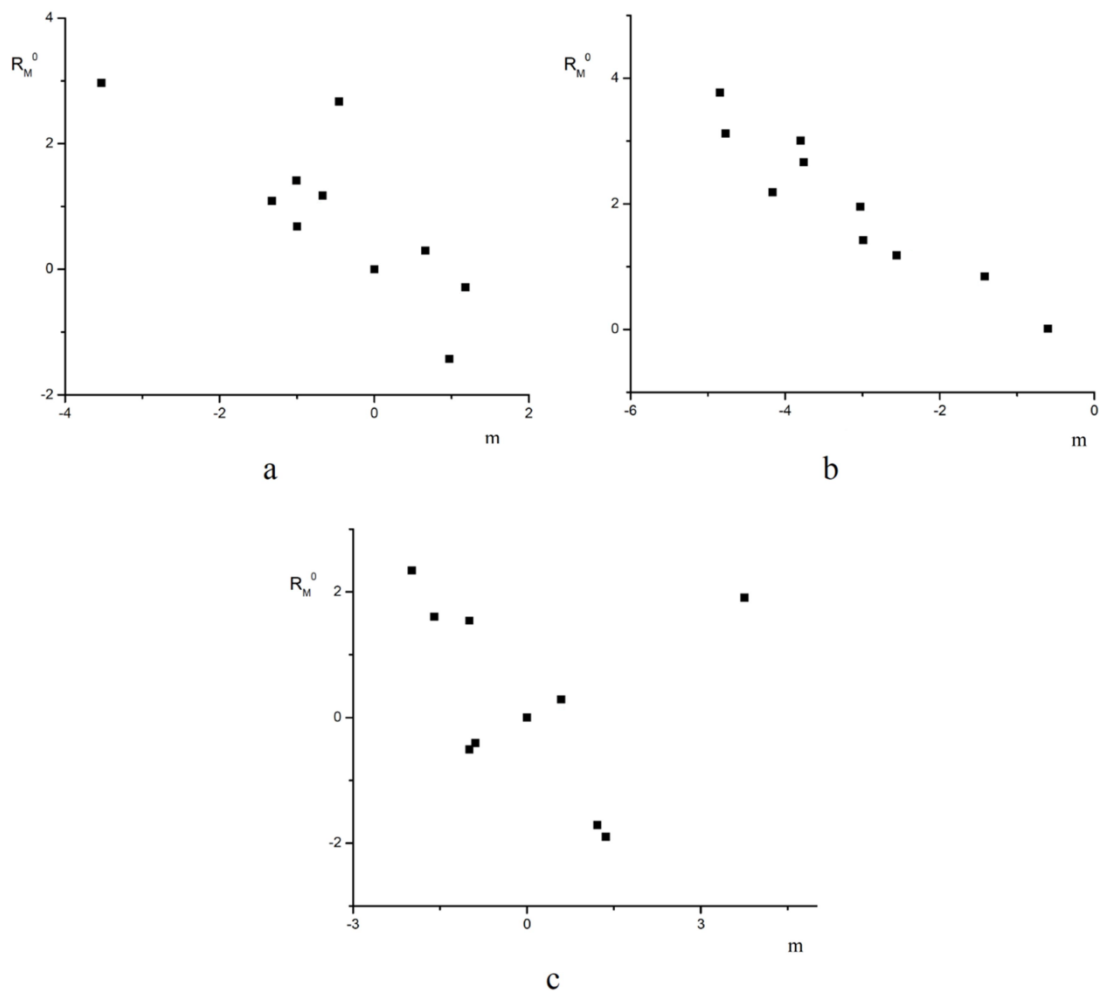
U cilju ispitivanja uticaja sastava mobilne faze na prepoznavanje sličnosti i/ili razlika ispitivanih jedinjenja, urađena je korelacija eksperimentalno dobijenih parametara lipofilnosti (R_M^0) i hidrofobne površine (m). Korelacije za sve ispitivane mobilne faze su prikazane na **Slici 3.1.3**, dok su odgovarajući statistički parametri dati u **Tabeli 3.1.12**.

Tabela 3.1.11. Parametar lipofilnosti R_M^0 , nagib (m), korelacioni koeficijent (r) i greška (s)

Br..	Metanol				Acetonitril				Tetrahidrofur			
	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s	R_M^0	m	r	s
1	0.284	0.599	0.960	0.110	-	-	-	-	-0.007	-0.602	-0.972	0.148
2	1.603	-1.600	-0.877	0.543	0.680	-1.000	-0.975	0.131	1.423	-2.990	-0.983	0.261
3	1.905	3.752	0.965	0.667	2.671	-0.456	-0.976	0.134	2.181	-4.163	-0.954	0.346
4	-1.711	1.214	0.922	0.328	1.173	-0.667	-0.974	0.133	1.954	-3.036	-0.985	0.344
5	-1.898	1.365	0.935	0.340	-0.288	1.182	0.975	0.143	3.118	-4.770	-0.994	0.374
6	-0.409	-0.890	-0.937	0.205	0.294	0.663	0.951	0.174	3.770	-4.843	-0.965	0.389
7	1.543	-0.991	-0.971	0.153	1.412	-1.009	-0.976	0.194	0.845	-1.422	-0.947	0.161
8	-0.505	-0.991	0.922	0.081	1.089	-1.325	-0.971	0.187	1.180	-2.555	-0.953	0.291
9	2.340	-1.986	-0.997	0.022	2.969	-3.53	-0.985	0.101	2.659	-3.762	-0.995	0.063

Tabela 3.1.12. Regresioni parametri za homologe serije u različitim organskim modifikatorima

Organski modifikator	r^2	Odsečak	Nagib
Metanol	-0.065	0.325(±0.488)	-0.199(±0.298)
Acetonitril	0.596	0.458(±0.287)	-0.773(±0.205)
Tetrahidrofur	0.886	-0.544(±0.327)	-0.800(±0.095)



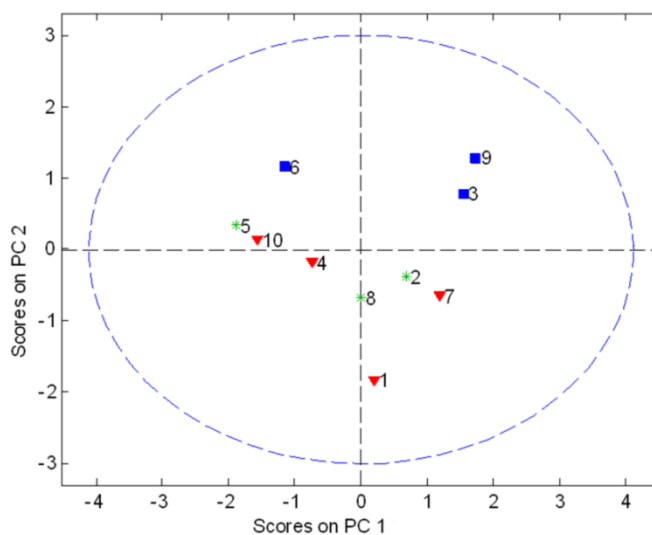
Slika 3.1.3. Homologe serije u tri različita organska modifikatora: a) acetonitril, b) tetrahidrofuran i c) metanol

Iz **Tabele 3.1.12** se vidi da se korelacioni koeficijenti povećavaju u nizu: MeOH < ACN < THF. Tetrahidrofuran i acetonitril su aprotični rastvarači. Takođe, acetonitril ima veću elucionu moć. Iz dobijenih rezultata se vidi da acetonitril i tetrahidrofuran ne pokazuju zadovoljavajuću selektivnost. Za razliku od njih, metanol kao protični rastvarač, u istim uslovima, pokazuje odličnu selektivnost, što znači da upotreba metanola, kao organskog modifikatora, daje bolje razdvajanje strukturno sličnih jedinjenja. Naime, u toku uspostavljanja ravnoteže, pre razvijanja hromatograma, metanol formira monosloj na stacionarnoj fazi i time omogućava građenja vodoničnih veza na datom sorbentu i ispoljavanje lipofilnosti koja je u boljoj saglasnosti sa n-oktanolom.

Na osnovu uspostavljenih korelacija, primenom tetrahidrofurana se omogućava da se ispitivana jedinjenja, uprkos strukturnim razlikama, ponašaju kao članovi homologe serije. Stoga može da se zaključi da je za određivanje lipofilnosti ispitivanih jedinjenja reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom najbolje primeniti tetrahidrofuran kao organski modifikator. Najverovatnije, visoko polarizovani π -elektronski sistem, u strukturi ispitivanih Šifovih baza, omogućava dipol interakcije molekula i sa mobilnom i sa stacionarnom fazom u RP hromatografskom sistemu kada je tetrahidrofuran upotrebljen kao organski modifikator.

Primenom PCA na retencione parametre mogu se dobiti informacije o sličnostima strukturnih osobina jedinjenja, kao i o specifičnim interakcijama u različitim hromatografskim sistemima. Takođe, primenom PCA na set izračunatih deskriptora mogu se grupisati jedinjenja na osnovu njihovih strukturnih osobina. Različiti strukturni deskriptori u sebi sadrže značajne informacije o strukturi posmatranog molekula. Zbog toga je potrebno primeniti PCA, kako na molekulske deskriptore, tako i na retencione parametre. PCA se može upotrebiti i za detekciju jedinjenja koja potpuno odstupaju iz ispitivanog seta jedinjenja, a koji mogu biti uklonjeni pre finalnog modelovanja.

Iz dobijenih rezultata PCA analize se jasno vidi da organski modifikatori imaju uticaja na interakcije ispitivanih jedinjenja sa stacionarnom fazom u određenom hromatografskom sistemu (Slika 3.1.4).



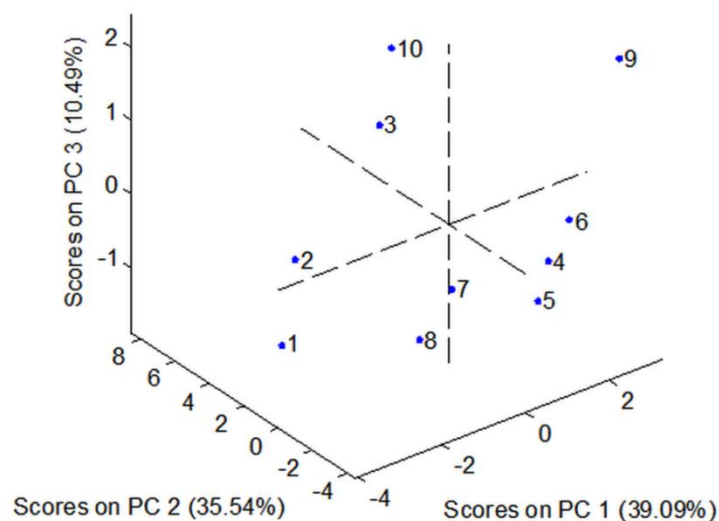
Slika 3.1.4. PC1-PC2 zavisnost eksperimentalno određenog parametra lipofilnosti

(R_M^0): acetonitril (*), metanol (▼), tetrahidrofuran (■).

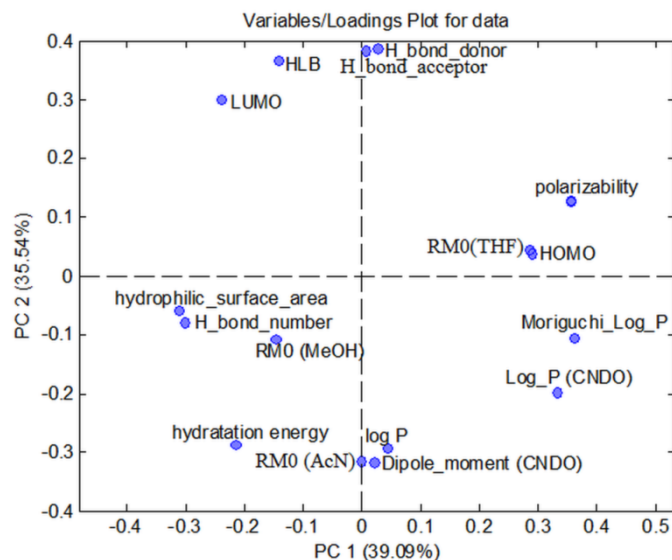
Ispitivana jedinjenja su primenom PCA odvojena u klase, u odnosu na R_M^0 vrednosti koje su dobijene primenom različitih organskih modifikatora. Na **Slici 3.1.4** prikazana je PC1-PC2 zavisnost eksperimentalno određenog parametra lipofilnosti od primenjenog organskog modifikatora.

U zavisnosti od primenjenog organskog modifikatora, posmatrane polidentatne Šifove baze, derivati aromatičnih karbonilnih jedinjenja, se odvajaju u tri različite grupe. Usled uticaja organskog modifikatora, dominantni separacioni mehanizam, pored adsorpcije, je particija. Orto izomeri ispitivanih jedinjenja (**4** i **7**), zajedno sa jedinjenjem **1** pokazuju zadovoljavajuće odvajanje kada je primenjen metanol kao organski modifikator. To je u saglasnosti sa činjenicom da se ispitivana jedinjenja, pri primenjenim hromatografskim uslovima i pri primeni metanola kao organskog modifikatora, ne ponašaju kao homologa serija. Aldiminska jedinjenja, dobijena iz aromatičnih aldehida, imaju hidroksilnu grupu u orto položaju u odnosu na aldehidnu grupu. Postojanje različitih intramolekulskih vodoničnih veza ($O-H\cdots N$ i/ili $O\cdots H-N$) i odgovarajuća tautomerija između enol-imin i keto-imin oblika, čini ova jedinjenja interesantnim za ispitivanje, bez obzira na strukturnu različitost. Elektronegativnost ili mogućnost doniranja elektronskog para N-supstituenata, njihova pozicija i stereochemija, kao i mogućnost građenja vodonične veze, može dodatno da stabilizuje jedan od tautomera. Takođe, jedinjenja **1** i **5** (*m*-izomeri) i jedinjenje **2** se efikasno odvajaju u acetonitril, dok *sep*-izomeri efikasno odvajaju u tetrahidrofuranu. Rezultati ove analize glavne komponente su u saglasnosti sa ponašanjem ispitivanih Šifovih baza u primenjenim hromatografskim sistemima. Svi podaci se nalaze unutar Hotelling T2 elipse, što ukazuje da nijedno jedinjenje ne odstupa od ispitivanog seta (nema tzv. *Outliera*; **Slika 3.1.4**).

Na **Slici 3.1.5** jedinjenja su grupisana u dve glavne grupe. Prema PC1 komponenti se razdvajaju jedinjenja sa različitim supstituentima (**1–3**, **7**, i **8**), dok se prema PC2 komponenti odvajaju jedinjenja koja sadrže hidroksilnu grupu (**4–6** i **9**). Projekcija korišćenih vektora je prikazana na **Slici 3.1.6**.



Slika 3.1.5. Skor vrednosti prve tri glavne komponente.



Slika 3.1.6. Projekcija vektora za PC1 i PC2.

Najveći uticaj na razdvajanje jedinjenja po PC1 osi imaju parametri koji opisuju veličinu i oblik molekula. Razdvajanje po PC2 je pod uticajem polarnih karakteristika (donori i akceptori vodonične veze, hidrofilni-lipofilni balans, dipolni momenat). R_M^0 vrednosti (za tri organska modifikatora) su grupisane zajedno sa deskriptorima koji su karakteristični za specifične interakcije u odgovarajućim hromatografskim sistemima. R_M^0 vrednosti određene primenom

metanola, kao organskog modifikatora, su u grupi sa deskriptorima koji definišu broj vodoničnih veza i hidrofилnu površinu. R_M^0 vrednosti određene primenom tetrahidrofurana, kao organskog modifikatora, su u grupi sa deskriptorima koji karakterišu veličinu i oblik molekula. Na ovaj način mogu da se odrede činioci koji najviše utiču na hromatografsko ponašanje ispitivanih polidentatnih Šifovih baza u svakom od primenjenih hromatografskih sistema. Pored toga, ispitivanje izabranog seta polidentatnih Šifovih baza, ne tako sličnih struktura, daje uvid na koji način treba pristupiti karakterizaciji potencijalnih lekova i pruža podatke koji mogu da budu korisni pri dizajnu i sintezi potencijalnih novih lekova.

3.1.2.2.1. Korelacija eksperimentalno određenih i izračunatih parametara lipofilnosti

Eksperimentalno određeni parametri lipofilnosti ispitivanog seta polidentatnih Šifovih baza u hromatografskim RP sistemima primenom tri organska modifikatora su korelisani sa izračunatim parametrima lipofilnosti u cilju sagledavanja efekta organskog modifikatora na eksperimentalno određivanje, kao i na saglasnost sa izračunatim parametrima.

Korelisani su hromatografski određeni parametri lipofilnosti R_M^0 dobijeni primenom metanola, acetonitrila i tetrahidrofurana, kao organskih modifikatora, i izračunatih parametara lipofilnosti: polrz (predviđena polarizabilnost), logPC16 (predviđeni heksadekan/gas podeoni koeficijent), logPoct (predviđeni oktanol/gas podeoni koeficijent), logPw (predviđeni voda/gas podeoni koeficijent), logPo/w (predviđeni oktanol/voda podeoni koeficijent), logS (predviđena rastvorljivost u vodi), CllogS (predviđena rastvorljivost u vodi nezavisna od konformacije), logHERG (predviđena IC50 vrednost za blokiranje HERG K^+ kanala), QPPCaco (predviđena očigledna Caco ćelijska propustljivost), logBB (predviđeni mozak/krv podeoni koeficijent), PMDCK (predviđena očigledna MDCK ćelijska propustljivost) i logKp (predviđena propustljivost kože).

Dobijeni koeficijenti korelacije u Pearsonovom korelacionom matriksu (**Tabela 3.1.13**) ukazuju na značajnu zavisnost ekperimentalno određenih parametara lipofilnosti od primenjenog organskog modifikatora koji, prvenstveno, znatno utiče na promene u monosloju na površini RP sorbenta, na samu orijentaciju molekula ispitivanih jedinjenja u mobilnoj fazi, kao i njihovo međusobno dejstvo u datom hromatografskom sistemu.

Tabela 3.1.13. Pearsonov korelacioni matriks eksperimentalno određenih i izračunatih parametara lipofilnosti

	R_M^0 (MeOH)	R_M^0 (AcN)	R_M^0 (THF)
polrz	-0.2605	0.0643	0.7480
logPC16	-0.2367	0.0964	0.7698
logPoct	-0.2407	0.0785	0.7062
logPw	-0.3198	-0.0097	0.6921
logPo/w	-0.2454	0.0842	0.7816
logS	0.2638	-0.0241	-0.7790
CllogS	0.2721	-0.0774	-0.7491
logHERG	0.2124	-0.1128	-0.7734
PCaco	-0.4345	-0.1714	0.2737
logBB	-0.1734	-0.3778	-0.2447
PMDCK	-0.4341	-0.1705	0.2750
logKp	-0.2534	0.1228	0.7622

Koeficijenti korelacije parametra lipofilnosti R_M^0 (MeOH) sa navedenim izračunatim parametrima se nalaze u opsegu od -0.4345 do 0.2721. Statistički, ovi koeficijenti nisu značajni, ali je interesantno napomenuti da je ovako eksperimentalno određena lipofilnost u pozitivnoj korelaciji isključivo sa parametrima rastvorljivosti u vodi, što je u skladu sa činjenicom da je metanol protični rastvarač i slab nukleofil koji ima sposobnost da gradi vodonične veze. Stvaranjem polarnog monosloja na površini nepolarnog RP-18 sorbenta praktično je favorizovao potpuno drugačije interakcije ispitivanih polidentatnih šifovih baza. Očigledno su hidrofobne interakcije bile potpuno zanemarene u ovakvom hromatografskom sistemu. Takođe, koeficijenti korelacije parametra lipofilnosti R_M^0 (ACN) sa izračunatim parametrima se kreću u opsegu od -0.3778 do 0.1228. Ipak, acetonitril je aprotičan rastvarač, koji ne gradi vodonične veze i omogućava u takvom hromatografskom sistemu ostvarivanje hidrofobnih interakcija, kada ispitivana jedinjenja, praktično, celom svojom strukturom utiču na vezivanje. Koeficijenti korelacije parametra lipofilnosti R_M^0 (THF) sa izračunatim parametrima se nalaze u opsegu od -0.7790 do 0.7816. Primena THF kao organskog modifikatora omogućava uspostavljanje RP hromatografskog sistema u kome su favorizovane interakcije za koje je isključivo odgovorna lipofilnost samog jedinjenja. U takvom sistemu dolazi do izražaja osnovna i potpuna lipofilnost

ispitivanih jedinjenja. Iako protičan rastvarač, THF nema sposobnost građenja vodoničnih veza, ali zbog svoje srednje polarnosti može da se primeni u širokom opsegu hromatografskih određivanja. Najveći koeficijent korelacije u Pearsonovom korelacionom matriksu (0,7816) parameter lipofilnosti $R_M^0(\text{THF})$ pokazuje sa $\log P_o/w$ (predviđeni oktanol/voda podeoni koeficijent) što predstavlja potvrdu svega navedenog tj. da je THF modifikator koji predstavlja izbor za primenu u RP hromatografskom sistemu pri određivanju parametra lipofilnosti ispitivanih ili strukturno sličnih jedinjenja. Najveći negativni koeficijent korelacije (-0,7790) je utvrđen za vezu sa $\log S$ (predviđena rastvorljivost u vodi), što je takođe u skladu sa datim objašnjenjima i rezultatima PCA analize.

Parametri lipofilnosti serije Šifovih baza derivata β -diketona i Šifovih baza derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja su određeni u uslovima reverzno-fazne hromatografije primenom različitih organskih modifikatora. Strukture ispitivanih jedinjenja, okarakterisane molekulskim deskriptorima su korelisane sa eksperimentalno dobijenim parametrima lipofilnosti. Iz dobijenih rezultata utvrđen je uticaj primenjenog organskog modifikatora na hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja i na određivanje parametara lipofilnosti, kao i da primenom određenog modifikatora posmatran molekul može da pokaže svoju lipofilnost koja je adekvatna onoj koju bi ispoljio u realnom okruženju, kao što je prolazak kroz ćelijsku membranu. U različitim organskim modifikatorima, različiti delovi strukture su uključeni više, u odnosu na ostali deo, u interakcije sa stacionarnom i sa mobilnom fazom. Pored toga, primenjeni organski modifikator pokazuje sposobnost modifikacije površine primenjenog sorbenta čime utiče na ispoljavanje lipofilnosti posmatranih jedinjenja.

Primena metanola, na primer, kao organskog modifikatora omogućava najbolje odvajanje strukturno sličnih jedinjenja. Međutim, zbog niske korelacije dobijenih retencionih parametara R_M i koncentracije metanola, to nije pogodno za određivanje lipofilnosti. Pored toga, metanol na površini sorbenta pravi monosloj kojim potpuno modifikuje njegovu površinu i otežava ispoljavanje lipofilnosti posmatranih molekula. Nasuprot metanolu, primena THF, dovodi do toga da ispitivana jedinjenja mogu da se posmatraju kao homologa serija, bez obzira na velike razlike u strukturi kao što je slučaj sa ispitivanim Šifovim bazama derivatima aromatičnih karbonilnih jedinjenja. U skladu sa ovim, THF je preporučeni organski modifikator mobilne faze koji je pogodan za određivanje lipofilnosti ispitivanih jedinjenja primenom reverzno-fazne tankoslojne hromatografije.

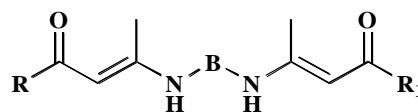
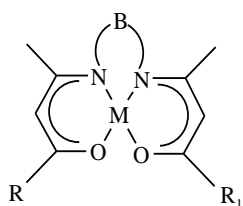
3.2. Ispitivanje uticaja supstituenata na predviđanje retencije Šifovih baza derivata β-diketona i njihovih kompleksa

3.2.1. Materijal i metode

3.2.1.1. Ispitivana jedinjenja

Ispitivano je 12 Šifovih baza (jedinjenja **1-12**), derivata β-diketona, njihovih 12 Cu(II) kompleksa (jedinjenja **13-24**) i 12 Ni(II) kompleksa (jedinjenja **25-36**) (Tabela 3.2.1). Podaci o sastavu i postupcima sinteze ispitivanih jedinjenja su dati u poglavlju 3.1.

Tabela 3.2.1. Strukture ispitivanih Šifovih baza, derivata β-diketona, i njihovih kompleksa



Jedinjenje	Kompleks	R	R ₁	B	Jedinjenje	Šifova baza
(13) (25)	[M(acac ₂ en)] ^{a,b}	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₂	(1)	H ₂ (acac ₂ en)
(14) (26)	[M(acac phacacen)] ^c	CH ₃	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₂	(2)	H ₂ (acac phacacen)
(15) (27)	[M(phacac ₂ en)]	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₂	(3)	H ₂ (phacac ₂ en)
(16) (28)	[M(phacac tfacacen)] ^d	C ₆ H ₅	CF ₃	CH ₂ CH ₂	(4)	H ₂ (phacac tfacacen)
(17) (29)	[M(acac tfacac en)]	CH ₃	CF ₃	CH ₂ CH ₂	(5)	H ₂ (acac tfacac en)
(18) (30)	[M(tfacac ₂ en)]	CF ₃	CF ₃	CH ₂ CH ₂	(6)	H ₂ (tfacac ₂ en)
(19) (31)	[M(acac ₂ pn)] ^e	CH ₃	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂	(7)	H ₂ (acac ₂ pn)
(20) (32)	[M(acac phacacpn)]	CH ₃	C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂	(8)	H ₂ (acac phacacpn)
(21) (33)	[M(phacac ₂ pn)]	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂	(9)	H ₂ (phacac ₂ pn)
(22) (34)	[M(phacac tfacacpn)]	C ₆ H ₅	CF ₃	CH(CH ₃)CH ₂	(10)	H ₂ (phacac tfacac pn)
(23) (35)	[M(acac tfacacpn)]	CH ₃	CF ₃	CH(CH ₃)CH ₂	(11)	H ₂ (acac tfacacpn)
(24) (36)	[M(tfacac ₂ pn)]	CF ₃	CF ₃	CH(CH ₃)CH ₂	(12)	H ₂ (tfacac ₂ pn)

3.2.1.2. Hromatografija

Za proučavanje hromatografskog ponašanja ispitivanih jedinjenja primenjena je tehnika horizontalne tankoslojne hromatografije. Korišćene su komercijalno dostupne ploče silika-gela i RP-18 F_{254S} silika-gela (Merck, Nemačka), veličine 10×10 cm. Sastav primenjenih mobilnih faza je dat u **Tabeli 3.2.2**. Za normalno-faznu hromatografiju upotrebljeno je 11 monokomponentnih mobilnih faza (1-11), 2 dvokomponentne vodene mobilne faze (12, 13) i 4 nevodene dvokomponentne mobilne faze (19-22), dok je za reverzno-faznu hromatografiju upotrebljeno 5 monokomponentnih mobilnih faza (1-5), 7 vodenih dvokomponentnih (12-18) i 2 dvokomponentne nevodene faze (19, 20). Eksperimentalni postupak hromatografskog ispitivanja je detaljno opisan u poglavlju 3.1.

Tabela 3.2.2. Primenjene mobilne faze

Br.	Sastav	Odnos (v/v)
1	hloroform	
2	acetone	
3	metanol	
4	etanol	
5	dihlormetan	
6	ugljentetrahlord	
7	acetonitril	
8	1,2,3,4-tetrahidronaftalen	
9	amil-acetat	
10	dioksan	
11	tetrahidrofuran	
12	metanol : voda	80 : 20
13	dioksan : voda	80 : 20
14	tetrahidrofuran : voda	60 : 40
15	etanol : voda	70 : 30
16	acetonitril : voda	70 : 30
17	izopropil-acetat : voda	70 : 30
18	acetone : voda	70 : 30
19	dihlormetan : ugljentetrahlord	80 : 20
20	toluen : dioksan	60 : 40
21	toluen : dioksan	70 : 30
22	methanol : ugljentetrahlord	60 : 40

3.2.1.3. Izračunavanja

Sve strukture ispitivanih Šifovih baza, derivata aromatičnih karbonilnih jedinjenja, su generisane u HyperChem Professional softveru (verzija 7.0, Hybercube, Gainseville, FL, USA). Geometrijska optimizacija molekulske strukture urađena je pomoću molekulske-mehaničke MM+ metode, koja je zasnovana na MM2 algoritmu. Izračunavanja primenom jedne tačke je urađena semi-empirijskom kvantno hemijskom metodom ZINDO/1. Dodatna izračunavanja su urađena u Molecular Modeling Pro Plus (MMP Plus) programu. Izračunati su sledeći deskriptori: zapremina molekula (MV), površina (SA), energija najviše popunjene orbitale (E_{HOMO}), energija najniže nepopunjene orbitale (E_{LUMO}), dipolni moment (μ), refraktivnost (R), polarizabilnost (α), hidrofilno-lipofilni balans (HLB) i parameter lipofilnosti (ClogP). Statističke kalkulacije, korelacije, odabir varijabli i MLR modelovanja su urađena korišćenjem NCSS statističkog paketa (Hintze, J. (2001) NCSS and PASS Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah). Analiza glavne komponente (PCA) je urađena u PLS Toolbox statističkom paketu (Eigenvector Research, Inc. v. 5.2.2.) u okviru MATLAB programa (verzija 7.4.0.287, R2007a, MathWorks INC, Natick, MA).

3.2.2. Rezultati i diskusija

Hromatografsko ispitivanje serije Šifovih baza derivata β -diketona i njihovih Cu(II) i Ni(II) kompleksa u uslovima normalno- i reverzno-fazne hromatografije je urađeno u cilju ispitivanja veze između mehanizama odvajanja u različitim hromatografskim sistemima, prvenstveno zbog prisustva različitih supstituenata koji mogu sukcesivno da se uvode u posmatrane strukture.

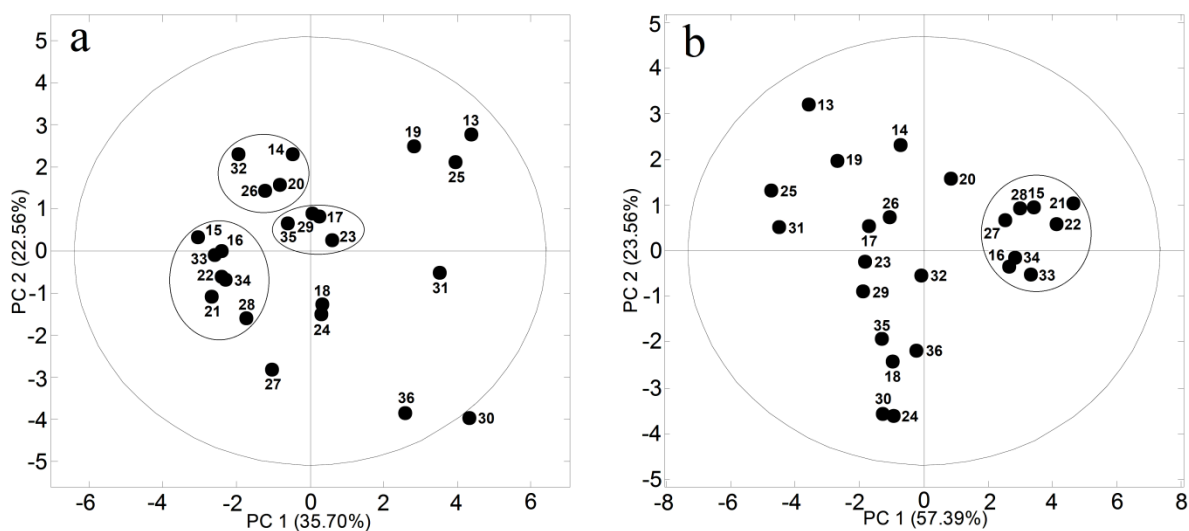
3.2.2.1. Analiza glavne komponente (PCA)

Analiza glavne komponente omogućava grupisanje ispitivanih jedinjenja na osnovu hromatografskog ponašanja, kao i povezivanje hromatografskog ponašanja sa strukturnim karakteristikama jedinjenja. Primenom ove analize posmatrane su sličnosti i razlike retencionih parametara ispitivanih jedinjenja. PC1 definiše slobodu u varijacijama retencionih parametara, dok PC2 definiše maksimalna odstupanja. PCA je primenjena na izračunate molekulske

deskriptore i retencione parametre ispitivanih jedinjenja, pri čemu su analizirani: i) retencioni parametri dobijeni normalno-faznom tankoslojnom hromatografijom, ii) retencioni parametri dobijeni reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom, iii) klasifikacija ispitivanih jedinjenja na osnovu izračunatih molekulskih deskriptora (za Šifrove baze i njihove komplekse istovremeno).

3.2.2.1.1. PCA kompleksnih jedinjenja

Na Slici 3.2.1. su prikazani rezultati PCA analize u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne tankoslojne hromatografije. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da PC1 (Slika 3.2.1a) prepoznaje razliku između kompleksa sa trifluorometil- i fenil-grupama, ali ne razdvaja komplekse sa različitim strukturom u diaminskom mostu i sa različitim centralnim jonima metala.

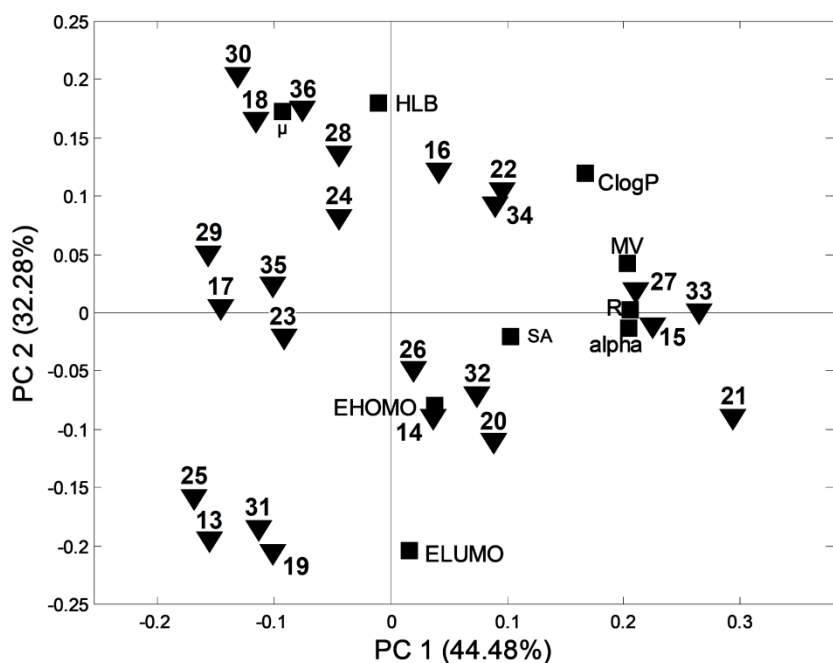


Slika 3.2.1. PCA kompleksa zasnovana na R_M vrednostima: a) silika-gel, b) RP silika-gel

Iz dobijenih rezultata se vidi da PC1 razdvaja komplekse po parovima (13, 25), (14, 26) (17, 23) (16, 22), (18, 24), (19, 25), (28, 34) i (29, 35), nezavisno od centralnog jona i strukture diaminskog mosta. Ovo je u saglasnosti sa mehanizmom razdvajanja u uslovima normalno-fazne hromatografije na tankom sloju. Tri glavna klastera ispitivanih kompleksa se dobijaju PCA

analizom, što je u saglasnosti sa njihovim strukturnim karakteristikama i specifičnim interakcijama koje ostvaruju u primenjenom normalno-faznom hromatografskom sistemu. Prvi klaster sadrži kompleksna jedinjenja sa fenil- i/ili trifluorometil-grupama (**15**, **16**, **21**, **22**, **28** i **34**). Navedeni supstituenti imaju negativni induktivni i sterni efekat. Druga dva klastera sadrže asimetrične komplekse koji sadrže metil-grupu sa jedne strane, i fenil- (**14**, **20**, **26** i **32**) ili trifluorometil- (**17**, **23**, **29** i **35**) grupu sa druge strane. Nasuprot tome, u uslovima reverzno-fazne hromatografije duž PC1 komponente razdvajaju se kompleksi koji sadrže u svojoj strukturi fenil- i trifluorometil- grupe (**15**, **16**, **21**, **22**, **27**, **28**, **33** i **34**) od ostalih jedinjenja, dok PC2 ne prepoznaje sličnosti između ispitivanih jedinjenja.

Na **Slici 3.2.2.** su prikazani biplotovi zasnovani na molekulskim deskriptorima ispitivanih jedinjenja. PC1 razdvaja μ i E_{LUMO} od ostalih deskriptora. E_{LUMO} je deskriptor koji najbolje opisuje ponašanje molekula koji sadrži metil-grupe (**13**, **19**, **25** i **31**). Molekulski deskriptor μ opisuje promene u molekulu usled sukcesivne supstitucije metil-grupe trifluorometil-grupama (**17**, **18**, **23**, **24**, **29**, **30**, **35**, **36**). Na osnovu toga jedinjenja se razdvajaju i grupišu sa odgovarajućim deskriptorima, kao što je prikazano na **Slici 3.2.2.**

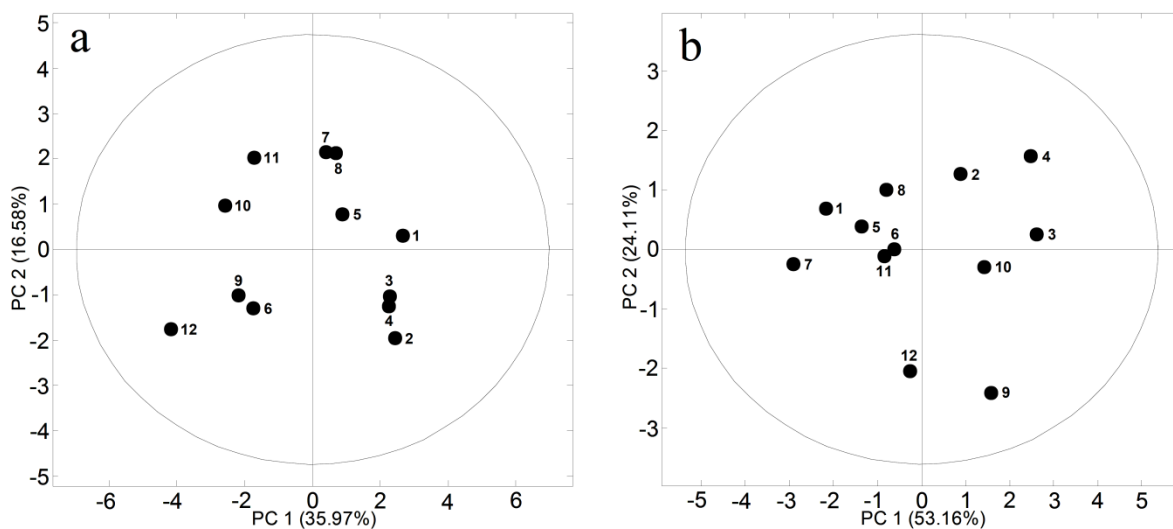


Slika 3.2.2. PCA kompleksnih jedinjenja zasnovana na molekulskim deskriptorima (biplot)

Molekulski deskriptori E_{LUMO} i μ opisuju karakteristične osobine prisutnih supstituenata, a samim tim i celog molekula i kroz promenu vrednosti opisuju molekul kada se vrši postupna supstitucija ovih grupa u ispitivanom setu jedinjenja koji se primenjuje kao model system. E_{LUMO} se opisuje kao sposobnost molekula da bude dobar nukleofil, dok dipolni moment pripada grupi deskriptora koja opisuje raspodelu naelektrisanja u molekulu. Sa druge strane, na osnovu izračinatih vrednosti molekulskih deskriptora HLB, ClogP, SA i MV se uočava razlika pri prisustvu trifluorometil- i fenil-grupa (**16, 22, 28, 34**). HLB je molekulski descriptor koji pokazuje da li molekul ima hidrofobne i/ili hidrofilne grupe na svojoj površini (Todeschini & Consonni, 2009). Pored toga, E_{HOMO} , α i R definišu sukcesivnu supstituciju metil-grupe fenil-grupama (**14, 15, 20, 21, 26, 27, 32, 33**). Energija E_{HOMO} je direktno povezana sa jonizacionim potencijalom i opisuje sklonost molekula za napad elektrofila (Karelson & Lobanov, 1996).

3.2.2.1.2. PCA Šifovih baza

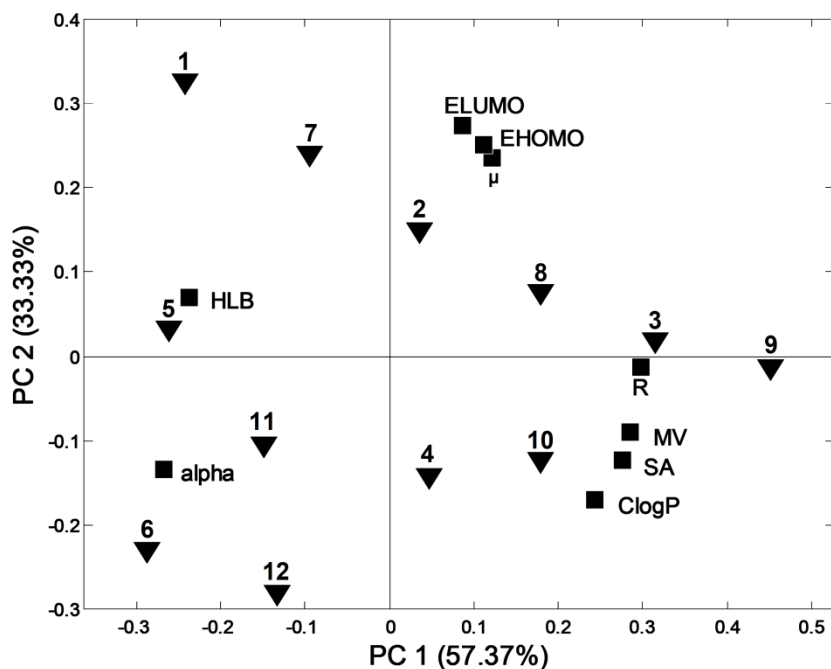
Rezultati PCA analize urađene na eksperimentalno određenim parametrima retencije, R_M , za ispitivane Šifove baze u primenjenim normalno- i reverzno-faznim hromatografskim sistemima, nije pokazala zadovoljavajuće razdvajanje jedinjenja po njihovoj strukturi u odnosu na razdvajanje postignuto kod odgovarajućih kompleksa (**Slika 3.2.3**).



Slika 3.2.3. PCA Šifovih baza zasnovana na R_M vrednostima: a) silika-gel, b) RP silika-gel.

U odnosu na komplekse, čija je struktura kvadratno-planarna, Šifove baze imaju otvorenu strukturu. Iz dobijenih eksperimentalnih i izračunatih podataka, kao i njihove korelacije u uslovima normalno-fazne hromatografije nije utvrđena pravilnosti u odnosu na strukture ispitivanih jedinjenja. Otvorena struktura Šifovih baza daje mogućnost različitih prostornih orijentacija, koje omogućavaju vodonične interakcije sa sorbentom. Međutim, evidentno grupisanje Šifovih baza (**Slika 3.2.3b**) u uslovima reverzno-fazne hromatografije, pokazuje da su zbog prisustva supstituenata koji favorizuju hidrofobne interakcije, ove interakcije dominantne u primenjenom hromatografskom sistemu (**1, 7; 2, 8, 5, 11; 3, 9, 6, 12; i 4, 10**).

Na **Slici 3.2.4**. je prikazan biplot molekulskih deskriptora ispitivanih Šifovih baza. Duž PC1 komponente se odvajaju deskriptori HLB i α , zajedno sa jedinjenjima koja sadrže metil- i/ili trifluorometil-grupe. Ovo je u saglasnosti sa hromatografskim ponašanjem ispitivanih jedinjenja sa ovim supstituentima u strukturi. Pored toga, PC2 komponenta odvajava ispitivana jedinjenja u saglasnosti sa elektronskim i geometrijskim deskriptorima. Na osnovu ovih rezultata potvrđeno je da supstituenti imaju veliki uticaj na hromatografsko ponašanje u primenjenim hromatografskim sistemima, kao i da najveći uticaj imaju njihov sterni i induktivni efekti.



Slika 3.2.4. PCA Šifovih baza zasnovana na molekulskim deskriptorima (biplot)

Naime, u uslovima normalno-fazne hromatografije, supstitucija metil-, trifluorometil- i/ili fenil-grupama smanjuje elektronsku gustinu donornih atoma, zbog dejstva induktivnog efekta, što dovodi do povećavanja mobilnosti ispitivanih Šifovih baza usled ostvarivanja manjeg broja vodoničnih interakcija. Poznato je da u trifluorometil- i fenil-grupe voluminozne, tako da je zbog sternog efekta otežan prilaz donornih atoma silanolnim grupama na površini sorbenta. Takođe, jedinjenja sa propilendiaminom u strukturi diaminskog mosta su hidrofobnija u poređenju sa onima koja sadrže etilendiamin. Međutim, zbog asimetrije diaminskog mosta omogućena je fleksibilnost u prostornoj orijentaciji ovih jedinjenja što dovodi do toga da donorni atomi kiseonika i azota mogu neometano da priđu površini sorbenta i da sa silanolnim grupama ostvare interakcije i vodonično vezivanje, bez obzira na izraženu hidrofobnost ovih jedinjenja.

Nasuprot tome, u uslovima reverzno-fazne hromatografije, ponašanje Šifovih baza je uzrokovano nespecifičnim interakcijama aromatičnih prstenova, koji su prisutni u strukturi jedinjenja, sa sorbentom i specifičnim interakcijama sa mobilnom fazom. Supstitucija metil-grupa trifluorometil- i/ili fenil-grupama dovodi do povećanja hidrofobnosti jedinjenja. Primena reverzno-fazne hromatografije rezultuje boljim razdvajanjem Šifovih baza, pri čemu su izraženiji efekti prisutnih supstituenata tj. Šifovih baza sa većim brojem sp^3 hibridizovanih atoma. Ovaj efekat supstituenata se smanjuje sa povećanjem dužine molekula, pri čemu dolazi do evidentnih promena u retenciji. Na lipofilnost Šifovih baza i njihovih kompleksa utiče induktivni efekat i veoma izražena rezonanca karakteristična za trifluorometil- i fenil-grupe.

3.2.2.2. Kvantitativni odnos strukture i retencije (QSSR)

Na osnovu retencionih parametara, za sve primenjene stacionarne i mobilne faze, su uspostavljeni QSRR modeli za posmatrane Šifove baze i njihova Cu(II) i Ni(II) kompleksna jedinjenja. Sledeći parametri su uzeti u razmatranje za proveru pouzdanosti QSSR modela: r^2 (korelacioni koeficijent), MSE (Mean square error), F (Fišerov statistički parameter), r^2_{cv} (Correlation coefficient for cross-referenced validation), PRESS (akronim za sumu kvadrata predviđenih rezidua, predictive residual sum of squares) i SSY (Sum of the squared deviations). Parametar PRESS jasno definiše grešku modela. QSSR model je statistički potvrđen kao dobar, ako je odnos PRESS/SSY manji od 0,4. Model savršeno objašnjava utvrđenu zavisnost ukoliko je količnik PRESS/SSY manji od 0,1 (Van de Waterbeemd, 1995).

3.2.2.2.1. QSRR kompleksa

U **Tabeli 3.2.3.** su prikazani statistički najbolji QSRR modeli za ispitivana jedinjenja. U reverzno-faznim hromatografskim uslovima dominantni mehanizam razdvajanja su hidrofobne interakcije između sorbenta i jedinjenja.

Tabela 3.2.3. QSRR modeli ispitivanih jedinjenja

Model	Jednačina	r^2	MSE	F	r^2_{cv}	PRESS	PRESS/ SSY
1 ^a	$R_M = 1.871(\pm 0.108) + 0.039(\pm 0.011) \cdot E_{HOMO} - 0.044(\pm 0.008) \cdot \mu - 0.331(\pm 0.021) \cdot ClogP$	0.945	0.014	113.362	0.920	0.401	0.080
2 ^b	$R_M = 29.600(\pm 10.071) - 0.553(\pm 0.406) \cdot E_{HOMO} + 0.192(\pm 0.069) \cdot \mu + 1.311(\pm 0.461) \cdot \alpha + 0.148(\pm 0.058) \cdot MV - 3.651(\pm 1.309) \cdot ClogP$	0.959	0.012	27.785	0.802	0.347	0.198
3 ^c	$R_M^0 = 1.482(\pm 1.205) - 0.571(\pm 0.166) \cdot E_{LUMO} + 0.119(\pm 0.010) \cdot HLB + 0.050(\pm 0.003) \cdot R$	0.924	0.067	80.583	0.880	2.085	0.120

^aRP-18, dihlormetan-ugljentetrahlid(80:20)

^bRP-18, dihlormetan

^cRP-18, dihlormetan-ugljentetrahlid(80:20)

Delokalizacija π -elektrona helatnog prstena je povećana supstitucijom metil-grupa fenil- i/ili trifluorometil-grupama. Lipofilnost ispitivanih jedinjenja takođe raste ovom supstitucijom. Prema modelu 1 (**Tabela 3.2.3**), deskriptori koji najviše utiču na retenciju ispitivanih kompleksnih jedinjenja su: μ , E_{HOMO} i $ClogP$. Dobijeni rezultati ukazuju da na lipofilni karakter ispitivanih jedinjenja ne utiču samo struktura molekula, već i druge interakcije, posebno one između samih molekula ili unutar molekula što dovodi do njihove različite orijentacije u prostoru, što je u saglasnosti sa biplot analizom glavnih komponenti. Na osnovu dobijenog odnosa PRESS/SSY (**Tabela 3.2.3**), jasno se vidi da model 1 pripada grupi savršenih QSRR modela.

3.2.2.2.2. QSRR Šifovih baza

U **Tabeli 3.2.3** je predstavljen statistički najbolji QSRR model za seriju ispitivanih Šifovih baza (model 2). Najveći uticaj na retenciju, po modelu 2, imaju sledeći deskriptori α ,

E_{HOMO} , μ , MV i ClogP. U primenjenom reverzno-faznim uslovima hromatografije, usled dominantnih hidrofobnih interakcija, ClogP je deskriptor koji ima najveći uticaj. Iz postavljenog modela očigledno je da deskriptori α i MV imaju manji uticaj na retenciju, dok veličina molekula nema uticaja, što je u skladu sa već utvrđenom činjenicom da se Šifove baze nalaze u otvorenoj formi što dovodi i do njihovog specifičnog hromatografskog ponašanja. Veliki broj sp^3 hibridizovanih atoma daje mogućnost različitih prostornih orijentacija molekula pri kontaktu sa površinom sorbenta i njegovim aktivnim centrima.

3.2.2.2.3. QSRR/QSAR kompleksa

U literaturi (Baošić et al., 2008) je utvrđena i opisana antimikrobna aktivnost bakar(II) i nikel(II) kompleksa ispitivanih tetradentatnih Šifovih baza, derivata β -diketona. QSRR i QSAR modeli ispitivanih kompleksa su razvijeni na osnovu teorijskih vrednosti molekulskih deskriptora koji su izračunati za date strukture, eksperimentalno određenih parametara retencije i parametara lipofilnosti, kao i na osnovu rezultata ispoljene antimikrobne aktivnosti. Oba modela su postavljena na osnovu rezultata koji su dobijeni u uslovima reverzno-fazne hromatografije. Na ovaj način definisani QSAR i QSRR modeli su upoređeni. QSAR model (**Tabela 3.2.3**, model 3) je statistički manje verovatan od QSRR modela (**Tabela 3.2.3**, model 1). Supstitucija metil-grupa fenil- i/ili trifluorometil-grupama značajno utiče na lipofilnost posmatranih kompleksnih jedinjenja. Helacija Šifovih baza menja njihove karakteristike, a samim tim i ponašanje u uslovima reverzno-fazne hromatografije, kao i u biološkim sistemima. Kompleksiranjem se smanjuje polarnost Šifovih baza i povećava lipofilni karakter nagrađenih kompleksnih jedinjenja. Samim tim, kompleksi pokazuju veću aktivnost u odnosu na odgovarajuću Šifovu bazu. Iz ovih modela i njihovog odnosa može da se pretpostavi da je eksperimentalno određeni retencioni parametar R_M bolji od parametra R_M^o za opisivanje lipofilnosti kompleksa Šifovih baza i sličnih jedinjenja, *in vivo* (Perušковиć, Stevanović, Lolić, & Baošić, 2014).

Utvrđeni QSRR modeli opisuju zavisnost između osobina molekula ispitivanih jedinjenja (Šifovih baza, njihovih Cu(II) i Ni(II) kompleksa) i hromatografski dobijenih retencionih parametara. Uticaji supstitucije, kao i induktivnog i sternog efekta na retencione parametre jedinjenja, ispitivani su u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne tankoslojne hromatografije, a zatim analizirani primenom PCA. Utvrđeno je da za ispitivane komplekse, molekulski

deskriptor E_{LUMO} prepoznaje prisustvo metil-grupe, dok molekularni deskriptor μ prepoznaje sukcesivnu supstituciju metil-grupa trifluorometil-grupama. Molekularni deskriptori HLB, ClogP, SA i MV prepoznaju prisustvo trifluorometil- i fenil-grupa, dok E_{HOMO} , α i R prepoznaju sukcesivnu supstituciju metil-grupa fenil-grupama. Kod ispitivanih Šifovih baza, molekularni deskriptori HLB i α prepoznaju jedinjenja sa metil-grupama u odnosu na jedinjenja sa trifluorometil- i/ili fenil-grupama. Lipofilnost ovih jedinjenja *in vivo* je bolje opisana sa parametrom R_M u odnosu na R_M^0 .

3.3. Ispitivanje biološke aktivnosti

3.3.1. Antimikrobna aktivnost

Šifove baze i njihovi kompleksi, su često izučavani zbog biološke aktivnosti. Neke Šifove baze, kao i njihovi Cu(II) kompleksi pokazuju antibakterijsku aktivnost prema Gram-negativnim sojevima *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus pyogenes*, kao i Gram-pozitivnim *Staphylococcus pyogenes* i *Pseudomonas aeruginosa* (Mohamed et al., 2005). Iminski derivati 2,4-dihloro-5-fluorofenila su pokazali antifungalnu aktivnost prema kliničkim sojevima *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium marneffeii* i *Trichophyton mentagrophyte* (Karthikeyan et al., 2006). Antifungalnu aktivnost prema sojevima *Candida*, *Aspergillus* i *Mucor* su pokazali i kompleksi Cu(II), Mn(II) i Co(II) (Neelakantan et al., 2008).

3.3.1.1. Materijal i metode

Antimikrobna aktivnost je određena metodom difuzije u agaru.

Kao test mikroorganizmi korišćeni su Gram-negativna bakterija *Escherichia coli* (ATCC 25922) i Gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), kao fakultativni anaerobi i potencijalni patogeni. Pored njih, kao predstavnici potencijanih fungalnih patogena korišćeni su *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24858) i *Candida albicans* (ATCC 24433).

Ispitivane su Šifove baze, derivati β -diketona, i njihovi Cu(II) kompleksi (**Tabela 3.2.1**).

Hranljiva podloga za bakterije bila je Miler-Hinton agar (Torlak; kazein hidrolizat 17,5 g/L, mesni ekstrakt 3,0 g/L, škrob 1,5 g/L, agar 16,0 g/L). Za kulturu *Saccharomyces cerevisiae* hranljiva podloga je bila sladni agar (Torlak; pepton 1 5,0 g/L, sladni ekstrakt 30,0 g/L, agar 15 g/L), dok je za kulturu *Candida albicans* korišćen agar (pepton 1 Torlak 10,0 g/L, ekstrakt kvasca 5,0 g/L, mesni ekstrakt 5,0 g/L, glukoza 10,0 g/L, natrijum-hlorid 10,0 g/L, agar 25,0 g/L). Podloge su zagrejane do ključanja na vodenom kupatilu radi potpunog rastvaranja, a nakon toga sterilisane u autoklavu u toku 25 min, na 121 °C.

Osnovni rastvor ispitivane supstance, koncentracije 5 mg/mL, je pripremljen rastvaranjem supstance u smeši dimetil-sulfoksida (DMSO) i dejonizovane vode (1/3, v/v). Od

osnovnog rastvora, mešanjem sa sterilnim fiziološkim rastvorom, pripremljena je serija standardnih rastvora. Na taj način, pripremljeni su rastvori ispitivane supstance sledećih koncentracija: 5000, 2500, 1250, 625 i 312 $\mu\text{g/mL}$. Razblaženja u agaru, u Petri šoljama, su pripremljena mešanjem 1 mL rastvora sa 9 mL otopljene podloge. Na ovaj način je dobijena serija podloga sa različitom koncentracijom ispitivane supstance: 500, 250, 125, 62,5 i 31,2 $\mu\text{g/mL}$. Petri šolje su ostavljene na +4 °C (kako bi došlo do difuzije), a zatim su prebačene u termostat. Posle 24 h inkubacije na 37°C (bakterije), odnosno na 28°C (kvasci i plesni) Petri šolje su pregledane i izmeren je poluprečnik zone inhibicije.

3.3.1.2. Rezultati i diskusija

Rezultati antimikrobnog dejstva ispitivanih jedinjenja, izraženi kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), prikazani su u **Tabeli 3.3.1**.

Generalno, Šifove baze su pokazale slabu antimikrobnu aktivnost. Šifove baze **6, 8, 9 i 10** pokazale su antifungalnu aktivnost prema *S. cerevisiae* u koncentracijama od 1,248-1,541 μM . Jedinjenje **6** je, pored toga, pokazalo i antifungalnu aktivnost prema *C. albicans*. Šifova baza **12** je imala antifungalnu aktivnost samo prema soju *C. albicans*. Šifove baze nisu pokazale antibakterijsku aktivnost ni prema Gram-negativnom soju *Escherichia coli*, ni prema Gram-pozitivnom soju *Staphylococcus aureus*.

Ispitivani Cu(II) kompleksi Šifovih baza su pokazali bolju antimikrobnu aktivnost u poređenju sa Šifovim bazama. Izuzev kompleksa **17 i 23**, svi kompleksi su pokazali antifungalnu aktivnost prema soju *S. cerevisiae* (0,558-1,772 μM). Kompleksi **13-15, 18, 19 i 24** su pokazali i antifungalnu aktivnost prema soju *C. albicans* (0,558-1,554 μM). Četiri kompleksa (**13, 15, 19 i 24**) su pokazala antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnom soju *Staphylococcus aureus*.

Cu(II) kompleksi Šifovih baza, kao i Šifove baze, nisu pokazali antibakterijsku aktivnost prema Gram-negativnom soju *Escherichia coli*.

Na osnovu dobijenih rezultata, za dalja istraživanja na ćelijama, odabrani su kompleksi **13, 15, 19 i 24**, jer su pokazali najraznovrsniju antimikrobnu aktivnost.

Tabela 3.3.1. Antimikrobna aktivnost Šifovih baza i Cu(II) kompleksa (MIC, μM)

Jedinjenje	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	1.541	1.541	-	-
7	-	-	-	-
8	1.248	-	-	-
9	1.301	-	-	-
10	1.514	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	1.477	-	-
13	1.772	1.544	1.544	-
14	0.558	0.558	-	-
15	1.158	1.158	1.158	-
16	1.323	-	-	-
17	-	-	-	-
18	0.324	0.648	-	-
19	1.480	1.480	1.480	-
20	1.082	-	-	-
21	1.121	-	-	-
22	1.276	-	-	-
23	-	-	-	-
24	0.625	1.250	1.250	-

3.3.2. Citotoksični efekat Cu(II) kompleksa Šifovih baza

Citotoksični efekat kompleksa metala se javlja kao posledica njihovih vezujućih interakcija sa DNK, koje uvode ćelije u zastoj ćelijskog metabolizma, apoptozu i regeneraciju kancerske DNK. Iako mehanizam antitumorske aktivnosti pretpostavlja različite signalne puteve, DNK je primarni unutarćelijski cilj svih antikancerskih supstanci. Interakcije malih molekula i DNK često za posledicu imaju oštećenje kancerske DNK, pri čemu dolazi do blokiranja njene deobe. Kompleksi metala sa Šifovim bazama, pre svega kompleksi prelaznih metala, se u poslednje

vreme ispituju u ovoj oblasti, prvenstveno zbog svoje specifične strukture i različite biološke aktivnosti (Lu et al., 2014; Zhen Li, Hui Yan, Guoliang Chang, Min Hong, Jianmin Dou, 2016).

U okviru ove doktorske disertacije ispitivan je citotoksični efekat onih Cu(II) kompleksa Šifovih baza (**13, 15, 19, 24**) koji su pokazali najraznovrsniju antimikrobnu aktivnost. Rađeni su eseji za merenje vijabilnosti ćelija i kulture ćelija raka debelog creva (Caco-2). Ispitivan je i apoptopski efekat odabranih Cu(II) kompleksa, pri čemu je upoređen uticaj na kancerske i zdrave ćelije.

3.3.2.1. Materijal i metode

AIM V i Dubelkov modifikovan medijum (engl. Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM) su nabavljeni od Life Technologies, Inc. (Rockville, MD; USA). Goveđi fetalni serum (engl. Fetal calf serum; FCS), penicilin, streptomycin, L-glutamat, neesencijalne aminokiseline, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), fikol-pak, tripan plavo i dimetil-sulfoksid (DMSO) su nabavljeni od Sigmee (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Aneksin V i propidijum-jodid su nabavljeni od Becton Dickinson Bioscience (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA). Caco-2 ćelijska linija (humani kancer debelog creva) je nabavljena od ATTC (engl. American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

3.3.2.1.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Za izolovanje mononuklearnih ćelija iz periferne krvi korišćeno je 30 mL krvi zdrave osobe. Pri izolovanju, krv je prvo razblažena dva puta sa puferisanim fiziološkim rastvorom i pažljivo nadslojena nad fikol u odnosu 3:1 (fikol:razblažena krv), u tubi zapremine 50 mL. Tako nadslojena krv se centrifugira 40 min na 400g, bez ikakvih kočnica pri zaustavljanju centrifuge. Nakon centrifugiranja, plazma se odbaci (gornji sloj) i aspirira samo interfazni sloj, između fikola i žute plazme. Tako dobijene ćelije se isperu dva puta sa puferisanim fiziološkim rastvorom, a zatim se deo boji tripan plavim, dok se ostatak koristi za dalje eksperimente. Alikvot ćelija koje su koncentrisane u 5 mL puferisanog fiziološkog rastvora se razblaži 20-40 puta sa tripan plavom bojom i potom se ćelije broje na hemocitometru i mikroskopu.

3.3.2.1.2. Aneksin V esej (esej vijabilnosti i apoptoze)

Za ovaj esej korišćene su mononuklearne ćelije iz pune krvi (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) zdrave osobe i Caco-2 ćelije. PBMCs su gajene u AIM V[®] medijumu dok su Caco-2 ćelije gajene u medijumu navedenom u prethodnom eksperimentu. Ćelije su testirane sa Cu(II) kompleksima Šifovih baza u opsegu koncentracija od 100-0.01 µg/mL. Po jednoj koncentraciji kompleksa korišćeno je 200.000 ćelija. Nakon stimulacije ćelija sa kompleksom, ćelije su inkubirane 24 i 48h, nakon čega su isprane puferisanim fiziološkim rastvorom i pri tome bojene sa Aneksin V (1 µl po tubi) i PI (1µL po tubi) 20 min na 4° C u tzv. vezujućem puferu koji je dobijen uz Aneksin V kit. Nakon toga, ćelije su isprane vezujućim puferom i analizirane protočnom citometrijom pomoći FACS Canto II instrumenta (BD Bioscience, San Jose, SAD). Pored uzoraka postavljene su kontrolne tube za analizu i kompenzaciju. Tuba 1 je sadržavala samo nebojene ćelije, tuba 2 je sadržavala ćelije obojene samo Aneksinom V, dok je tuba 3 sadržavala ćelije obojene sa PI. Eksperiment je urađen u duplikatu. Analiza je rađena pomoću FlowJo softvera verzija 10 (Treestar, Ashland, SAD).

3.3.2.1.3. MTT esej

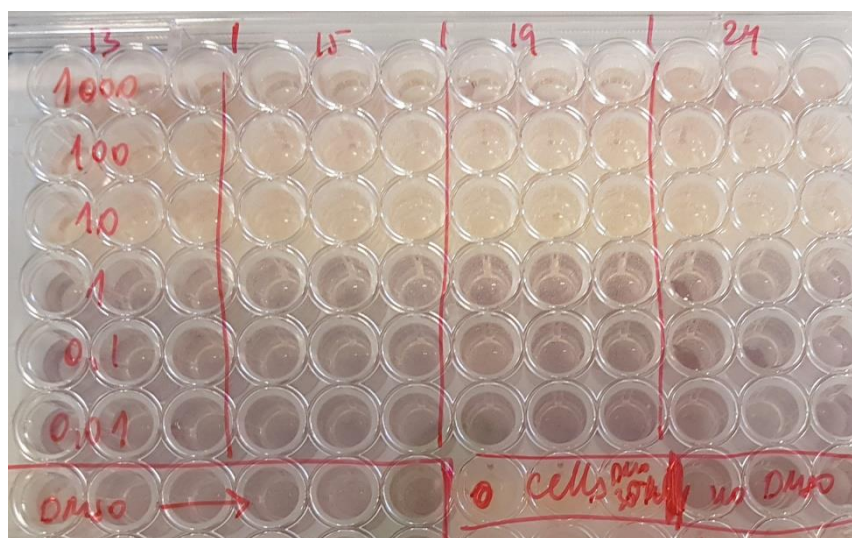
Caco-2 ćelije su kultivisane u T-75 boci sa modifikovanim DMEM medijumom koji sadrži 10% FCS, 1% streptomicina, 1% penicilina i 1% neesencijalnih aminokiselina, a nakon toga inkubirane na 37° C u inkubatoru pod 5% CO₂. Ćelije su prebačene na pločicu sa 96 bunara, 24h pre samog eksperimenta, tako što je posađeno 200.000 ćelija po bunaru sa zapreminom od 200 µL. Nakon 24h inkubacije, ćelije su stimulisane sa rastvorom Cu(II) kompleksa Šifovih baza koji je nakon rastvaranja u DMSO profiltriran kroz 0.2 µm filter. Koncentracija ovog rastvora je bila 10 puta veća od testiranih koncentracija u opsegu od 0.01-1000 µg/mL. Finalna koncentracija DMSO u uzorku je bila 1%. Ćelije tretirane sa 1% DMSO u medijumu su postavljene kao negativna kontrola. Ćelije su inkubirane 24 i 48h u inkubatoru. Nakon toga, 10 µL MTT rastvora (5 mg/mL u puferisanom fiziološkom rastvoru) je, nakon filtriranja kroz 0.2 µm filter, dodato u svaki bunar i inkubirano 3h u inkubatoru. Nakon inkubacije ćelija sa MTTom, medijum je izvađen pažljivo pipetom i kristali formazana su rastvoreni sa po 100 µl DMSO rastvora. Apsorbanca je očitana pomoću ELISA čitača na 550 i 620 nm. Procenat

vijabilnih ćelija je određen na osnovu netretiranih ćelija. IC50 vrednost je određena na osnovu koncentracije koja je neophodna da ubije 50 % ćelija. Eksperiment je urađen u duplikatu.

3.3.2.2. Rezultati

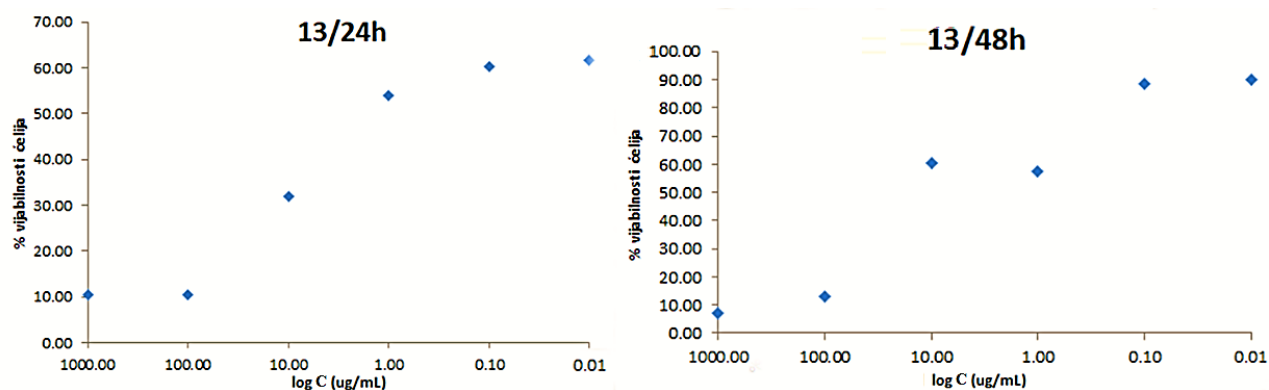
3.3.2.2.1. Uticaj Cu(II) kompleksa Šifovih baza na citotoksičnost Caco-2 ćelija

U cilju određivanja citotoksičnosti Cu(II) kompleksa Šifovih baza i njihovih IC50 vrednosti na kancerškoj ćelijskoj liniji Caco-2 urađen je MTT esej. Ćelije su tretirane 24 i 48h varirajućom koncentracijom kompleksa. Procenat vijabilnosti je opadao sa povećanjem koncentracije kompleksa u medijumu ćelija. Uočena je manja količina formiranog formazana i neobojenost medijuma (**Slika 3.3.1**).



Slika 3.3.1. Formiranje formazana i praćenje obojenosti medijuma kod vijabilnih ćelija.

Nakon očitavanja pločice određen je procenat preostalih vijabilnih ćelija, na osnovu procenta vijabilnih ćelija koje nisu tretirane ispitivanim kompleksom i koji je postavljen kao 100% vijabiliteta. Na osnovu dobijenih rezultata, dobijene su linearne zavisnosti % vijabilnosti ćelija od logaritma koncentracije, za svako primenjeno vreme inkubacije (primer grafika za kompleks **13** je prikazan na **Slici 3.3.2**), iz kojih je određena IC50 vrednost (**Tabela 3.3.2**).



Slika 3.3.2. Dozno-zavisna vijabilnosti Caco-2 ćelija od koncentracije kompleksa 13

Tabela 3.3.2. IC50 vrednosti dobijene MTT esejom

Kompleks	IC50 (μg/mL)	
	24 h	48 h
13	0.34	5.98
15	1.91	6.02
19	0.02	0.61
24	2.11	1.94

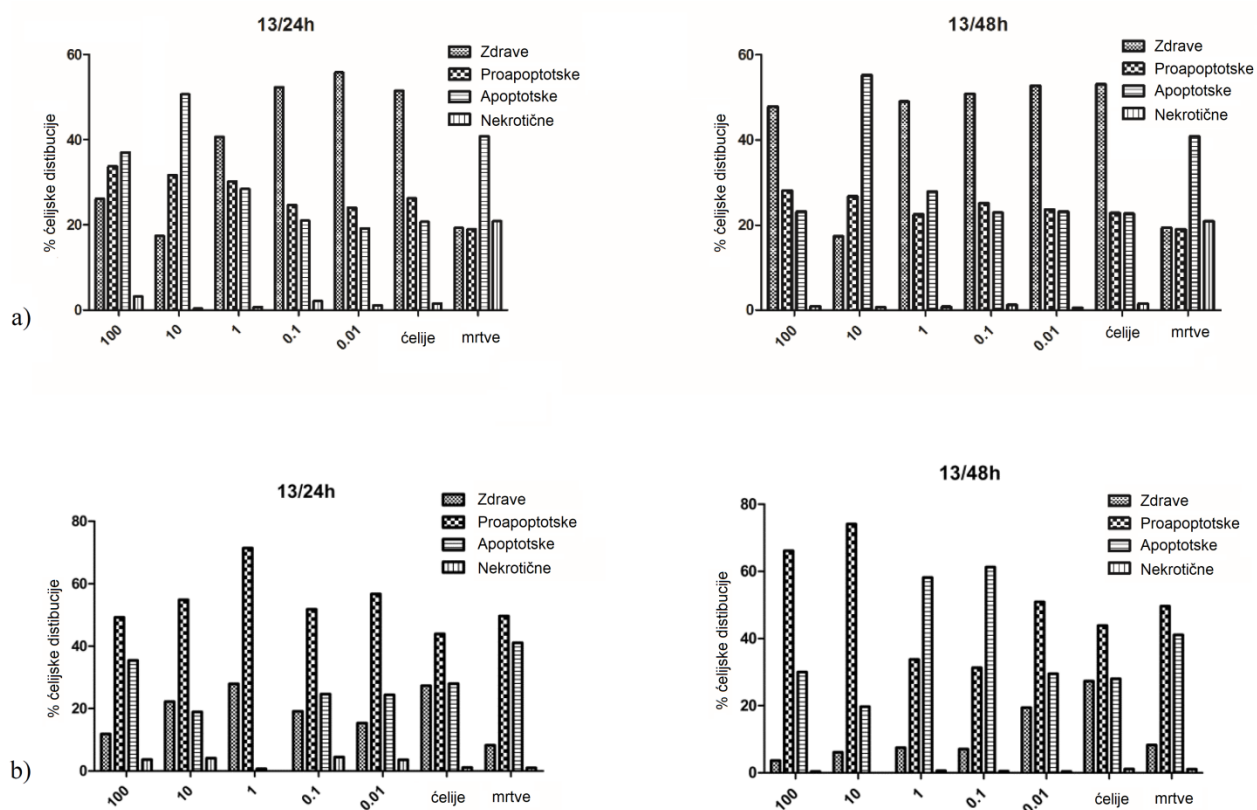
3.3.2.2.2. Apoptotski efekat Cu(II) kompleksa Šifovih baza i poređenje uticaja na zdrave i kancerske ćelije

Ispitivan je apoptotski efekat izabranih kompleksa Šifovih baza (**13**, **15**, **19**, **24**), kao i poređenje njihovog uticaja na zdrave i kancerske ćelije.

Na **Slici 3.3.3** predstavljeni su rezultati iz kojih se vidi uticaj kompleksa **13** na Caco-2 i PBMC ćelije. Utvrđeno je da vreme inkubacije ne utiče na dejstvo jedinjenja **13** na PBMC ćelije, kao i da kompleks **13** ne dovodi do nekroze PBMC ćelija. Pri koncentraciji ispitivanog jedinjenja od 10 μg/mL dolazi do smanjenja broja zdravih ćelija, nezavisno od perioda inkubacije. Takođe, nezavisno od perioda inkubacije, broj ćelija u apoptozi je veći pri koncentraciji kompleksa **13** od 10 μg/mL, dok je pri koncentraciji od 100 μg/mL veći broj proapoptotskih ćelija. Niže

koncentracije kompleksa nemaju veliki uticaj na proces ubijanja ćelija. Iz ovoga se može zaključiti da koncentracije kompleksa **13** koji ubija ćelije iznosi 10 $\mu\text{g/mL}$ (dostiže se plato zasićenja).

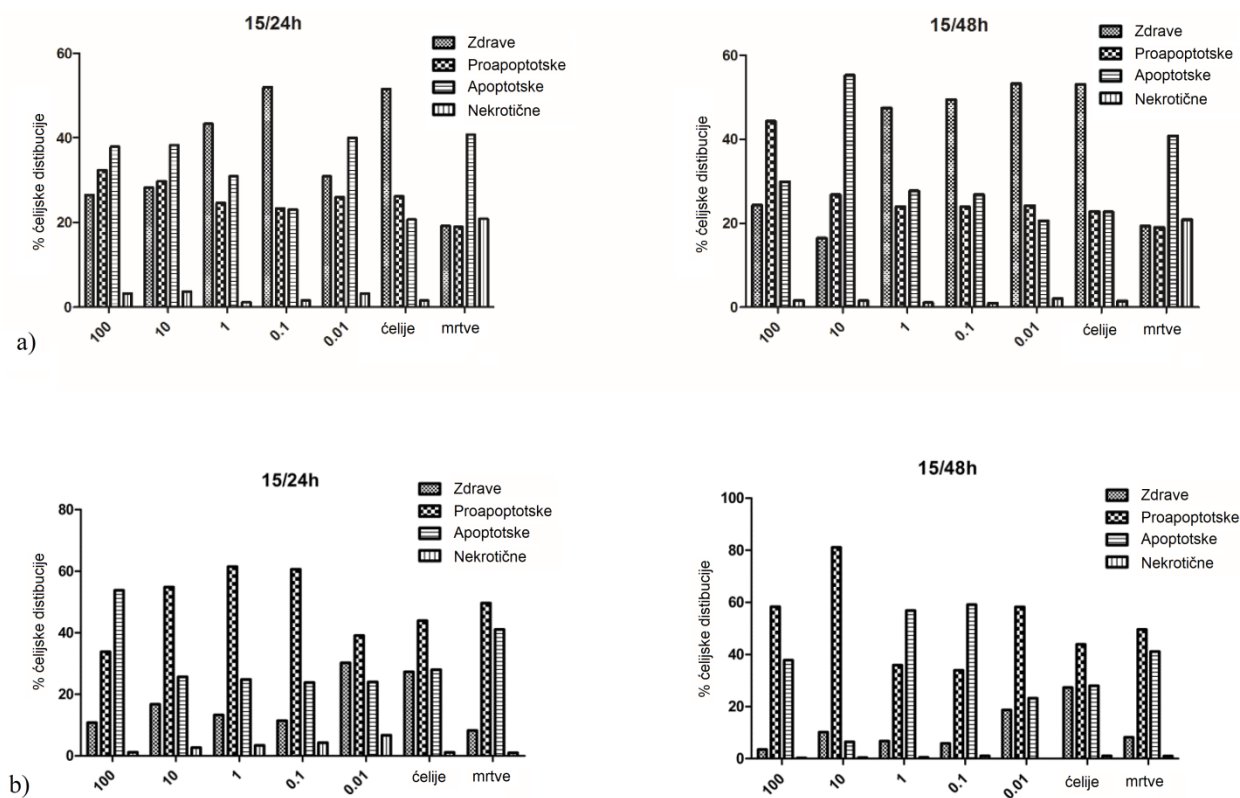
Kada je isti kompleks testiran na kancerškoj ćelijskoj liniji debelog creva, tzv. Caco-2, uočeno je da se broj zdravih Caco-2 ćelija smanjuje pri porastu koncentracije kompleksa. Tokom prvih 24h inkubacije uočen je najveći uticaj pri koncentraciji kompleksa od 1 $\mu\text{g/mL}$. Pri toj koncentraciji prisutan kompleks uvodi ćelije u ranu apoptozu (proapoptozu). Međutim, nakon inkubacije od 48h potrebna koncentracija kompleksa, koja uvodi ćelije u apoptozu, je 10 $\mu\text{g/mL}$. Upoređivanjem uticaja kompleksa **13** na zdrave i kancerške ćelije može se uočiti efikasniji uticaj kompleksa na kancerške ćelije.



Slika 3.3.3. Apoptotski efekat kompleksa **13** na a) PBMC, b) Caco-2.

Dobijeni rezultati za kompleks **15**, pokazuju da kompleks ima veliki uticaj na zdrave ćelije. Na **Slici 3.3.4** predstavljeni su rezultati uticaja ispitivanog kompleksa **15** na Caco-2 i PBMC ćelije. Uočava se smanjenje broja zdravih ćelija u korist apoptotičnih, samo pri najvećoj testiranoj koncentraciji ovog jedinjenja (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) u toku 24h, kao i pri koncentraciji od 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ u toku 48h inkubacije. Uticaj kompleksa **15** na vijabilnost i apoptozu kancerskih ćelija je značajniji i pri nižim koncentracijama, mada je utvrđeno da ćelije u većem procentu ulaze u ranu fazu apoptoze. Pri inkubaciji PBMC ćelija sa kompleksom **15**, na 24h, skoro da ne dolazi do apoptoze ćelija, a nema ni proapoptoze. Pri koncentraciji od 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dolazi do smanjenja broja zdravih ćelija, nezavisno od vremena inkubacije.

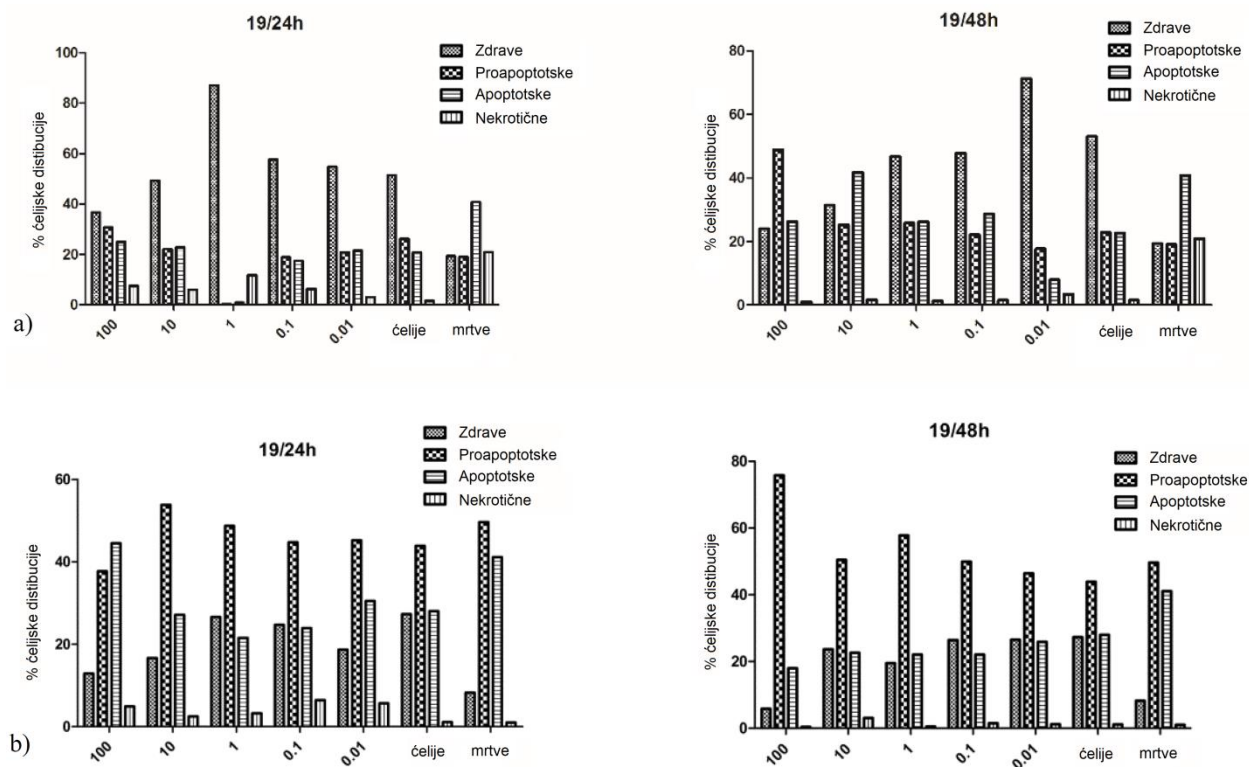
Pri inkubaciji Caco-2 ćelija sa kompleksom **15** koncentracije 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nezavisno od vremena inkubacije, dolazi do smanjenja broja zdravih ćelija. Takođe, pri istoj koncentraciji i inkubaciji od 24h je izražen proapoptotski efekat, dok je pri inkubaciji od 48h izražen apoptotski efekat.



Slika 3.3.4. Apoptotski efekat kompleksa **15** na a) PBMC, b) Caco-2.

Uticaj kompleksa **19** na zdrave i kancerske ćelije prikazan je na **Slici 3.3.5**. Kompleks **19** ne dovodi do nekroze PBMC ćelija, pri primeni ispitivanog opsega koncentracija. Generalno, iz rezultata može da se zaključi da kompleks **19** ima više izraženi inflamatorni i apoptotski efekat na kancerskim ćelijama, gde dolazi do porasta broja apoptotskih i proapoptotiskih ćelija sa porastom koncentracije kompleksa i dužim vremenom inkubacije. Proinflamatorni efekat je više izražen kod dužeg vremena inkubacije, jer je većina ćelija u fazi rane apoptoze, što nije uočeno na zdravim ćelijama. Kod zdravih ćelija, jedino pri inkubaciji u trajanju od 48h, sa koncentracijom kompleksa **19** od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dolazi do povećanja broja ćelija u proapoptozu.

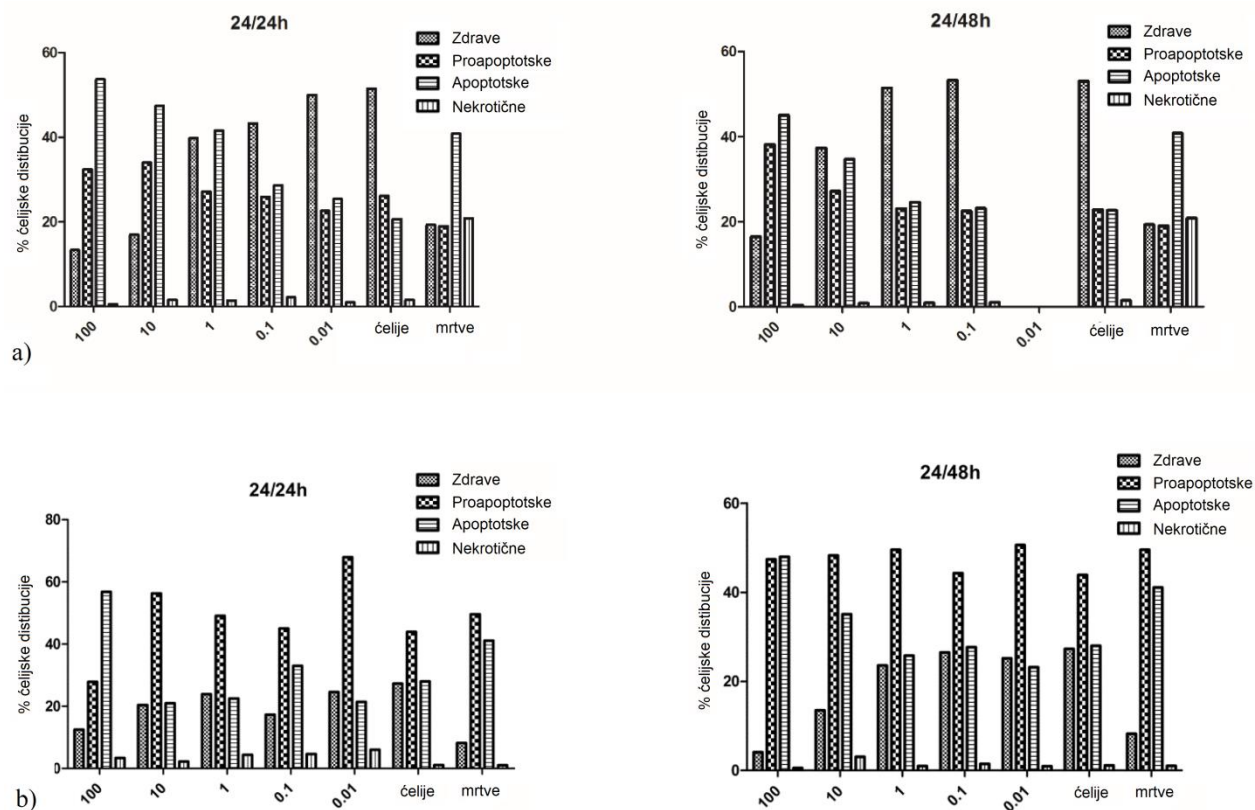
Pri inkubaciji od 24h, koncentracija kompleksa **19** od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ smanjuje broj zdravih ćelija Caco-2, dok ista koncentracija dovodi i do porasta broja ćelija u apoptozu (**Slika 3.3.5b**). Pri inkubaciji od 24h nema promene u broju ćelija u proapoptozu. Pri istoj koncentraciji (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), inkubacijom u trajanju od 48h, se smanjuje broj zdravih ćelija i dolazi do povećanja broja proapoptotiskih ćelija, dok se broj ćelija u apoptozu ne menja.



Slika 3.3.5. Apoptotski efekat kompleksa **19** na a) PBMC, b) Caco-2.

Ispitivani kompleks **24** (Slika 3.3.6), generalno, izaziva efekat inflamacije i ćelijske smrti samo pri visokim koncentracijama, kako u zdravim, tako i u kancerskim ćelijama. Pri inkubaciji od 24h, kompleks **24**, u koncentraciji većoj od 10 $\mu\text{g/mL}$ ubija ćelije PBMC, dok je pri inkubaciji od 48h isti efekat izraženiji pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$. Do porasta broja apoptotskih ćelija PBMC dolazi već pri koncentraciji od 1 $\mu\text{g/mL}$ (24h inkubacija) tj. pri koncentraciji većoj od 10 $\mu\text{g/mL}$ (48h inkubacija). Takođe, broj proapoptotskih ćelija raste pri koncentracijama kompleksa **24** većim od 10 $\mu\text{g/mL}$, nezavisno od vremena inkubacije.

Iz dobijenih rezultata se vidi da pri koncentracijama kompleksa **24** većim od 10 $\mu\text{g/mL}$ dolazi do smanjenja broja ćelija Caco-2. Pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ i inkubaciji od 24 h dolazi do povećanja broja ćelija u apoptozi, a pri inkubaciji u trajanju od 48 h i pri koncentraciji ispitivanog jedinjenja od 10 $\mu\text{g/mL}$. Kompleks 24, pri ispitivanim koncentracijama, ne dovodi do nekroze i proapoptoze.



Slika 3.3.6. Apoptotski efekat kompleksa **24** na a) PBMC, b) Caco-2.

Na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da nijedan od ispitivanih kompleksa (**13**, **15**, **19**, **24**) ne dovodi do nekroze, kako zdravih (PBMC), tako ni kancerskih (Caco-2) ćelija i stoga se može pretpostaviti da ispitivani kompleksi specifično deluju na ćelije i navode ih da uđu u programiranu ćelijsku smrt. Specifično delovanje ispitivanih kompleksa je posledica njihove strukture i prisustva karakterističnih supstituenata, kao i razlika u diaminskom mostu, koji menjaju ukupnu lipofilnost kompleksa, kao i mogućnost zauzimanja različitih konformacija pri prolasku kroz ćelijsku membranu i pri ostvarivanju interakcija unutra ćelije.

Od svih ispitivanih kompleksa, kompleks **19** je pokazao da pri primenjenoj najnižoj koncentraciji izaziva citotoksični efekat na kancerskim ćelijama, tj. pokazao je najveći inhibitorni efekat u poređenju sa ostalim ispitivanim kompleksima, što je direktno posledica njegove specifične strukture. U poređenju sa zdravim ćelijama utvrđeno je da kompleks **19** ima znatno viši uticaj na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu kancerskih ćelija. Vreme inkubacije takođe utiče na vijabilnost ćelija. Iz dobijenih rezultata primenom MTT eseja se može uočiti da duže vreme inkubacije povećava dozu neophodnu da ubije ćelije, gde IC₅₀ vrednost raste oko 5 puta, sa izuzetkom kod kompleksa **24**. Jači efekat na kancerske u odnosu na zdrave ćelije je takođe uočen i kod kompleksa **13** i **15**. Međutim, ovi kompleksi dovode ćelije u proapoptotsko stanje, što je stanje rane apoptoze. Nasuprot tome, citotoksični uticaj kompleksa **24** se ne smanjuje sa vremenom inkubacije.

3.3.2.3. Diskusija

Iz dobijenih eksperimentalnih rezultata jasno se vidi da specifičnost u strukturi, prisustvo određenog supstituenta, kao i struktura diaminskog mosta direktno utiču na citotoksičnost ispitivanih jedinjenja, kao i na efikasnost njihovog delovanja. Kompleksna jedinjenja Cu(II) sa Šifovim bazama koja su ispitivana u okviru ove doktorske disertacije imaju kvadratno-planarnu strukturu. Ugao između dva helatna prstena u kompleksu **13** iznosi samo 8.99⁰ (N. M. Aburas et al., 2013). Ispitivana kompleksna jedinjenja koja sadrže metil-grupe (**13**, **19**) imaju niže vrednosti IC₅₀ (**Tabela 3.3.2**) u poređenju sa kompleksnim jedinjenjima koji sadrže fenil- (**15**), odnosno trifluorometil-grupe (**24**). Ovo je u skladu sa dobijenim rezultatima pri ispitivanju uticaja supstituenata na retenciju i određivanje lipofilnosti posmatranog seta Cu(II) kompleksa Šifovih baza, kao i datim objašnjenjima u delu 3.2.2.1. ove doktorske disertacije. Na **Slici 3.2.2**

su prikazani biplotovi zasnovani na molekulskim deskriptorima ispitivanih jedinjenja. Molekulski deskriptor koji najbolje definiše komplekse koji sadrže metil-grupu je E_{LUMO} koji opisuje sposobnost molekula da bude dobar nukleofil, što u ovom slučaju utiče na lipofilnost posmatranih jedinjenja, a favorizovano je činjenicom da molekuli koji sadrže simetrično supstituisane metil-grupe imaju manju zapreminu od onih sa fenil- i trifluorometil-grupama, pa ne dolaze do izražaja sterne smetnje. Pored toga, delokalizacija π -elektrona helatnog prstena je povećana supstitucijom metil-grupa sa fenil- i/ili trifluorometil-grupama i odgovorna je za povećanje lipofilnosti posmatranih jedinjenja.

Analiza dobijenih rezultata ispitivanja apoptotskog efekta kompleksnih jedinjenja **13**, **15**, **19** i **24**, kao i poređenje njihovog uticaja na zdrave i kancerske ćelije ukazuje na jasnu razliku u mehanizmu delovanja. Ispitivani kompleksi zbog svojih strukturnih karakteristika pokazuju različit efekat deluju na zdrave i kancerske ćelije, pri različitim koncentracijama. Kompleks **13** pri koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ubija ćelije Caco-2, dok na zdrave ćelije (PBMC) utiče tek pri sto puta većoj koncentraciji (10 $\mu\text{g/mL}$), pri inkubaciji u trajanju od 48h. Nezavisno od vremena inkubacije, kompleks **15** ubija ćelije kancera (Caco-2) pri koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g/mL}$, a na zdrave počinje da utiče tek pri koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$. Dejstvom ovog kompleksa, pri koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g/mL}$, sa porastom vremena inkubacije (sa 24 na 48h) i ćelije koje su bile u proapoptozi prelaze u apoptozu. Kompleks **19** pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$, i inkubaciji u trajanju od 24h stabilizuje zdrave ćelije. Isti efekat je izražen i pri koncentraciji od 0,01 $\mu\text{g/mL}$ i inkubaciji od 48h. Stabilizujući efekat kompleksa **19** vidi se i u smanjenju broja ćelija u apoptozi, pri koncentraciji od 1 $\mu\text{g/mL}$ i inkubaciji u trajanju od 24h. Primenom ovog kompleksa, jedino pri inkubaciji od 48h, pri koncentracijom od 100 $\mu\text{g/mL}$, dolazi do povećanja broja ćelija u proapoptozi. Stabilizujući efekat na zdrave ćelije je utvrđen samo pri primeni ovog kompleksa. Takođe, pri koncentracijama većim od 10 $\mu\text{g/mL}$ i inkubaciji od 24h dolazi do smanjenja broja ćelija Caco-2, dok pri inkubaciji od 48 h do smanjenja broja ćelija Caco-2 dolazi pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$. Kompleks **24** ubija ćelije PBMC pri koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$ (24h inkubacija), tj. pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ (48h inkubacija). Pri istim koncentracijama, za iste periode inkubacije kompleks **24** ubija i ćelije Caco-2.

Supstitucijom metil-grupe u kompleksnom jedinjenju **13** fenil-grupama, pri čemu se u diaminskom mostu nalazi etilendiamin, IC_{50} vrednost posmatrana posle inkubacije u trajanju od 24h raste 6 puta. Ovako očigledna i izražena razlika u ispoljavanju citotoksičnog efekta

ispitivanih kompleksa **13** i **15** nije posledica samo njihove lipofilnosti. Naime, lipofilnost kompleksa **15**, zbog prisustva fenil-grupa, u simetričnoj strukturi jedinjenja koja je favorizovana i etilendiaminskim mostom, je veća u poređenju sa kompleksom **13** (R. Baošić, Radojević, et al., 2007). Međutim, eksperimentalno dobijene IC50 vrednosti ova dva kompleksa, nakon inkubacije u trajanju od 48h, se praktično izjednačavaju, što ukazuje na činjenicu da kompleks **15**, zbog prisutnih fenil-grupa, koje su voluminozne, otežano prolazi kroz ćelijsku membranu, tj. potrebno je više vremena kako bi došlo do ispoljavanja efekta citotoksičnosti i čak do izjednačavanja efekta delovanja u poređenju sa kompleksom **13**. Ovo je u skladu sa dobijenim rezultatima pri ispitivanju uticaja supstituenata na retenciju i određivanje lipofilnosti posmatranog seta Cu(II) kompleksa Šifovih baza, kao i datim objašnjenjima u delu 3.2.2.1. ove doktorske disertacije. Na **Slici 3.2.2** su prikazani biplotovi zasnovani na molekulskim deskriptorima ispitivanih jedinjenja. Molekulski deskriptori koji definišu tj. prepoznaju sukcesivnu supstituciju metil-grupe fenil-grupama su E_{HOMO} , α i R. Energija E_{HOMO} je direktno povezana sa jonizacionim potencijalom i opisuje sklonost molekula za napad elektrofila. Polarizabilnost označava efikasnost intermolekulskih i disperzionih interakcija sa okolinom, dok je refraktivnost povezana sa veličinom i polarizabilnošću prisutnih supstituenata. Takođe, ovakvo eksperimentalno ponašanje ispitivanih jedinjenja je u saglasnosti sa činjenicom da supstitucija metil-grupa sa fenil-grupama ima za posledicu, zbog sternih smetnji, povećanje ugla između helatnih prstenova na 11.71° , čime je otežan i usporen prolaz molekula nakon izvršene supstitucije.

Pri supstituciji metil-grupe (kompleks **19**) sa trifluorometil-grupom (kompleks **24**), utvrđena je značajna razlika u eksperimentalno dobijenim IC50 vrednostima, bez obzira na dužinu vremena inkubacije. Lipofilnost posmatranih kompleksa je zadovoljavajuća i daje mogućnost kompleksima da prođu kroz ćelijsku membranu. Supstitucija manje polarne metil-grupe, polarnijom trifluorometil-grupom dovodi do porasta lipofilnosti jedinjenja, jer lipofilnost ispitivanih jedinjenja, kao što je objašnjeno u delu **3.1** i **3.2** ove doktorske disertacije, nije posledica isključivo same strukture, već i drugih osobina i interakcija koje mogu da ostvare u datom sistemu. U ovom slučaju izražena je jaka rezonanca tj. rezonancioni efekat trifluorometil-grupe koji dovodi do porasta lipofilnosti. Ovo je u skladu sa dobijenim rezultatima pri ispitivanju uticaja supstituenata na retenciju i određivanje lipofilnosti posmatranog seta Cu(II) kompleksa Šifovih baza, kao i datim objašnjenjima u delu **3.2.2.1.** ove doktorske disertacije. Na **Slici 3.2.2** su prikazani biplotovi zasnovani na molekulskim deskriptorima ispitivanih jedinjenja.

Molekulski deskriptor koji definiše molekul na osnovu koga se prepoznanje supstitucija metil-grupe trifluorometil-grupom je dipolni momenat μ , koji opisuje raspodelu naelektrisanja u molekulu. Prisutni atomi fluora sa izraženom elektronegativnošću i velikim negativnim naelektrisanjem, koje se nalazi u elektronskom oblaku trifluorometil-grupe, pokazuju verovatno specifične interakcije u unutrašnjosti ćelije koje dovode do utvrđenog efekta da pri istim koncentracijama ubija neselektivno i zdrave i kancerske ćelije, kao i da na delovanje kompleksa **24** nema uticaja produžavanje vremena inkubacije (**Tabela 3.3.2, Slika 3.3.6**).

Pored evidentnog uticaja supstitenta na eksperimentalno određenu biološku aktivnost, utvrđeno je da postoji i uticaj strukture diaminskog mosta na ispoljavanje te aktivnosti. Naime, analizom dobijenih rezultata za komplekse **13** i **19** utvrđeno je da promena etilendiaminskog mosta u propilendiaminski most dovodi do znatnog snižavanja IC₅₀ vrednosti i to skoro 7 puta. Prisustvo propilendiamina u diaminskom mostu, zbog asimetrije u strukturi, daje mogućnost rotacije molekula kompleksa **19**, što verovatno omogućava zauzimanje različitih konformacija pri prolasku kroz ćelijsku membranu i pri ispoljavanju specifičnih interakcija u unutrašnjosti ćelije. Promena u strukturi diaminskog mosta dovodi do pojave novog enantiomernog centra na C atomu metilenske grupe, što za posledicu ima odstupanje od kvadratno-planarne geometrije usled odbijanja metil-grupa diaminskog mosta i helatnog prstena, a samim tim i povećanje ugla između helatnih prstenova.

Od svih ispitivanih kompleksa, jedino kompleks **24**, pri istim koncentracijama utiče i na zdrave i na kancerske ćelije. Zbog toga, njegovo vezivanje za HSA nije ispitivano u daljem radu. Kompleksi **13** i **15** utiču na zdrave ćelije tek na koncentracijama 100 puta većim od koncentracije na kojoj pokazuju citotoksično dejstvo prema kancerskim ćelijama, dok kompleks **19**, jedini, pokazuje efekat stabilizacije zdravih ćelija i pri ispitivanim koncentracijama ne pokazuje citotoksičnost prema zdravim ćelijama, već samo prema kancerskim. U daljem radu ispitivani su kompleksi **13, 15** i **19**.

3.4. Vezujući afinitet Cu(II) kompleksa Šifovih baza za humani serum albumin: eksperimentalni i teorijski pristup

Humani serum albumin (HSA) predstavlja jedan od najviše istraženih proteina. Razlog tome je njegov vezujući kapacitet za različite bioaktivne komponentne, kao i njegove funkcije transporta bioaktivnih jedinjenja, regulacije osmotskog pritiska, itd. HSA je monomerni protein molekulske mase oko 66 kDa, koji sadrži 17 disulfidnih mostova i jedan slobodan ostatak cisteina Cys₃₄. Strukturno sadrži najviše α -heliksa koji čine više od 2/3 proteina. U okviru 3D strukture uočavaju se tri homologa domena (I, II i III) i svaki od njih sadrži dva subdomena (A i B) (Bujacz & IUCr, 2012; X. M. He & Carter, 1992). Pored toga, HSA poseduje samo jedan ostatak triptofana - Trp₂₁₄ (He & Carter, 1992), pa zbog toga predstavlja odličan model za ispitivanje afiniteta vezivanja nekog liganda za protein i određivanje konstante vezivanja.

Prilikom proučavanja protein-ligand interakcija često se koristi fenomen gašenja fluorescencije (eng. fluorescence quenching), koji podrazumeva bilo koji proces koji dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije u uzorku. Vezivna mesta na HSA molekulu za mnoge aromatične i heterociklične ligande su uglavnom locirana u okviru dva hidrofobna džepa u subdomenima IIA (tzv. Sudlow-ovo mesto I) i IIIA (tzv. Sudlow-ovo mesto II) (Sudlow, Birkett, & Wade, 1975; Zsila, 2013). Za takozvano Sudlow-ovo mesto I, ili varfarin-azopropazonsko mesto, je poznato, da se za njega vezuju heterociklični anjonski liganadi, kao i neki lekovi, dok se u subdomenu IB nalazi mesto za vezivanje hema (Sudlow et al., 1975). Pored toga, dešava se da prilikom vezivanja određenog liganda za protein može doći do promene konformacije proteina ka više ili manje stabilnoj strukturi. Ovo je od značaja, jer je struktura proteina povezana sa njegovom funkcijom, pa samim tim ako odgovarajući ligand menja konformaciju proteina može doći do gubljenja funkcije tog proteina. Zbog toga, prilikom ispitivanja afiniteta vezivanja nekog liganda za protein, važno je da se ispita stabilnost proteina kao nosioca. Postoje razne metode koje se koriste za ovakva ispitivanja. Najčešće se koriste CD spektroskopija, kristalografija, NMR spektroskopija, ITC kalorimetrija i dr. U novije vreme, *in silico* pristup molekuskog dokinga je zamenio mnoge od ovih metoda. U nekoliko studija pokazano je da se Cu(II) kompleksi Šifovih baza vezuju za HSA, gase fluorescenciju triptofana, kao i da se vezuju za određeni domen na proteinu, što dovodi do zaključka da postoji mogućnost njihovog

transporta i dispozicije u krvnoj plazmi (da Silveira et al., 2009; M. Li, Huang, Ye, & Xie, 2015; Sartaj Tabassum, Musheer Ahmad, Mohd Afzal, Mehvash Zaki, 2014).

Do sada nisu ispitivane protein-ligand interakcije Cu(II) kompleksa polidentantnih Šifovih baza sa HSA ili sa drugim proteinom. U okviru ove doktorske disertacije ispitan je vezujući afinitet onih Cu(II) kompleksa Šifovih baza koji su pokazali citotoksični efekat na kancerskim ćelijama (opisano u delu 5.2 ove doktorske disertacije).

3.4.1. Materijal i metode

3.4.1.1. Određivanje koncentracije proteina

Liofilizovan HSA protein (Sigma, Nemačka) je odmeren na analitičkoj vagi i rastvoren u puferisanom fiziološkom rastvoru. Kada se dobijeni rastvor izbistrio, izvršeno je centrifugiranje u trajanju od 5 minuta na 13400 rpm. Supernatant je korišćen za merenje koncentracije proteina. Koncentracija proteina je određena spektrofotometrijski, na osnovu eksitacionog koeficijenta HSA i molarne mase HSA ($\epsilon = 35700 \text{ M}^{-1}\text{cm}$, $M = 66\ 000 \text{ g/mol}$), merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 280 nm u kvarcnoj kivetu od 1cm.

3.4.1.2. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentni spektri su snimani na spektrofluorimetru FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Japan), na sobnoj temperaturi (25°C) u kvarcnoj kivetu zapremine 3,5 ml, sa prorezom širine 5 nm. Emisioni spektri, u opsegu od 290-450 nm, su snimljeni pobuđivanjem triptofana u strukturi HSA koncentracije 1 μM u puferisanom fiziološkom rastvoru, sa i bez prisustva Cu(II) kompleksa Šifovih baza. Koncentracije rastvora ispitivanih kompleksa su bile u opsegu od 0.5-35 μM , a pripremljeni su u 1% DMSO kao rastvaraču. S obzirom da neki kompleksi mogu da daju emisione spektre, prvo su snimljeni fluorescentni spektri svih pripremljenih rastvora Cu(II) kompleksa Šifovih baza, sa rastućom koncentracijom, u puferisanom fiziološkom rastvoru. Dobijene vrednosti su oduzete od vrednosti dobijenih za HSA-kompleks spektre, kako bi se uklonio uticaj emisije samih kompleksa. Svi spektri su analizirani koristeći Origin Pro 8 softver (Northampton, MA, USA).

3.4.1.3. Analiza gašenja fluorescencije HSA sa Cu(II) kompleksima Šifovih baza

Stern-Volmer

Gašenje fluorescencije se opisuje Stern-Volmer-ovom jednačinom:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} \cdot [Q]$$

F_0 i F su emisijski intenziteti proteina pre i posle dodatka liganda, K_{sv} je Stern-Volmer-ova konstanta, a $[Q]$ je koncentracija liganda koji se vezuje za protein (Hasni et al., 2011; Liang, Tajmir-Riahi, & Subirade, 2008).

Iz Stern-Volmer-ove linearizacije izračunate su konstante brzine gašenja fluorescencije biomolekula (K_Q) primenom sledeće jednačine:

$$K_{sv} = K_Q \cdot \tau_0$$

gde je τ_0 poznata vrednost (5,6 ns) za životni vek ekscitovanog stanja HSA. K_{sv} je izračunat na osnovu nagiba Stern-Volmer-ove jednačine (Lakowicz, 1999; R. Wang et al., 2013).

Logaritamska jednačina

Za statički mehanizam gašenja fluorescencije triptofana, konstanta vezivanja (K_a), kao i broj vezivnih mesta se mogu izračunati na osnovu sledeće jednačine:

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

Nagib dobijen iz ove jednačine predstavlja broj vezujućih mesta, dok odsečak predstavlja konstantu vezivanja (Lakowicz, 2016).

3.4.1.4. CD spektroskopija

CD spektri u dalekoj ultraljubičastoj oblasti su snimljeni na JASCO J-815 spektropolarimetru (JASCO, Japan) na 25°C, u opsegu od 260 do 195 nm, u kvarcnoj kiveti sa optičkim putem od 0.01 cm. Broj akumulacija je podešen na 4, dok je brzina snimanja bila 50 nm/min. Snimani su spektri kako čistog HSA (10 μM), tako i kompleksa koji gradi protein sa ispitivanim Cu(II) kompleksnim jedinjenjem Šifove baze. Molski odnosi u kojima su mešani protein i odgovarajuće kompleksno jedinjenje su: 1:0.1, 1:0.5, 1:1 i 1:5. Rezultati su predstavljeni kao srednji molarni elipticitet aminokiselinskih ostataka proteina:

$$[\theta] = \theta / (10 \cdot n \cdot C \cdot d)$$

gde je θ izmereni elipicitet, n je broj aminokiselinskih ostataka u proteinu (585 za HSA), C je molarna koncentracija proteina u uzorku, dok je d dužina svetlosnog puta u kiveti. Određivanje procentnog udela sekundarnih struktura rađeno je po Ognjenovic i dr. (Ognjenovi et al., 2014). Korišćen je CONTIN softver sa SP29 proteinskom bazom podataka, koji je omogućen preko CDPro softverskog paketa.

3.4.1.5. Molekulsko modelovanje i molekularni doking

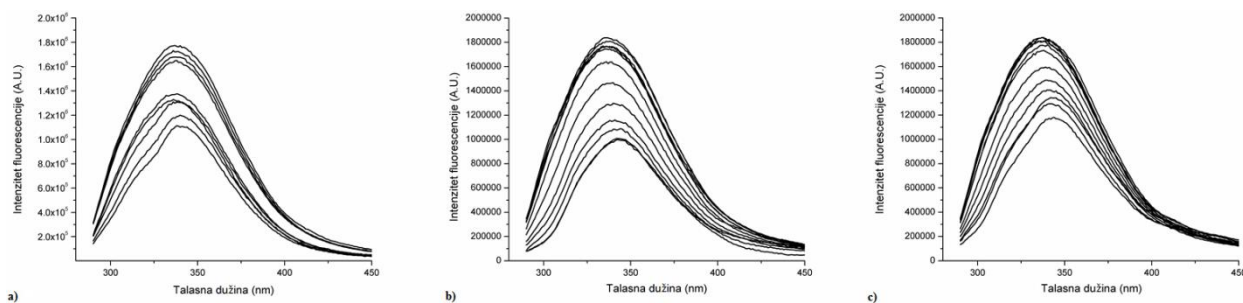
Da bi se odredila geometrija sintetisanih kompleksa i parcijalna naelektrisanja svih atoma u kompleksnom jedinjenju, urađeni su kvantno hemijski proračuni B3LYP metodom sa 6-31G(d,p) bazis setom za atome ugljenika, vodonika, azota i kiseonika i LANI2DZ bazis setom za atom bakra. Unutrašnji elektroni bakra su zamenjeni LANI2 efektivnim potencijalom, kako bi se što tačnije odredio njihov uticaj na elektronsku gustinu kompleksa (N. M. Aburas et al., 2013). Parcijalna naelektrisanja atoma, korišćena u doking proračunima, su izračunata RESP metodom. Svi kvantno hemijski proračuni su urađeni u programu Gaussian09 (Frisch et al. 2013).

Početna struktura HSA proteina je preuzeta iz proteinske baze podataka (PDB) – struktura 1BM0 (Sugio, Kashima, Mochizuki, Noda, & Kobayashi, 1999). Kristalografski pronađeni molekuli rastvarača su izbrisani iz strukture i protonovanost svih titrabilnih aminokiselinskih ostataka u proteinu je određena pomoću Poisson-Boltzmanovog modela elektrostatičkog kontinuuma u programu H++ (Anandakrishnan, Aguilar, & Onufriev, 2012). Aminokiseline koje su nedostajale u kristalnoj strukturi (na N i C terminalima) su modelovane u programu CHARMM (Brooks et al., 1983). U istom programu urađena je i optimizacija strukture proteina korišćenjem CHARMM-27 polja sila. Na tako pripremljenoj strukturi proteina urađen je doking liganda pomoću mreže (grid) centrirane na centru mase proteina, dimenzija 80 x 80 x 80 Å. Doking eksperiment je urađen u programu Autodock4 (Morris et al., 2009).

3.4.2. Rezultati

3.4.2.1. Interakcije Cu(II) kompleksa Šifovih baza sa HSA

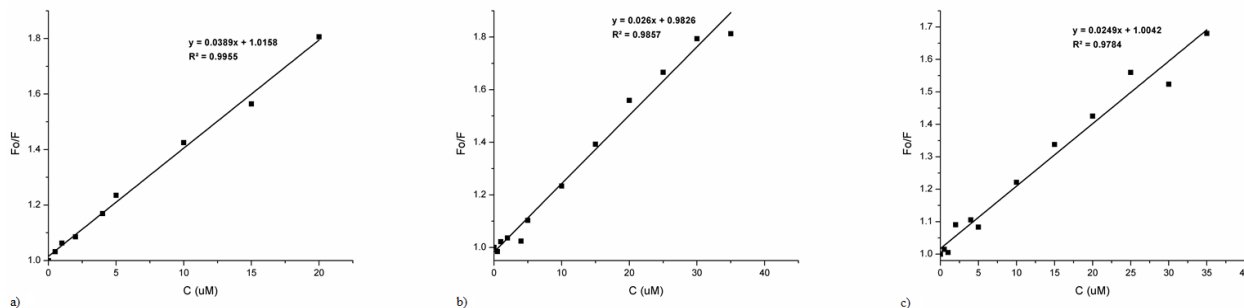
Interakcije Cu(II) kompleksa Šifovih baza sa HSA proteinom su praćene fluorescentnom spektroskopijom, metodom gašenja triptofanske fluorescencije HSA proteina pri povećanju koncentracije kompleksa. Na **Slici 3.4.1** prikazani su emisijski spektri HSA proteina sa kompleksima **13**, **15** i **19**. Sva tri ispitivana kompleksa, pri povećanju njihove koncentracije, dovode do gašenja triptofanske fluorescencije HSA koji je ekscitovan na 280 nm. Njegov emisijski maksimum λ_{max} na talasnoj dužini oko 340 nm, opada sa rastućom koncentracijom liganda koji se vezuju za njega, tj. ispitivanih jedinjenja. Naime, uočava se određeni pomeraj λ_{max} za svaki ispitivani kompleks: sa 337 nm na 346 nm za kompleks **13**, 336 nm na 344 nm za kompleks **15**, 338 nm na 342 nm za kompleks **19**. U emisijskim spektrima HSA sa svim kompleksima uočava se tzv. „crveni pomeraj“ λ_{max} ili pomeraj ka višim talasnim dužinama, gde se fluorescentni intenzitet HSA smanjuje za 30%, 19% i 13.8% za komplekse **13**, **15** i **19**, respektivno pri odnosu kompleks:protein 10:1. Ovi rezultati ukazuju na ostvarene interakcije ispitivanih kompleksa sa HSA proteinom. Pri najvišim vrednostima testiranih koncentracija kompleksa uočen je veći pad intenziteta signala za 44.6%, 38% i 46.5% za komplekse **13**, **15** i **19**, u odnosu na intenzitet signala proteina bez prisustva kompleksa, što može da ukaže na mogućnost zasićenja proteina sa kompleksom i gubitak njegove konformacije.



Slika 3.4.1. Emisioni spektar 1 μ M HSA sa kompleksima u koncentracionom opsegu od 0.5-35 μ M. a) HSA sa kompleksom **13**; b) HSA sa kompleksom **15** i c) HSA sa kompleksom **19**.

Gašenje emisije triptofana na 340 nm je primenjeno za određivanje jačina interakcija između HSA proteina i datog kompleksa primenom Stern-Volmerove jednačine i analize ovih podataka. Intenzitet gašenja emisije, prikazan kao linearna zavisnost odnosa F_0/F i koncentracije ispitivanih kompleksa, omogućava određivanje Stern-Volmer-ovu konstante, K_{SV} (Slika 3.4.2 i Tabela 3.4.1).

Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da sva tri kompleksa na Stern-Volmer-ovim graficima pokazuju linearnost, što znači da kompleksi dovode do gašenja emisije Trp₂₁₄ HSA proteina. Na osnovu ovoga može da se izračuna konstanta brzine gašenja fluorescencije HSA (K_Q). Dobijene vrednosti su date u Tabeli 3.4.1.



Slika 3.4.2. Stern-Volmer-ova linearizacija i određivanje K_{SV}

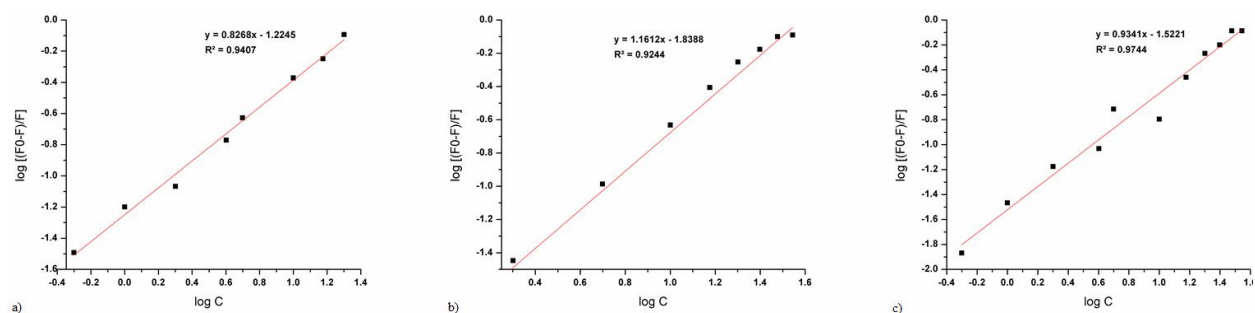
a) kompleks 13, b) kompleks 15, c) kompleks 19.

Tabela 3.4.1. Parametri vezivanja ispitivanih kompleksa za HSA.

Kompleks	Stern-Volmer-ova jednačina		logaritamska jednačina	
	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$	$K_Q (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_a (\text{M}^{-1})$	n
13	$3.9 \cdot 10^4$	$6.9 \cdot 10^{12}$	$5.7 \cdot 10^4$	0.83
15	$2.6 \cdot 10^4$	$4.6 \cdot 10^{12}$	$1.4 \cdot 10^4$	1.16
19	$2.5 \cdot 10^4$	$4.4 \cdot 10^{12}$	$3.1 \cdot 10^4$	0.93

Linearnost grafika, kao i vrednosti K_Q veće od 10^{10} ukazuju na statički mehanizam gašenja emisije i postojanje kompleksa između HSA i ispitivanih Cu(II) kompleksnih jedinjenja Šifovih baza (**13, 15, 19**).

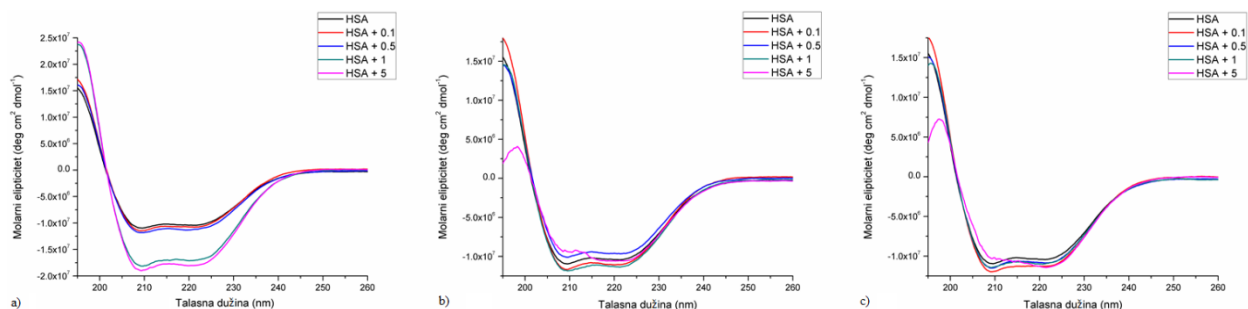
S obzirom da je utvrđeni mehanizam gašenja statički, omogućeno je određivanje konstante vezivanja (K_a) formiranog kompleksa, kao i određivanje broja vezivnih mesta (n). Iz dvostrukog logaritamskog grafika (**Slika 3.4.3**), linearizacijom prave dobija se jednačina prave u kojoj nagib predstavlja broj vezujućih mesta, dok odsečak predstavlja konstantu vezivanja (**Tabela 3.4.1**) (Lakowicz, 1999).



Slika 3.4.3. Dvostruki logaritamski grafik: a) kompleks **13**, b) kompleks **15**, c) kompleks **19**.

3.4.2.2. Uticaj vezivanja Cu(II) kompleksa Šifovih baza na sekundarne strukture HSA

Radi provere konformacionih promena na sekundarnim strukturama HSA proteina snimljeni su CD spektri HSA i Cu(II) kompleksa Šifovih baza u dalekoj UV oblasti (**Slika 3.4.4**). CD spektri su snimljeni u molskim odnosima protein:ligand od 1:0,1 do 1:5. Izabrana je najniža koncentracija kompleksa koja je korišćena kao najviša koncentracija pri testovima citotoksičnosti u prethodnom poglavlju (**3.3.2**), jer sa primenjenim nižim koncentracijama ispitivanih kompleksa nema promene u sekundarnoj strukturi HSA proteina.



Slika 3.4.4. CD spektri: a) kompleks **13**, b) kompleks **15**, c) kompleks **19**.

Na osnovu snimljenih spektara može da se zaključi da kompleks **13** nema uticaja na promenu strukture sve dok nije postignut odnos 1:1. Naime, na **Slici 3.4.4a** je prikazan CD spektar HSA proteina sa bogatim sadržajem α -heliksa (minimumi na 208 nm i 222 nm). Pri odnosima protein:ligand 1:1 i 1:5 dolazi do promene u strukturi proteina, dajući veći molarni elipticitet kako u minimumu tako i u maksimumu (**Slika 3.4.4a**). Izračunavanjem udela (%) sekundarnih struktura utvrđeno je da dolazi do povećanja udela α -heliksa u korist smanjenja β -pločica i to od 52% na 74% za α -heliks, tj. sa 8,7% na 0,2% za β -pločice (**Tabela 3.4.2**). Kompleks **15** utiče na strukturu proteina ukoliko je odnos protein:ligand 1:5, pri čemu je uočen znatni pad molarnog elipticiteta u maximumu, na oko 195 nm, ali i smanjenje molarnog elipticiteta u minimumu na oko 210 nm (**Slika 3.4.4b**). Preračunavanjem udela (%) sekundarnih struktura (**Tabela 3.4.3**) dobija se da se udeo α -heliksa, ali i β -pločica, znatno smanjio u korist nerazvijene strukture, vodeći ka denaturaciji ili razvijanju proteina. Slična pravilnost u ponašanju je utvrđena i za kompleks **19** (**Slika 3.4.4c** i **Tabela 3.4.4**). Naime, u slučaju ova dva kompleksa pokazano je da molski odnosi 1:1 ne utiču na promenu strukture HSA proteina.

Tabela 3.4.2. Određivanje sekundarne strukture HSA, pre i posle dodatka kompleksa **13**.

Odnos protein:kompleks	% sekundarne strukture			
	α -heliks	β -ploča	β -navoj	nerazvijena struktura
1:0	52,1	8,7	18,5	22,7
1:0.1	53,0	7,6	16,8	22,7
1:0,5	52,9	6,6	18,2	22,3
1:1	71,4	0,7	12,5	15,3
1:5	73,9	0,2	11,3	14,6

Tabela 3.4.3. Određivanje sekundarne strukture HSA, pre i posle dodatka kompleksa **15**.

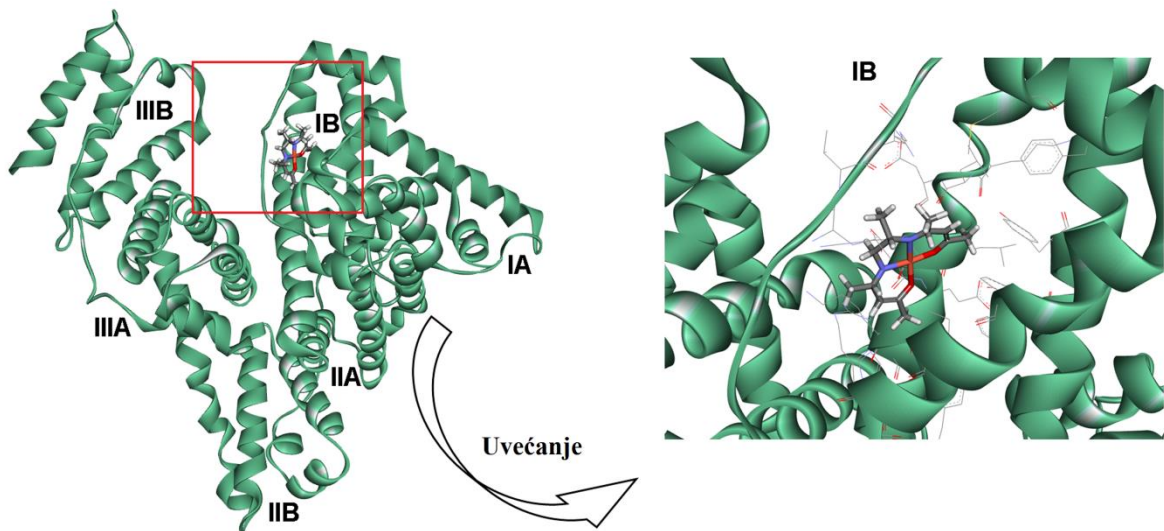
Odnos protein:kompleks	% sekundarne strukture			
	α -heliks	β -ploča	β -navoj	nerazvijena struktura
1:0	52,1	8,7	18,5	22,7
1:0,1	56,2	7,3	16,2	22,5
1:0,5	47,3	10,4	18,7	23,5
1:1	50,7	6,7	19,5	23,1
1:5	34,9	4,8	23,7	36,5

Tabela 3.4.4. Određivanje sekundarne strukture HSA, pre i posle dodatka kompleksa **19**.

Odnos protein:kompleks	% sekundarne strukture			
	α -heliks	β -ploča	β -navoj	nerazvijena struktura
1:0	52,1	8,7	18,5	22,7
1:0,1	54,4	6,5	17,0	22,1
1:0,5	50,6	7,2	18,7	22,5
1:1	50,7	7,3	20,1	21,9
1:5	40,2	4,1	20,9	34,8

3.4.2.3. Molekulski doking [Cu(acac₂pn)] za HSA protein

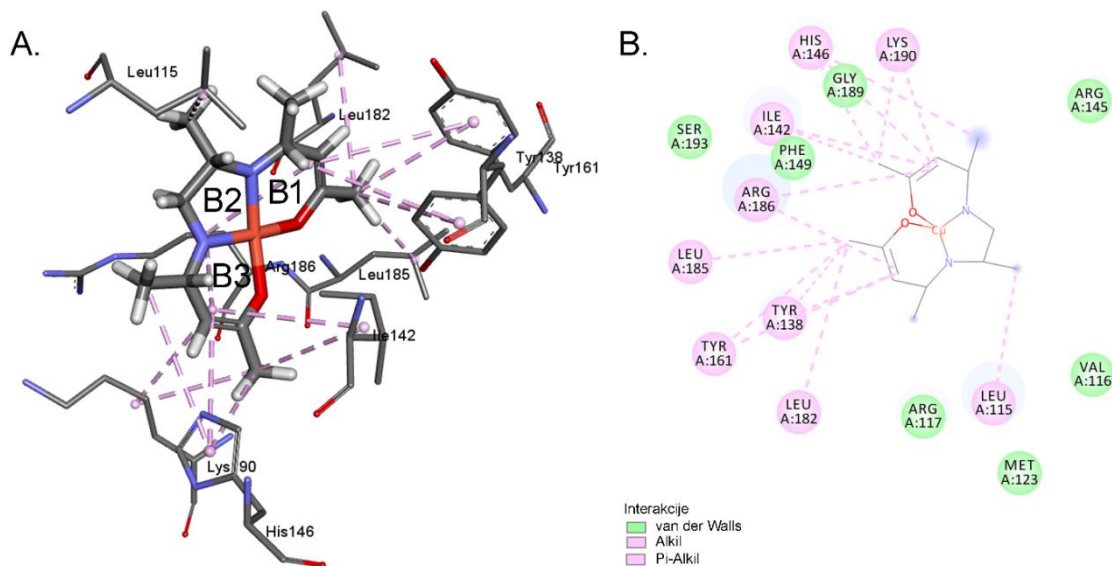
Molekulski doking i izračunavanje parametara kod kompleksa HSA-[Cu(acac₂pn)] ukazuje na potencijalno mesto vezivanja ispitivanog kompleksa u HSA. Detaljne analize pokazale su da se ispitivano kompleksno jedinjenje [Cu(acac₂pn)] (kompleksa **19**) vezuje za HSA na subdomen IB (**Slika 3.4.5**). HSA protein je preuzet iz proteinske baze podataka (struktura 1BM0 (Sugio et al., 1999)).



Slika 3.4.5. Kompleks HSA-[Cu(acac₂pn)] i mesto vezivanja.

- a) uobičajna mesta vezivanja su obeležena rimskim brojevima, b) IB domen kao potencijalno mesto vezivanja kompleksa **19** (prikazan sa uvećanjem)

Mesto sa visokim afinitetom vezivanja se nalazi između sledećih aminokiselina: naelektrisanih, polarnih i aminokiseline sa pirolskom grupom Lys₉₀, Tyr₁₃₈, His₁₄₆, Tyr₁₆₁, Arg₁₈₆; nepolarnih Leu₁₁₅, Ile₁₄₂, Leu₁₈₂, Leu₁₈₅ (**Slika 3.4.6A**). Uočeno je da je kompleks pozicioniran najbliže položaju koji se nalazi između Leu₁₈₂ i Arg₁₈₆ i da se najviše protein-ligand interakcija odigrava između helatnih prstenova kompleksa [Cu(acac₂pn)] (B1 i B3) dok prsten propilendiaminskog mosta (B2) interaguje samo sa Leu₁₁₅ (**Slika 3.4.6A**). Ostvarene su π interakcije B1 helatnog prstena sa ostacima Leu₁₈₂, Leu₁₈₅, kao i sa fenolnim ostacima Tyr₁₃₈ i Tyr₁₆₁. Helatni prsten B3 interaguje sa ostatkom Lys₉₀, piridinskim ostatkom His₁₄₆, kao i sa Ile₁₄₂. Iz 2D dijagrama (**Slika 3.4.6B**) zaključeno je da su Leu₁₁₅, His₁₄₆, Ile₁₄₂ i Arg₁₈₆ aminokiseline koje stabilizuju nagrađeni kompleks između ispitivanog jedinjenja i HSA. Pored alkil i π -alkil interakcija uočene su i van der Waals-ove interakcije i to sa sledećim aminokiselinama: Val₁₁₆, Arg₁₁₇, Met₁₂₃, Arg₁₄₅, Phe₁₄₉, Gly₁₈₉ i Ser₁₉₃.



Slika 3.4.6. Interakcije HSA proteina iz subdomena IB sa [Cu(acac₂pn)]

A- mesto vezivanja i alkil interakcije. B- 2D dijagram sa najznačajnijim interakcijama.

3.4.3. Diskusija

Vezujuće interakcije nekih supstanci za serum albumin *in vitro* uzet je kao model protein u proteinskoj hemiji kako bi se izučavale protein-ligand interakcije (Hu, Liu, Shen, Fang, & Qu, 2005). U okviru ovog dela doktorske disertacije ispitane su interakcije kompleksa 13, 15 i 19 sa HSA proteinom kao modelom i mogućim nosiocem supstance do ciljnih ćelija. Određen je afinitet vezivanja kompleksa za protein, uticaj na strukturu proteina prilikom vezivanja. Za kompleks 19 ([Cu(acac₂pn)]) je određeno i teorijsko mesto vezivanja za HSA protein. Pokazano je da kompleksi koji imaju citotoksični efekat na Caco-2 ćelije imaju visoki afinitet vezivanja za HSA, da postoji jedno vezivno mesto, kako teorijski, tako i eksperimentalno, kao i da molski odnos veoma malo utiče na promenu strukture proteina. Izuzetak je Cu(II) kompleks **13** koji je pokazao da ima sposobnost veće stabilizacije proteina.

Naime, emisioni spektri ispitivanih kompleksa pokazali su gašenje fluorescencije Trp₂₁₄ što ukazuje na formiranje kompleksa između HSA i liganda. Uočen je pomeraj emisionog maksimuma u crvenom opsegu spektra, što dovodi do povećanja polarnosti mikrokruženja triptofanskog ostatka (Ng et al., 2013). Samim tim, to može dovesti i do mogućih konformacionih promena u strukturi HSA zbog intramolekulskih sila koje su uključene u održavanje sekundarne strukture, zajedno sa smanjenjem hidrofobnosti, indukujući da je

triptofanski ostatak više izložen rastvaraču (X.-F. Zhang et al., 2008). Ovaj fenomen je najviše uočen kod kompleksa **13** koji sadrži, u svojoj simetričnoj strukturi, dve metil-grupe i etilendiaminski most. Naime, pomeraj emisionog maksimuma je najznačajniji kod kompleksa **13**, a uočen je i najveći pad inteziteta emisionog maksimuma. Najmanji pomeraj emisionog maksimuma uočen je kod kompleksa **19**, verovatno zbog prisutne asimetrije u diaminskom mostu koji sadrži propilendiamin, što je u skladu sa rezultatima koji su dati u poglavlju **3.1** i **3.2** ove doktorske disertacije. Kod kompleksa **19** je, zbog takve strukture, izražena promena ugla između helatnih prstenova, pri čemu se dobija narušena kvadratno-planarna struktura i potpuno drugačija konformacija u odnosu na ispitivane komplekse **13** i **15**. Pored toga, svi ispitivani kompleksi su pokazali da njihovo prisustvo dovodi do gašenja fluorescencije triptofanskog ostatka. Do gašenja fluorescencije dolazi usled transfera protona ili elektrona, transfera energije, konformacione promene i intramolekulske reakcije. Daljom obradom rezultata Stern-Volmer-ovom linerizacijom i određivanjem K_{sv} i K_Q konstanti pokazano je da je mehanizam vezivanja liganda za protein statički (Ghisaidoobe & Chung, 2014b). Statičko gašenje emisije se zove i gašenje nastalo usled formiranja nefluorescentnog kompleksa.

Analizom dobijenih K_{sv} vrednosti jasno se vidi da vrednosti variraju u zavisnosti od primenjenog kompleksa i to u nizu **13** > **15** > **19**. Ispitivani kompleksi ostvaruju interakcije i koordinišu sa različitim ostacima. Na osnovu dvostrukog logaritamskog grafika su određene konstante vezivanja K_a , čije su vrednosti dovoljno visoke, što ukazuje da se ligand vezuje za protein. Dobijene K_a su značajno niže od npr. nekovaletne veze avidin-biotin ($K = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) (Livnah, Bayer, Wilchek, & Sussman, 1993), sugerišući mogućnost oslobađanja liganda od serum albumina u ciljnim ćelijama, kao što je i pokazano (M. Li et al., 2015). Dobijena K_a vrednost je najveća za kompleks **13**, što govori o ostvarivanju jačih interakcija i intramolekulskih sila sa HSA, kao i o formiranju stabilnijeg kompleksa, što verovatno dovodi do promene konformacione strukture proteina. Ovo je u korelaciji sa dobijenim rezultatima i datim objašnjenjima pri analizi najvećeg pomeranja emisionog maksimuma HSA u prisustvu ispitivanih jedinjenja.

U nekoliko studija pokazano je da vezivanje liganda za HSA vodi ka stabilizaciji njegove konformacije, poput vitamina B12 (Hou et al., 2008), masnih kiselina (Guizado, 2014), lupeola (Kallubai, Rachamalla, Yeggoni, & Subramanyam, 2015) i floretina (Barreca et al., 2017). Naši rezultati pokazuju da pri molskom odnosu protein:ligand od 1:1 ne dolazi do značajne promene u

sekundarnoj strukturi proteina. Međutim, pri većoj koncentraciji dolazi do destabilizacije konformacije HSA sa kompleksom **15** i kompleksom **19**. Za razliku od njih kompleks **13** je pokazao da ima sposobnost da stabilizuje konformaciju HSA proteina, time što dolazi do porasta udela α -heliksa, čak i pri molskom odnosu protein:ligand 1:1. Ovo je u skladu sa eksperimentalno određenom konstantnom vezivanja, koja je oko 5 puta veća u poređenju sa vrednostima konstanti vezivanja koje su dobijene za druga dva ispitivana jedinjenja. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima datim u literaturi, gde se definiše slično ponašanje Cu(II) kompleksa sa 1,1-*O*-fenantrolinom, kao i Cu(II)-epigalokatehingalat kompleksa (Shahabadi, Bazvandi, & Taherpour, 2017; Singha Roy, Ghosh, & Dasgupta, 2013).

Molekulskim dokingom pokazano je da mesto vezivanja kompleksa **19** za HSA na subdomenu IB. Ovo mesto je poznato po tome što se za njega vezuje hem (J. Zhang et al., 2016). Vezivanje je posledica van der Waals-ovih i π -interakcija (alkil tipa). Sam kompleks se stabilizuje između Leu₁₁₅, His₁₄₆, Ile₁₄₂ i Arg₁₈₆, tako da arginin interaguje sa oba helatna prstena u strukturi posmatranog jedinjenja, histidin utiče na stabilnost jednog od helatnih prstenova, dok leucin stabilizuje propilendiaminski prsten diaminskog mosta.

4. ZAKLJUČCI

- Utvrđen je uticaj primenjenih organskih modifikatora na hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja i na određivanje parametara lipofilnosti. Primenom određenog modifikatora molekul može da ispolji lipofilnost, adekvatnu onoj koju bi ispoljio u realnom okruženju, kao što je prolazak kroz ćelijsku membranu. Metanol, kao organski modifikator omogućava najbolje odvajanje strukturno sličnih jedinjenja, dok primenom THF ispitivana jedinjenja mogu da se posmatraju kao homologa serija, bez obzira na velike razlike u strukturi.
- Za ispitivana jedinjenja, utvrđeni su molekularni deskriptori koji najbolje opisuju promenu osobina molekula izazvanu sukcesivnom supstitucijom i njihov uticaj na lipofilnost. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da voluminozni supstituenti sa izraženim induktivnim efektom povećavaju lipofilnost. Takođe, diaminski most koji sadrži propilensku grupu doprinosi većoj hidrofobnosti. QSRR i QSAR modeli ispitivanih kompleksa su razvijeni na osnovu teorijskih molekularnih deskriptora izračunatih za date strukture, kao i parametara retencije i lipofilnosti.
- Nijedan od ispitivanih kompleksa ne dovodi do nekroze ćelija već ih uvodi u programiranu ćelijsku smrt. Tri od četiri kompleksa su pokazala citotoksičnost prema Caco-2 kancerskim ćelijama, a da pri istim koncentracijama ne utiču na zdrave ćelije. Kompleks sa najvećim proapoptotskim efektom na kancerskim ćelijama je pokazao i stabilizujući efekat prema zdravim ćelijama. Takođe, utvrđen je uticaj strukture na citotoksičnost datih jedinjenja.
- U okviru ovih ispitivanja je utvrđeno da Cu(II) kompleksi sa polidentatnim Šifovim bazama imaju visoki afinitet vezivanja za HSA, da postoji jedno vezivno mesto, kao i da vezivanjem ovih kompleksa dolazi do minornih promena u sekundarnim strukturama proteina koje, u nekim slučajevima, čak dovode i do stabilizacije proteina. Doking studija za ispitivani kompleks sa najvećim proapoptotskim efektom na kancerskim ćelijama potvrđuje vezivanje kompleksa za HSA u subdomenu IB, pa se samim tim HSA može smatrati mogućim nosiocem supstance do ciljnih ćelija.

5. LITERATURA

- Abo Dena, A. S. (2014). To the Memory of Hugo Schiff: Applications of Schiff Bases in Potentiometric Sensors. *ISSN Russian Journal of Applied Chemistry*, 87(3), 1070–4272. <https://doi.org/10.1134/S1070427214030227>
- Aburas, N., Lolić, A., Stevanović, N., Tripković, T., Nikolić-Mandić, S., & Baošić, R. (2012). Electrochemical behavior and antioxidant activity of tetradentate Schiff bases and their copper(II) complexes. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 9(6), 859–864. <https://doi.org/10.1007/s13738-012-0102-7>
- Aburas, N. M., Stevanović, N. R., Milčić, M. K., Đ. Lolić, A., Natić, M. M., Tešić, Živoslav Lj., & Baošić R. M. (2013). Influence of the Structure on the Antioxidant Activity of Tetradentate Schiff Bases and their Copper(II) Complexes: Possible Mechanisms. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(8), 1322–1328. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130167>
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27604355>
- Agrawal, Y. K., Talati, J. D., Shah, M. D., Desai, M. N., & Shah, N. K. (2004). Schiff bases of ethylenediamine as corrosion inhibitors of zinc in sulphuric acid. *Corrosion Science*, 46(3), 633–651. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(03\)00174-4](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(03)00174-4)
- Ahmad, A., Qasimullah, Muzaffar, S., Andrabi, A., & Qureshi, P. M. (1996). Solvent Polarity as a Function of R_f in Thin-Layer Chromatography of Selected Nitro Functions. *Journal of Chromatographic Science*, 34(8), 376–378. <https://doi.org/10.1093/chromsci/34.8.376>
- Ali, M., Jesmin, M., Salahuddin, M., Habib, M., & Khanam, J. (2008). Antineoplastic activity of N-salicylidene-glycinato-di-aquanickel(II) complex against Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) cells in mice. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2(3), 292–298. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v2i3.39748>
- Allen, A. D., & Tidwell, T. T. (2012). New Directions in Ketene Chemistry: The Land of

- Opportunity. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012(6), 1081–1096.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201101230>
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. V. (2012). H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W537–W541.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks375>
- Anderson, O. P., La Cour, A., Findeisen, M., Hennig, L., Simonsen, O., Taylor, L. F., & Toftlund, H. (1997). Zinc(II) N2S2 Schiff-base complexes incorporating pyrazole: Syntheses, characterization, tautomeric equilibria and racemization kinetics. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (1), 111–120. <https://doi.org/10.1039/A603158G>
- Arida, H. A., El-Reefy, S. A., & El-Saied, A. M. (2003). A New Lead(II)-Selective PVC-Coated Graphite Rod Electrode Based on a Schiff Base Complex. *Analytical Sciences*, 19(5), 687–690. <https://doi.org/10.2116/analsci.19.687>
- Bajorath, J. (2001). Selected Concepts and Investigations in Compound Classification, Molecular Descriptor Analysis, and Virtual Screening. <https://doi.org/10.1021/CI0001482>
- Baošić, R. M., Milojković-Opsenica, D. M., & Tešić, Ž. L. (2003). The effect of the substituents of β -ketoiminato ligand of copper(II) and nickel(II) complexes on their retention on thin layers of polyacrylonitrile. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 16(6), 412–416. <https://doi.org/10.1556/JPC.16.2003.6.1>
- Baošić, R., Radojević, A., Radulović, M., Miletić, S., Natić, M., & Tešić, Ž. (2008). Relationships between structure, retention and biological activity of some Schiff base ligands and their complexes. *Biomedical Chromatography*, 22(4), 379–386.
<https://doi.org/10.1002/bmc.943>
- Barluenga, J., Aznar, F., & Valdés, C. (2004). N-Trialkylsilylimines as Coupling Partners for Pd-Catalyzed C-N Bond-Forming Reactions: One-Step Synthesis of Imines and Azadienes from Aryl and Alkenyl Bromides. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(3), 343–345. <https://doi.org/10.1002/anie.200352808>
- Barreca, D., Laganà, G., Toscano, G., Calandra, P., Kiselev, M. A., Lombardo, D., ... Migliardo, F. (2017). The interaction and binding of flavonoids to human serum albumin modify its

- conformation, stability and resistance against aggregation and oxidative injuries. *BBA - General Subjects*, 1861, 3531–3539. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.014>
- Bate-Smith, E. C., & Westall, R. G. (1950a). Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4, 427–440. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90049-7)
- Bate-Smith, E. C., & Westall, R. G. (1950b). Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4, 427–440. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90049-7)
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology annual review* (Vol. 11, pp. 127–152). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bij, K. E., Horváth, C., Melander, W. R., & Nahum, A. (1981). Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 203, 65–84. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)80282-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80282-4)
- Blagus, A., Cinčić, D., Friščić, T., Kaitner, B., & Stilinović, V. (2010). Schiff Bases Derived From Hydroxyaryl Aldehydes: Molecular And Crystal Structure, Tautomerism, Quinoid Effect, Coordination Compounds. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 29 (2), 117–138.
- Blagus, A., & Kaitner, B. (2011a). 1,1'-[m-Phenylenebis(nitrilomethanylylidene)]dinaphthalen-2-ol-1, 1'-[m-phenylenebis(iminomethanylylidene)]dinaphthalen-2(1H)-one (0.58/0.42). *Acta Crystallographica Section E*, E67, o2908-o2909. <https://doi.org/10.1107/S1600536811040918>
- Blagus, A., & Kaitner, B. (2011b). 2-[1-(3-Aminophenyl-imino)-ethyl]phenol, 67(6). *Acta Crystallographica Section E*, E67, o1423. <https://doi.org/10.1107/S1600536811017624>
- Blagus, A., & Kaitner, B. (2011c). 2-[[4-[[2-Hydroxyphenyl](phenyl)methylidene]amino}phenyl]imino](phenyl) methyl}phenol, 67(12). *Acta Crystallographica Section E*, E67, o3252. <https://doi.org/10.1107/S1600536811046988>
- Blagus, A., & Kaitner, B. (2011d). 2,2'-[1,5-Bis(4-amino-phen-yl)-1,5-dihydrobenzo[1,2-d;4,5-d'] diimidazole-2,6-diyl]diphenol. *Acta Crystallographica Section E*, E67, o2666-o2667.

<https://doi.org/10.1107/S1600536811036737>

- Blagus, A., & Kaitner, B. (2011e). Two ketimine polymorphs of 2-{1-[(2-Aminophenyl)imino]ethyl}phenol. *Acta Chimica Slovenica*, 58(4), 823–829.
- Borchardt, R. T. (2011). Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T.: Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability, *Gastroenterology*, 96, 736–749, 1989—The Backstory. *The AAPS Journal*, 13(3), 323–327. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9283-8>
- Bradfield, A. E., & Bate-Smith, E. C. (1950). Chromatographic behaviour and chemical structure II. The tea catechins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4, 441–444. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90050-3)
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2), 187–217. <https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>
- Bujacz, A., & IUCr. (2012). Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 68(10), 1278–1289. <https://doi.org/10.1107/S0907444912027047>
- Burdett, J. L., & Rogers, M. T. (1964). Keto-Enol Tautomerism in α -Dicarbonyls Studied by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. ¹ I. Proton Chemical Shifts and Equilibrium Constants of Pure Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 86(11), 2105–2109. <https://doi.org/10.1021/ja01065a003>
- Burdett, J. L., & Rogers, M. T. (1966). Keto—Enol Tautomerism in β -Dicarbonyls Studied by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Studies of Proton Chemical Shifts and Equilibrium Constants at Different Temperatures. *The Journal of Physical Chemistry*, 70, 939–941. <https://doi.org/10.1021/j100875a510>
- Calvin, M., & Wilson, K. W. (1945). Stability of Chelate Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 67(11), 2003–2007. <https://doi.org/10.1021/ja01227a043>
- Carter, M. J., Rillema, D. P., & Basolo, F. (1974). Oxygen Carrier and Redox Properties of Some Neutral Cobalt Chelates. Axial and In-Plane Ligand Effects. *Journal of the American*

- Chemical Society*, 96(2), 392–400. <https://doi.org/10.1021/ja00809a012>
- Cazes, J. (2010). *Encyclopedia of chromatography*. CRC Press. ISBN 9781420084597
- Choi, Y.-K., Kim, W.-S., Chung, K., Chung, M.-W., & Nam, H.-P. (2000). Catalytic effect of transition metal(II)-N,N'-bis(naphthaldehyde)diimines on reduction of thionyl chloride. *Microchemical Journal*, 65(1), 3–15. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00011-4)
- Cohen, M. P. (2013). Clinical, pathophysiological and structure/function consequences of modification of albumin by Amadori-glucose adducts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(12), 5480–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.024>
- Consonni, V., & Todeschini, R. (2010). Molecular Descriptors. In *Recent Advances in QSAR Studies* (pp. 29–102). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9783-6_3
- Cozzi, P. G.. (2004). Metal–Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. *Chemical Society Reviews*, 33(7), 410–421. <https://doi.org/10.1039/B307853C>
- Cronin, M. T. D. (2010). Quantitative Structure–Activity Relationships (QSARs) – Applications and Methodology. In *Recent Advances in QSAR Studies* (pp. 3–11). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9783-6_1
- Cross, S. E., Magnusson, B. M., Winckle, G., Anissimov, Y., & Roberts, M. S. (2003). Determination of the Effect of Lipophilicity on the in vitro Permeability and Tissue Reservoir Characteristics of Topically Applied Solutes in Human Skin Layers. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(5), 759–764. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12131.x>
- Cserhádi, T. (1984). Determination of the lipophilicity of some aniline derivatives by reversed-phase thin-layer chromatography. The effect of the organic phase in the eluent. *Chromatographia*, 18(6), 318–322. <https://doi.org/10.1007/BF02259085>
- Cserhádi, T. (1994). Relationship between the physicochemical parameters of 3,5-dinitrobenzoic acid esters and their retention behaviour on β -cyclodextrin polymer support. *Analytica Chimica Acta*, 292(1–2), 17–22. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00035-2](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00035-2)
- da Silveira, V. C., Caramori, G. F., Abbott, M. P., Gonçalves, M. B., Petrilli, H. M., & da Costa

- Ferreira, A. M. (2009). Oxindole-Schiff base copper(II) complexes interactions with human serum albumin: Spectroscopic, oxidative damage, and computational studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *103*(10), 1331–1341.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.05.015>
- Dabić, D., Natić, M., Džambaski, Z., Stojanović, M., Marković, R., Milojković-Opsenica, D., & Tešić, Ž. (2011). Estimation of Lipophilicity Of *N*-Substituted 2-Alkylidene-4-Oxothiazolidines By Means of Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *34*(10–11), 791–804.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2011.571157>
- Danielsson, L., & Zhang, Y. (1996). Methods for determining *n*-octanol-water partition constants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *15*(4), 188–196. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(96\)00003-9](https://doi.org/10.1016/0165-9936(96)00003-9)
- David, O., Meester, W. J. N., Bieräugel, H., Schoemaker, H. E., Hiemstra, H., & van Maarseveen, J. H. (2003). Intramolecular Staudinger Ligation: A Powerful Ring-Closure Method To Form Medium-Sized Lactams. *Angewandte Chemie International Edition*, *42*(36), 4373–4375. <https://doi.org/10.1002/anie.200351930>
- Dellis, D., Giaginis, C., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2007). Physicochemical profile of nimesulide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *44*(1), 57–62.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.01.035>
- Desai, S. B., Desai, P. B., & Desai, K. R. (2001). Synthesis Of Some Schiff Bases, Thiazolidinones And Azetidinones Derived From 2,6-Diaminobenzo[1,2-D:4,5-D'] Bisthiazole And Their Anticancer Activities. *Heterocyclic Communications*, *7*(1), 83–90.
<https://doi.org/10.1515/HC.2001.7.1.83>
- Devillers, J. (1996). *Neural networks in QSAR and drug design*. Harcourt Brace.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Liu, S.-Q. (2016). Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Efremov, R. G., Chugunov, A. O., Pyrkov, T. V., Priestle, J. P., Arseniev, A. S., & Jacoby, E. (2007). Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design. *Current Medicinal*

- Chemistry*, 14(4), 393–415. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305542>
- Ehresmann, B., Martin, B., Horn, A. H. C., & Clark, T. (2003). Local molecular properties and their use in predicting reactivity. *Journal of Molecular Modeling*, 9(5), 342–347. <https://doi.org/10.1007/s00894-003-0153-x>
- Ettre, L. S. (1993). Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(4), 819–872. <https://doi.org/10.1351/pac199365040819>
- Evans, D. A., Janey, J. M., Magomedov, N., & Tedrow, J. S. (2001). Chiral Salen-Aluminum Complexes as Catalysts for Enantioselective Aldol Reactions of Aldehydes and 5-Alkoxyoxazoles: An Efficient Approach to the Asymmetric Synthesis of syn and anti beta-Hydroxy-alpha-amino Acid Derivatives Financial support has been provided by the National Institutes of Health (GM 43912-11 and GM 33328-18). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 40(10), 1884–1888. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385662>
- Fattori, D. (2004). Molecular recognition: the fragment approach in lead generation. *Drug Discovery Today*, 9(5), 229–238. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)03007-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)03007-1)
- Fehring, V., & Selke, R. (1998). Highly Enantioselective Complex-Catalyzed Reduction of Ketones— Now with Purely Aliphatic Derivatives Too. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(13–14), 1827–1830. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980803\)37:13/14<1827::AID-ANIE1827>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980803)37:13/14<1827::AID-ANIE1827>3.0.CO;2-C)
- Finizio, A., Vighi, M., & Sandroni, D. (1997). Determination of n-octanol/water partition coefficient (Kow) of pesticide critical review and comparison of methods. *Chemosphere*, 34(1), 131–161. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(96\)00355-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(96)00355-4)
- Flynn, G. L. (1980). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(9), 1109. <https://doi.org/10.1002/jps.2600690938>
- Fujita, T., Iwasa, J., & Hansch, C. (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *Journal of the American Chemical Society*, 86(23), 5175–5180. <https://doi.org/10.1021/ja01077a028>
- Gaica, S., Opsenica, D., Šolaja, B., Tešić, Ž., & Milojković-Opsenica, D. (2002). The retention behavior of some cholic acid derivatives on different adsorbents. *Journal of Planar*

- Chromatography – Modern TLC*, 15(4), 299–305. <https://doi.org/10.1556/JPC.15.2002.4.11>
- Gaillard, P., Pierre-Alain, C., & Testa, B. (1994). The conformation-dependent lipophilicity of morphine glucuronides as calculated from their molecular lipophilicity potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4(5), 737–742. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80191-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80191-8)
- Gao, J., Qiao, S., & Whitesides, G. M. (1995). Increasing binding constants of ligands to carbonic anhydrase by using “greasy tails”. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(13), 2292–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7608894>
- Garnovskii, A. D., Nivorozhkin, A. L., & Minkin, V. I. (1993). Ligand environment and the structure of schiff base adducts and tetracoordinated metal-chelates. *Coordination Chemistry Reviews*, 126(1–2), 1–69. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(93\)85032-Y](https://doi.org/10.1016/0010-8545(93)85032-Y)
- Gault, V. A., & McClenaghan, N. H. (2009). *Understanding Bioanalytical chemistry : principles and applications*. John Wiley & Sons.
- Gervasi, O., Murgante, B., Laganà, A., Taniar, D., Mun, Y., & Gavrilova, M. L. (Eds.). (2008). *Computational Science and Its Applications – ICCSA 2008* (Vol. 5072). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69839-5>
- Ghisaidoobe, A. B. T., & Chung, S. J. (2014a). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518–38. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
- Ghisaidoobe, A. B. T., & Chung, S. J. (2014b). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518–38. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
- Gilbert, M. T. (n.d.). *High performance liquid chromatography*. Retrieved from [https://books.google.rs/books?id=jDoXBQAAQBAJ&dq=M.T.Gilbert,+High+Performance+Liquid+Chromatography,+Wright,+Bristol,\(1987\)+164&lr=&source=gbs_navlinks_s](https://books.google.rs/books?id=jDoXBQAAQBAJ&dq=M.T.Gilbert,+High+Performance+Liquid+Chromatography,+Wright,+Bristol,(1987)+164&lr=&source=gbs_navlinks_s)
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–90. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>

- Grinberg, N. (1990). *Modern thin-layer chromatography*. M. Dekker. Retrieved from [https://books.google.rs/books?id=GQnvsd0vmiMC&dq=S.Gocan,+Modern+Thin-Layer+Chromatography,+N.Grinberg+\(Ed.\),+1990.&lr=&source=gbs_navlinks_s](https://books.google.rs/books?id=GQnvsd0vmiMC&dq=S.Gocan,+Modern+Thin-Layer+Chromatography,+N.Grinberg+(Ed.),+1990.&lr=&source=gbs_navlinks_s)
- Grivani, G., Khalaji, A. D., Tahmasebi, V., Gotoh, K., & Ishida, H. (2012). Synthesis, characterization and crystal structures of new bidentate Schiff base ligand and its vanadium(IV) complex: The catalytic activity of vanadyl complex in epoxidation of alkenes. *Polyhedron*, *31*(1), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.09.011>
- Guizado, T. R. C. (2014). Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin. *Journal of Molecular Modeling*, *20*(10), 2450. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2450-y>
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., & Li, P. (2007). Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydrate Research*, *342*(10), 1329–1332. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.04.006>
- Gupta, K. C., & Sutar, A. K. (2008). Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, *252*(12–14), 1420–1450. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.09.005>
- Gupta, V. K., Pal, M. K., & Singh, A. K. (2009). Comparative study of Ag(I) selective poly(vinyl chloride) membrane sensors based on newly developed Schiff-base lariat ethers derived from 4,13-diaza-18-crown-6. *Analytica Chimica Acta*, *631*(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.033>
- Hajrezaie, M., Paydar, M., Moghadamtousi, S. Z., Hassandarvish, P., Gwaram, N. S., Zahedifard, M., Abdulla, M. A. (2014). A Schiff base-derived copper (II) complex is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells by activating the intrinsic pathway. *TheScientificWorldJournal*, *2014*, 540463. <https://doi.org/10.1155/2014/540463>
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, *47*(4), 409–443. <https://doi.org/10.1002/prot.10115>
- Hansch, C., & Fujita, T. (1964). p - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, *86*(8), 1616–1626. <https://doi.org/10.1021/ja01062a035>

- Hansch, C., Maloney, P. P., Fujita, T., & Muir, R. M. (1962). Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. *Nature*, *194*(4824), 178–180. <https://doi.org/10.1038/194178b0>
- Hansch, C., Muir, R. M., Fujita, T., Maloney, P. P., Geiger, F., & Streich, M. (1963). **The** Correlation of Biological Activity of Plant Growth Regulators and Chloromycetin Derivatives with Hammett Constants and Partition Coefficients. *Journal of the American Chemical Society*, *85*(18), 2817–2824. <https://doi.org/10.1021/ja00901a033>
- Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*, *126*(2), 630–639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.087>
- Hassan, R., Arida, H., Montasser, M., & Abdel Latif, N. (2013). Synthesis of New Schiff Base from Natural Products for Remediation of Water Pollution with Heavy Metals in Industrial Areas. *Journal of Chemistry*, *2013*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/240568>
- He, L., & Jurs, P. C. (2005). Assessing the reliability of a QSAR model's predictions. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *23*(6), 503–523. <https://doi.org/10.1016/j.jm gm.2005.03.003>
- He, X. M., & Carter, D. C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, *358*(6383), 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>
- Héberger, K. (2007). Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. *Journal of Chromatography A*, *1158*(1–2), 273–305. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.108>
- Heinisch, L., Roemer, E., Jütten, P., Haas, W., Werner, W., & Möllmann, U. (1999). Semisynthetic derivatives of madurahydroxylactone and their antibacterial activities. *The Journal of Antibiotics*, *52*(11), 1029–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656576>
- Henchoz, Y., Bard, B., Guillarme, D., Carrupt, P.-A., Veuthey, J.-L., & Martel, S. (2009). Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *394*(3), 707–729. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2634-y>
- Heshmatpour, F., Rayati, S., Afghan Hajiabbas, M., Abdolalian, P., & Neumüller, B. (2012).

- Copper(II) Schiff base complexes derived from 2,2'-dimethyl-propandiamine: Synthesis, characterization and catalytic performance in the oxidation of styrene and cyclooctene. *Polyhedron*, 31(1), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.09.048>
- Hill, A. P., & Young, R. J. (2010). Getting physical in drug discovery: a contemporary perspective on solubility and hydrophobicity. *Drug Discovery Today*, 15(15–16), 648–655. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.05.016>
- Homburg, C., de Haas, M., von dem Borne, A., Verhoeven, A., Reutelingsperger, C., & Roos, D. (1995). Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*, 85(2). Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/85/2/532?sso-checked=true>
- Hou, H.-N., Qi, Z.-D., OuYang, Y.-W., Liao, F.-L., Zhang, Y., & Liu, Y. (2008). Studies on interaction between Vitamin B12 and human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.029>
- Hu, Y.-J., Liu, Y., Shen, X.-S., Fang, X.-Y., & Qu, S.-S. (2005). Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure* 738(1–3), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.062>
- Huang, S.-Y., Grinter, S. Z., & Zou, X. (2010). Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(40), 12899. <https://doi.org/10.1039/c0cp00151a>
- Jarrahpour, A., Khalili, D., De Clercq, E., Salmi, C., & Brunel, J. M. (2007). Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity Evaluation of Some New bis-Schiff Bases of Isatin and Their Derivatives. *Molecules*, 12(8), 1720–1730. <https://doi.org/10.3390/12081720>
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., & Duhr, S. (2011). Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 9(4), 342–353. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0380>
- Joshi, K. C., & Pathak, V. N. (1977). Metal chelates of fluorinated 1,3-diketones and related compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 22(1–2), 37–122. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80433-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80433-6)

- Juranić, I. O., Drakulić, B. J., Petrović, S. D., Mijin, D. Ž., & Stanković, M. V. (2006). A QSAR study of acute toxicity of N-substituted fluoroacetamides to rats. *Chemosphere*, *62*(4), 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.05.005>
- Kaliszan, R. (1999). Chromatography and capillary electrophoresis in modelling the basic processes of drug action. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *18*(6), 400–410. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00120-X)
- Kallubai, M., Rachamalla, A., Yeggoni, D. P., & Subramanyam, R. (2015). Comparative binding mechanism of lupeol compounds with plasma proteins and its pharmacological importance. *Molecular bioSystems*, *11*(4), 1172–83. <https://doi.org/10.1039/c4mb00635f>
- Kansy, M., Senner, F., & Gubernator, K. (1998). Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, *41*(7), 1007–1010. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>
- Karthikeyan, M. S., Prasad, D. J., Poojary, B., Subrahmanya Bhat, K., Holla, B. S., & Kumari, N. S. (2006). Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *14*(22), 7482–7489. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.07.015>
- Katsuki, T. (2004). Unique asymmetric catalysis of cis- β metal complexes of salen and its related Schiff-base ligands. *Chemical Society Reviews*, *33*(7), 437. <https://doi.org/10.1039/b304133f>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1751*(2), 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kerns, E. H. (2001). High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *90*(11), 1838–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745742>
- Khuhawar, M. Y., & Soomro, A. L. (1992). High performance liquid chromatographic determination of copper(II), Nickel(II), Palladium(II), and Platinum(II) using solvent extraction and bis(isovalerylacetone)ethylenediimine as complexing reagent. *Journal of*

- Liquid Chromatography*, 15(4), 647–656. <https://doi.org/10.1080/10826079208018823>
- Klebe, G., & Böhm, H.-J. (1997). Energetic and Entropic Factors Determining Binding Affinity in Protein-Ligand Complexes. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 17(1–3), 459–473. <https://doi.org/10.3109/10799899709036621>
- Koba, M., Bączek, T., & Marszał, M. P. (2012). Importance of retention data from affinity and reverse-phase high-performance liquid chromatography on antitumor activity prediction of imidazoacridinones using QSAR strategy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 64–65, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.010>
- Kobayashi, S., Mori, Y., Fossey, J. S., & Salter, M. M. (2011). Catalytic Enantioselective Formation of C-C Bonds by Addition to Imines and Hydrazones: A Ten-Year Update. *Chemical Reviews*, 111(4), 2626–2704. <https://doi.org/10.1021/cr100204f>
- Komsta, Lukasz. (2008). Quick prediction of the retention of solutes in 13 thin layer chromatographic screening systems on silica gel by classification and regression trees. *Journal of Separation Science*, 31(15), 2899–2909. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800237>
- Komsta, L., Waksmundzka-Hajnos, M., & Sherma, J. (2013). *Thin layer chromatography in drug analysis*. Retrieved from https://books.google.rs/books?id=LSEtAgAAQBAJ&dq=komsta+TLC&source=gbs_navlinks_s
- Krasikov, V. D. (2003). Contemporary Planar Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 58(8), 706–720. <https://doi.org/10.1023/A:1025075325079>
- Kroemer, R. T. (2007). Structure-based drug design: docking and scoring. *Current Protein & Peptide Science*, 8(4), 312–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696866>
- Kubinyi, H. (1988). Free Wilson Analysis. Theory, Applications and its Relationship to Hansch Analysis. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 7(3), 121–133. <https://doi.org/10.1002/qsar.19880070303>
- Kureshy, R. I., Khan, N. H., Abdi, S. H. R., Patel, S. T., Iyer, P. K., Subramanian, P. S., & Jasra, R. V. (2002). A Highly Potential Analogue of Jacobsen Catalyst with In-built Phase Transfer Capability in Enantioselective Epoxidation of Nonfunctionalized Alkenes. *Journal*

- of Catalysis*, 209(1), 99–104. <https://doi.org/10.1006/jcat.2002.3558>
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer.
- Lakowicz, J. R. (2016). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Verlag.
- Layer, R. W. (1963). The Chemistry of Imines. *Chemical Reviews*, 63(5), 489–510.
<https://doi.org/10.1021/cr60225a003>
- Lázníček, M., & Lázníčková, A. (1995). The effect of lipophilicity on the protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(7), 823–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562605>
- Leo, A. J. (1993). Calculating log Poct from structures. *Chemical Reviews*, 93(4), 1281–1306.
<https://doi.org/10.1021/cr00020a001>
- Li, A. P. (2001). Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 6(7), 357–366. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267922>
- Li, L.-J., Wang, C., Tian, C., Yang, X.-Y., Hua, X.-X., & Du, J.-L. (2013). Water-soluble platinum(II) complexes of reduced amino acid Schiff bases: synthesis, characterization, and antitumor activity. *Research on Chemical Intermediates*, 39(2), 733–746.
<https://doi.org/10.1007/s11164-012-0593-y>
- Li, M., Huang, S., Ye, C., & Xie, Y. (2015). Synthesis, structure, protein binding of Cu(II) complexes with a tridentate NNO Schiff-base ligand. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150, 290–300.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.05.064>
- Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A., & Subirade, M. (2008). Interaction of β -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications. *Biomacromolecules*, 9(1), 50–56.
<https://doi.org/10.1021/bm700728k>
- Liu, S., Peng, J., Yang, H., Bai, Y., Li, J., & Lai, G. (2012). Highly efficient and convenient asymmetric hydrosilylation of ketones catalyzed with zinc Schiff base complexes. *Tetrahedron*, 68(5), 1371–1375. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.12.054>

- Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M., & Sussman, J. L. (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), 5076–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8506353>
- Lu, J., Sun, Q., Li, J.-L., Jiang, L., Gu, W., Liu, X., ... Yan, S.-P. (2014). Two water-soluble copper(II) complexes: Synthesis, characterization, DNA cleavage, protein binding activities and in vitro anticancer activity studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 137, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.015>
- Mahajan, R. K., Kaur, R., Kaur, I., Sharma, V., & Kumar, M. (2004). Mercury(II) Ion-Selective Electrodes Based on p-tert-Butyl Calix[4]crowns with Imine Units. *Analytical Sciences*, 20(5), 811–814. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.811>
- Mannhold, R. (2008). *Molecular drug properties : measurement and prediction*. Wiley-VCH.
- Manz, A. (Andreas), Pamme, N., & Iossifidis, D. (2004). *Bioanalytical chemistry*. Imperial College Press.
- Marchand, C., Beutler, J. A., Wamiru, A., Budihas, S., Möllmann, U., Heinisch, L., ... Pommier, Y. (2008). Madurahydroxylactone derivatives as dual inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and RNase H. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 361–4. <https://doi.org/10.1128/AAC.00883-07>
- Martin, A. J., & Synge, R. L. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *The Biochemical Journal*, 35(12), 1358–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16747422>
- Martin, Y. C. (2010). *Quantitative drug design : a critical introduction*. CRC Press/Taylor & Francis. Retrieved from <https://www.crcpress.com/Quantitative-Drug-Design-A-Critical-Introduction-Second-Edition/Martin/p/book/9781420071009>
- Mashhadizadeh, M. H., & Sheikhshoaie, I. (2003). Co²⁺-selective membrane electrode based on the Schiff Base NADS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(5), 708–712. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1744-6>
- Mason, M. R., & Perkins, A. M. (2000). Alkylaluminophosphonate-catalyzed ring-opening

- homopolymerization of epichlorohydrin and propylene oxide. *Journal of Organometallic Chemistry*, 599(2), 200–207. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(99\)00764-0](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(99)00764-0)
- Masson, G., Lalli, C., Benohoud, M., & Dagousset, G. (2013). Catalytic enantioselective [4 + 2]-cycloaddition: a strategy to access aza-hexacycles. *Chemical Society Reviews*, 42(3), 902–23. <https://doi.org/10.1039/c2cs35370a>
- Matsunaga, S., & Shibasaki, M. (2013). Multimetallic Schiff Base Complexes as Cooperative Asymmetric Catalysts. *Synthesis*, 45(4), 421–437. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1316846>
- Maurya, M. R., Kumar, M., & Kumar, U. (2007). Polymer-anchored vanadium(IV), molybdenum(VI) and copper(II) complexes of bidentate ligand as catalyst for the liquid phase oxidation of organic substrates. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 273(1–2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.03.074>
- McDonnell, J. M. (2001). Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(5), 572–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578932>
- McFarland, J. W. (1970). Parabolic relation between drug potency and hydrophobicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 13(6), 1192–1196. <https://doi.org/10.1021/jm00300a040>
- Mehrotra, R. C., Bohra, R., & Gaur, D. P. (1978). *Metal B-diketonates and allied derivatives*.
- Meyer, H. (1899). Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 42(2–4), 109–118. <https://doi.org/10.1007/BF01834479>
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. Wiley.
- Mohamed, G. G., Omar, M. M., & Hindy, A. M. M. (2005). Synthesis, characterization and biological activity of some transition metals with Schiff base derived from 2-thiophene carboxaldehyde and aminobenzoic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 62(4–5), 1140–1150. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.03.031>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
- Muthu Tamizh, M., Mereiter, K., Kirchner, K., & Karvembu, R. (2012). Ruthenium(II) carbonyl complexes containing “pincer like” ONS donor Schiff base and triphenylphosphine as catalyst for selective oxidation of alcohols at room temperature. *Journal of Organometallic Chemistry*, 700(700), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2011.12.016>
- Nagaosa, Y., Kawabe, H., & Bond, A. M. (1991). Separation and simultaneous determination of aluminum, iron, and manganese in natural water samples by using high-performance liquid chromatography with spectrophotometric and electrochemical detection, 63(1), 28–33.
- Nahum, A., & Horvath, C. (1981). Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 203, 53–63. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)80281-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80281-2)
- Neelakantan, M. A., Rusalraj, F., Dharmaraja, J., Johnsonraja, S., Jeyakumar, T., & Sankaranarayana Pillai, M. (2008). Spectral characterization, cyclic voltammetry, morphology, biological activities and DNA cleaving studies of amino acid Schiff base metal(II) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(4), 1599–1609. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.06.008>
- Neil J. Henson, P. Jeffrey Hay, & Redondo, A. (1999). Density Functional Theory Studies of the Binding of Molecular Oxygen with Schiff’s Base Complexes of Cobalt. *Inorganic Chemistry*, 38(7), 1618–1626. <https://doi.org/10.1021/IC9813056>
- Ng, C.-H., Wang, W.-S., Chong, K.-V., Win, Y.-F., Neo, K.-E., Lee, H.-B., ... Leong, W. K. (2013). Ternary copper(ii)-polypyridyl enantiomers: aldol-type condensation, characterization, DNA-binding recognition, BSA-binding and anticancer property. *Dalton Transactions*, 42(28), 10233. <https://doi.org/10.1039/c3dt50884f>
- Nguyen, K. M. H., & Largeron, M. (2015). A bioinspired catalytic aerobic oxidative C-H functionalization of primary aliphatic amines: synthesis of 1,2-disubstituted benzimidazoles. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 21(36), 12606–10. <https://doi.org/10.1002/chem.201502487>

- Nienhaus, G. U. (2005). *Protein-Ligand Interactions* (Vol. 305). New Jersey: Humana Press.
<https://doi.org/10.1385/1592599125>
- Nishinaga, A., & Tomita, H. (1980). Model Catalytic oxygenations with Co(II)—Schiff base complexes and the role of cobalt-oxygen complexes in the oxygenation process. *Journal of Molecular Catalysis*, 7(2), 179–199. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(80\)85017-6](https://doi.org/10.1016/0304-5102(80)85017-6)
- Nyiredy, S. (Szabolcs). (2001). *Planar chromatography : a retrospective view for the third millennium*. Budapest: Springer. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/planar-chromatography-a-retrospective-view-for-the-third-millennium/oclc/55508789>
- Ognjenović, J., Stojadinović, M., Milčić, M., Apostolović, D., Vesić, J., Stambolić, I., ... Velicković, T. C. (2014). Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white. *Food Chemistry*, 164, 36-43.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.005>
- Palomo, C., Aizpurua, J. M., Ganboa, I., & Oiarbide, M. (2004). Asymmetric synthesis of beta-lactams through the Staudinger reaction and their use as building blocks of natural and nonnatural products. *Current Medicinal Chemistry*, 11(14), 1837–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279571>
- Pandeya, S., Sriram, D., Nath, G., & De Clercq, E. (1999). Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. *Il Farmaco*, 54(9), 624–628. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(99\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(99)00075-0)
- Polyakova, Y., Jin, L. M., & Row, K. H. (2006). QSPR Models for Chromatographic Retention of Some Azoles with Physicochemical Properties. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 27, 211-216.
- Polyakova, Y. L., & Row, K. H. (2005). Quantitative Structure-Retention Relationships Applied to Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Medicinal Chemistry Research*, 14(8–9), 488–522. <https://doi.org/10.1007/s00044-006-0152-4>
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1601, pp. 1–17). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Przybylski, P., Huczynski, A., Pyta, K., Brzezinski, B., & Bartl, F. (2009). Biological Properties

- of Schiff Bases and Azo Derivatives of Phenols. *Current Organic Chemistry*, 13(2), 124–148. <https://doi.org/10.2174/138527209787193774>
- Put, R., & Vander Heyden, Y. (2007). Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure-retention relationships. *Analytica Chimica Acta*, 602(2), 164–72. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.014>
- Qin, L.-T., Liu, S.-S., Chen, F., Xiao, Q.-F., & Wu, Q.-S. (2013). Chemometric model for predicting retention indices of constituents of essential oils. *Chemosphere*, 90(2), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.07.010>
- Qin, W., Long, S., Panunzio, M., & Biondi, S. (2013). Schiff bases: A short survey on an evergreen chemistry tool. *Molecules*, 18(10), 12264–12289. <https://doi.org/10.3390/molecules181012264>
- Rathelot, P., Vanelle, P., Gasquet, M., Delmas, F., Crozet, M., Timon-David, P., & Maldonado, J. (1995). Synthesis of novel functionalized 5-nitroisoquinolines and evaluation of in vitro antimalarial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 30(6), 503–508. [https://doi.org/10.1016/0223-5234\(96\)88261-4](https://doi.org/10.1016/0223-5234(96)88261-4)
- Rekker, R. F. (1977). *The hydrophobic fragmental constant, its derivation and application : a means of characterizing membrane systems*. Elsevier Scientific Pub. Co. ISBN: 0444415483
- Rekker, R. F., Mannhold, R., Bijloo, G., de Vries, G., & Dross, K. (1998). The lipophilic behaviour of organic compounds:2. The development of an aliphatic hydrocarbon/water fragmental system via interconnection with octanol-water partitioning data. *Molecular Informatics*, 17(6), 537–548. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3838\(199812\)17:06<537::AID-QSAR537>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3838(199812)17:06<537::AID-QSAR537>3.0.CO;2-D)
- Rogers, M. T., & Burdett, J. L. (1965). Keto–enol tautomerism in β -dicarbonyls studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy: II. Solvent effects on proton chemical shifts and on equilibrium constants. *Canadian Journal of Chemistry*, 43(5), 1516–1526. <https://doi.org/10.1139/v65-202>
- Roy, K., Kar, S., Das, R. N., Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). Chapter 1 – Background of QSAR and Historical Developments. In *Understanding the Basics of QSAR for Applications*

in *Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment* (pp. 1–46). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801505-6.00001-6>

- Royal Society of Edinburgh., R. S. of. (1966). *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*. (Vol. v.25 (1868-1869)). Edinburgh : The Society. Retrieved from <http://www.biodiversitylibrary.org/item/126701>
- Rutkowska, E., Pajak, K., & Józwiak, K. (2013). Lipophilicity--methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70(1), 3–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610954>
- Sârbu, C., Casoni, D., Darabantu, M., & Maieranu, C. (2004). Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of some 1,3-oxazolidine systems by RP-HPTLC and PCA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(1), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.01.002>
- Sârbu, C., Djaković-Sekulić, T., & Perišić-Janjić, N. (2002). Evaluation of lipophilicity of some benzimidazole and benzotriazole derivatives by RP HPTLC and PCA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(3), 739–745. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00338-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00338-2)
- Sartaj Tabassum, Musheer Ahmad, Mohd Afzal, Mehvash Zaki, P. K. B. (2014). Synthesis and structure elucidation of a copper(II) Schiff-base complex: In vitro DNA binding, pBR322 plasmid cleavage and HSA binding studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 321–331. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2014.08.015>
- Schiff, H. (1869). Ueber condensirte Harnstoffe. *Annalen Der Chemie Und Pharmacie*, 151(2), 186–213. <https://doi.org/10.1002/jlac.18691510208>
- Schmitz-DuMont, O. (1964). Inorganic Complexes. Von C. K. Jørgensen. Academic Press, London-New York 1963. 1. Aufl., 220 S., geb. £ 2.2—. *Angewandte Chemie*, 76(20), 867–867. <https://doi.org/10.1002/ange.19640762019>
- Shahabadi, N., Bazvandi, B., & Taherpour, A. (Arman). (2017). Synthesis, structural determination and HSA interaction studies of a new water-soluble Cu(II) complex derived from 1,10-phenanthroline and ranitidine drug. *Journal of Coordination Chemistry*, 70(18), 3186–3198. <https://doi.org/10.1080/00958972.2017.1380195>

- Shamsipur, M., Soleymanpour, A., Akhond, M., Sharghi, H., & Naseri, M. A. (2001). Iodide-selective carbon paste electrodes based on recently synthesized Schiff base complexes of Fe(III). *Analytica Chimica Acta*, 450(1–2), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01380-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01380-0)
- Sharma, P., Cabrera, A., Singh, S., & Jha, N. K. (1997). Schiff Base Complexes Of Antimony: A Review. *Main Group Metal Chemistry*, 20(8), 551–566. <https://doi.org/10.1515/MGMC.1997.20.8.551>
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. Marcel Dekker. Retrieved from <https://www.scribd.com/doc/53038655/Sherma-2003-Handbook-of-Thin-Layer-Chromatography>
- Shi, L., Ge, H.-M., Tan, S.-H., Li, H.-Q., Song, Y.-C., Zhu, H.-L., & Tan, R.-X. (2007). Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(4), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.11.010>
- Singh, P., & Sahai, R. (1967a). Chemical and spectroscopic studies in metal β -diketonates. I. Preparation and study of halogenate metal acetylacetonates. *Australian Journal of Chemistry*, 20(4), 639. <https://doi.org/10.1071/CH9670639>
- Singh, P., & Sahai, R. (1967b). Chemical and spectroscopic studies in metal β -diketonates. II. Nitration of metal β -diketonates. *Australian Journal of Chemistry*, 20(4), 649. <https://doi.org/10.1071/CH9670649>
- Singh, R. (2002). *Chromatography*. Mittal Publ.
- Singha Roy, A., Ghosh, K. S., & Dasgupta, S. (2013). An investigation into the altered binding mode of green tea polyphenols with human serum albumin on complexation with copper. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 31(10), 1191–1206. <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.729158>
- Sinha, D., Tiwari, A. K., Singh, S., Shukla, G., Mishra, P., Chandra, H., & Mishra, A. K. (2008). Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(1), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.03.022>

- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W. (2013). Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 334–395.
<https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>
- Smith, C. D., Gavriilyuk, J. I., Lough, A. J., & Batey, R. A. (2010). Lewis Acid Catalyzed Three-Component Hetero-Diels-Alder (Povarov) Reaction of *N*-Arylimines with Strained Norbornene-Derived Dienophiles. *The Journal of Organic Chemistry*, 75(3), 702–715.
<https://doi.org/10.1021/jo9021106>
- Smith, D. A., & van de Waterbeemd, H. (1999). Pharmacokinetics and metabolism in early drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(4), 373–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419843>
- Snell, E. E., & Jenkins, W. T. (1959). The mechanism of the transamination reaction. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 54(S1), 161–177.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030540413>
- Soczewinski, E., & Wachtmeister, C. A. (1962). The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and RM values. *Journal of Chromatography A*, 7, 311–320. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)86422-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)86422-0)
- Souane, R., Isel, F., Peruch, F., & Lutz, P. J. (2002). Pyridine bis(imine) cobalt or iron complexes for ethylene and 1-hexene (co)polymerisation. *Comptes Rendus Chimie*, 5(1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/S1631-0748\(02\)01329-2](https://doi.org/10.1016/S1631-0748(02)01329-2)
- Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2006). Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(1), 15–26.
<https://doi.org/10.1002/prot.21082>
- Souza, A. O. de, Galetti, F. C. S., Silva, C. L., Bicalho, B., Parma, M. M., Fonseca, S. F., ... Oliveira, M. C. F. de. (2007). Antimycobacterial and cytotoxicity activity of synthetic and natural compounds. *Química Nova*, 30(7), 1563–1566. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700012>
- Sriram, D., Yogeewari, P., Myneedu, N. S., & Saraswat, V. (2006). Abacavir prodrugs: Microwave-assisted synthesis and their evaluation of anti-HIV activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(8), 2127–2129. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.01.050>

- Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, *11*(6), 824–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1207674>
- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., & Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, *12*(6), 439–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388840>
- Tarafder, M. T. H., Ali, A. M., Elias, M. S., Crouse, K. A., & Silong, S. (2000). Coordination chemistry and biological activity of bidentate and quadridentate nitrogen–sulfur donor ligands and their complexes. *Transition Metal Chemistry*, *25*(6), 706–710. <https://doi.org/10.1023/A:1007069601569>
- Tešić, Z. L., Janjić, T. J., Tošić, R. M., & Čelap, M. B. (1993). Effect of electronegativity of donor atoms on RF values of tris(β-diketonato) complexes of cobalt(III), chromium(III) and ruthenium(III) by thin-layer chromatography on silica gel. *Chromatographia*, *37*(11–12), 599–602. <https://doi.org/10.1007/BF02274108>
- Thompson, T. N. (2001). Optimization of metabolic stability as a goal of modern drug design. *Medicinal Research Reviews*, *21*(5), 412–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11579441>
- Todeschini, R., Lasagni, M., & Marengo, E. (1994). New molecular descriptors for 2D and 3D structures. Theory. *Journal of Chemometrics*, *8*(4), 263–272. <https://doi.org/10.1002/cem.1180080405>
- Torres-Lapasió, J. ., Rosés, M., Bosch, E., & García-Alvarez-Coque, M. . (2000). Interpretive optimisation strategy applied to the isocratic separation of phenols by reversed-phase liquid chromatography with acetonitrile–water and methanol–water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, *886*(1–2), 31–46. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00507-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00507-0)
- Trifković, J., Andrić, F., Ristivojević, P., Andrić, D., Tešić, Ž. L., & Milojković-Opsenica, D. M. (2010). Structure-retention relationship study of arylpiperazines by linear multivariate modeling. *Journal of Separation Science*, *33*(17–18), 2619–2628. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000200>
- Uden, P. C. (1984, December 12). Inorganic gas chromatography. <https://doi.org/10.1016/S0021->

- Uden, P. C., & Henderson, D. E. (1974). Non-fluorinated tetradentate β -ketoamines as derivatizing ligands for the gas chromatographic analysis of Cu(II), Ni(II) and Pd(II). *Journal of Chromatography A*, 99, 309–318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)90865-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)90865-3)
- van de Waterbeemd, H., Smith, D. A., & Jones, B. C. (2001). Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15(3), 273–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289080>
- van Engeland, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. M. (1998). Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R)
- Varmuza, K., & Filzmoser, P. (2009). *Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics*. CRC Press.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622868>
- Vollhardt, K. P. C., & Schore, N. E. (2011). *Organic chemistry: Structure and function*. W.H. Freeman. ISBN 1464120277
- Vrakas, D., Tsantili-Kakoulidou, A., & Hadjipavlou-Litina, D. (2003). Exploring the consistency of logP estimation for substituted coumarins. *QSAR & Combinatorial Science*, 22(6), 622–629. <https://doi.org/10.1002/qsar.200300824>
- Vukovic, N., Sukdolak, S., Solujic, S., & Niciforovic, N. (2010). Substituted imino and amino derivatives of 4-hydroxycoumarins as novel antioxidant, antibacterial and antifungal agents: Synthesis and in vitro assessments. *Food Chemistry*, 120(4), 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.040>
- Wang, P. H., Keck, J. G., Lien, E. J., & Lai, M. M. (1990). Design, synthesis, testing, and quantitative structure-activity relationship analysis of substituted salicylaldehyde Schiff

- bases of 1-amino-3-hydroxyguanidine tosylate as new antiviral agents against coronavirus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33(2), 608–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153821>
- Wang, Q. S., & Zhang, L. (1999). Review Of Research On Quantitative Structure-Retention Relationships In Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1081/JLC-100101639>
- Wang, R., Yin, Y., Li, H., Wang, Y., Pu, J.-J., Wang, R., ... Wang, R. (2013). Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry. *Molecular Biology Reports*, 40(4), 3409–3418. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2418-x>
- Waring, M. J. (2009). Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates-Molecular weight dependent lower logD limits based on permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(10), 2844–2851. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.109>
- Waterhouse, R. N. (n.d.). Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Molecular Imaging and Biology : MIB : The Official Publication of the Academy of Molecular Imaging*, 5(6), 376–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14667492>
- Wei, Y., Yao, L., Zhang, B., He, W., & Zhang, S. (2011). Novel Schiff base ligands derived from Cinchona alkaloids for Cu(II)-catalyzed asymmetric Henry reaction. *Tetrahedron*, 67(44), 8552–8558. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.08.076>
- Williams, M. A. (2013). Protein–Ligand Interactions: Fundamentals (pp. 3–34). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_1
- Yang, Y. L., Wan, N. N., Wang, W. P., Xie, Z. F., & De Wang, J. (2011). Synthesis of bis(indolyl) methanes catalyzed by Schiff base–Cu(II) complex. *Chinese Chemical Letters*, 22(9), 1071–1074. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2011.04.014>
- Yoon, T. P., & Jacobsen, E. N. (2003). Privileged Chiral Catalysts. *Science*, 299(5613). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/299/5613/1691.full>
- Yoshiaki, N., Izuru T., Sakae U., & Masanobu H. (1999). Extremely High Enantioselective Redox Reaction of Ketones and Alcohols Catalyzed by RuCl₂(PPh₃)

- (oxazolinylferrocenylphosphine). *Organometallics*, 18(12), 2291–2293.
<https://doi.org/10.1021/OM990210O>
- Zapała, W., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2005). Retention process in reversed phase TLC systems with polar bonded stationary phases. *Journal of Separation Science*, 28(6), 566–574. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400093>
- Zhang, J., Chen, W., Tang, B., Zhang, W., Chen, L., Duan, Y., ... Zhang, Y. (2016). Interactions of 1-hydroxypyrene with bovine serum albumin: insights from multi-spectroscopy, docking and molecular dynamics simulation methods. *RSC Advances*, 6, 23622–23633.
<https://doi.org/10.1039/c6ra00981f>
- Zhang, N., Fan, Y., Zhang, Z., Zuo, J., Zhang, P., Wang, Q., ... Bi, C. (2012). Syntheses, crystal structures and anticancer activities of three novel transition metal complexes with Schiff base derived from 2-acetylpyridine and l-tryptophan. *Inorganic Chemistry Communications*, 22, 68-72. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2012.05.022>
- Zhang, X.-F., Xie, L., Liu, Y., Xiang, J.-F., Li, L., & Tang, Y.-L. (2008). Molecular interaction and energy transfer between human serum albumin and bioactive component Aloe dihydrocoumarin. *Journal of Molecular Structure*, 888(1–3), 145–151.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.11.051>
- Zhen Li, Hui Yan, Guoliang Chang, Min Hong, Jianmin Dou, M. N. (2016). Cu(II), Ni(II) complexes derived from chiral Schiff-base ligands: Synthesis, characterization, cytotoxicity, protein and DNA-binding properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, 403–412. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2016.09.005>
- Zsila, F. (2013). Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model. *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1668–1682.
<https://doi.org/10.1021/mp400027q>

6. PRILOG



ПРИМЉЕНО: 29.11.2017.			
Орг. јед.	Број	Прилог	Вредности
	1140/2		

Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Студентски трг 12-16 * П. факс 51 * 11158 Београд 118 * ПАК: 105305 * Тел/факс: 011-2184330 * <http://helix.chem.bg.ac.rs/>

Решење број: 1-11/17

ЕТИЧКИ ОДБОР

Хемијски факултет Универзитета у Београду

На II редовној седници Етичког одбора Хемијског факултета, одржаној 30. октобра 2017. године, разматран је захтев Николе Стевановића, мастер хемичара, студента докторских академских студија из хемије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, о давању сагласности за употребу хуманог биолошког материјала у истраживачке сврхе, за потребе израде докторске дисертације под називом: "Полидентатне Шифове базе и њихови $Cu(II)$ комплекси: липофилност и биолошка активност", на Хемијском факултету Универзитета у Београду, које ће се спроводити под руководством в. професора др Раде Баошић.

На основу анализе приспеле документације (Захтев за одобрење спровођења научно-истраживачке студије; Образац са подацима о одговорном истраживачу; Образац за добијање писане сагласности за учешће у научно-истраживачкој студији; дозвола регионалне етичке комисије у Стокхолму, Шведска) и непосредног увида у стање, Етички одбор Хемијског факултета донео је следећу

ОДЛУКУ

Одобрава се коришћење биолошког материјала прикупљеног у лабораторији универзитетске болнице Каролинска, Шведска (30 mL пуне периферне венске крви) од 5 здравих испитаника, за академску студију: "Испитивање цитотоксичног ефекта Шифових база и њихових комплекса на здравим и канцерским ћелијама", чији је експериментални протокол у складу са прописаним етичким нормама.

Београду, 29.11.2017. године

Председник Етичког одбора

др Наталија Половић, в. професор

BIOGRAFIJA

Nikola R. Stevanović je rođen 5. oktobra 1983. godine u Kosovskoj Mitrovici. Osnovnu i srednju školu završio je u Kragujevcu. U periodu od 2002. do 2006. godine studirao je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program diplomirani biohemičar, upisao je 2006. godine. Diplomirao je na Katedri za analitičku hemiju 07.09.2011.godine sa prosečnom ocenom 8,68 i sa ocenom 10 na diplomskom radu, kod mentora dr Rade Baošić vanrednog profesora Hemijskog fakulteta, čime je stekao zvanje diplomirani biohemičar. Master akademske studije (studijski program Hemija - uža oblast: Analitička hemija) upisao je 2011.godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kod mentora dr Rade Baošić, vanrednog profesora Hemijskog fakulteta. Master rad pod naslovom „Kvantitativni odnos strukture i antioksidativne aktivnosti Šifovih baza i njihovih bakar(II) kompleksa“ odbranio je 2012.godine i stekao zvanje master hemičar. Doktorske akademske studije (Doktor hemijskih nauka - uža oblast: Analitička hemija) upisao je školske 2012/2013. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

U periodu od jula 2012. do septembra 2013. godine bio je zaposlen kao Saradnik u nastavi za užu naučnu oblast Analitička hemija, na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U tom periodu je učestvovao u realizaciji eksperimentalnih vežbi na predmetima: Analitička hemija 1, Bioanalitička hemija, Analitička hemija 2 i Praktikum iz analitičke hemije. Od septembra 2013. godine je zaposlen na Hemijskom fakultetu u Beogradu kao asistent za užu naučnu oblast Analitička hemija.

U dosadašnjem naučno-istraživačkom radu kandidat Nikola R.Stevanović je bio angažovan na nekoliko projekata. Od 2012. godine je angažovan na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj 172017) pod nazivom: „Korelacija strukture i osobina prirodnih i sintetičkih molekula i njihovih kompleksa sa metalima“. U periodu od 2013. do 2014. godine bio je angažovan na projektu: „Microbial cell surface determinants of virulence as targets for new therapeutics in Cystic Fibrosis“ (BMBS COST Action BM1003), dok je u periodu od 2014. do 2015. godine bio angažovan na Inovacionom projektu “Razvoj analitičkih postupaka za utvrđivanje autentičnosti srpskog vina” (broj 451-03-2802-IP Tip 1/78).

Kandidat je član Srpskog hemijskog društva od 2010. godine. Aktivno učestvuje u radu Republičke komisije za takmičenja iz hemije za učenike osnovnih škola od 2012.godine. Bio je član organizacionog odbora 51. Savetovanja Srpskog hemijskog društva. Učestvovao je u radu sledećih komisija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu: Komisija za sprovođenje upisa, Komisija za popis hemikalija i laboratorijskog materijala, Komisija za popis stakla, Komisija za utvrđivanje predloga kandidata za izbor prodekana, Komisija za nabavku, Komisija za popis plemenitih metala.

BIBLIOGRAFIJA

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1. Najat Aburas, Aleksandar Lolić, Nikola Stevanović, Tatjana Tripković, Snežana Nikolić-Mandić, Rada Baošić, Electrochemical behavior and antioxidant activity of tetradentate Schiff bases and their copper(II) complexes, Journal of Iranian Chemical Society, (2012) DOI: 10.1007/s13738-012-0102-7
2. Najat M Aburas, Nikola R Stevanovic, Milos K Milcic, Aleksandar D Lolic, Maja M Natic, Zivoslav Lj Tesic, Rada M Baosic: Influence of the Structure on the Antioxidant Activity of Tetradentate Schiff Bases and their Copper(II) Complexes: Possible Mechanisms. Journal of the Brazilian Chemical Society, 24 (8), 1322-1328 (2013) DOI: 0103-5053.20130167
3. Danica S. Perušković, Branka Darić, Anita Blagus, Nikola R. Stevanović, Aleksandra V. Pavlović, Aleksandar Đ. Lolić, Rada M. Baošić: Influence of organic modifiers on RP-TLC determination of lipophilicity of some polydentate Schiff bases. Monatshefte fuer Chemie/Chemical Monthly, 146 (1): 1-6 (2015) DOI 10.1007/s00706-014-1313-7
4. Nikola R. Stevanović, Danica S. Perušković, Uroš M. Gašić, Vesna R. Antunović, Aleksandar Đ. Lolić, Rada M. Baošić: Effect of substituents on prediction of TLC retention of tetradentate Schiff bases and their Copper(II) and Nickel(II) complexes. Biomedical Chromatography, 31 (3), (2017) DOI: 10.1002/bmc.3810

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23)

5. Filipović, D., Gašić, U., Stevanović, N., Dabić Zagorac, D., Fotirić Akšić, M., Natić, M. Carbon Stable Isotope Composition of Modern and Archaeological Fruit Stones of Cornelian Cherry: a Pilot Study. Isotopes in Environmental and Health Studies (2017), Article in press.
6. Danica S. Perušković, Nikola R. Stevanović, Aleksandar Lolic, Milan R. Nikolić, Rada M. Baošić: Quantitative Structure-Activity Relationship Study of Some Antipsychotics by Multiple Linear Regression. American Journal of Analytical Chemistry 04/2014; 5(5):335-342.

7. Danica Perušković, Nikola Stevanović, Aleksandar Lolić, Rada Baošić: Correlation Between Structure, Retention and Lipophilicity of Some Antidepressants: QSRR and QSAR Studies. Letters in Drug Design & Discovery 02/2014; 11(2):162-168(7).
8. Zoran Vujčić, Nataša Božić, Nikola Gligorijević, Nikola Stevanović, Nikola Lončar, Rada Baošić: Thin layer chromatographic comparison of raw and soluble starch hydrolysis patterns of some α -amylases from Bacillus sp. isolated in Serbia. Journal of the Serbian Chemical Society, (2014), 79 (4), 411-420.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Никола Р. Стевановић

Број индекса ДХ42/2012

Изјављујем

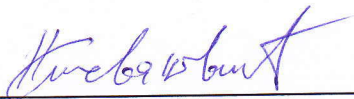
да је докторска дисертација под насловом:

„Полидентатне Шифове базе и њихови $Cu(II)$ комплекси: липофилност и биолошка активност”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 15.12.2017.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Никола Р. Стевановић
Број индекса ДХ42/2012
Студијски програм доктор хемијских наука
Наслов рада „Полидентатне Шифове базе и њихови $Cu(II)$
 комплекси: липофилност и биолошка активност”
Ментор др Рада Баошић, ванредни професор

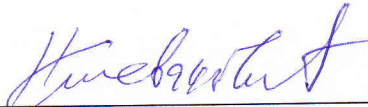
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 15. 12. 2017.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Полидентатне Шифове базе и њихови $Cu(II)$ комплекси: липофилност и биолошка активност”

која је моје ауторско дело.

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

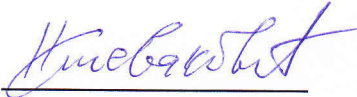
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 15.12.2017.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.