

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Irena T. Novaković

**Proučavanje interakcija biološki  
aktivnog hinona avarona i njegovih  
derivata sa lizozimom, linearnom i  
cirkularnom dezoksiribonukleinskom  
kiselinom**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY

Irena T. Novaković

**Investigation of interactions of  
biologically active quinone avarone and  
its derivatives with lysozyme, linear and  
circular deoxyribonucleic acid**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR:

redovni profesor, dr Dušan Sladić, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

---

ČLANOVI KOMISIJE:

naučni savetnik, dr Slađana Kostić-Rajačić, Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za hemiju

---

vanredni profesor, dr Zoran Vujčić, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

---

vanredni profesor, dr Goran Roglić, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

---

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Hemijskog fakulteta i IHTM-Centra za hemiju, Univerziteta u Beogradu.

Rad je rađen pod rukovodstvom dr Dušana Sladića, kome sam zahvalna na ukazanom poverenju i pomoći pri izradi ovog rada.

Veliku zahvalnost izražavam dr Zoranu Vujčiću za stalno zanimanje za moj rad, ne samo pri izradi ove disertacije već od samog početka mog naučno-istraživačkog rada.

Zahvaljujem se i dr Goranu Rogliću i dr Slađani Kostić-Rajačić na podršci, pomoći i korisnim savetima tokom izrade ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Miroslavi Vujčić za osmišljavanje eksperimenata i načina modifikacije DNA kao i izradu agaroznih gelova. Bez njene pomoći i zalaganja, proučavanje mehanizma dejstva hinonskih jedinjenja bilo bi mnogo komplikovanije.

Zahvaljujem se i svim kolegama iz laboratorije. Oni su bili uz mene i kada je igranje hemijom bilo zabavno ali i kada me je trebalo preživeti.

Zahvalna sam i svim ostalim kolegama, koji zbog moje nespretnosti nisu stali u ovu zahvalnicu, a koji su doprineli da mi naučno-istraživački dani budu veseliji i ispunjeniji.

Zahvalnost dugujem i suprugu Miroslavu i sinu Dimitriju na bezrezervnoj podršci.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojoj nani. Sigurna sam da bi ona prokomentarisala: „Ja sam za tebe životno školovani Bizmark a ti si sada zvanično školovana baraba!“ ali sam isto tako sigurna da bi se beskrajno radovala sa mnom.

# Doktorska disertacija

## **Proučavanje interakcija biološki aktivnog hinona avarona i njegovih derivata sa lizozimom, linearnom i cirkularnom dezoksiribonukleinskom kiselinom**

### **IZVOD**

Cilj našeg rada bio je ispitivanje biološke aktivnosti metilamino- i metoksi-derivata avarona i razjašnjavanje mehanizma njihovog biološkog dejstva.

Za sintezu su izabrani derivati za koje se očekivalo da će imati negativniji polutaladni potencijal od avarona i samim tim pokazivati povećanu aktivnost. Sintetisani su 4'-(metilamino)-avaron, 3'-(metilamino)-avaron i 3'-metoksi-avaron.

Antibakterijska aktivnost dobijenih derivata je ispitivana prema gram-pozitivnim bakterijama: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Streptosporangium longisporum*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea* i *Staphylococcus aureus*, prema gram-negativnim bakterijama: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* i prema kulturama gljivica: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* disk-difuzionom metodom. Takođe, ispitivana je i toksičnost derivata na račiće *Artemia salina*.

Potencijalna antioksidativna aktivnost avarona i dobijenih derivata ispitivana je testom sa DPPH.

Antitumorska aktivnost ispitivana je za sve derivate na osam vrsta ćelija raka (ćelijske linije raka grlića materice, melanoma i leukemije, rak dojke pozitivan na estrogenu receptor, rak dojke negativan na estrogenu receptor, rak pluća, leukemija T-ćelija i promijelocitna leukemija) pri čemu je ispitivana i njihova citotoksičnost na limfocite.

Svim hinonskim derivatima hemijski je modifikovan model-enzim lizozim. Dobijenim modifikatima lizozima je nakon modifikacije određena enzimska aktivnost. Sama modifikacija je praćena UV/Vis spektrofotometrijom, SDS elektroforezom i masenom spektrometrijom. Mesto vezivanja hinonskih derivata za molekul lizozima

određeno je tehnikom MALDI TOF posle tripsinske digestije modifikata. S obzirom na uočeno vezivanje avaronskih derivata za  $\epsilon$ -amino grupu lizina (Lys-97) u lizozimu, sintetisano je jedinjenje 4'-((5-*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)-avarona, koje je poslužilo kao model jedinjenje za dalja ispitivanja biološke aktivnosti lizozim-hinonskog adukta. Dobijenim modifikatima lizozima određena je MIC vrednost prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama.

Ispitivano je i dejstvo avarona i njegovih derivata na cirkularnu DNA plazmida pRB322 i pUC18 pri čemu je sama interakcija sa hinonima proučavana elektroforezom na agaroznom gelu. Ispitivano je i dejstvo hinona na DNA timusa teleta. Snimljeni su UV i fluorescentni spektri hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta, na osnovu kojih su doneseni zaključci o interakcijama između hinonskih jedinjenja i DNA sisarskog porekla.

*Ključne reči:* avaron, biološka aktivnost, modifikacija, lizozim, linearna i cirkularna DNA

Naučna oblast:	Hemija
Uža naučna oblast:	Organska hemija
UDK broj:	547.9

Doctoral dissertation

## **Investigation of interactions of biologically active quinone avarone and its derivatives with lysozyme, linear and circular deoxyribonucleic acid**

### **SUMMARY**

The aim of our work has been investigation of biological activity of methylamino- and methoxy- derivatives of avarone, their bioconjugates of lysozyme and study of the mechanism of their biological action.

For synthesis were chosen derivatives for which it was expected to have more negative half-wave potential than avarone and therefore a higher activity. The selected compounds are 3'-methylamino, 4'-methylamino- and 3'-methoxyavarone.

Antimicrobial activity of the synthesized derivatives was investigated towards Gram positive bacteria: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Sreptosporangium longisporum.*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea* and *Staphylococcus aureus*, Gram negative bacteria: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* and fungi cultures: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Sacharomyces cerevisiae*, all by disc diffusion method. Toxicity against *Artemia salina* nauplii was surveyed as well.

Antioxidant activity of avarone and its derivatives was assessed by DPPH assay.

Antitumor activity was determined for all derivatives towards eight lines of tumor cells (myelogenous leukemia (K562), cervix carcinoma (HeLa), human malignant melanoma cells (Fem-X), Jurkat T cell leukemia, estrogen receptor negative breast carcinoma (MDA-MB-231), estrogen receptor positive breast carcinoma (MCF7), human fetal lung fibroblast (MRC-5) and human promyelocytic leukemia (HL-60)). For all derivatives toxicity towards lymphocytes was determined.

Model enzyme lysozyme was modified with the synthesized quinones and for all the obtained bioconjugates MIC value towards Gram positive and Gram negative bacteria were determined. Modification reaction was monitored by UV/VIS

spectrophotometry, SDS electrophoresis and mass spectrometry. Binding position of quinone derivatives on lysozyme was determined by MALDI TOF spectrometry after trypsin digestion. Since the avarone derivatives were found to bind to lysine (Lys-97) in lysozyme, 4'-((5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-carboxypentyl)-amino)avarone has been synthesized as a model compound for further investigation of the biological activity of lysozyme—quinone adduct. For all obtained modifications of lysozyme, activity towards *Micrococcus luteus* after reaction of modification was determined.

The mechanism of action of avarone and its derivatives on circular plasmids pRB322 and pUC18 DNA and their action on DNA of bovine thymus was investigated as well. UV spectra of plasmid and bovine thymus DNA and their modifications were recorded and interactions with quinones were studied by electrophoresis on agarose gel.

*Key words:* avarone, biological activity, modification, lysozyme, linear and circular DNA

Chemistry, Organic chemistry

UDC number: 547.9



IZVOD .....	II
SUMMARY .....	IV
SADRŽAJ .....	VI
1. UVOD .....	1
2. OPŠTI DEO .....	2
2.1 PREGLED NEKIH ANTITUMORSKIH AGENASA SA HINONSKOM STRUKTUROM .....	2
2.2 MEHANIZAM DEJSTVA ANTITUMORSKIH JEDINJENJA SA HINONSKOM STRUKTUROM.....	5
2.2.1 Redoks reaktivnost.....	5
2.2.2 Alkilovanje/arilovanje ćelijskih nukleofila .....	8
2.2.3 Vezivanje za DNA interkalacijom .....	11
2.3 HINONI I HIDROHINONI IZ MORSKIH ORGANIZAMA .....	12
2.4 SESKVITERPENSKI HIDROHINON/HINON AVAROL/AVARON .....	14
2.5 PROMENE NA PROTEINIMA POD UTICAJEM HINONSKIH JEDINJENJA .....	16
2.5.1 Umrežavanje proteina .....	16
2.5.2 Stvaranje adukta protein-hinon.....	17
2.5.3 Promena kod enzima ĉiji su kofaktori metalni joni .....	18
2.6 PROMENE NA DNA POD UTICAJEM HINONSKIH JEDINJENJA.....	19
2.6.1 Alkilovanje DNA lanca i promene koje pri tom nastaju .....	19
2.6.2 Reakcije radikala sa DNA.....	21
2.6.2.1 Apstrakcija vodonika sa šećerne komponente DNA.....	22
2.6.2.2 Reakcija radikala sa nukleobazom.....	24
3. NAŠI RADOVI.....	26
3.1 SINTEZA DERIVATA.....	26
3.2 KARAKTERIZACIJA SINTETISANIH DERIVATA.....	30
3.2.1 Karakterizacija 4'-(metilamino)-avarona.....	30
3.2.2 Karakterizacija 3'-(metilamino)-avarona.....	31
3.2.3 Karakterizacija 3'-metoksi-avarona.....	32
3.2.4 Karakterizacija 4'-((5-((tert-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil) amino)avarona.....	34
3.2.5 Elektrohemijska karakterizacija avarona i njegovih derivata.....	35
3.3 ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI .....	37
3.3.1 Određivanje antibakterijskog i antifungalnog dejstva hinonskih derivata.....	37
3.3.2 Ispitivanje citotoksiĉnosti jedinjenja Brine shrimp testom.....	39
3.3.3 Ispitivanje antitumorskog dejstva .....	40
3.3.4 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti .....	43
3.4 HEMIJSKA MODIFIKACIJA LIZOZIMA IZ BELANCETA JAJETA .....	45
3.4.1 Optimizacija uslova modifikacije .....	47
3.4.2 Obrada smeše nakon modifikacije.....	51
3.4.3 Praćenje hemijske modifikacije.....	52
3.4.3.1 UV/Vis spektrofotometrija .....	52
3.4.3.2 SDS elektroforeza .....	53
3.4.3.3 Provera ĉistoće modifikata HPLC hromatografijom .....	54
3.4.3.4 Maseni spektar modifikovanog lizozima .....	55
3.4.3.5 Tripsinska digestija modifikata i MALDI TOF .....	57
3.5 OSOBINE MODIFIKATA LIZOZIMA.....	62
3.5.1 Enzimski aktivnost lizozima nakon modifikacije .....	62
3.5.2 Određivanje temperature topljenja lizozima i njegovih modifikata .....	63
3.5.3 Antibakterijska aktivnost modifikata lizozima - određivanje vrednosti MIC.....	64
3.5.4 Brine shrimp test toksiĉnosti avarona, njegovih derivata, lizozima i njegovih modifikata 67	
3.5.5 Ispitivanje antibakterijske aktivnosti 4'-((5-((tert-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avarona i njegove toksiĉnosti Brine shrimp testom .....	69
3.6 INTERAKCIJE AVARONA I NJEGOVIH DERIVATA SA PLAZMIDIMA PBR322 I PUC18 IZ <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	70
3.7 INTERAKCIJA AVARONA I NJEGOVIH DERIVATA SA DNA IZ TIMUSA TELETA.....	77

3.7.1	<i>Apsorpcioni spektri hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta</i> .....	77
3.7.2	<i>Fluorescentni spektri hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta</i> .....	79
4.	EKSPERIMENTALNI DEO .....	83
4.1	OKSIDACIJA.....	85
4.1.1	<i>Dobijanje avarona</i> .....	85
4.2	DOBIJANJE DERIVATA AVARONA .....	85
4.2.1	<i>Dobijanje 3'-metoksi-avarona</i> .....	85
4.2.2	<i>Dobijanje 4'-(metilamino)-avarona i 3'-(metilamino)-avarona</i> .....	86
4.2.3	<i>Dobijanje 4'-((5-((tert-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil) amino)avarona</i> .....	86
4.3	ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG DEJSTVA PREMA ODABRANIM GRAM-POZITIVNIM I GRAM-NEGATIVNIM BAKTERIJSKIM KULTURAMA I PREMA ODABRANIM GLJIVICAMA DISK-DIFUZIONOM METODOM .....	87
4.4	TEST BILOŠKE AKTIVNOSTI – "BRINE SHRIMP" .....	88
4.5	ISPITIVANJE ANTITUMORSKOG DEJSTVA.....	88
4.5.1	<i>Ćelijske linije</i> .....	88
4.5.2	<i>Određivanje broja ćelija i vijabilnosti</i> .....	89
4.5.3	<i>Kolorimetrijski SRB test</i> .....	90
4.6	ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI DPPH TESTOM.....	91
4.7	HEMIJSKA MODIFIKACIJA LIZOZIMA IZ BELANCETA JAJETA AVARONOM I NJEGOVIM DERIVATIMA.....	92
4.7.1.	<i>Hemijska modifikacija lizozima. Optimizacija uslova.</i> .....	92
4.7.2	<i>SDS elektroforeza</i> .....	92
4.7.3	<i>Provera čistoće modifikovanog lizozima HPLC-om</i> .....	94
4.7.4	<i>Snimanje masenih spektara modifikovanog lizozima</i> .....	95
4.7.5	<i>Snimanje MALDI TOF modifikata lizozima</i> .....	95
4.7.6	<i>Određivanje koncentracije lizozima nakon modifikacije Bradford-ovom metodom</i> .....	96
4.7.7	<i>Određivanje enzimske aktivnosti lizozima nakon modifikacije</i> .....	97
4.7.8	<i>Određivanje tačke topljenja lizozima i njegovih modifikata</i> .....	97
4.7.9	<i>Određivanje MIC vrednosti za avaron, njegove derivate, lizozim i njegove modifikate</i> ...	98
4.8	DEJSTVO AVARONA I NJEGOVIH DERIVATA NA CIRKULARNU I LINEARNU DNA.....	99
4.8.1	<i>Interakcije avarona i njegovih derivata sa plazmidom pBR322 i plazmidom pUC18</i> .....	99
4.8.2	<i>Interakcije avarona i njegovih derivata sa plazmidom pUC18 bez prisustva kiseonika</i> ..	100
4.8.3	<i>Elektroforeza na agaroznom gelu</i> .....	101
4.8.4	<i>Interakcija avarona i njegovih derivata sa DNA iz timusa teleta</i> .....	101
4.8.5	<i>Snimanje UV/Vis apsorpcionih spektara hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta</i> .....	102
4.8.6	<i>Snimanje fluorescentnih spektara hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta</i> .....	102
5.	ZAKLJUČAK .....	103
6.	LITERATURA .....	108
7.	PRILOG .....	114
8.	BIOGRAFIJA .....	129

# 1. UVOD

Iz mediteranskog sundera *Dysidea avara* izolovani su seskviterpenski hidrohinon avarol i u manjoj količini odgovarajući hinon avaron. Za ovaj redoks par nađeno je da ispoljava niz bioloških efekata: dejstvo na HIV virus, antimikrobno dejstvo na neke gram-pozitivne bakterije, kidanje lanaca DNA.

Cilj ovog rada bio je dobijanje derivata avarona sa elektron-donorskim supstituentima na hinonskom jezgri, proveravanje njihove biološke aktivnosti, proučavanje mehanizma biološkog dejstva dobijenih derivata, pre svega praćenja arilovanja ćelijskih nukleofila. Kao modeli ćelijskih nukleofila izabrani su enzim lizozim i linearna i cirkularna DNA.

U prvom delu rada dati su opšti podaci o jedinjenjima sa hinonskom strukturom koji se koriste kao antitumorski agensi. Opisani su glavni mehanizmi njihovog dejstva, kao i promene na proteinima i nukleinskim kiselinama koje se dešavaju pod uticajem hinonskih jedinjenja. Dati su i podaci o hidrohinonima i hinonima iz morskih organizama i njihovoj biološkoj aktivnosti.

U drugom delu dati su eksperimentalni rezultati koji obuhvataju karakterizaciju dobijenih derivata, tumačenje antibakterijskog dejstva, toksičnosti na račiće *Artemia salina*, antitumorske aktivnosti i citotoksičnosti prema limfocitima, kao i tumačenja modifikacije lizozima i linearne i cirkularne DNA sintetisanim derivatima avarona.

Treći deo obuhvata eksperimentalne propise.

Na kraju rada dat je spisak korišćene literature, a u prilogu su snimljeni spektri.

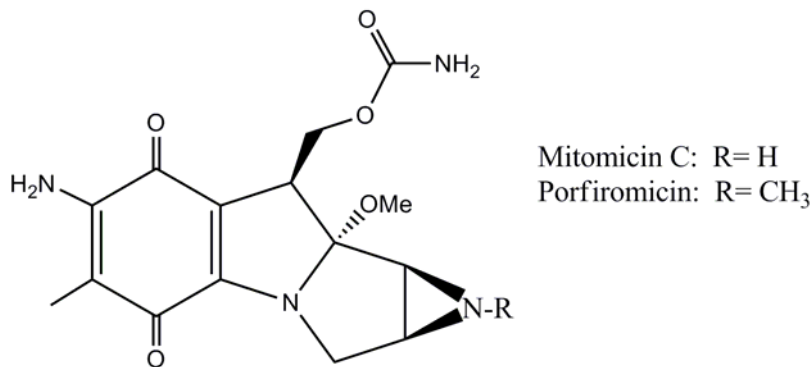
## 2. OPŠTI DEO

### 2.1 Pregled nekih antitumorskih agenasa sa hinonskom strukturom

Rak je bolest koju karakteriše poremećaj kontrolnih mehanizama koji upravljaju procesima proliferacije i diferencijacije ćelija, što dovodi do nekontrolisanog razmnožavanja ćelija i stvaranja lokalnih tumora. Mali deo ćelija unutar tumora predstavljaju matične tumorne ćelije koje zadržavaju sposobnost daljeg deljenja, ali i mogućnost migracije u udaljene delove tela u procesu metastaziranja tumora. Tretman ljudi obolelih od raka svodi se na hiruški zahvat, zračenje i hemoterapiju. Osnovni princip pri kreiranju nekog antitumorskog leka jeste stvaranje agenasa koji će uništiti ćelije tumora, a da pri tom normalna, zdrava tkiva ostanu neoštećena. S obzirom na to da nijedan od do sada primenjivanih agenasa ne zadovoljava ovaj kriterijum u potpunosti i dalje se radi na sintezi novih antitumorskih lekova koji će biti manje toksični po okolna tkiva.

Iako savremena farmaceutska industrija raspolaže velikim potencijalom za dizajniranje i sintezu novih, hemijski veoma složenih agenasa, ona nastavlja da se oslanja na jedinjenja izolovana iz prirodnih izvora radi dobijanja novih efikasnih medikamenata.

Posebno interesantna grupa hinonskih jedinjenja koja je našla kliničku primenu u lečenju raznih kanceroznih oboljenja izolovana je kao grupa sekundarnih metabolita iz sojeva *Streptomyces*. Iz *Streptomyces caespitosus* izolovan je mitomicin C<sup>1</sup> (slika 1).

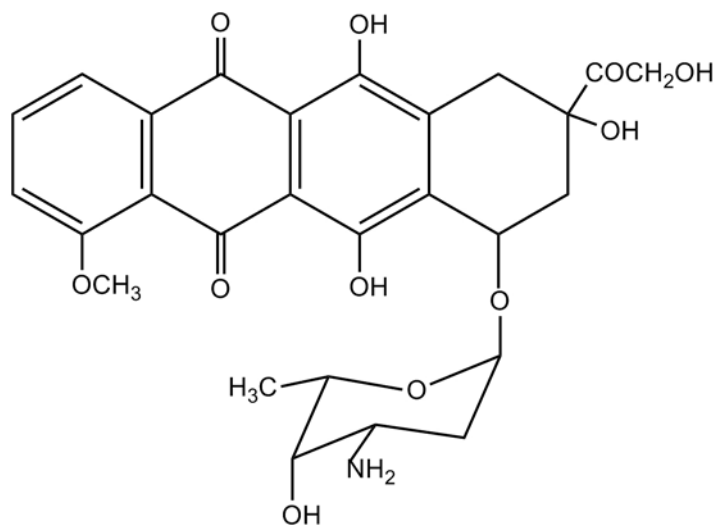


Slika 1. Mitomicin C i porfiromicin

Već dugi niz godina mitomicin C se koristi za tretman raka mokraćne bešike<sup>2</sup>, želuca<sup>3</sup>, pankreasa<sup>4</sup>, debelog creva<sup>5</sup> i jednjaka<sup>6</sup>. U kombinaciji sa drugim antitumorskim lekovima mitomicin C ima mnogo širu paletu dejstva. Aktivnost ovog agensa i njegova povećana aktivnost na ćelije sa sniženim sadržajem kiseonika koje su otporne na zračenje<sup>7</sup>, uslovljavaju stalno interesovanje za mitomicin C i ispitivanje novih pristupa za još bolju efikasnost ovog leka.

Iz soja *Streptomyces arduus* izolovan je porfiromicin<sup>8</sup> koji za razliku od mitomicina ima CH<sub>3</sub> grupu na atomu azota iz aziridinskog prstena (slika 1). Ovo jedinjenje je aktivno prema sličnim ćelijama tumora kao i mitomicin C, a pokazuje i dejstvo na EMT6 ćelije raka dojke<sup>9</sup>. Porfiromicin je pod aerobnim uslovima manje toksičan na ćelije tumora nego mitomicin C, dok pri nižim koncentracijama kiseonika pokazuje sličnu ili povećanu aktivnost<sup>10</sup>.

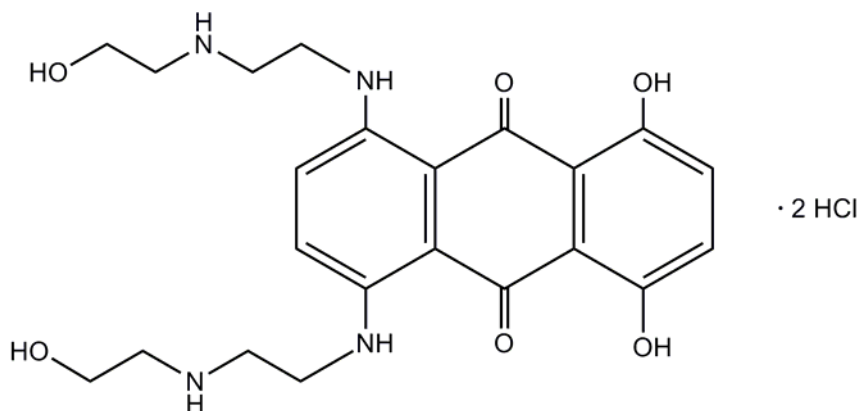
Iz soja *Streptomyces peucetius* izolovan je doksorubicin (slika 2), hinoidno jedinjenje koje se koristi u tretmanu leukemije, Hodgkin-ove bolesti, raka dojke, mokraćne bešike i jajnika.



**Slika 2.** Doksorubicin

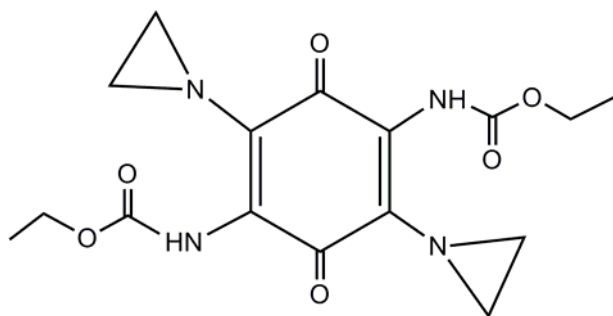
Struktura ovih izolovanih antitumorskih agenasa poslužila je kao osnov za sintezu novih jedinjenja sa hinonskim elementom u osnovnom skeletu. Uporedo sa izolovanjem biološki aktivnih jedinjenja razvijale su se i sintetičke metode kojima su dobijeni novi hinonski biološki aktivni agensi.

Sintetičko jedinjenje mitoksantron (slika 3) koristi se u tretmanu multiple skleroze<sup>11</sup>, metastaza raka dojke, nehodžkinovog limfoma, a u kombinaciji sa prednisonom koristi se za lečenje metastaza raka prostate.



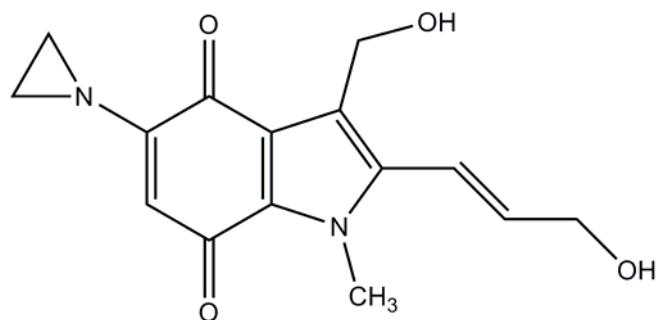
**Slika 3.** Mitoksantron

Antitumorsko jedinjenje sa hinonskom strukturom diazikvon (slika 4), dobijeno sintezom, pokazuje najveću aktivnost prema tumorskim ćelijama prisutnim u centralnom nervnom sistemu<sup>12</sup> i prema ćelijama tumora jajnika<sup>13</sup> mada deluje i na druge tipove tumorskih ćelija.



**Slika 4.** Diazikvon

Po ugledu na strukturu mitomicina C koja sadži indolhinonski prsten, sintetisano je novo jedinjenje EO 9 (slika 5), sa istim fragmentom uz dodatak novih strukturnih elemenata. Ispostavilo se da ovo jedinjenje pokazuje antitumorsku aktivnost prema ćelijama melanoma, tumora bubrega, tumora pluća i leukemije<sup>14,15</sup>.



Slika 5. Jedinjenje EO 9

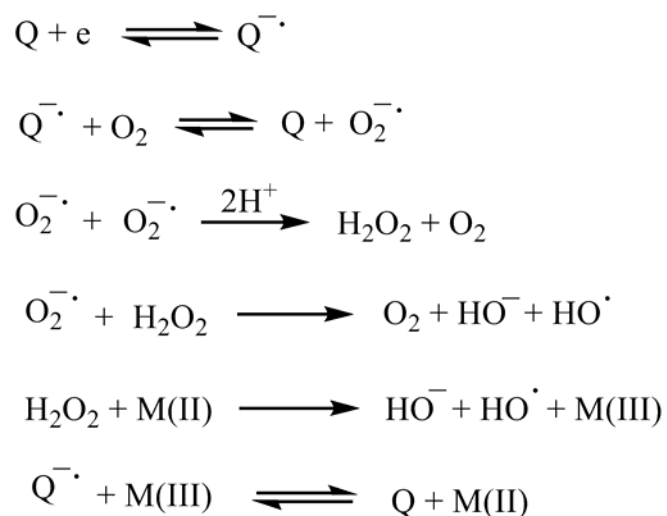
## 2.2 Mehanizam dejstva antitumorskih jedinjenja sa hinonskom strukturom

Hinoni su visoko reaktivna jedinjenja. Generalni mehanizam njihovog dejstva obuhvata tri procesa:

- 1) redoks procesi hinon/hidrohinon koji mogu generisati reaktivne kiseonične vrste koje oštećuju biomakromolekule, inhibiraju transport elektrona u mitohondrijama i oksidativnu fosforilaciju
- 2) alkilovanje/arilovanje ćelijskih nukleofila
- 3) vezivanje za DNA interkalacijom

### 2.2.1 Redoks reaktivnost

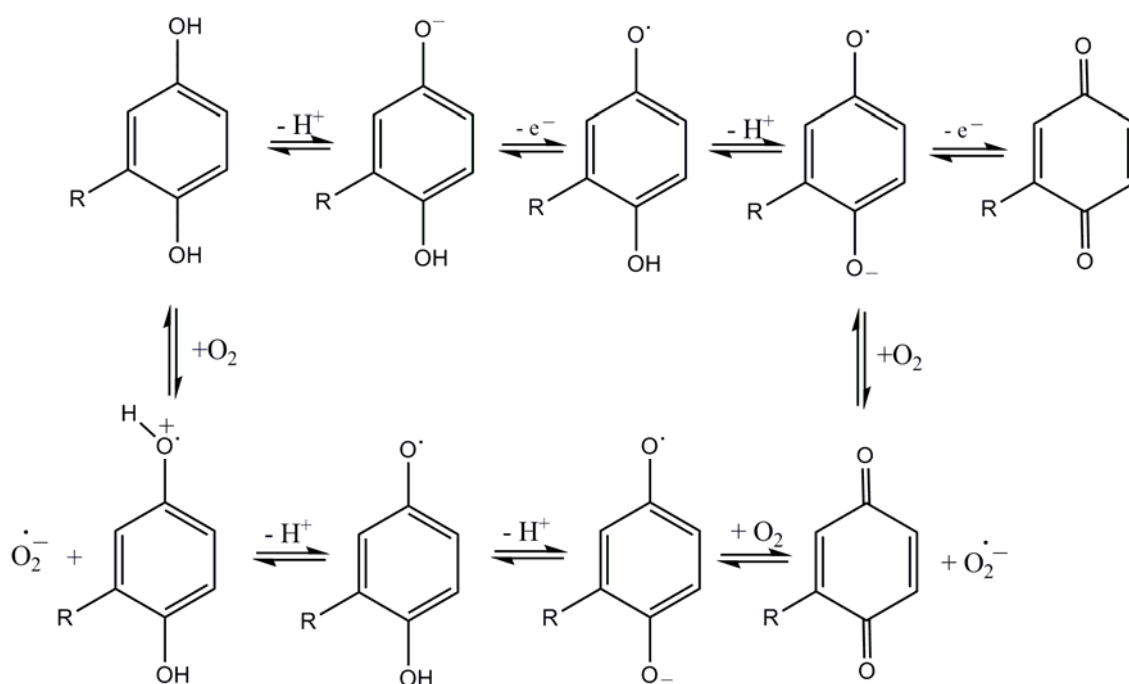
U skladu sa polutalasnim potencijalima hinon/hidrohinonskih parova, mogući mehanizam dejstva hinonskih antitumorskih agenasa je sukcesivni jednoelektronski transfer, zasnovan na sposobnosti ovog para da gradi radikalske intermedijere i stvara reaktivne kiseonične vrste<sup>16</sup> (shema 1).



**Shema 1.** Mehanizam stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta

Jednoelektronska redukcija hinona do semihinonskih anjon-radikala katalizovana je enzimima NAD(P)H-oksidoreduktazom i citohrom P<sub>450</sub> reduktazom<sup>17</sup>. Jednom stvoreni semihinonski anjon-radikal može se pod aerobnim uslovima oksidovati molekulskim kiseonikom i stvoriti superoksidni anjon-radikal. S obzirom na to da je u vodenim rastvorima vreme života superoksidnog anjon-radikala kratko, on može reagovati sa drugim superoksidnim anjon-radikalom uz formiranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i oslobađanje molekulskog kiseonika. Međusobnim reagovanjem superoksidnog anjon-radikala i vodonik peroksida u prisustvu jona prelaznih metala (u biološkim sistemima najčešće u prisustvu jona gvožđa) nastaje hidroksil radikal HO<sup>•</sup> koji može usloviti oksidaciju i degradaciju proteina i nukleinskih kiselina u ćeliji i stimulisati lipidnu peroksidaciju. Vodonik-peroksid može reagovati i direktno sa jonom prelaznog metala i stvoriti hidroksil radikal Fentonovom reakcijom. Konačno, M(III) se redukuje najverovatnije semihinonskim anjon-radikalom do M(II) što zatvara započeti redoks ciklus.





**Slika 6.** Redoks promene para hidrohina/hinon i nastajanje superoksidnog anjon-radikala

Stvaranje superoksidnog anjon-radikala uz generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta je osnova citotoksičnosti redoks para hinon/hidrohina (slika 6).

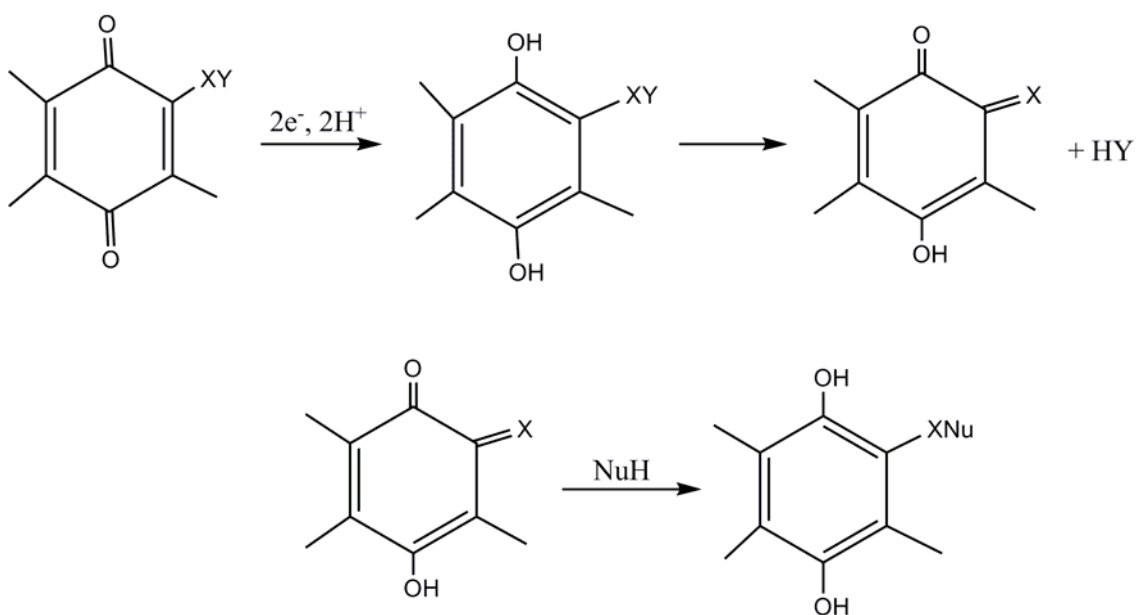
Međutim, svi aerobni organizmi imaju razvijene mehanizme za sprečavanje oštećenja koja bi mogla biti izazvana slobodnoradikalnim intermedijerima. Na prvom mestu su superoksid-dismutaze (SOD), katalaza i glutation. Unutarćelijski metaloproteini Cu-Zn-SOD, Mn-SOD i Fe-SOD katalizuju disproporcionisanje superoksidnog anjon-radikala na vodonik-peroksid i vodu. Oslobođeni vodonik-peroksid se prevodi u vodu i kiseonik u prisustvu katalaze i glutationa. Drugu neenzimsku zaštitu, čine vitamini C i E. Lipofilni vitamin E ugrađen je u ćelijsku membranu, dok se hidrofilni vitamin C nalazi u citosolu. U reakcijama sa slobodnim radikalima ovi vitamini prelaze u rezonanciono stabilizovane, manje reaktivne fenoksi odnosno alkoksi radikale blokirajući na taj način oštećenja ćelijskih komponenata. Zahvaljujući glutationu regenerišu se u neutralni oblik.

Moguća je i dvoelektronska redukcija hinona do hidrohina katalizovana enzimom DT-dijaforazom<sup>18</sup>.

## 2.2.2 Alkilovanje/arilovanje ćelijskih nukleofila

Antitumorski alkilujućí agensi sa hinonskom strukturom imaju dva važna strukturna elementa koja uslovljavaju njihovo biološko dejstvo. Prvi je alkilujućí element koji može da formira kovalentne veze sa ćelijskim komponentama uključujući proteine, lipide i DNA. Interakcija sa DNA je generalno najvažnija za aktivnost ovih antitumorskih agenasa i može se ispoljiti kao stvaranje DNA monoadukta ili umrežavanje DNA kod bifunkcionalnih alkilujućih agenasa, što dovodi do apoptoze ili smrti ćelije<sup>19-22</sup>.

Drugi element je hinonsko jezgro koje redoks ciklusom (oksidovana/redukovana forma) može uticati na aktivnost alkilujućeg dela molekula. Većina alkilujućih antitumorskih agenasa je aktivna tek nakon bioreduktivne aktivacije. Termin bioreduktivna aktivacija obuhvata seriju mehanizama kojima se antitumorski agens redukuje do reaktivnog intermedijera koji kasnije može podleći nukleofilnoj adiciji. Uprošćeni osnovni mehanizam bioreduktivnog alkilovanja dat je na shemi 2.



**Shema 2.** Uprošćeni osnovni mehanizam bioreduktivnog alkilovanja

Hinonski metidi (organska jedinjenja koja sadrže karbonilnu grupu, cikloheksadien i egzocikličnu C—C dvostruku vezu) se mogu stvarati ili iz semihinona ili iz hidrohinona nekog hinonskog leka, te su najvažniji enzimi za aktivaciju alkilujućih

agenasa sa hinonskom strukturom NAD(P)H oksidoreduktaza za jednoelektronski transfer i DT-dijaforaza za dvoelektronsku redukciju hinona do hidrohina.

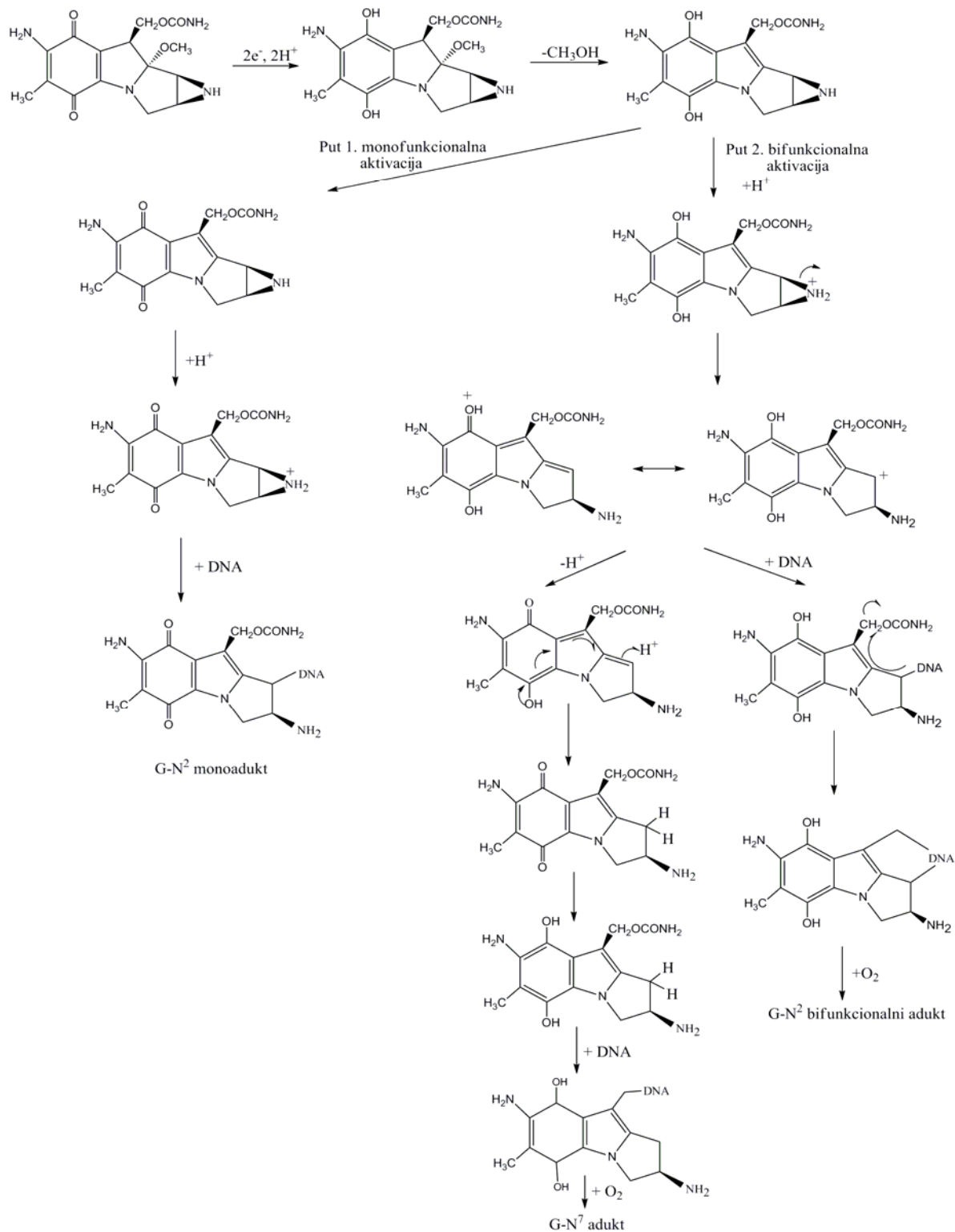
S obzirom na to da je reduktivna forma hinonskih lekova aktivna, nije iznenađujuće da su ovi agensi upravo najaktivniji u uslovima smanjene koncentracije kiseonika, odnosno smanjene mogućnosti njihove reoksidacije. Potvrđeno je da su mitomicin C, doksorubicin i diaziquon bio-reduktivni alkilujući molekuli upravo aktivni u hipooksigenim uslovima<sup>23</sup>.

Primer bio-reduktivne aktivacije mitomicina C i mehanizam alkilovanja DNA<sup>24</sup> dat je na slici 7.

Delimično supstituisani hinonski agensi, odnosno agensi sa hinonskim jezgrom koje može podleći Michael-ovoj adiciji, mogu direktno da ariluju ćelijske nukleofile kao što su tioli, amini i glutation<sup>25,26</sup>. Isti tip reakcije moguć je i sa bazama nukleinskih kiselina. Najčešći položaji su N-1, N-2 i N-7 guanina, N-6 adenina, N-4 citozina i N-3 timina<sup>27</sup>. Za razliku od dobro proučenog mehanizma generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta hinonima, uloga formiranja Michael-ovog adukta u toksičnosti hinona nije dovoljno razjašnjena.

Delimično objašnjenje još uvek nejasnog mehanizma arilovanja ćelijskih nukleofila dobijeno je eksperimentom u kome je praćena reakcija između 5-hidroksi-1,4-naftohinona sa glutationom i amino-kiselinama<sup>28,29</sup>. Naime, EPR tehnikama je utvrđeno da nakon nukleofilne Michael-ove adicije sulfhidrilne grupe glutationa na hinonsko jezgro dolazi do stvaranja semihinonskog anjon-radikala, koji se inače stvara i u redoks ciklusu hinona. U hipoksičnim uslovima, pri kojima je većina antitumorskih agenasa najaktivnija, može doći do oksidacije ovog intermedijera viškom hinona. U sistemima sa povećanom koncentracijom kiseonika, može doći do reakcije semihinonskog anjon-radikala i molekuskog kiseonika, čime započinje ranije objašnjena kaskada stvaranja hidroksilnog radikala koji može usloviti oksidativni stres u ćeliji.

S obzirom na to da se mehanizam arilovanja ćelijskih nukleofila ne može u potpunosti razdvojiti od redoks mehanizma delovanja hinonskih agenasa, razumljivo je što je do sada ostao nedovoljno objašnjen.

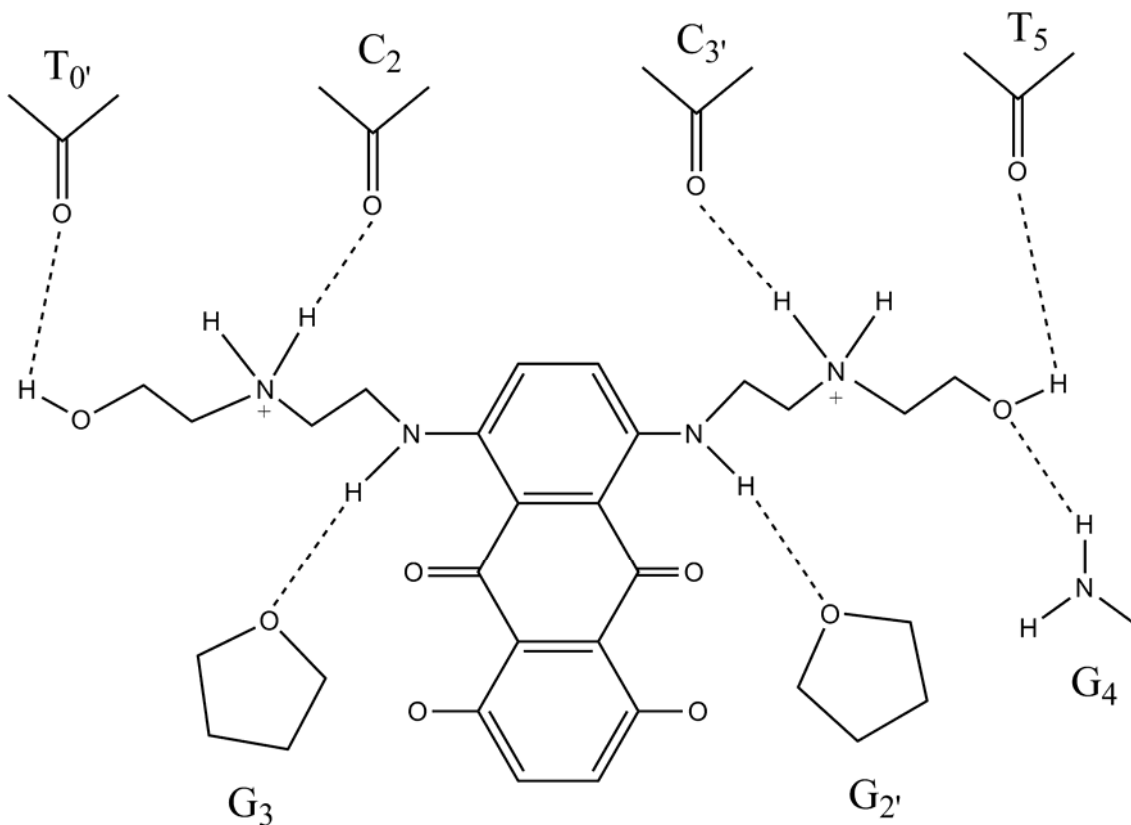


**Slika 7.** Bioreduktivni put aktivacije mitomicina C i mehanizmi alkilovanja DNA

### 2.2.3 Vezivanje za DNA interkalacijom

Hinonska jedinjenja sa planarnom farmakoforom vezuju se za DNA interkalacijom odnosno nekovalentnim vezivanjem što uzrokuje prekid nizova DNA i inhibira biosintezu DNA i RNA. Najčešće pozicioniranje ostataka hinonskih jedinjenja je u maloj brazdi DNA, a u zavisnosti od supstituenata na farmakofori, za svaki lek postoji određeno preferencijalno vezivanje za neku sekvenciju DNA baza.

Primer jedinjenja koje deluje ovakvim mehanizmom je mitoksantron<sup>30</sup> (slika 8). Mitoksantron se interkalira u malu brazdu DNA i vodoničnim vezama vezuje za GC sekvencije DNA. Uočeno je i da u nekim regionima DNA može doći do vezivanja velikog broja molekula mitoksantrona. Nakon interkalacije, jednoelektronskom elektrohemijском redukcijom ovog hinona generišu se superoksidni anjon-radikali, koji dovode do oštećenja DNA.



**Slika 8.** Interkalacija mitoksantrona

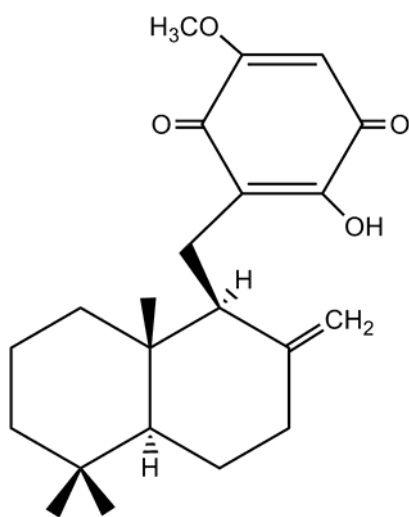
## 2.3 Hinoni i hidrohini iz morskih organizama

Prirodni proizvodi su oduvek bili neiscrpan izvor biološki aktivnih jedinjenja. Obnovljen interes za prirodne proizvode i nove strukture koji oni nude je od posebnog značaja u marinskoj farmakologiji. Osim što je 80% površine pod vodom, životne forme nađene u morima mogu se opisati kao jedinstvene zbog specifične ravnoteže koja vlada u tim uslovima. Po pravilu su to niže životne forme koje proizvode jedinjenja potpuno drugačijih struktura i funkcija u odnosu na ona koja su nalažena ranije.

Izolovanje prostaglandina iz korala<sup>31</sup> potvrdilo je da su morski organizmi bogati izvor mnogih egzotičnih jedinjenja. Proučavanjem velikog broja životnih formi nađenih u morima, uočeno je da dobar deo iz njih izolovanih jedinjenja ima važne biološke aktivnosti, što je još više podstaklo dalja istraživanja.

Jedna od većih grupa jedinjenja izolovanih iz morskih organizama su hinoni i hidrohini nađeni u većem broju algi i sunđera<sup>32,33</sup>.

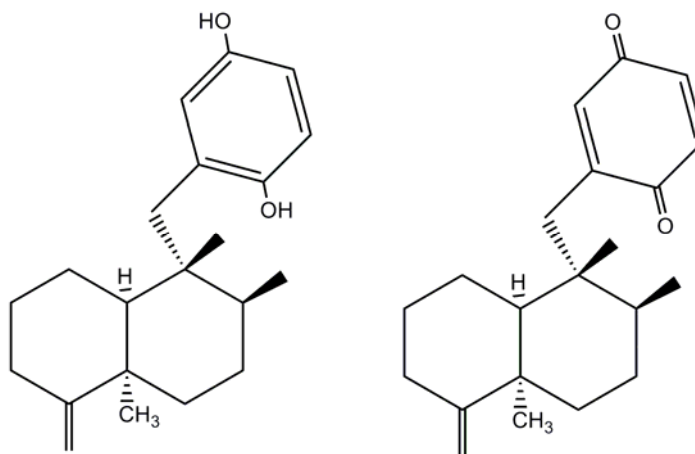
Iz sunđera *Hyatella intestinalis* izolovan je seskviterpenski hinon hijatelahinon (slika 9)<sup>34</sup> koji pokazuje antitumorsku aktivnost, inhibira HIV1 reversnu transkriptazu i imunomodulaciju<sup>35</sup>.



Slika 9. Hijatelahinon

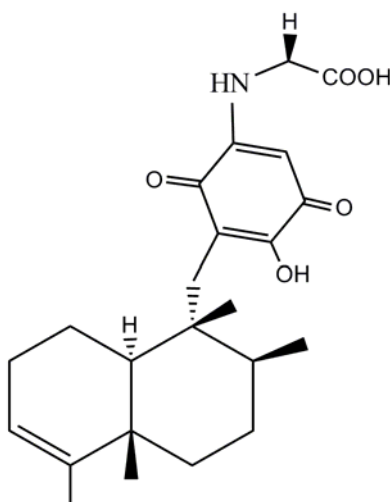
Ispitivanjem lipidnog ekstrakta sunđera *Dysidea arenaria*, izolovan je hidrohino/hinonski par arenarol/arenaron (slika 10)<sup>36</sup>. Za ovaj par nađeno je da

pokazuje selektivnu citotoksičnu aktivnost na ćelije A549 humanog kancera pluća ( $IC_{50}= 4,3 \mu\text{g/mL}$ ) i na virus influence tipa A ( $IC_{50}= 11,6 \mu\text{g/mL}$ )<sup>37</sup>.



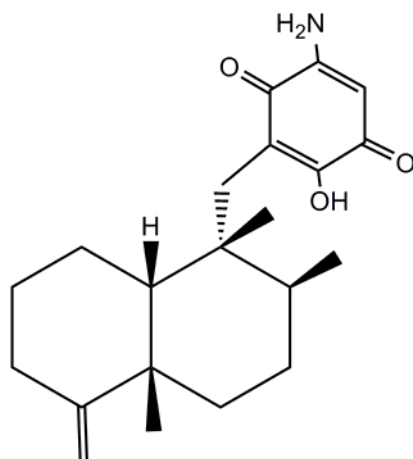
**Slika 10.** Arenarol i arenaron

Serijski nakidžihinoni (slika 11) izolovani su iz *Spongia* sp.<sup>38</sup>. Utvrđeno je da nakidžihinon A ima snažno dejstvo na ćelije mišjeg limfoma<sup>39</sup> i da inhibira dejstvo protein-kinaze<sup>40</sup>.



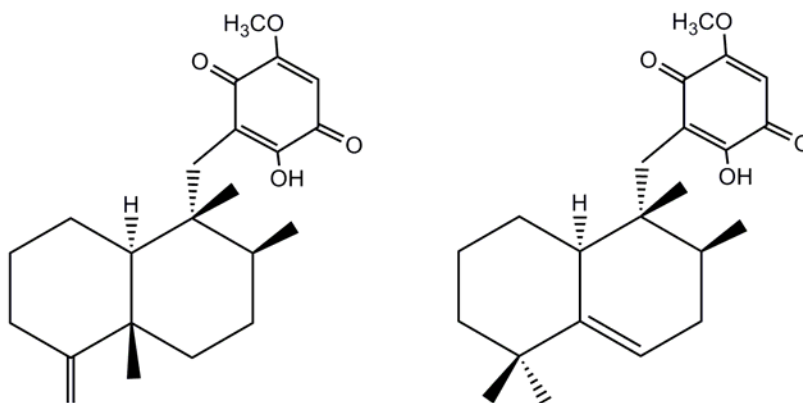
**Slika 11.** Nakidžihinon A

Iz morskog sundera *Dactylospongia elegans* izolovan je 5-epi-smenospongini (slika 12). Ispitivanjem biološke aktivnosti ovog seskviterpenskih hinona, utvrđeno je da pokazuje aktivnost prema ćelijama leukemije K562<sup>41</sup> i ćelijama monocitne leukemije RAW 264,7<sup>42</sup>.



**Slika 12.** 5-Epi-smenospongine

Ilimahinon i mamanutahinon (slika 13) izolovani su iz sundera *Dactylospongia elegans*. Pokazano je da ova jedinjenja imaju aktivnost na ćelije kancera dojke (ilimahinon  $IC_{50}$ = 1,50  $\mu$ g/mL, mamanutahinon  $IC_{50}$ = 2,64  $\mu$ g/mL) i ćelije kancera pluća H187 (ilimahinon  $IC_{50}$ = 3,37  $\mu$ g/mL, mamanutahinon  $IC_{50}$ = 8,78  $\mu$ g/mL)<sup>43</sup>.

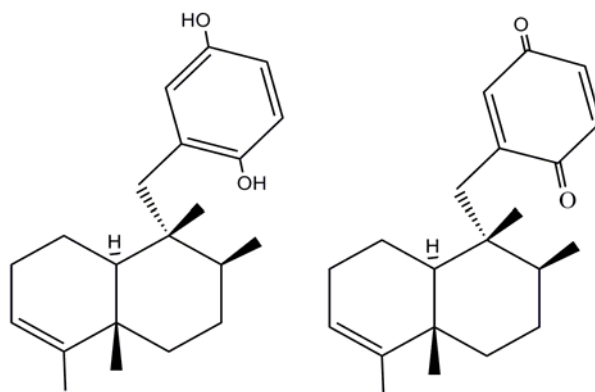


**Slika 13.** Ilimahinon i mamanutahinon

## 2.4 Seskviterpenski hidrohionon/hinon avarol/avaron

Iz mediteranskog sundera *Dysidea avara*<sup>39</sup> izolovani su seskviterpenski hidrohionon avarol i odgovarajući hinon avaron (slika 14). Količina avarola u ovom sunderu je velika, čak 18% sirovog lipidnog ekstrakta, što je izuzetno visok sadržaj pojedinačnog jedinjenja u nekom morskom organizmu.





**Slika 14.** Avarol i avaron

Za ovaj redoks par je izmeren redoks potencijal od  $-0,53$  V pa se biološka aktivnost avarola/avarona proučava u paru, jer je usled lakoće redoks konverzije moguće prisustvo oba oblika.

Ova dva jedinjenja imaju niz bioloških efekata. Mehanizam dejstva ovog para je isti kao mehanizam dejstva sličnih jedinjenja sa delimično supstituisanim hinonskim elementom u strukturi. Na osnovu strukturnih karakteristika jedinjenja, biološka aktivnost avarol/avaron sistema se može povezati sa dva procesa:

- sukcesivni jednoelektronski transfer zasnovan na sposobnosti ovog para da gradi radikalske intermedijere i
- adicija ćelijskih nukleofila na hinonsko jezgro.

Sukcesivni jednoelektronski transfer uz stvaranje radikalskih intermedijera i toksičnih kiseoničnih radikala, potvrđen je u eksperimentima sa superoksid-dismutazom (SOD) pri čemu je uočena inverzna međuzavisnost između citotoksičnog dejstva avarola i ukupnog sadržaja SOD<sup>44</sup>.

Nukleofilna adicija ćelijskih nukleofila na avaronsko jezgro u prvom redu podrazumeva reakcije sa proteinima i nukleinskim kiselinama. S obzirom na to da su hinoni bifunkcionalni agensi, u reakciji sa hinonskim jezgrom je moguće umrežavanje proteina i DNA, ali i stvaranje proteinskih i nukleinskih monoaddukata što zavisi od samih osobina biomakromolekula. Mehanizam arilovanja ćelijskih nukleofila potvrđen je modifikacijom glutationa<sup>45</sup> i  $\beta$ -laktoglobulina<sup>46</sup>. U eksperimentima sa glutationom došlo je do nukleofilne adicije sulfhidrilnih grupa na hinonsko jezgro avarona, dok je u eksperimentima sa  $\beta$ -laktoglobulinom došlo do nukleofilne adicije  $\epsilon$ -amino grupe lizina na hinonsko jezgro.

Utvrđeno je da avarol i avaron imaju umereno antibakterijsko i antifungalno dejstvo<sup>47</sup>.

Za ovaj hidrohion/hinonski par utvrđeno je da ima jako dejstvo na ćelije tumora.<sup>48</sup> Proučavanjem dejstva avarola na Friend-ove ćelije leukemije ustanovljeno je da usporava rast ćelija leukemije generisanjem kiseoničnih radikala, odnosno da preko kiseoničnih medijatora utiče na prekidanje nizova DNA.<sup>49,50</sup> Oba jedinjenja imaju jaku citostatičku aktivnost na ćelije limfoma inhibirajući mitozu L5178y ćelija *in vitro* i *in vivo*. Vrednosti IC<sub>50</sub> ovih jedinjenja na ćelije L5178y *in vitro* su 0,93±0,13 μM za avarol i 0,62±0,11 μM za avaron, što znači da su aktivniji nego terapijski primenljiv citostatik bleomicin<sup>51</sup>.

Dokazano je da avarol i avaron imaju antivirusno dejstvo na HIV virus na ćelijskoj grupi H9, pri čemu se brzina proliferacije ćelija vraća na normalu 4 dana nakon tretmana inficiranih ćelija sa 0,1 μg/mL avarola ili avarona<sup>52</sup>. Uočeno je i snižavanje sadržaja leukotriena B4 i prostanglandina PGE<sub>2</sub> u monocitima inficiranim HIV-om<sup>53</sup>.

Proučavanjem uticaja avarola i avarona na agregaciju humanih trombocita uočeno je da avaron inhibira njihovu agregaciju čak i u prisustvu jedinjenja koja aktiviraju agregaciju trombocita, adenzin-5'-difosfata i U46619 stimulišućeg faktora<sup>54</sup>.

## **2.5 Promene na proteinima pod uticajem hinonskih jedinjenja**

### **2.5.1 Umrežavanje proteina**

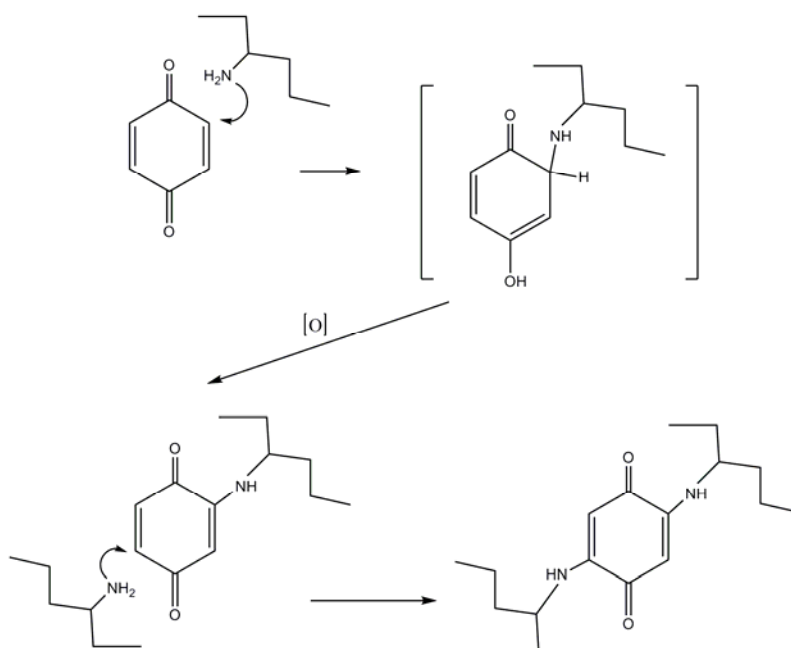
Nesupstituisani i monosupstituisani hinoni kao modifikujući agensi pripadaju grupi bifunkcionalnih, umrežavajućih reagenasa. Reagensi ovog tipa se koriste za intermolekulsko povezivanje ili intramolekulsko umrežavanje proteina<sup>55</sup>.

Proteini se pod dejstvom hinona mogu umrežavati na više načina uključujući reakcije sa hinonima i stvorenim radikalskim vrstama u oksidativnom sistemu:

- 1) Nukleofilnom adicijom amino ili slobodnih sulfhidrilnih proteinskih grupa na hinonsko jezgro nastaju monosupstituisani adukti koji mogu podleći

narednoj adiciji nukleofilnih proteinskih ostataka na hinonsko jezgro<sup>56</sup> (slika 15).

- 2) Vezivanjem hinona za protein mogu nastati fenolni radikali koji su vezani za protein. Reakcijom dva takva fenolna radikala može doći do umrežavanja proteina stvaranjem kovalentne veze.
- 3) U prisustvu hinona i kiseonika može doći i do stvaranja sekundarnih proteinskih radikala, u prvom redu stvaranja tirozil-radikala. Povezivanjem tako dobijenih radikala dolazi do umrežavanja proteina.
- 4) Prisutni hinoni, generišući superoksidni anjon-radikal, mogu da oksiduju merkapto grupe u disulfidne pri čemu dolazi do intramolekulskog umrežavanja proteina stvaranjem disulfidnih mostova.



**Slika 15.** Umrežavanje proteina dvostrukom Michael-ovom adicijom proteinskih nukleofila na hinonsko jezgro

### 2.5.2 Stvaranje adukta protein-hinon

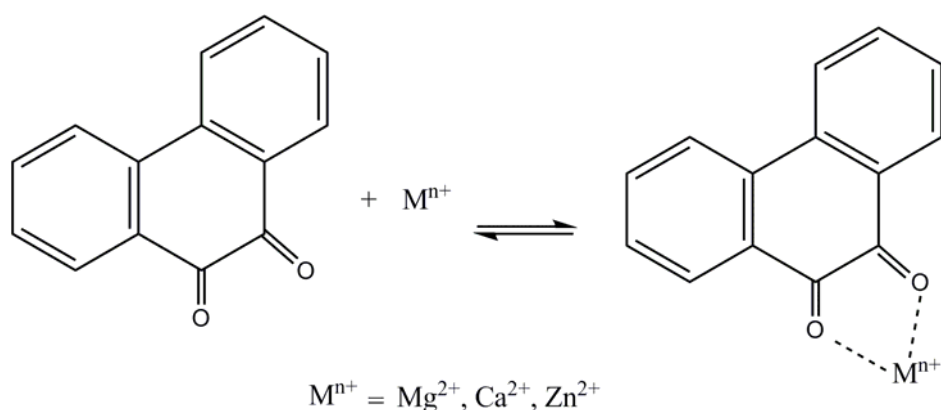
Proteini se u reakcijama sa jedinjenjima hinonskog tipa ne moraju nužno polimerizovati. Moguće je da se proteinski nukleofili poput sulfhidrilnih grupa, amino

grupa lizina<sup>57</sup> ili N-terminalne grupe vezuju za hinonsko jezgro jednostrukom Michael-ovom adicijom, što dovodi do stvaranja adukta protein-hinon. Takvo vezivanje može indukovati promenu tercijarne strukture proteina i promenu enzimске aktivnosti ukoliko je stvoren adukt enzim-hinon.

Protein sa kovalentno vezanim hinonskim jedinjenjem može biti njegov nosač do određenih ćelija, pri čemu se hidrolitičkim enzimima data hinonska aktivna komponenta izručuje u većim koncentracijama i sa umanjenim toksičnim dejstvom na ostale ćelije organizma<sup>58</sup>.

### 2.5.3 Promena kod enzima čiji su kofaktori metalni joni

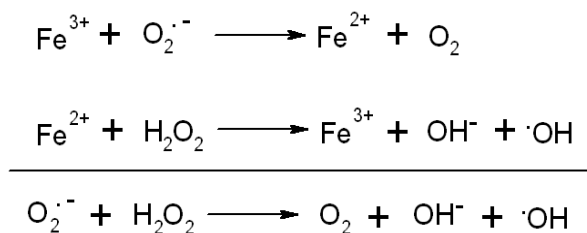
Transfer elektrona ima vitalnu ulogu u biološkim redoks reakcijama pri čemu je većina tih procesa aktivirana nekovalentnim interakcijama. Biološka aktivnost metaloenzima je povezana sa koordinativnim sposobnostima metalnog jona koji se nalazi u aktivnom mestu. U slučaju hinonskih jedinjenja, moguće je da se za metalni jon koordinativno veže jedan ili dva molekula prisutnog hinona<sup>59</sup> (shema 3). Formirani kompleks hinona sa metalnim jonom utiče na povećavanje elektron-akceptorske sposobnosti hinona.



**Shema 3.** Nekovalentno vezivanje hinonskog jedinjenja za metalni jon

S obzirom na to da se jednoelektronskim transferom hinoni transformišu u radikal-anjone, metalni joni koji deluju kao Luisove kiseline mogu da formiraju komplekse i sa radikal-anjonskim produktima što, takođe, aktivira reakcije elektron-transfera.

U skladu sa redoks ravnotežom između hinona, hidrohina i semihinonskog anjon-radikala, u prisustvu kiseonika moguće je stvaranje superoksidnog anjon-radikala. Nastali superoksidni anjon-radikal može promeniti oksidaciono stanje metala npr.  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  i time uticati na katalitičke osobine enzima čiji su kofaktori metalni joni (shema 4).



**Shema 4.** Promene oksidacionog stanja metala pod uticajem superoksidnog anjon-radikala

## 2.6 Promene na DNA pod uticajem hinonskih jedinjenja

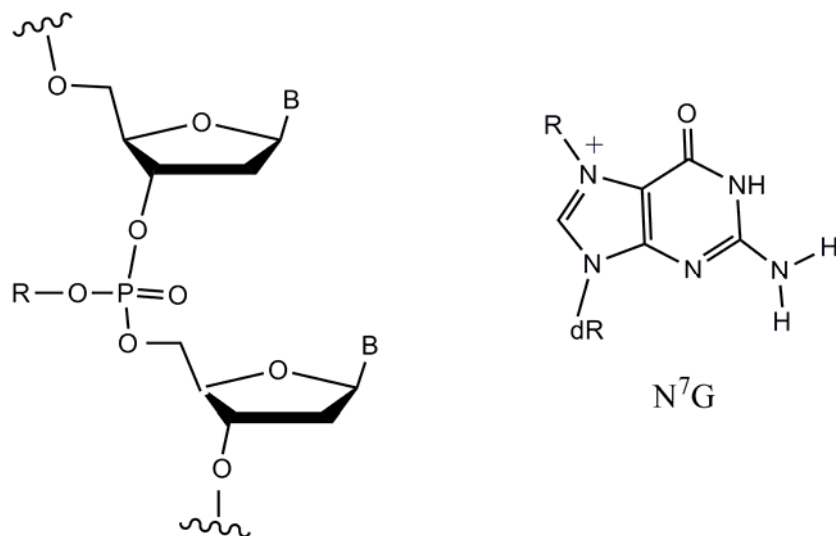
Postoje dva osnovna tipa reakcija između DNA i jedinjenja sa hinonskim strukturnim elementom koje dovode do molekulskih oštećenja DNA:

- 1) alkilovanje (arilovanje) DNA lanca
- 2) reakcija  $\pi$ -veze ili C-H veze iz DNA sa radikalima

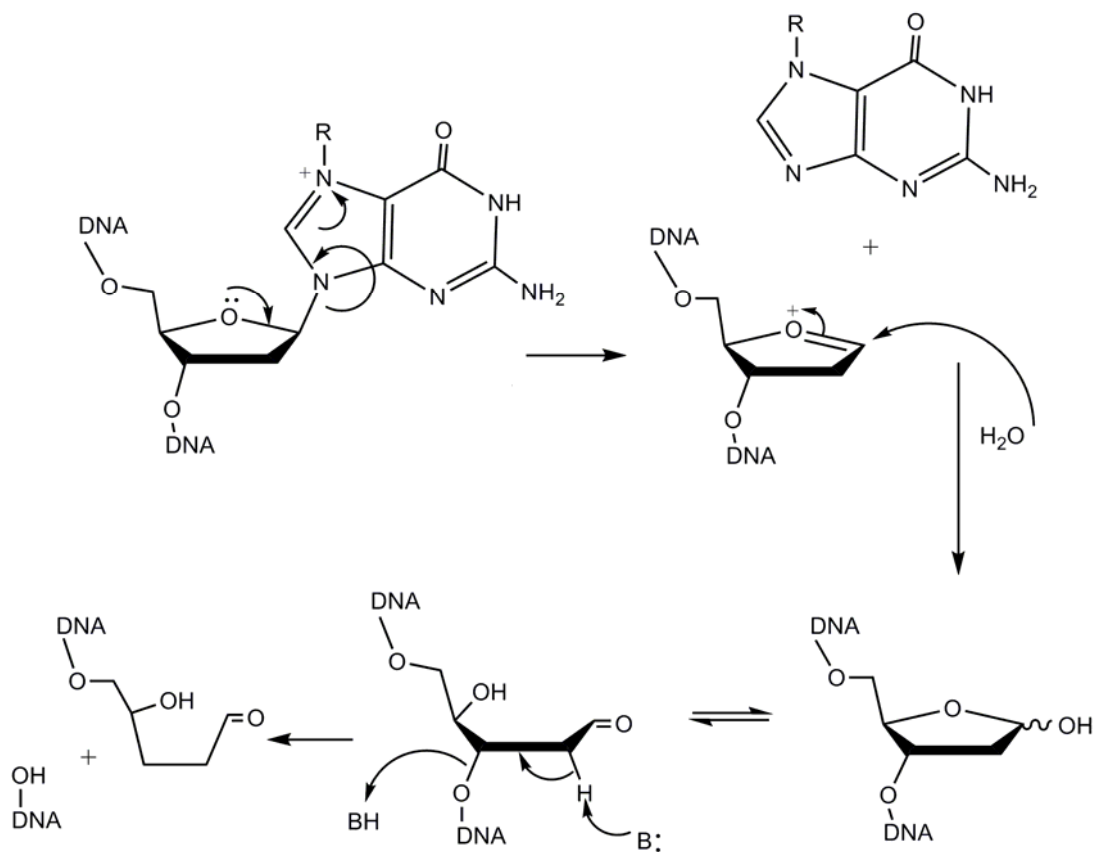
### 2.6.1 Alkilovanje DNA lanca i promene koje pri tom nastaju

Postoji određena pravilnost prilikom alkilovanja DNA lanca: tvrdi alkilujući agensi (mala veličina, pozitivna šarža na molekulu, mala polarizabilnost) reaguju sa O-tvrđim nukleofilima DNA dok meki alkilujući agensi (voluminozni, nenaelektrisani, polarizabilni) reaguju sa N-mekim nukleofilom DNA. Uočeno je da je za tvrde alkilujuće agense najreaktivniji kiseonik O-P iz fosfodiesterne veze dok je za meke najreaktivniji N7 atom guanina<sup>60</sup> (slika 16). Medjutim, dobijeni adukti gde su jedinjenja za DNA vezana za endociklične atome azota N7G, N7A, N3G, N3A, N1A, N3C

pokazuju izrazitu tendenciju ka deglikozilovanju (shema 5). Brzina deglikozilovanja se povećava ukoliko su na alkil supstuentu elektron-privlačne grupe<sup>61</sup>.

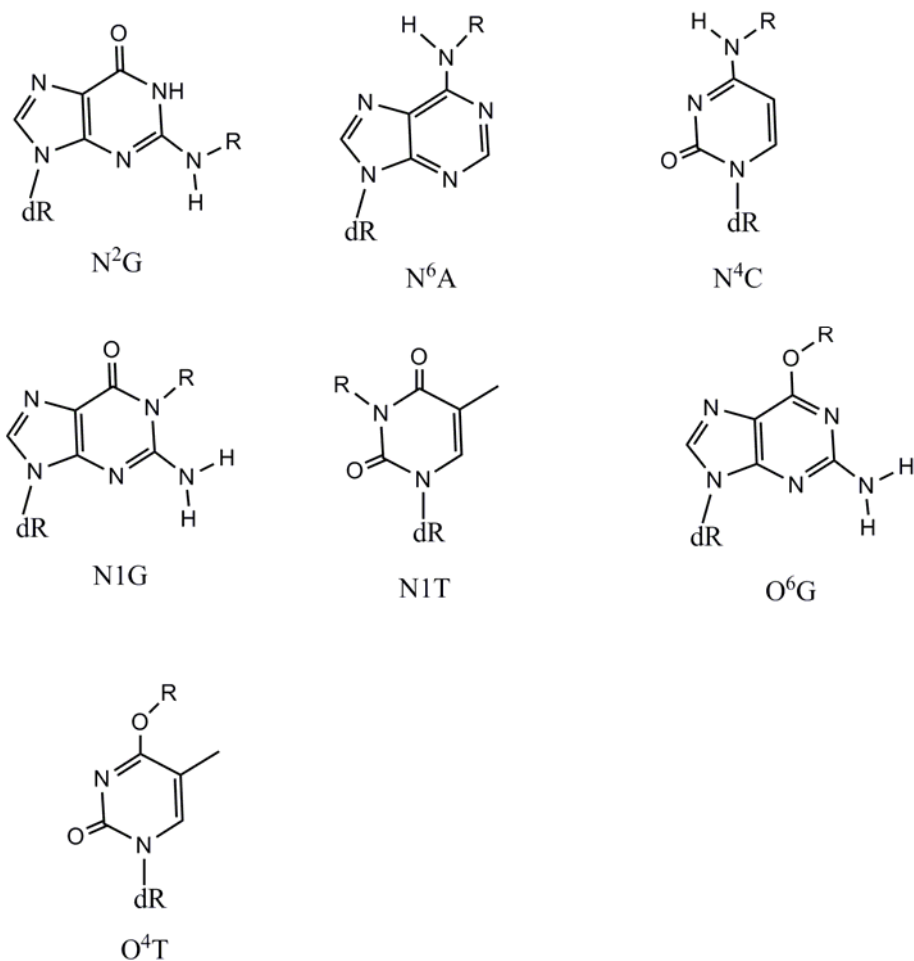


**Slika 16.** Vezivanje alkilujućeg agensa za fosfodiesteranu vezu i N7 atom guanina



**Shema 5.** Deglikozilovanje (depurinacija)

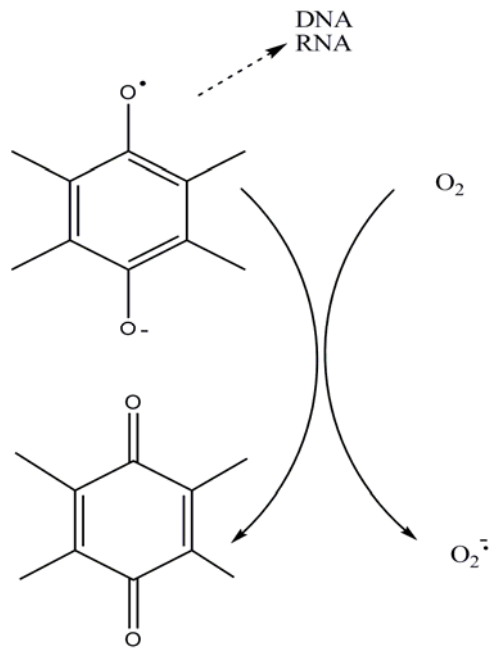
Mogu se alkilovati i drugi atomi poput N<sup>2</sup>G, N<sup>6</sup>A, N<sup>4</sup>C i amidnih azota N1G i N1T ali i O<sup>6</sup>G i O<sup>4</sup>T pri čemu se dobijaju stabilni DNA adukti (slika 17).



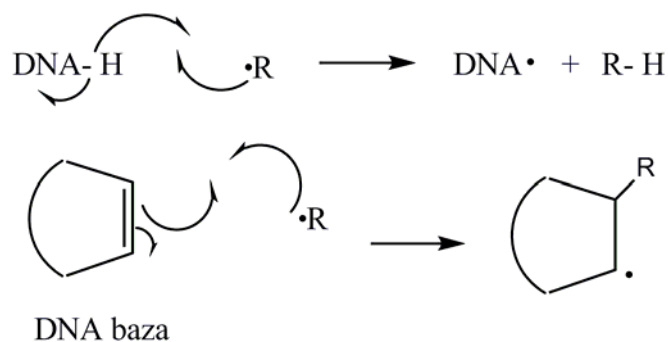
**Slika 17.** Stabilni DNA adukti dobijeni nakon alkilovanja DNA

### 2.6.2 Reakcije radikala sa DNA

Hinonski antitumorski agensi se intracelularno mogu konvertovati u slobodne radikale. Ovi semihinonski slobodni radikali mogu ili direktno stupiti u reakciju sa molekulima DNA ili generisati reaktivne kiseonične radikalske vrste, u prvom redu superoksidni anjon-radikal ili hidroksilni radikal (shema 6)<sup>62</sup>. Ovako nastali radikali mogu da sa molekulom DNA reaguju dvostruko: ili apstrahuju vodonik sa šećerne komponente DNA ili reaguju sa dvostrukom vezom na nukleobazi (shema 7).



**Shema 6.** Generisanje superoksid anjon-radikala iz semihinonskog anjon-radikala

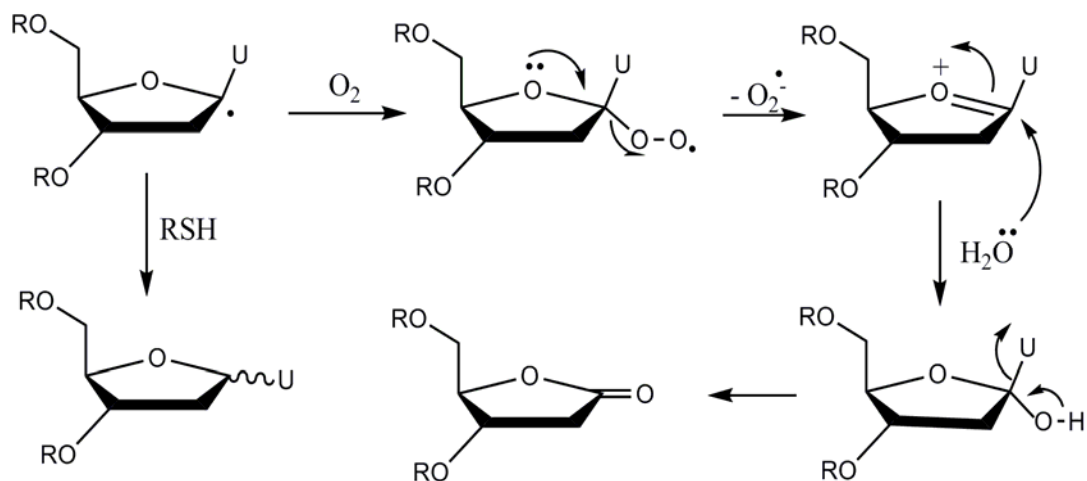


**Shema 7.** Moguće reakcije radikala i molekula DNA

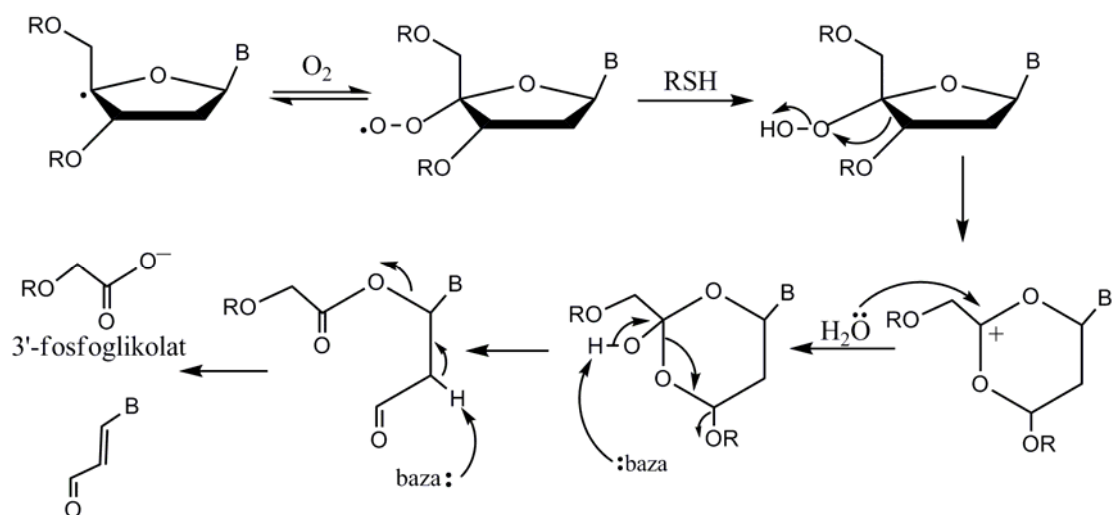
### 2.6.2.1 Apstrakcija vodonika sa šećerne komponente DNA

U prisustvu radikala, može doći do apstrakcije vodonika sa šećerne komponente molekula DNA, bilo da se vodonik apstrahuje sa C1' ili sa C4' atoma deoksiriboze (shema 8 i shema 9), što dovodi do generisanja radikala 2-deoksiriboze. Stvoreni radikal 2-deoksiriboze u ćeliji može reagovati ili sa molekulskim kiseonikom (koncentracija u ćeliji 60-100  $\mu\text{M}$ ) ili sa tiolima, u prvom redu glutationom (koncentracija u ćeliji 1-10 mM)<sup>63</sup>.





**Shema 8.** Apstrakcija vodonika sa C1' atoma, generisanje peroksi-radikala i narušavanje strukture molekula DNA uz eliminaciju nukleobaze

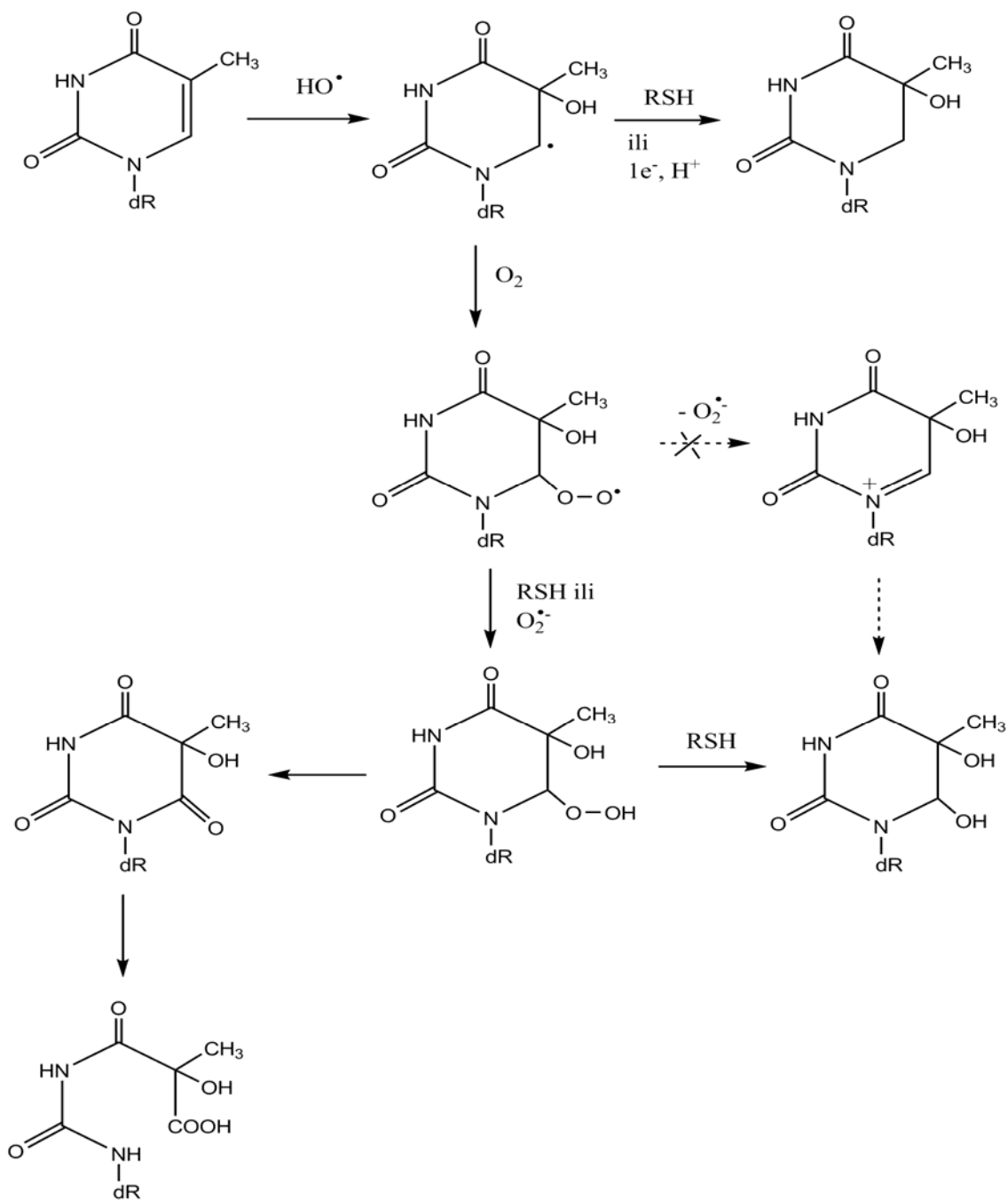


**Shema 9.** Apstrakcija vodonika sa C4' atoma, Criegee-ovo premeštanje i narušavanje strukture molekula DNA uz generisanje 3'-fosfoglikolata i propenala nukleobaze

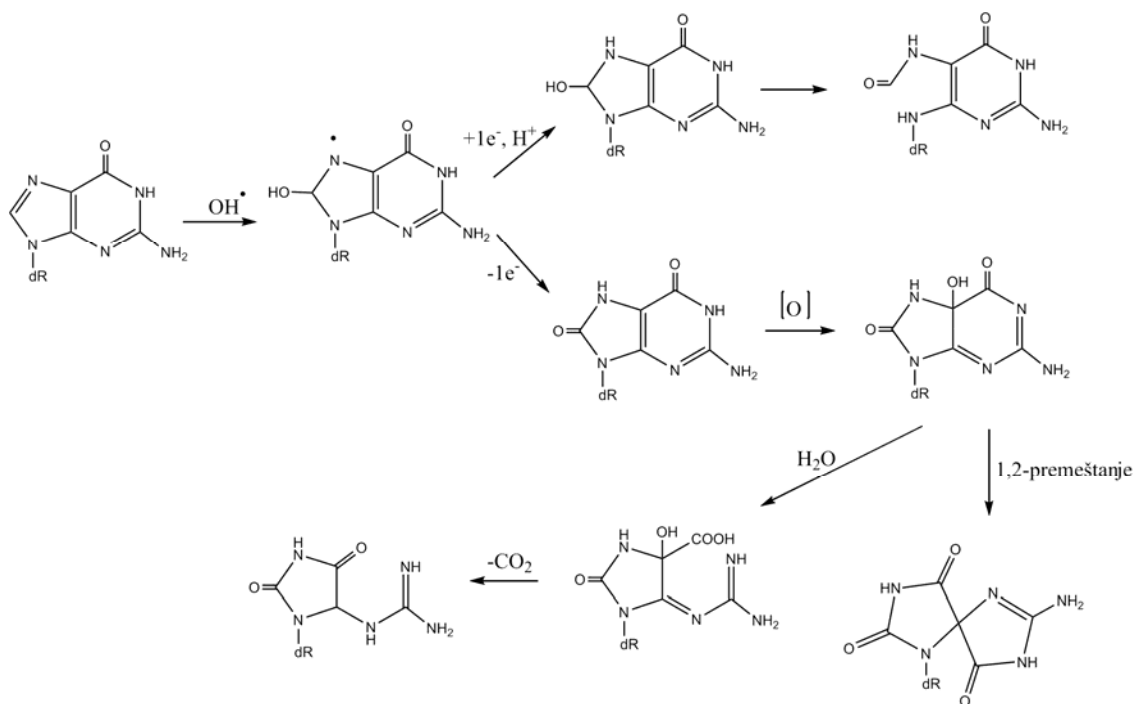
Mehanizam apstrakcije vodonika sa C4' atoma predstavlja jednu od reakcija narušavanja strukture DNA molekula<sup>64</sup>. Propenal nukleobaze koji nastaje pri ovoj reakciji, može uslovno delovati kao malondialdehid i prouzrokovati dalja oštećenja molekula DNA kovalentnom modifikacijom guanina<sup>65</sup>.

### 2.6.2.2 Reakcija radikala sa nukleobazom

Radikali radije reaguju sa heterocikličnim bazama DNA nego sa njenom šećernom komponentom. Oštećenja DNA u prisustvu radikala najčešće se uočavaju u reakcijama sa timidinom i guanozinom (shema 10 i shema 11). Na shemama su data najzastupljenija oksidativna oštećenja DNA koja ilustruju opštu vrstu reakcija koje se najčešće javljaju posle napada radikala na nukleobaze.



Shema 10. Oštećenja DNA u reakciji hidroksil radikala i timidina



**Shema 11.** Oštećenja DNA u reakciji dezoksiguanozina i hidroksil radikala

Pod određenim uslovima, moguće su i takozvane tandemne reakcije između inicijalno stvorenih radikala na molekulu DNA i nukleinskih baza unutar molekula DNA. Ove reakcije su slabo proučene usled velike brzine odigravanja intramolekulskih radikalnih reakcija.

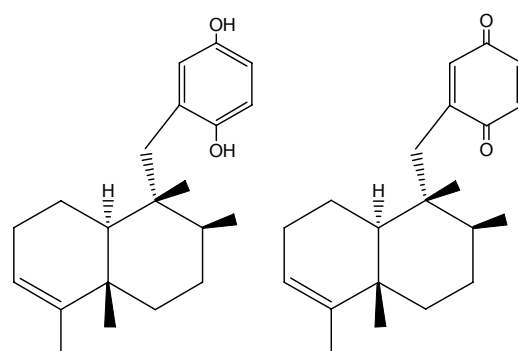
### 3. NAŠI RADOVI

#### 3.1 Sinteza derivata

Iz mediteranskog suđera *Dysidea avara* (slika 18) izolovani su seskviterpenski hidrohionon avarol i u minimalnoj količini odgovarajući hinon avaron (slika 19). Avarol je oksidovan srebro-oksikom u avaron koji je kasnije korišćen za sintezu izabranih hinonskih derivata.



Slika 18. *Dysidea avara*

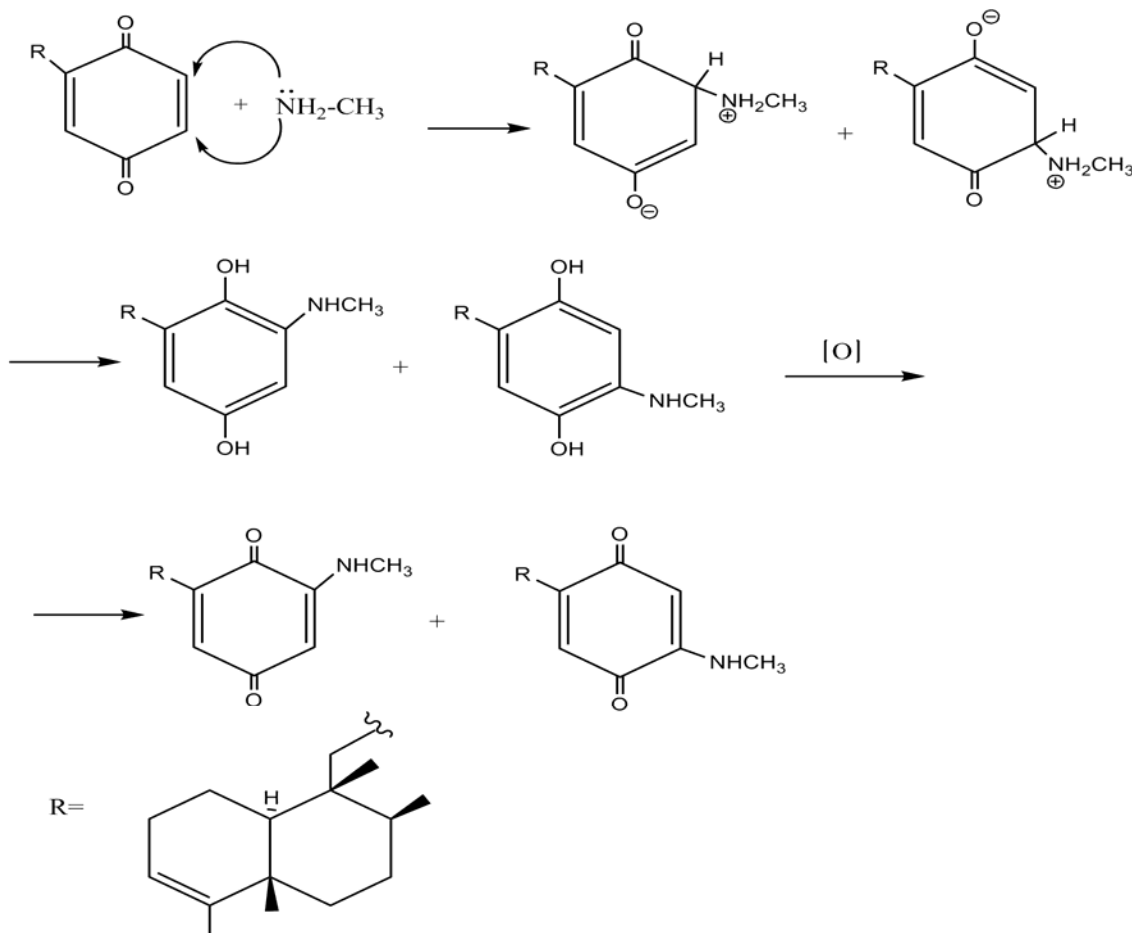


Slika 19. Avarol i avaron

Sinteza metilamino-derivata avarona izvođena je reakcijom avarona i metilamin-hidrohlorida u sistemu EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1) uz dodatak piridina radi povećanja koncentracije nukleofila. Reakcija se odvijala na sobnoj temperaturi 16 h, uz mešanje.

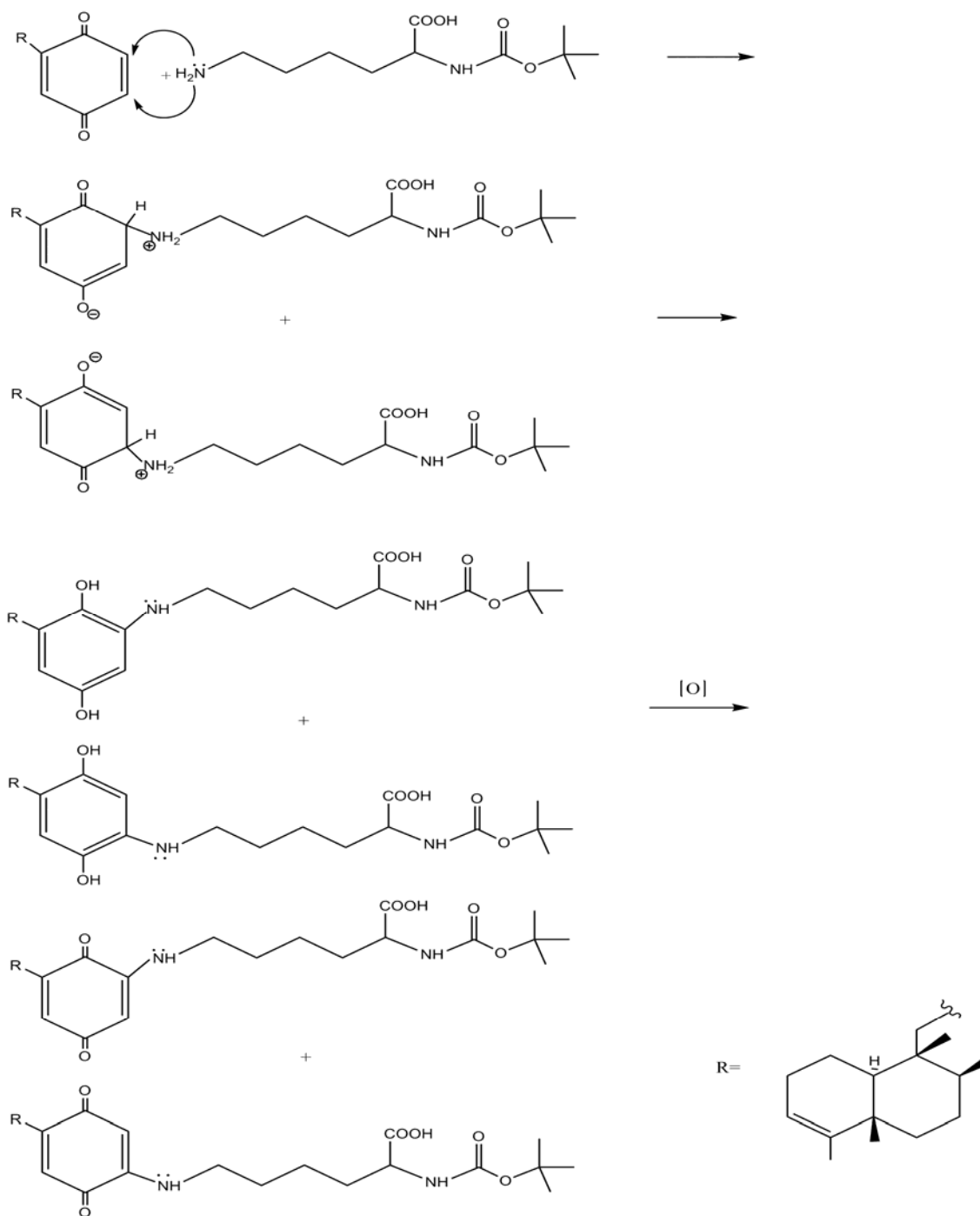
Metilamino-derivati dobijaju se Michael-ovom adicijom metilamina na hinonsko jezgro avarona<sup>66</sup>. Kao proizvod reakcije se dobija smesa 3'- i 4'-(metilamino)-avarola koja se spontano oksiduje viškom hinona u smesu odgovarajućih avaronskih derivata. Dobijena smeša derivata je razdvojena hromatografijom na koloni silika-gela pri čemu

su izolovana oba proizvoda: 4'-(metilamino)avaron u prinosu od 34% i 3'-(metilamino)-avaron u prinosu od 27%. Mehanizam reakcije predstavljen je na slici 20.



**Slika 20.** Mehanizam nukleofilne adicije alkanamina na avaron

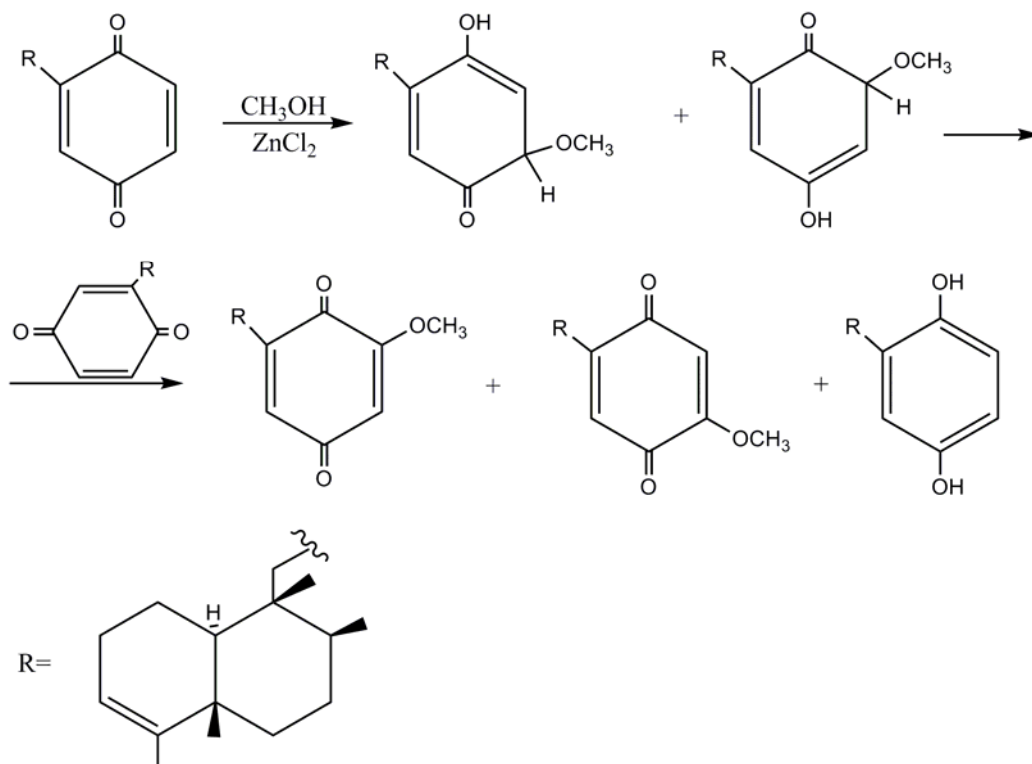
Sinteza 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avarona izvođena je u 20% EtOH uz dodatak 50 mM NaHCO<sub>3</sub> zbog povećanja nukleofilnosti ε-amino grupe zaštićenog lizina. Reakcija se odvijala 48 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Dobijena smeša derivata je razdvajana višestrukim hromatografijama na koloni silika-gela, a konačno prečišćena preparativnom tankoslojnom hromatografijom na silika-gelu u metanolu. Izolovan je 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avaron u prinosu od 40% dok se 3'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avaron dobija u zanemarljivom prinosu. Mehanizam reakcije predstavljen je na slici 21.



**Slika 21.** Mehanizam adicije zaštićenog lizina na avaron

Za dobijanje metoksi-derivata korišćena je reakcija alkoksilovanja metanolom u prisustvu  $ZnCl_2$ <sup>67</sup>. Reakciono vreme je bilo 2 h, dok je reakciona temperatura podešena tako da smesa sve vreme lagano refluktuje. Kao proizvod reakcije dobija se 3'-metoksi-avaron u prinosu od 72%. Moguće je i stvaranje 4'-metoksi derivata, ali je on dobijen u

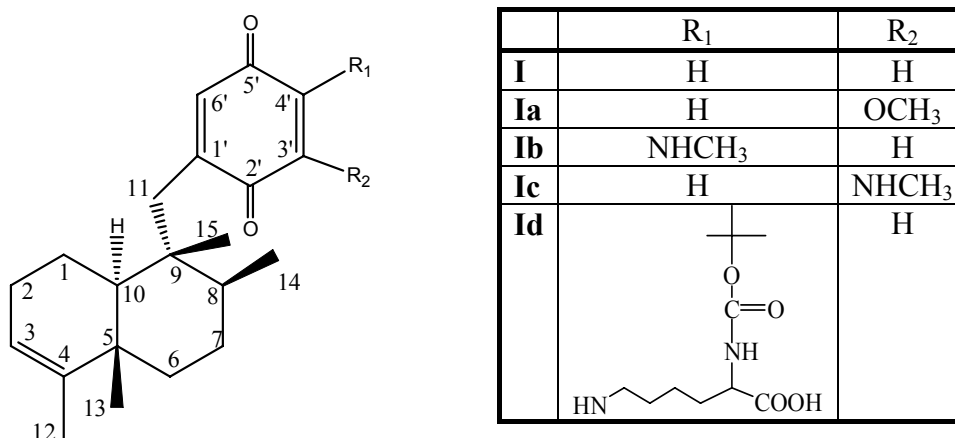
zanemarljivoj količini (u prinosu ispod 5%). Mehanizam ove reakcije predstavljen je na slici 22.



**Slika 22.** Mehanizam nukleofilne adicije metanola na avaron

## 3.2 Karakterizacija sintetisanih derivata

Svi sintetisani derivati (slika 23) okarakterisani su  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , masenim i UV/Vis spektrima.



Slika 23. Strukture seskviterpenskih hinona

### 3.2.1 Karakterizacija 4'-(metilamino)-avarona

$^1\text{H-NMR}$ : Hinonski protoni se nalaze na  $\delta$  (H-3') 5,43 i  $\delta$  (H-6') 6,34 kao singleti, što ukazuje na supstituciju u položaju 4'. Olefinski proton iz terpenskog dela molekula nalazi se na  $\delta$  5,14 i daje široki singlet. Protoni iz metil grupe vezane za atom azota daju dublet na  $\delta$  2,84 ( $J=5,6$  Hz), dok proton na azotu daje široki kvartet na  $\delta$  5,58. Protoni na metilenskom mostu, usled geminalnog sprežanja daju dva dubleta na  $\delta$  2,46 i  $\delta$  2,67 ( $J=13$  Hz). Na  $\delta$  1,00 je singlet koji potiče od 3H, C13-H, dok singlet na  $\delta$  0,85 potiče od 3H, C15-H. Protoni 3H, C14-H daju dublet na  $\delta$  0,94 ( $J=6$  Hz). Multiplet na  $\delta$  1,1-2,0 odgovara protonima iz terpenskog dela molekula.

$^{13}\text{C-NMR}$ : Hemijska pomeranja ugljenika u terpenskom delu molekula su određena poređenjem sa spektrom dimetil-etra avarola<sup>68</sup>.



Pomeranja u terpenskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1	27,46	6	28,83	11	38,46
2	26,44	7	22,62	12	18,01
3	120,70	8	37,27	13	19,32
4	142,95	9	32,85	14	16,75
5	35,63	10	49,29	15	19,96

Pomeranja u hinonskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1'	147,06	4'	151,32	7'	29,63
2'	183,47	5'	185,18		
3'	131,71	6'	143,96		

MS: U masenom spektru javljaju se molekularni jon 341 i M+1 jon 342 jakog intenziteta.

UV/Vis: U spektru snimljenom u etanolu, javljaju se dva maksimuma u UV oblasti na 225 nm ( $\epsilon=1,68 \cdot 10^5 \text{ dm}^2/\text{mol}$ ) i na 255 nm ( $\epsilon=1,4 \cdot 10^5 \text{ dm}^2/\text{mol}$ ) i jedan u VIS oblasti na 492 nm ( $\epsilon=4,4 \cdot 10^4 \text{ dm}^2/\text{mol}$ ).

Izmerena vrednost  $[\alpha]_D^{20}$  za 4'-(metilamino)-avaron u hloroformu je  $+116,25^\circ$  (koncentracija  $8 \cdot 10^{-4} \text{ g/mL}$ ).

### 3.2.2 Karakterizacija 3'-(metilamino)-avarona

$^1\text{H-NMR}$ : Hinonski protoni se nalaze na  $\delta$  (H-4') 5,41 i  $\delta$  (H-6') 6,38 kao dubleti, usled njihovog  $^4\text{J}$  sprezanja ( $J=2,4 \text{ Hz}$ ), što ukazuje na supstituciju u položaju 3'. Na  $\delta$  5,13 široki singlet daje olefinski proton iz terpenskog dela molekula. Protoni iz metil grupe vezane za atom azota daju dublet na  $\delta$  2,84 ( $J=5,2 \text{ Hz}$ ), dok proton na azotu daje široki kvartet na  $\delta$  5,7. Protoni na metilenskom mostu, usled geminalnog sprezanja daju dva dubleta na  $\delta$  2,46 i  $\delta$  2,67 ( $J=13,8 \text{ Hz}$ ). Na  $\delta$  0,99 je singlet koji potiče od 3H, C13-H dok singlet na  $\delta$  0,83 potiče od 3H, C15-H. Protoni 3H, C14-H daju dublet na

$\delta$  0,92 ( $J=6,2$  Hz). Multiplet na  $\delta$  1,1-2,0 odgovara protonima iz terpenskog dela molekula.

$^{13}\text{C}$ -NMR: Hemijska pomeranja ugljenika u terpenskom delu molekula su određena poređenjem sa spektrom dimetil-etra avarola<sup>68</sup>.

Pomeranja u terpenskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1	28,02	6	29,10	11	38,35
2	27,30	7	26,44	12	17,99
3	120,59	8	36,44	13	19,94
4	141,26	9	32,78	14	16,75
5	35,93	10	46,63	15	20,52

Pomeranja u hinonskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1'	143,95	4'	147,81	7'	29,63
2'	183,55	5'	185,48		
3'	139,83	6'	142,06		

MS: U masenom spektru javljaju se molekulski jon 341 i M+1 jon 342 jakog intenziteta.

UV/Vis: U spektru snimljenom u etanolu, javljaju se dva maksimuma u UV oblasti na 225 nm ( $\epsilon=2,53 \cdot 10^5$  dm<sup>2</sup>/mol) i na 258 nm ( $\epsilon=2,86 \cdot 10^5$  dm<sup>2</sup>/mol) i jedan u vidljivoj oblasti na 497 nm ( $\epsilon=5,53 \cdot 10^4$  dm<sup>2</sup>/mol).

Izmerena vrednost  $[\alpha]_D^{20}$  za 3'-(metilamino)-avaron u hloroformu je +120° (koncentracija  $5 \cdot 10^{-4}$  g/mL).

### 3.2.3 Karakterizacija 3'-metoksi-avarona

$^1\text{H}$ -NMR: Hinonski protoni se nalaze na  $\delta$  (H-4') 5,87 i  $\delta$  (H-6') 6,43 kao dubleti, usled njihovog  $^4\text{J}$  sprežanja ( $J=2,2$  Hz), što ukazuje na supstituciju u položaju 3'. Olefinski proton iz terpenskog dela molekula se nalazi na  $\delta$  5,14. Protoni na

metilenskom mostu, usled geminalnog sprezanja daju dva dubleta na  $\delta$  2,47 i  $\delta$  2,65 ( $J=13,6$  Hz). Na  $\delta$  1,00 je singlet koji potiče od 3H, C13-H, dok singlet na  $\delta$  0,85 potiče od 3H, C15-H. Protoni 3H, C14-H daju dublet na  $\delta$  0,95 ( $J=6,0$  Hz). Multiplet na  $\delta$  1,1-2,0 odgovara protonima iz terpenskog dela molekula. Protoni iz metil grupe vezane za atom kiseonika daju singlet na  $\delta$  3,81.

$^{13}\text{C}$ -NMR: Hemijska pomeranja ugljenika u terpenskom delu molekula su određena poređenjem sa spektrom dimetil-etra avarola<sup>68</sup>.

Pomeranja u terpenskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1	32,65	6	29,95	11	37,89
2	27,86	7	26,36	12	17,97
3	120,89	8	38,38	13	19,94
4	143,89	9	32,65	14	16,61
5	35,01	10	48,34	15	19,23

Pomeranja u hinonskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1'	144,93	4'	106,90	7'	56,26
2'	182,04	5'	187,24		
3'	158,97	6'	136,76		

MS: U masenom spektru postoji M–MeOH jon na 313 jakog intenziteta. Molekulski jon se ne javlja.

UV/Vis: U spektru snimljenom u etanolu, javljaju se dva maksimuma u UV oblasti na 220 nm ( $\epsilon=8,74 \cdot 10^5$  dm<sup>2</sup>/mol) i na 285 nm ( $\epsilon=8,13 \cdot 10^5$  dm<sup>2</sup>/mol) i jedan u vidljivoj oblasti na 398 nm ( $\epsilon=5,53 \cdot 10^4$  dm<sup>2</sup>/mol).

Izmerena vrednost  $[\alpha]_D^{20}$  u hloroformu je bila  $+21,11^\circ$  (koncentracija  $9 \cdot 10^{-4}$  g/mL).

### 3.2.4 Karakterizacija 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)-amino)avarona

Za derivat 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avarona,  $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$  spektri su snimljeni u metanolu.

$^1\text{H-NMR}$ : Hinonski protoni se nalaze na  $\delta$  (H-3') 5,40 i  $\delta$  (H-6') 6,32 kao singleti, što ukazuje na supstituciju u položaju 4'. Olefinski proton iz terpenskog dela molekula nalazi se na  $\delta$  5,11 i daje široki singlet. Protoni na metilenskom mostu, usled geminalnog sprežanja daju dva dubleta na  $\delta$  2,50 i  $\delta$  2,57 ( $J=6,6$  Hz). Na  $\delta$  1,01 je singlet koji potiče od 3H, C13-H, singlet na  $\delta$  1,51 daju 3H, C12-H, dok singlet na  $\delta$  0,85 potiče od 3H, C15-H. Protoni 3H, C14-H daju dublet na  $\delta$  0,94 ( $J=6,2$  Hz). Na  $\delta$  1,42 nalaze se protoni metil grupa iz Boc-a. Široki signal na  $\delta$  3,95 daje proton sa  $\alpha$ -C atoma vezanog za COOH. Na  $\delta$  3,13 je široki signal koji potiče od 2H sa C atoma direktno vezanog za  $\epsilon$ -amino grupu lizina. Multiplet na  $\delta$  1,1-2,0 odgovara protonima iz terpenskog dela molekula i protonima iz lizinskog dela molekula.

$^{13}\text{C-NMR}$ : Hemijska pomeranja ugljenika u terpenskom delu molekula su određena poređenjem sa spektrom dimetil-etra avarola<sup>68</sup>.

Pomeranja u terpenskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1	28,68	6	30,74	11	39,53
2	27,41	7	20,49	12	17,36
3	121,61	8	37,46	13	18,08
4	144,03	9	33,87	14	17,17
5	36,04	10	skriven	15	18,30

Pomeranja u hinonskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1'	149,71	4'	152,40
2'	184,41	5'	184,76
3'	133,25	6'	145,12

Pomeranja u lizinskom delu molekula:

C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$	C	$\delta_c(\text{ppm})$
1"	43,50	4"	38,44	7"	157,81
2"	24,27	5"	57,05	8"	80,04
3"	23,38	6"	179,50	9",10",11"	28,79

MS: U masenom spektru javlja se molekulski jon  $M+Na+1$  na 579 slabog intenziteta.

UV/Vis: U spektru snimljenom u metanolu, javljaju se dva maksimuma u UV oblasti na 225 nm ( $\epsilon=2,53 \cdot 10^5 \text{ dm}^2/\text{mol}$ ) i na 258 nm ( $\epsilon=2,86 \cdot 10^5 \text{ dm}^2/\text{mol}$ ) i jedan u vidljivoj oblasti na 497 nm ( $\epsilon=5,53 \cdot 10^4 \text{ dm}^2/\text{mol}$ ).

Elementalna analiza:  $C_{32}H_{48}N_2O_6$  ( $M_r=556,7$ )

Izračunate vrednosti C (69,04), H (8,69), N (5,03)

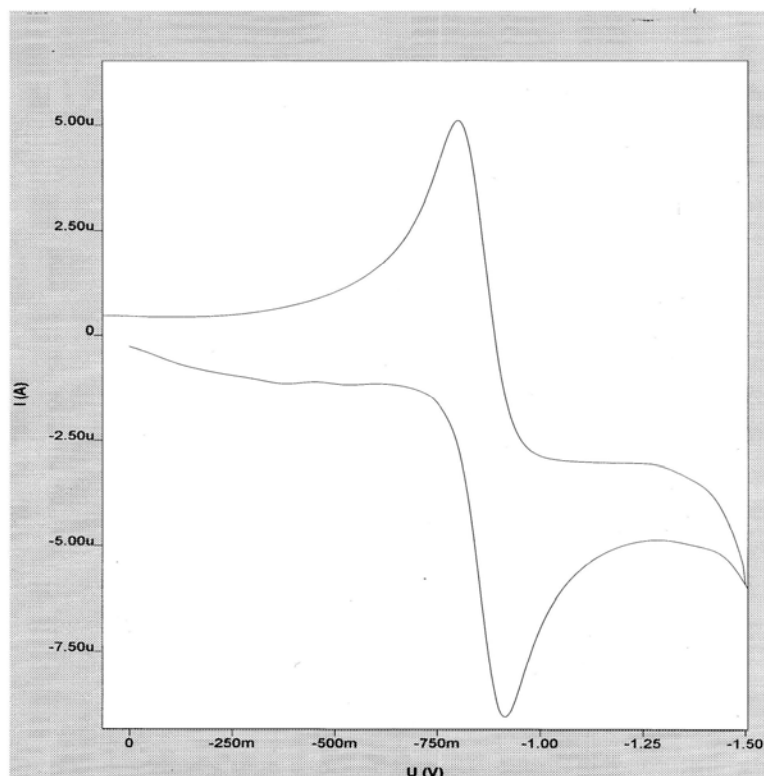
Nađene vrednosti C (69,01), H (8,76), N (4,97)

Izmerena vrednost  $[\alpha]_D^{20}$  za 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)-amino)avaron je  $-39^\circ$  (koncentracija  $1 \cdot 10^{-3} \text{ g/mL}$  u metanolu).

Tačka topljenja jedinjenja je  $129-131^\circ\text{C}$ .

### 3.2.5 Elektrohemijaska karakterizacija avarona i njegovih derivata

Avaronu i dobijenim derivatima određen je polutaladni potencijal prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi. Ispitivani hinoni su rastvoreni u prečišćenom acetonitrilu u koncentracijama od 1-3 mM. Merenja su rađena u atmosferi azota na  $25^\circ\text{C}$ , kao elektrolit je korišćen tetraetilamonijum-perhlorat dok je radna elektroda bila rotaciona platinska disk elektroda. Za sva ispitivana jedinjenja uočeno je da na voltogramu imaju dva redukciona talasa, pri čemu je prvi reverzibilan (slika 24). Dobijene vrednosti polutalasnog potencijala date su u tabeli 1.



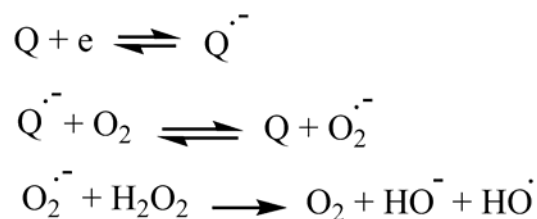
Slika 24. Ciklični voltamogram za 4'-(metilamino)-avaron

Tabela 1. Polutaladni potencijali avarona i njegovih derivata

Jedinjenje	Oznaka	$E_{p/2}$ (V) <sup>a</sup>
Avaron	<b>I</b>	-0,53
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b>	-0,66
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b>	-0,85
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b>	-0,84

<sup>a</sup> – u odnosu na ZKE

Na osnovu dobijenih vrednosti za polutaladni potencijal, moglo bi se zaključiti da derivati **Ia—c** budući da imaju negativniji polutaladni potencijal od avarona, mogu lakše generisati radikalske vrste: semihinonski anjon-radikal, superoksidni anjon-radikal, hidroksil radikal<sup>16</sup> (shema 12).



**Shema 12.** Generisanje radikalskih vrsta

S obzirom na to da na biološku aktivnost hinonskih jedinjenja utiču sposobnost stvaranja slobodnih radikala i mogućnost nukleofilne adicije biomakromolekula na hinonsko jezgro, dobijene vrednosti za polutaladni potencijal mogu samo delimično da objasne i predvide aktivnost i toksičnost dobijenih derivata avarona.

### 3.3 Ispitivanje biološke aktivnosti

#### 3.3.1 Određivanje antibakterijskog i antifungalnog dejstva hinonskih derivata

Antibakterijsko dejstvo je određivano prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama kao i prema sojevima gljivica. U eksperimentu su korišćene sledeće gram-pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Streptosporangium longisporum*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea* i *Staphylococcus aureus* i gram-negativne bakterije: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* i *Escherichia coli*. Izabrani sojevi gljivica bili su: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*.

Za određivanje antibakterijskog dejstva korišćena je disk-difuziona metoda. Na papirne diskove prečnika 8 mm naneti su avaron i njegovi derivati rastvoreni u DMSO-u u koncentraciji 1 mg/disk. Kontrolna proba je disk na koji je nanesen DMSO dok je slepa proba prazan disk. Hranljivi agar napravljen prema propisu proizvođača se zaseje bakterijama i na njega se postave pripremljeni diskovi.

Nakon termostatisiranja 24 h na 37 °C za bakterijske sojeve i 48 h na 30 °C za sojeve gljivica, određena je zona inhibicije za sve derivate. Kao kontrolni antibiotik

korišćen je tetraciklin, a kao kontrolni antimikotik nistatin. Rezultati antibakterijske i antifungalne aktivnosti se nalaze u tabelama 2 i 3, redom.

**Tabela 2.** Antibakterijske aktivnosti avarola, avarona i njegovih derivata

Bakterija	Prečnik zone inhibicije (mm)						
	Avarol	I	Ia	Ib	Ic	Slepa proba	Tetraciklin
<i>C. sporogenes</i>	16	22	18	0	11	0	24
<i>M. flavus</i>	16	22	14	0	12	0	27
<i>S. aureus</i>	18	18	15	0	10	0	24
<i>E. coli</i>	17	20	19	0	0	0	14
<i>K. pneumonia</i>	15	17	13	0	0	0	23
<i>P. aeruginosa</i>	16	21	15	0	14	0	25
<i>S. enteritidis</i>	18	23	17	0	16	0	25
<i>P. vulgaris</i>	16	25	18	0	0	0	26
<i>S. longisporum</i>	17	22	15	0	11	0	24
<i>B. subtilis</i>	17	16	14	0	11	0	25
<i>S. lutea</i>	11	22	15	0	14	0	23

**Tabela 3.** Antifungalne aktivnosti avarola, avarona i njegovih derivata

Gljivice	Prečnik zone inhibicije (mm)						
	Avarol	I	Ia	Ib	Ic	Slepa proba	Nistatin
<i>A. niger</i>	14	16	13	0	0	0	17
<i>C. albicans</i>	15	16	14	0	0	0	18
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	0	0	0	0	15



### 3.3.2 Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja *Brine shrimp* testom

Citotoksičnost neke supstancije može se dovesti u korelaciju sa rezultatima *Brine shrimp* testa, odnosno sa smrtnošću račića *Artemia salina*<sup>69</sup>. Ovaj test citotoksičnosti je izabran zbog pokazanog dobrog slaganja ovih rezultata sa testovima antileukemijske aktivnosti na L5178y (ćelije mišjeg limfoma) i L1210 (ćelije leukemije)<sup>70</sup>. Rezultati se izražavaju kao statistički izračunata vrednost LC<sub>50</sub> u ppm. Rezultati ovog testa dati su u tabeli 4.

**Tabela 4.** Rezultati *Brine shrimp* testa

Jedinjenje		LC <sub>50</sub> (ppm)
Avaron	<b>I</b>	0,14
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b>	0,02
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b>	0,34
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b>	2,40

Analizom dobijenih rezultata može se videti da:

1. Sva jedinjenja osim jedinjenja **Ib** pokazuju antibakterijsku aktivnost prema izabranim sojevima bakterija
2. Osnovno jedinjenje, avaron, pokazuje najveću antibakterijsku aktivnost. Aktivnost prema soju *E. coli* za jedinjenja **I** i **Ia** je veća od aktivnosti kontrolnog antibiotika tetraciklina.
3. Uvođenje metilamino-supstituenta na avaronsko jezgro u položaj 4' dovodi do potpunog gubitka antibakterijske aktivnosti, dok se uvođenjem istog supstituenta u položaj 3' dobija jedinjenje aktivno prema većini izabranih bakterijskih sojeva.
4. Prema sojevima gljivica, aktivna su jedinjenja **I** i **Ia** dok jedinjenja **Ib** i **Ic** ne pokazuju antifungalnu aktivnost.
5. Aktivnost jedinjenja **I** prema sojevima *A. niger* i *C. albicans* je približno jednaka aktivnosti izabranog antimikotika nistatina.

6. Prema soju kvasca *S. cerevisiae* nijedno jedinjenje ne pokazuje aktivnost.
7. U *Brine shrimp* testu, jedinjenje **Ia** pokazuje najveću citotoksičnost. To je u skladu sa lakoćom stvaranja superoksidnih radikala<sup>71</sup> s obzirom na to da ima negativniji redoks potencijal od avarona.
8. Jedinjenja **Ib** i **Ic** pokazuju manju citotoksičnost od avarona. Smanjenje citotoksičnosti ovih derivata ne može se objasniti smanjenom brzinom stvaranja superoksidnih anjon-radikala jer je redoks-potencijal ovih derivata negativniji od avarona. Ovakva odstupanja javljala su se i kod nekih ranije sintetisanih derivata avarona<sup>72</sup>. S obzirom na to da na ukupnu biološku aktivnost i citotoksičnost utiču istovremeno i stvaranje superoksidnog anjon-radikala i mogućnost alkilovanja ćelijskih nukleofila, dobijeni rezultati bi se mogli objasniti mehanizmom nukleofilne adicije. Očigledno je da položaj supstituenta na hinonskom jezgru ima uticaj na sledeću nukleofilnu adiciju na hinonsko jezgro što uzrokuje razliku u citotoksičnosti ovih metilamino-derivata.

### 3.3.3 Ispitivanje antitumorskog dejstva

U ovim eksperimentima određena je antitumorska aktivnost avaronskih derivata prema osam ćelijskih linija ljudskog raka, kao i citotoksičnost na limfocite PBMC (mononuklearne ćelije periferne krvi), nestimulisane i stimulisane fitohemaglutininom u cilju pojačanog imunog odgovora. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 5) određene su IC<sub>50</sub> vrednosti (koncentracija agensa pri kojoj se ćelijska populacija smanji na polovinu) karakteristične za citotoksično dejstvo derivata prema neoplastičnim ćelijskim linijama raka grlića materice (HeLa), melanoma (Fem-X), leukemije (K562), raka dojke pozitivnog za estrogenski receptor (MCF7), raka dojke negativnog za estrogenski receptor (MDA-MB-231), raka pluća (MRC5), leukemije T-ćelija (Jurkat) i promijelocitne leukemije (HL60).

**Tabela 5.** Antitumorska aktivnost avarola, avarona i njegovih derivata

Jedinjenje	IC <sub>50</sub> (μM)								
	HL60	Jurkat	MDA-MB-231	MCF7	MRC5	HeLa	Fem-X	K562	
Avarol	37,82	4,67	61,07	> 100	> 100	19,7	21,7	7,30	
Avaron	<b>I</b>	31,75	9,87	26,84	9,87	> 100	26,8	23,9	4,90
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b>	23,33	8,26	2,07	13,71	> 100	13,31	9,84	2,12
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b>	24,58	9,27	41,81	11,68	> 100	12,56	2,41	9,31
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b>	45,16	19,12	> 100	8,78	> 100	11,28	5,25	3,61

Dobijeni rezultati se mogu sumirati u nekoliko tačaka:

1. Svi derivati pokazuju aktivnost prema ispitivanim ćelijama raka, osim prema ćelijama raka pluća (MRC5), što opravdava njihovu sintezu u cilju dobijanja novih biološki aktivnih jedinjenja<sup>73</sup>.
2. Generalno, ispitivana jedinjenja pokazuju određenu selektivnost prema ćelijama leukemije (K562) i leukemije T-ćelija (Jurkat), pri čemu najveću aktivnost pokazuje jedinjenje **Ia**. Osim jedinjenja **Ic**, aktivnost svih ostalih derivata prema ćelijama Jurkat i K562 je manja od 10 μM što predstavlja jako dobru antitumorsku aktivnost. Poređenja radi, za komercijalne antitumorske agense topotekan, gemcitabin i paklitaksel prema ćelijama Jurkat dobijene IC<sub>50</sub> vrednosti su u opsegu 15-20 μM dok prema istim ćelijama cisplatin ima IC<sub>50</sub> vrednost 9,2 μM<sup>74</sup>.
3. Svi sintetisani derivati imaju prema ćelijama melanoma (Fem-X) i ćelijama raka materice (HeLa) veću aktivnost od avarola i avarona. Prema Fem-X ćelijama, jedinjenje **Ib** pokazuje najveću aktivnost. Vrednost IC<sub>50</sub> za ovo jedinjenje (2,41 μM) je manja od IC<sub>50</sub> vrednosti za komercijalna jedinjenja korišćena pri lečenju melanoma daunorubicin (12 μM), karmustin (37 μM), gosipol (8,2 μM), dok jedinjenje vinblastin (0,4 μM) pokazuje izuzetnu selektivnost prema ćelijama melanoma<sup>75</sup>.

4. Prema ćelijama promijelocitne leukemije (HL60) sva jedinjenja pokazuju sličnu aktivnost.
5. Jedinjenje **Ia** pokazuje najveću aktivnost prema ćelijama raka dojke negativnim za estrogenski receptor (MDA-MB-231). Njegova aktivnost je 2  $\mu$ M, dok ostala jedinjenja pokazuju umerenu ili slabu aktivnost.

Avarolu, avaronu i derivatima avarona određena je citotoksičnost prema limfocitima (PBMC) nakon 72 h kontinuiranog dejstva (tabela 6).

**Tabela 6.** Citotoksično dejstvo avarola, avarona i derivata na limfocite

		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	
		PBMC	PBMC+PHA <sup>b</sup>
Avarol		3,0 $\pm$ 1,7 (n=3) <sup>c</sup>	3,2 $\pm$ 2,0 (n=3)
Avaron	<b>I</b>	4,8 $\pm$ 2,7 (n=3)	4,5 $\pm$ 0,9 (n=3)
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b>	5,91 $\pm$ 0,44 (n=3)	5,47 $\pm$ 0,17 (n=3)
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b>	> 100 (n=3)	> 100 (n=3)
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b>	4,94 $\pm$ 0,31 (n=3)	4,23 $\pm$ 0,14 (n=3)

a - IC<sub>50</sub> je određivan sa n nezavisnih eksperimenata na PBMC dobijenim od različitih zdravih dobrovoljaca i izražen je u  $\mu$ M

b - fitohemaglutinin

c- broj određivanja

Analizom dobijenih rezultata može se videti da:

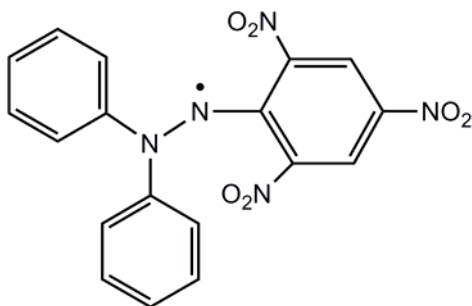
1. Derivat **Ib** ima najmanju citotoksičnost; vrednost njegove citotoksičnosti premašuje vrednost koju ima smisla određivati (>100). S obzirom na njegovu visoku selektivnost prema Fem-X ćelijama (2,41  $\mu$ M) i izuzetno nisku citotoksičnost, ovaj derivat je dobar kandidat za dalja ispitivanja.

2. Avarol, avaron i derivati **Ia** i **Ic** imaju sličnu citotoksičnost prema neoplastičnim ćelijama i prema ćelijama imunog sistema. Među njima, avarol ima najveću citotoksičnost, a osnovno jedinjenje avaron **I** ima jače citotoksično dejstvo od sintetisanih derivata.

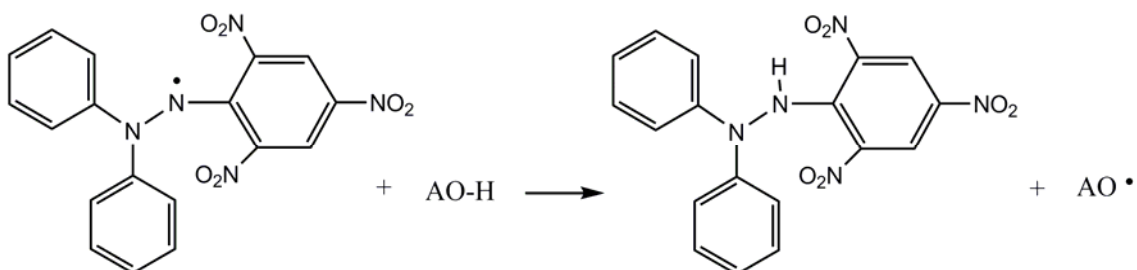
Dobijeni rezultati bioloških testova ne mogu se objasniti direktnom korelacijom sa elektrohemijskim parametrima. Naime, ispitivanjem biološke aktivnosti niza sintetisanih derivata avarona i model sistema *tert*-butil-1,4-benzohinona, javljala su se izvesna odstupanja koja su navodila na zaključak o istovremenom učešću dva mehanizma: stvaranje superoksidnih anjon-radikala i alkilovanje ćelijskih nukleofila. Očigledno je da se ova dva mehanizma međusobno ne isključuju. Naša pretpostavka je da u zavisnosti od uslova i prirode supstituenta na hinonskom jezgru, mogući napad ćelijskih nukleofila na hinonsko jezgro ubrzava stvaranje superoksidnih anjon-radikala što samim tim povećava citotoksičnost jedinjenja.

### 3.3.4 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost avarola, avarona i njegovih derivata ispitivana je DPPH testom<sup>76</sup>. Slobodni DPPH radikal (slika 25) je stabilizovan rezonancijom, u rastvoru je ljubičaste boje i može da reaguje sa potencijalnim antioksidativnim jedinjenjima. Ukoliko ima reakcije, dolazi do slabljenja ili gubitka ljubičaste boje rastvora sa slobodnim DPPH radikalom (shema 13) usled smanjenja količine prisutnog slobodnog radikala DPPH zbog vezivanja atoma vodonika. Antioksidativna moć avarola, avarona i njegovih derivata je praćena promenom apsorpcije na 517 nm i data je u tabeli 7.



Slika 25. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikal, DPPH



**Shema 13.** Princip ispitivanja antioksidativne aktivnosti jedinjenja DPPH testom

**Tabela 7.** Antioksidativna aktivnost avarola, avarona i njegovih derivata prema DPPH

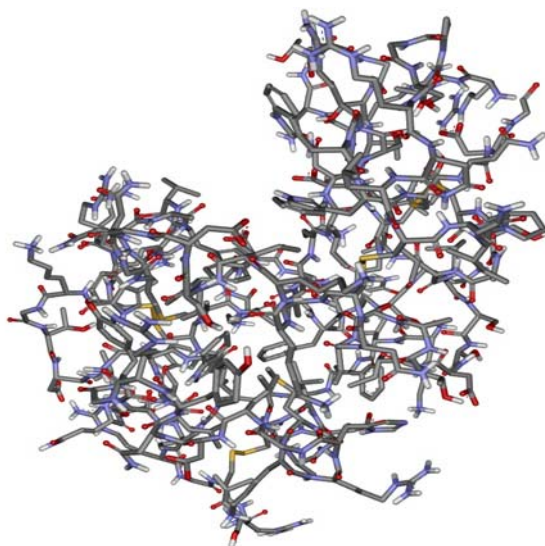
Jedinjenje	IC <sub>50</sub> (μM)
Avarol	244,89
Avaron	<b>I</b> 4013,26
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b> 4992,54
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b> 5695,23
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b> 5814,78
Trolox	0,25
BHT	1,49

Analizom dobijenih rezultata uočava se da avaron i sintetisani derivati imaju zanemarljivu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa standardnim antioksidativnim jedinjenjima troloxom (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) i BHT-om (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol). Rezultati nisu iznenađujući, jer u ispitivanim seskviterpenskim hinonskim jedinjenjima ne postoji deo molekula koji bi mogao da preda radikal vodonika prisutnom DPPH radikalumu. Dobijeni rezultati su u skladu sa našom pretpostavkom da radikalni mehanizam dejstva hinonskih jedinjenja počinje da bude dominantan tek nakon nukleofilnog napada nekog ćelijskog nukleofila, pri čemu nastaje semihinonski intermedijer, koji može biti donor vodoničnog radikala<sup>28</sup>. S obzirom na to da u sistemu ne postoje nukleofili već samo slobodni radikali DPPH, avaron i njegovi derivati bez inicijacije ne mogu da stvaraju slobodne radikale koji bi reagovali sa DPPH i na taj način slabili ljubičastu boju slobodnog radikala DPPH.

### 3.4 Hemijska modifikacija lizozima iz belanceta jajeta

Jedinjenja hinonske strukture, generalno, imaju sposobnost alkilovanja ćelijskih nukleofila. Da bismo utvrdili da li sintetisani derivati avarona mogu da reaguju ovim mehanizmom, kao ćelijski nukleofil izabrali smo model-enzim lizozim. Ovaj enzim je nađen u mnogim tkivima i biološkim fluidima uključujući suze, kolostrum, mleko, urin, nazalni sekret. Pronađen je u tkivima vodozemaca, mekušaca i insekata kao i u nekim biljkama poput papaje i smokve. Osim toga, uočeno je da određeni broj bakterija i gljivica, takođe, proizvodi lizozim<sup>77</sup>.

Za naša ispitivanja izabrali smo lizozim iz belanceta kokošijeg jajeta (slika 26).

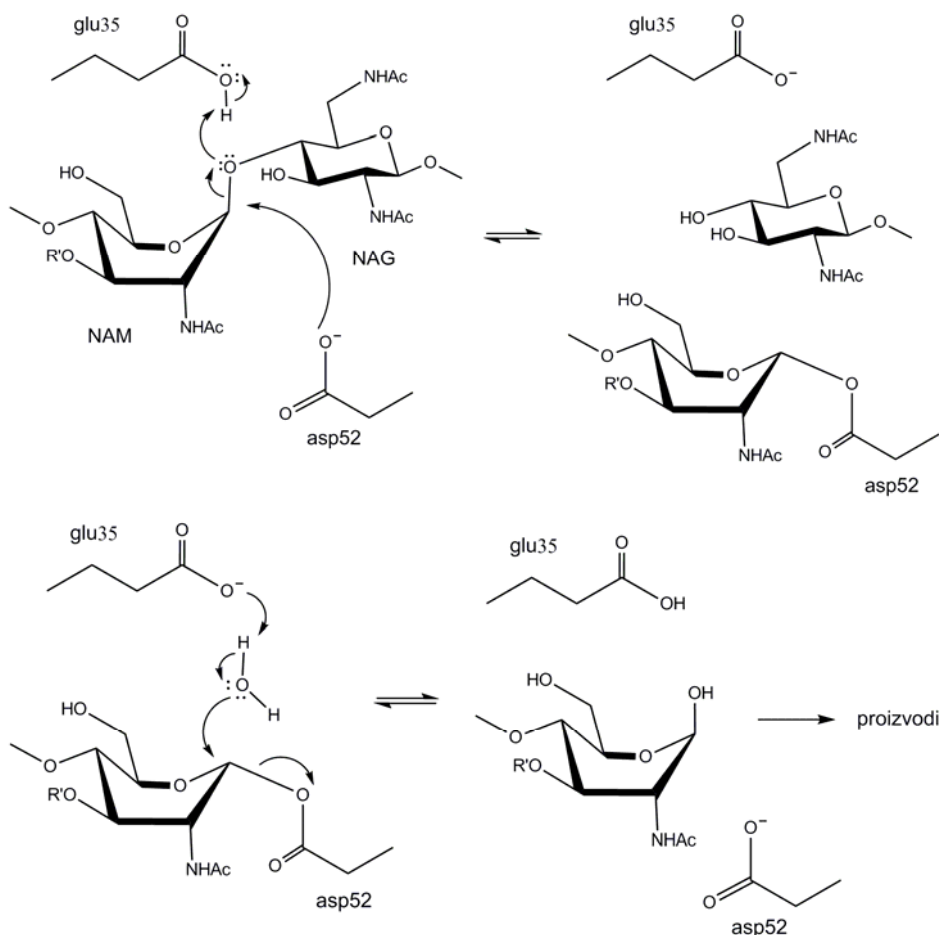


**Slika 26.** Lizozim

To je enzim koji se sastoji od 129 aminokiselinskih ostataka sa relativnom molekulskom masom od oko 14400 Da. Sadrži četiri disulfidna mosta, smeštena u unutrašnjost enzima i šest lizinskih aminokiselinskih ostataka, uglavnom smeštenih na hidrofilnoj površini enzima. Maksimum stabilnosti lizozima je na pH 5,5 dok je njegova izoelektrična tačka na pH 10,7 što ukazuje na veliki broj baznih aminokiselinskih ostataka.

Lizozim je enzim koji raskida strukturu peptidoglikana, glavnog sastojka ćelijskog zida bakterija, koji je sastavljen iz amino-šećera *N*-acetil-muraminske kiseline

i *N*-acetil-glukoamina. Osnovna veza između ovih komponenti u polisaharidu je  $\beta$ -glikozidna veza između C-1 *N*-acetil-muraminske kiseline i C-4 *N*-acetil-glukoamina, mada postoje i 1-3 i 1-6 veze između amino-šećera. Lizozim hidrolizuje  $\beta$  1-4 vezu (slika 27).



**Slika 27.** Način delovanja lizozima

Peptidoglikan formira glavni površinski sloj ćelijskog zida gram-pozitivnih bakterija pa su, samim tim, gram-pozitivne bakterije osjetljivije na dejstvo lizozima. I gram-negativne bakterije kao komponentu ćelijskog zida imaju peptidoglikan, ali se on nalazi ispod spoljašnje lipidne membrane ćelijskog zida, te su ove bakterije neosetljive na dejstvo lizozima. Za merenje biološke aktivnosti lizozima, koristi se bakterija osjetljiva na lizozim, *Micrococcus luteus* na pH 7,4.

Zbog antibakterijskog dejstva, lizozim se koristi u industriji hrane kao konzervans mesa, ribe, povrća, vina, sireva i mleka u prahu<sup>78,79</sup>. Sve češća je primena lizozima u medicini, naročito kod mikrobnih infekcija, dok se u poslednje vreme koristi



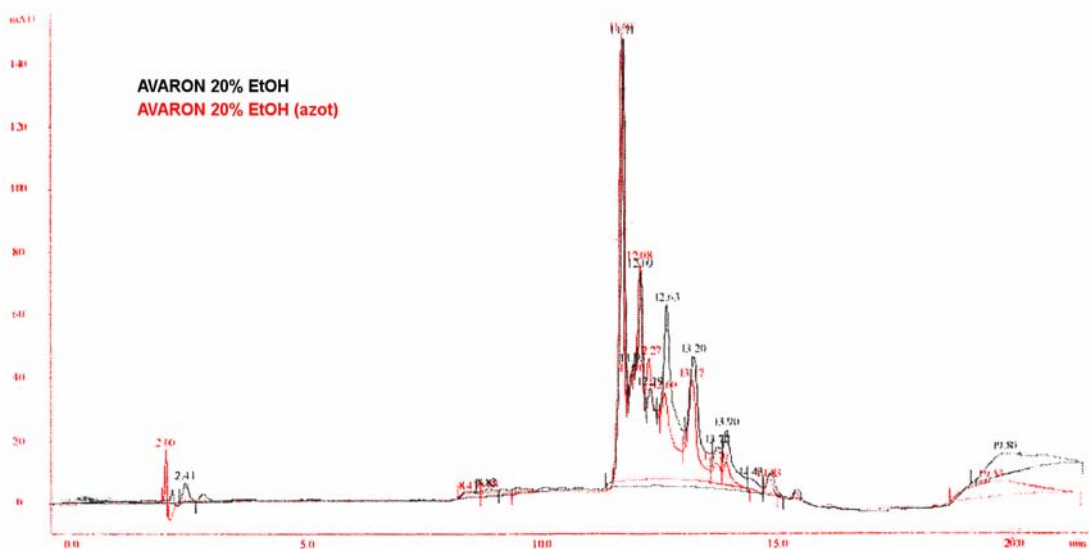
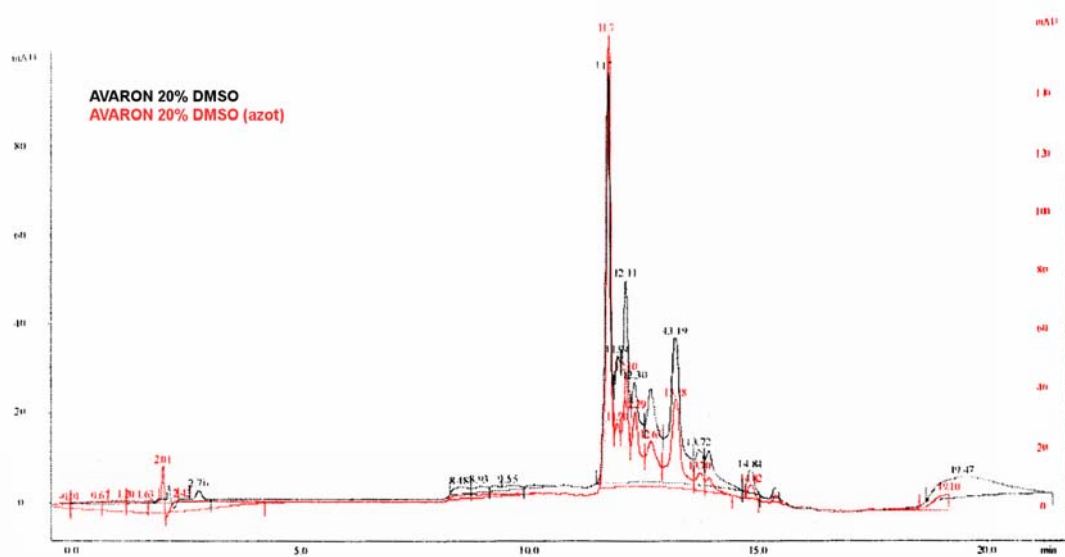
i za dijagnostifikovanje pojedinih bolesti. Tako na primer, praćenjem koncentracije lizozima u urinu pacijenata i uočavanjem njegovog povišenog nivoa, moguće je dijagnostifikovati Crohn-ovu bolest, neke tipove leukemije i bolesti urinarnog trakta<sup>80,81</sup>.

### 3.4.1 Optimizacija uslova modifikacije

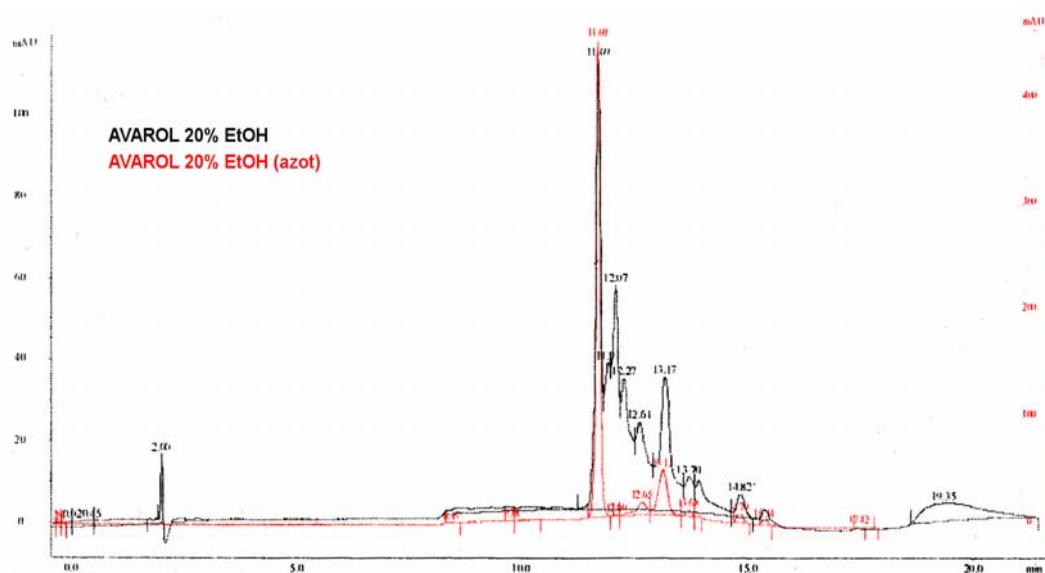
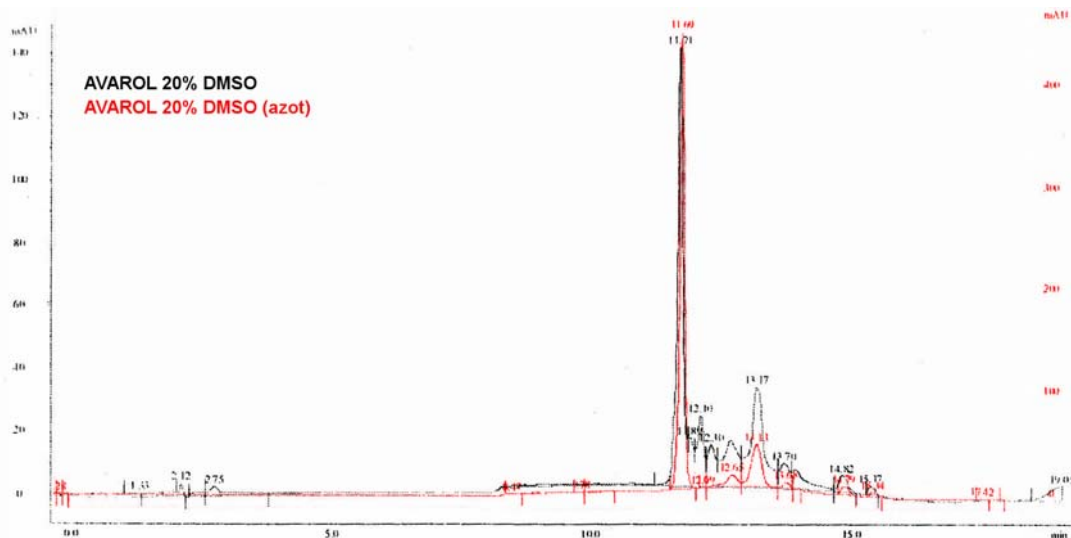
Izbor sredine za modifikaciju enzima bio je ograničen s jedne strane nerastvorljivošću organskih jedinjenja u vodi, a sa druge strane nerastvorljivošću ili denaturacijom enzima u organskim rastvaračima. Izbor organskih rastvarača sveden je na one koji se mešaju sa vodom. Kao kompromisno rešenje, nadjeno je da je maksimalno dozvoljeno prisustvo organskih rastvarača u vodi koje neće uticati na sam enzim 20%, a da je pri tom rastvorljivost ispitivanih organskih jedinjenja zadovoljavajuća.

Povećavanje nukleofilnosti aminokiselinskih ostataka enzima omogućeno je dodatkom baze. I pored toga što je uočena jača modifikacija enzima u prisustvu  $\text{NaHCO}_3$  za rad je izabrana slabija baza  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  zbog mogućnosti snimanja masenih spektara sirovog proizvoda nakon modifikacije.

Da bismo utvrdili uticaj kiseonika u modifikaciji enzima kao i mogućnost autooksidacije hinonskog adukta vezanog za molekul lizozima, enzim je modifikovan avarolom i avaronom u 20% etanolu i 20% DMSO-u u prisustvu  $\text{O}_2$  i bez njega i u prisustvu 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .



Slika 28a. HPLC hromatogrami avaronskih modifikata lizozima u 20% EtOH i 20% DMSO



**Slika 28b.** HPLC hromatogrami avarolskih modifikata lizozima u 20% EtOH i 20% DMSO

Dobijeni HPLC hromatogrami modifikata (slike 28a i 28b) pokazali su da:

1. Avarol u inertnoj atmosferi  $N_2$  ne modifikuje lizozim, bez obzira na to da li je kao sredina za modifikaciju korišćen 20% etanol ili 20% DMSO.

2. Avaron i u atmosferi sa O<sub>2</sub> i u atmosferi N<sub>2</sub> modifikuje lizozim i u 20% etanolu i u 20% DMSO-u, potvrđujući na taj način da je reoksidacija semihinonskog adukta dobijenog nakon modifikacije moguća prisutnim viškom hinona i bez prisustva kiseonika.
3. Avarol u atmosferi kiseonika modifikuje lizozim i u prisustvu 20% etanola i u prisustvu 20% DMSO-a, što ukazuje na brzu oksidaciju avarola u avaron i dalju modifikaciju lizozima nastalim avaronom.
4. Analizom dobijenih HPLC hromatograma uočava se da je integral pikova na retencionom vremenu od 12,10 min, što odgovara modifikovanom lizozimu, veći za modifikacije rađene u 20% etanolu nego u 20% DMSO-u, pa je kao sredina za modifikaciju izabran 20% etanol.

Vreme trajanja modifikacije određeno je praćenjem SDS elektoroforezom u određenim vremenskim intervalima. Bez obzira na to što se promena boje smeše uočava odmah po dodatku hinonskih derivata, odlučeno je da modifikacija enzima traje 48 h na sobnoj temperaturi uz neprestano mešanje u cilju dobijanja veće količine modifikovanog enzima.

Ubrzavanje modifikacije lizozima povećanjem temperature onemogućeno je samom osobinom enzima da se polimerizuje pod uticajem toplote kao i ubrzavanjem polimerizacije hinonskih jedinjenja na primenjenom pH 8,0.

Za modifikaciju lizozima, finalne koncentracije 5 mg/mL (približno 0,0021 M), upotrebljen je veliki višak hinonskih jedinjenja, finalne koncentracije 2 mg/mL (približno 0,0064 M). Višak modifikujućih agenasa dodat je zbog reoksidacije dobijenih adukata polaznim hinonom nakon nukleofilne adicije na hinonsko jezgro kao i radi omogućavanja stvaranja polihinonskih modifikata lizozima.

Iz svega navedenog, lizozim iz belanceta jajeta modifikovan je u 20% etanolu uz prisustvo kiseonika i 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 48 h na sobnoj temperaturi uz neprestano mešanje na šejkeru. Finalne koncentracije enzima i hinonskih jedinjenja bile su 5 mg/mL i 2 mg/mL, redom.

### 3.4.2 Obrada smeše nakon modifikacije

Nakon 48 h modifikovanja lizozima na sobnoj temperaturi, dobijena je smeša sa vidljivim talogom. Sadržaj smeše je centrifugiran na 14000 ob/min pri čemu je odvojen supernatant od dobijenog taloga.

Talog je prvo tretiran vodom, da bi se ekstrahovao eventualno prisutni enzim u talogu, a potom i etanolom za ekstrahovanje organskih jedinjenja. Proverom vodenog ekstrakta, spot testom je dokazano prisustvo lizozima. Snimljeni maseni spektar vodenog ekstrakta potvrdio je prisustvo nemodifikovanog lizozima u talogu.

Supernatant dobijen nakon centrifugiranja smeše rasoljen je na kolonicama Sephadex G-50, a enzim je eluiran u  $V_0$ . Supernatanti su dalje korišćeni za ispitivanje same modifikacije lizozima.

Kolonice nakon rasoljavanja enzimskog rastvora su ostavljene da se rasuše a zatim je etanolom, *batch* metodom, ekstrahovana zaostala količina hinona na koloni.

Količina hinona u etanolnim ekstraktima iz taloga i sa Sephadex-kolonica, određivana je TLC skenerom. Napravljena standardna serija hinonskih jedinjenja u etanolu naneta je na TLC ploču zajedno sa ispitivanim etanolnim ekstraktima taloga i Sephadexa posle rasušivanja kolonica. Nakon razvijanje ploče, za etanolne ekstrakte dobijene ekstrahovanjem rasušenih Sephadex kolonica nađeno je da na koloni zaostaje po 31,25  $\mu\text{g}$  hinonskih jedinjenja. Za ispitivane etanolne ekstrakte taloga, primećeno je da postoji velika količina polimerizovanog hinona što se manifestovalo kao razmaz od početne mrlje do same  $R_f$  vrednosti za sva ispitivana jedinjenja. Iz tog razloga, nažalost, nije bilo moguće odrediti količinu hinonskog jedinjenja u ispitivanim etanolnim ekstraktima taloga.

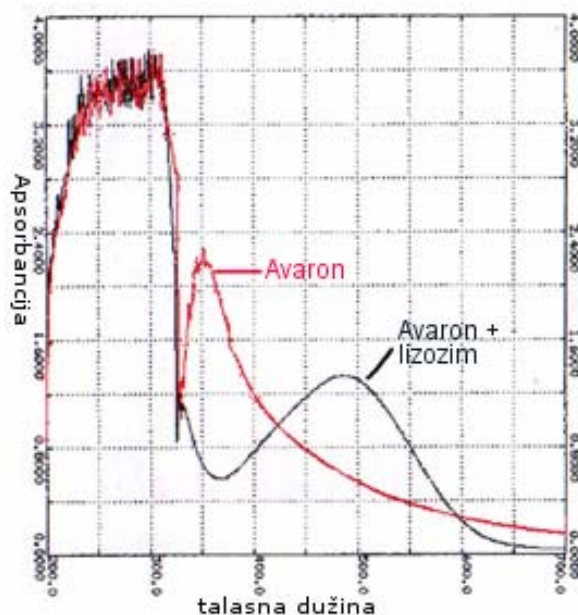
Dobijena količina polimerizovanog hinona može se objasniti primenjenim baznim uslovima za modifikaciju lizozima (pH 8,0) koji su bili potrebni za povećavanje nukleofilnosti aminokiselinskih ostataka na enzimu. Prisutna količina nemodifikovanog lizozima u talogu se onda može objasniti smanjenjem rastvorljivosti lizozima u prisustvu organskog polimera i njegovom koprecipitacijom zajedno sa hinonskim polimerom.

### 3.4.3 Praćenje hemijske modifikacije

#### 3.4.3.1 UV/Vis spektrofotometrija

S obzirom na to da u toku kovalentnog modifikovanja proteina dolazi do promene na samoj hinonskoj hromofori, moguće je praćenje modifikacije UV/Vis spektrofotometrijom. Modifikacija lizozima se za jedinjenja **I** i **Ia** vizuelno uočava po promeni boje reakcione smeše odmah nakon mešanja hinona i enzimskog rastvora. Uočava se prelaz iz žute u jarko crvenu boju. Ovo je prva indikacija da Michael-ovom reakcijom reaguju amino-grupe enzima, jer su amino-derivati avarona crvene boje<sup>69</sup>. U ranijim radovima, promena boje iz žute u crvenu uočena je i za Michael-ovu reakciju alkiltio-derivata avarona sa amino-grupama  $\beta$ -laktoglobulina<sup>82</sup>. Za derivate **Ib** i **Ic** promena boje je manje izražena jer se teško uočava prelaz između dve nijanse crvene boje.

Snimljeni su UV/Vis spektri svih modifikujućih agenasa u 20% etanolu, a zatim spektri modifikata lizozima. Spektralne promene su vidljive za sve testirane derivate. Uočava se pomeranje apsorpcionog maksimuma ka većim talasnim dužinama (slika 29). UV/Vis spektri ostalih derivata nalaze se u prilogu.



Slika 29. UV/Vis spektri avarona i avaronskog modifikata lizozima

### 3.4.3.2 SDS elektroforeza

Hinoni kao bifunkcionalni modifikujućí agensi mogu se koristiti za umrežavanje proteina što se može pratiti SDS elektroforezom. Nakon uočene reakcije između lizozima i modifikujućih agenasa UV/Vis spektrofotometrijom, bilo je potrebno utvrditi da li je došlo do kovalentnog vezivanja enzimskog ostatka za hinonsko jezgro i umrežavanja proteina.

Nativni lizozim se, pored monomerne forme, može naći i u formi dimera, trimera i tetramera što zavisi od načina izolovanja samog lizozima i starosti jajeta. Proučavanjem lizozima, nađeni su najznačajniji aminokiselinski parovi koji učestvuju u procesu dimerizacije, najčešće stvaranjem sonih mostova, mada nije isključena ni dimerizacija stvaranjem intermolekulskih disulfidnih mostova<sup>83</sup>. Iz tih razloga, za elektroforezu su korišćeni redukcioní uslovi, koji bi usloveli disocijaciju dimernih formi enzima i omogućili uočavanje dimernih i polimernih formi enzima nastalih isključivo njegovom kovalentnom modifikacijom hinonima, mada primenjeni uslovi ne utiču na sone mostove.

Napravljene su smese od 5 mg/mL lizozima i po 2 mg/mL hinonskih derivata u 20% EtOH i 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Nakon 48 h mućkanja na šejkeru na sobnoj temperaturi, smesa je centrifugirana i naneta na kolonice napunjene Sephadex-om G-50. Proteini su eluirani destilovanom vodom, a sakupljana je frakcija modifikovanog enzima koja silazi u V<sub>0</sub>.

Za SDS elektroforezu naneto je po 25 µL uzoraka modifikovanog lizozima i lizozima tretiranog pod istim uslovima bez hinona. Na gelu se uočava da nemodifikovani lizozim ima dve trake: na 14 kDa izraženu traku za monomer i na 28 kDa slabiju traku za dimer lizozima. Lizozim modifikovan avaronom i njegovim derivatima takođe ima dve trake na gelu: izraženu traku na 14 kDa za monomer i slabu traku na 28 kDa za dimer lizozima (slika 30).



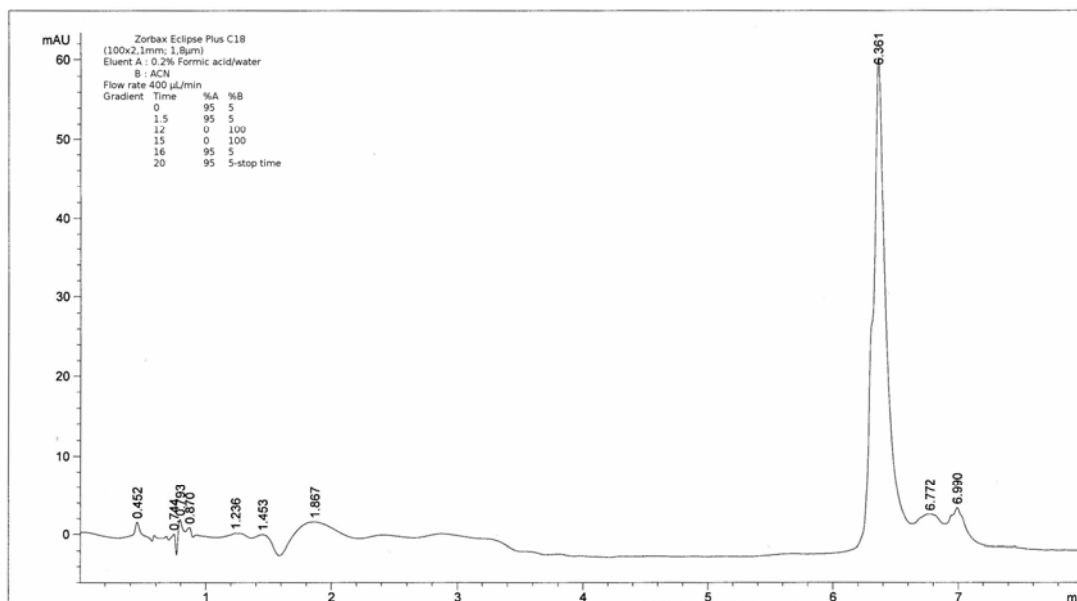
**Slika 30.** SDS elektroforegram

S obzirom na to da hinoni mogu biti umrežavajući agensi za proteine, očekivana je dimerizacija lizozima i mnogo jača traka na 28 kDa u odnosu na lizozim. Međutim, to se nije desilo. Dobijeni rezultati na SDS elektroforezi ukazuju na izostanak dimerizacije lizozima u prisustvu avarona i svih njegovih derivata. Slabije trake modifikata na 14 kDa za derivate **Ia** i **Ib** mogu se objasniti većom količinom lizozima prisutnog u talogu koji se dobija nakon modifikacije.

#### **3.4.3.3 Provera čistoće modifikata HPLC hromatografijom**

Nakom centrifugiranja i hromatografije supernatanata na Sephadex-u G-50, dobijenim prečišćenim uzorcima je stepen čistoće određivan HPLC hromatografijom na RP-18 koloni. Dobijeni hromatogram za modifikat lizozima avaronom dat je na slici 31.





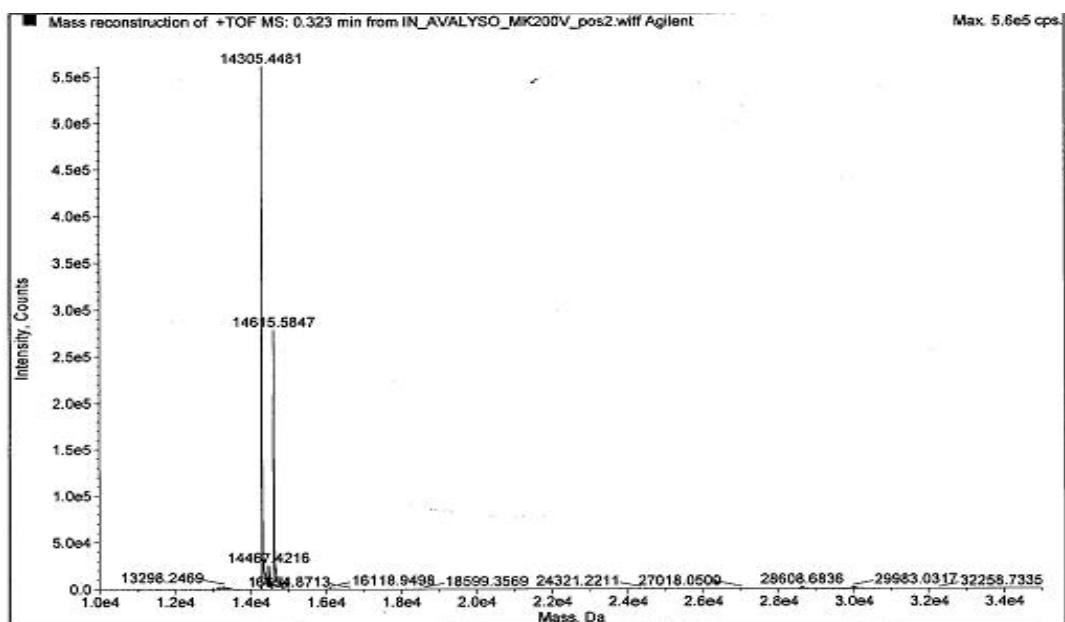
**Slika 31.** HPLC hromatogram modifikata lizozima avaronom

Na hromatogramu se uočava jedan glavni pik na retencionom vremenu od 6,361 min što ukazuje na postojanje samo jednog modifikata lizozima. Retenciono vreme za nemodifikovani lizozim bilo je 6,325 min.

#### 3.4.3.4 Maseni spektar modifikovanog lizozima

Da bismo utvrdili da li su se i u kojoj količini avaron i njegovi derivati uopšte vezali za molekul lizozima, snimljeni su maseni spektri modifikata nakon obrade smeše. Vodeni rastvori uzoraka modifikovanog lizozima su u struji mobilne faze (0,2% mravlja kiselina u smesi voda–acetonitril=50:50) protoka 0,2 mL/min uneseni u maseni spektrometar te su dobijeni spektri lizozima modifikovanog svim ispitivanim jedinjenjima.

Na slici 32 dat je maseni spektar lizozima modifikovanog avaronom, dok su karakteristični pikovi za ostale modifikate dati u tabeli 8. Kompletni maseni spektri modifikata lizozima nalaze se u prilogu.

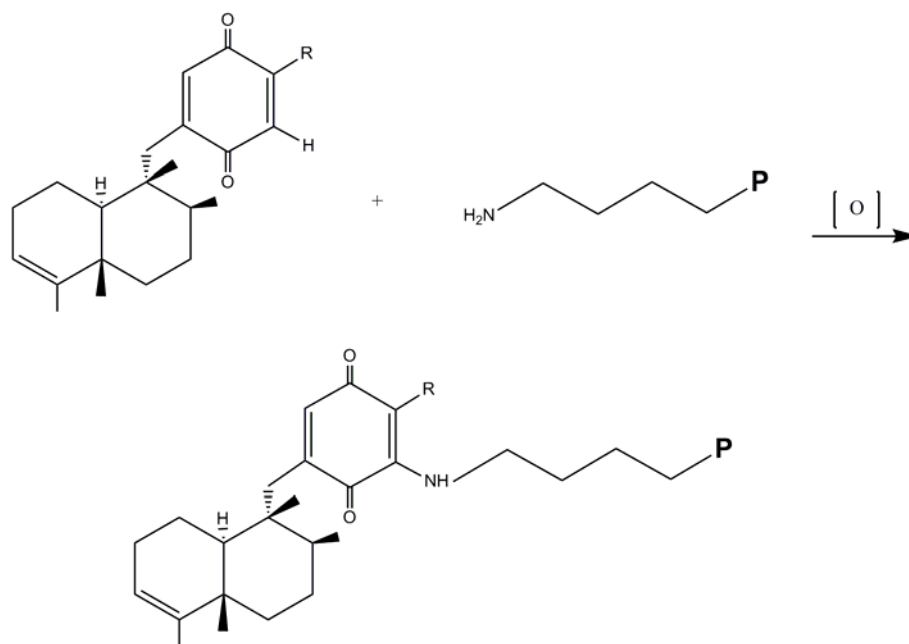


Slika 32. Maseni spektar lizozima modifikovanog avaronom

Tabela 8. Pikovi modifikata

Jedinjenje		Drugi pik (masa Da)
Avaron	<b>I</b>	14615,5847
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b>	14645,6289
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b>	14644,6209
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b>	14644,6026

Svi maseni spektri modifikata imali su dva pika: jedan pik na 14305,4481 Da i drugi pik na masi koja odgovara masi lizozima uvećanoj za masu svakog od derivata umanjenu za masu dva atoma vodonika. S obzirom na pretpostavljeni nukleofilni napad  $\epsilon$ -amino grupe lizina na hinonsko jezro, smanjenje mase za dva vodonikova atoma se može objasniti gubitkom jednog vodonika sa  $\epsilon$ -amino grupe lizinskog ostatka i gubitkom jednog vodonika sa hinonskog jezgra na kome se odigrala Michael-ova reakcija (slika 33).

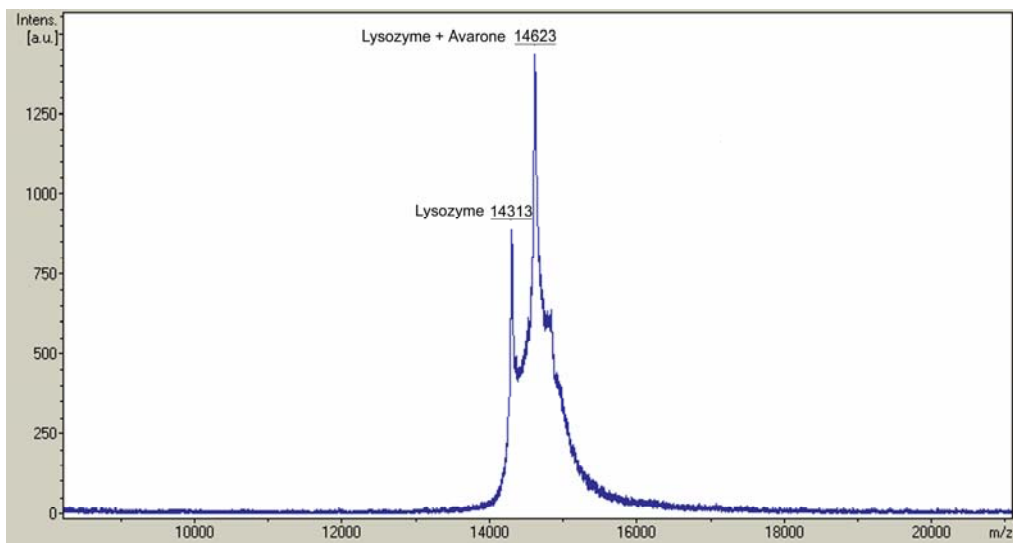


**Slika 33.** Michael-ova adicija lizinskog ostatka na hinonsko jezgro

Na ovaj način, dobijena je potvrda o vezivanju jednog molekula lizozima za hinonsko jezgro avarona i njegovih derivata nukleofilnom Michael-ovom adicijom. Ostalo je, međutim, nejasno koji je od šest prisutnih lizina u molekulu lizozima učestvovao u reakciji. Da bismo to utvrdili, urađena je tripsinska digestija svih modifikata lizozima i snimljen MALDI TOF.

### 3.4.3.5 Tripsinska digestija modifikata i MALDI TOF

Snimljeni su maseni spektri nativnog lizozima i svih njegovih modifikata korišćenjem tehnike MALDI TOF. Na svim spektrima modifikata pojavljuju se dva pika: jedan za nemodifikovani lizozim na 14313 Da i drugi na masi koja odgovara masi lizozima uvećanoj za masu derivata, a umanjenu za dva atoma vodonika, što je isto kao kod masenih spektara snimljenih na klasičnom MS aparatu. Dobijeni spektri su potvrdili da se jedan molekul lizozima kovalentno vezao za jedan molekul avarona i svih njegovih derivata. Na slici 34 prikazan je MALDI TOF spektar lizozima i avaronom modifikovanog lizozima, dok su karakteristični pikovi za ostale modifikate lizozima dati u tabeli 9.



**Slika 34.** MALDI TOF spektar lizozima i avaronom modifikovanog lizozima

**Tabela 9.** Karakteristični pikovi za modifikate lizozima

Jedinjenje		Drugi pik (Da)
Avaron	<b>I</b>	14623
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b>	14653
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b>	14652
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b>	14652

Da bismo utvrdili koji je lizinski ostatak, od šest potencijalnih, učestvovao u nukleofilnoj adiciji na hinonsko jezgro, urađena je tripsinska digestija nativnog lizozima i svih modifikata.

Nakon tripsinske digestije nativnog enzima, dobijena pokrivenost sekvencije je bila 66% (tabela 10). Pokrivenost sekvencije uglavnom služi kao parametar za dokazivanje i identifikaciju proteina i enzima. U našem slučaju, s obzirom na to da je lizozim kupljen od Sigmee, pokrivenost sekvencije je služila kao pokazatelj dobro urađene tripsinske digestije lizozima.

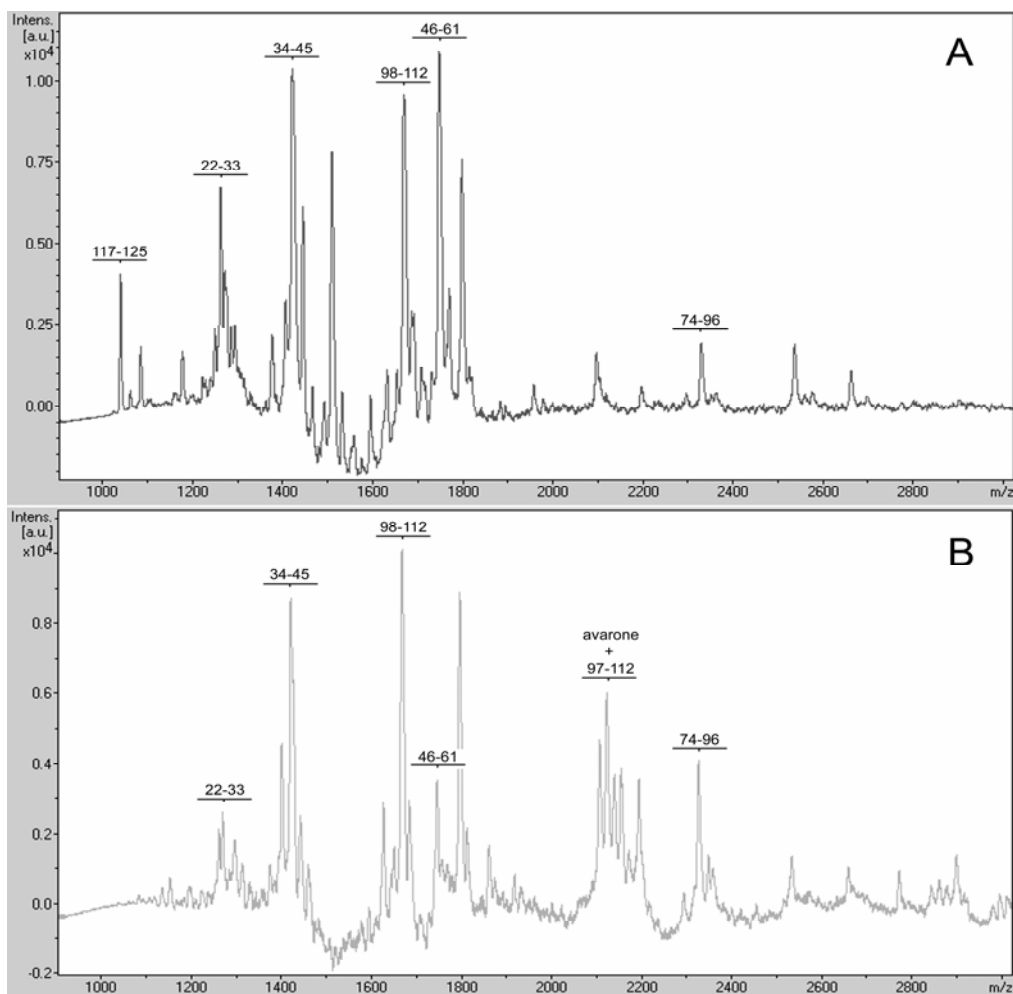
**Tabela 10.** Peptidni fragmenti dobijeni nakon tripsinske digestije nemodifikovanog lizozima

Peptidni fragmenti	Masa (Da)
74-96	2338,7138
46-61	1754,8503
98-112	1676,8896
34-45	1429,4882
22-33	1269,4602
117-125	1046,1705

Tripsinskom digestijom u gelu, pri čemu je uzeta traka na 14 kDa za modifikate lizozima, dobijena je pokrivenost sekvencije od 67%, što je zadovoljavajući procenat.

Na slici 35 dati su uporedni MALDI TOF spektri nativnog (**A**) i avaronom modifikovanog lizozima (**B**) nakon tripsinske digestije. Analizom dobijenih peptidnih fragmenata može se zaključiti da:

1. U modifikatu se javlja većina peptidnih fragmenata prisutnih i u nativnom lizozimu
2. U peptidnom spektru avaronom modifikovanog lizozima, pojavljuje se novi peptidni fragment na masi 2115,5296 Da



**Slika 35.** MALDI TOF spektri peptidnih fragmenata lizozima (**A**) i avaronom modifikovanog lizozima (**B**)

Sagledavanjem mesta lizinskih ostataka u molekulu lizozima (Lys-1, Lys-13, Lys-33, Lys-96, Lys-97 i Lys-116), a na osnovu mase novog peptidnog fragmenta, potrebno je bilo zaključiti koji lizinski ostatak se kovalentno vezao za avaronsko jezgro. Vezivanjem avarona za lizinski ostatak onemogućava se prilaz tripsina tom lizinu, što uslovljava pojavu većeg fragmenta odnosno izostanak tripsinskog cepanja na tom mestu. Na osnovu mase 2115,5296 Da novog fragmenta i na osnovu uočenih položaja lizina u molekulu, došlo se do zaključka da ta masa potiče od fragmenta 97-112 uvećanog za masu avarona i umanjenog za dva atoma vodonika.

To je jednoznačno dokazalo da je mesto vezivanja avarona za molekul lizozima lizin-97, s obzirom na izostanak tripsinske digestije iza lizina-97 usled vezivanja voluminozne grupe i smanjenja baznosti azota.

Identični spektri peptidnih fragmenata dobijeni su i nakon tripsinske digestije ostalih modifikata lizozima. Mase dobijenih peptidnih fragmenata 97-112 za avaron i njegove derivate date su u tabeli 11.

**Tabela 11.** Mase dobijenih peptidnih fragmenata nakon tripsinske digestije za modifikate lizozima

Modifikat lizozima+jedinjenje		Novi pik, fragment 97-112 (Da)
Avaron	<b>I</b>	2115,5296
3'-Metoksi-avaron	<b>Ia</b>	2145,5496
4'-(Metilamino)-avaron	<b>Ib</b>	2144,5696
3'-(Metilamino)-avaron	<b>Ic</b>	2144,5696

Može se zaključiti da se avaron i njegovi derivati za molekul lizozima kovalentno vezuju preko lizina-97 nukleofilnom Michael-ovom adicijom.

## 3.5 Osobine modifikata lizozima

### 3.5.1 Enzimaska aktivnost lizozima nakon modifikacije

Utvrđivanjem mesta vezivanja hinonskih jedinjenja za molekul lizozima, uočava se da se lizin-97, a samim tim i voluminozna grupa na njemu, nalazi sa suprotne strane od aktivnog mesta enzima (slika 36).



**Slika 36.** Prikaz mesta vezivanja hinona za molekul lizozima



S obzirom na to, pretpostavili smo da se enzimaska aktivnost modifikata neće bitno razlikovati od nativnog lizozima.

Koncentracija proteina nakon modifikacije, urađena je po Bradford-ovoj proceduri<sup>84</sup>. Posle određivanja koncentracije, za svaki modifikat određena je enzimaska aktivnost prema *Micrococcus luteus* po standardnom postupku<sup>85</sup>. Kao kontrola, za upoređivanje enzimske aktivnosti korišćeni su nativni lizozim i lizozim tretiran pod uslovima modifikacije samo bez prisustva hinonskih jedinjenja. Dobijeni rezultati dati su tabeli 12.

**Tabela 12.** Enzimaska aktivnost nativnog lizozima, tretiranog lizozima i modifikata lizozima

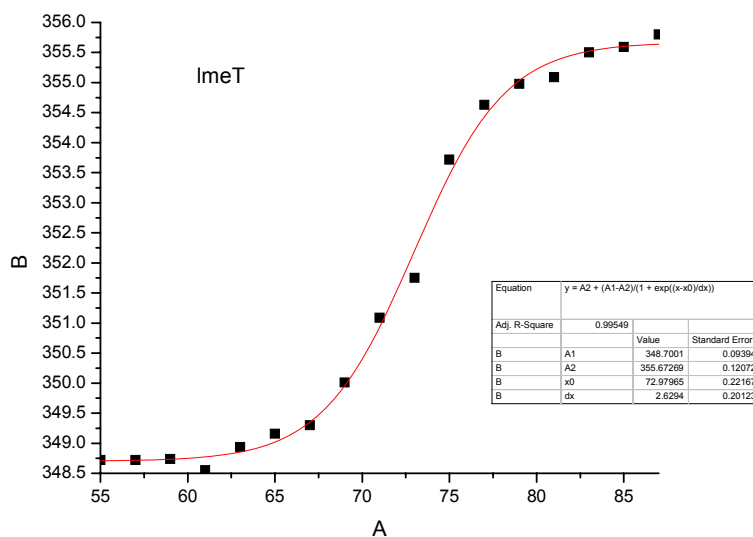
	Lizozim	Tretirani lizozim	I-L	Ia-L	Ib-L	Ic-L
Aktivnost (unit/mg)	43000	32977	28647	26806	25267	27787
Ostatak aktivnosti prema nativnom enzimu (%)	100	77	67	62	59	65
Ostatak aktivnosti prema tretiranom enzimu (%)	-	100	87	81	77	84

Analizom dobijenih rezultata, uočava se da se deo enzimske aktivnosti gubi samim tretmanom enzima, odnosno upotrebljenim uslovima za njegovu modifikaciju (20% etanol, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). U odnosu na tretirani lizozim, očuvanje enzimske aktivnosti je 60-80%, što je u skladu sa utvrđenim mestom vezivanja derivata koje je udaljeno od aktivnog mesta enzima. Smanjenje aktivnosti lizozima se može objasniti konformacionim promenama na enzimu nakon modifikacije.

### 3.5.2 Određivanje temperature topljenja lizozima i njegovih modifikata

Temperature topljenja lizozima i njegovih modifikata određene su fluorescentnom spektroskopijom<sup>86</sup>. Intenzitet fluorescencije se smanjuje sa temperaturom za sve derivate. Analiziranjem zavisnosti maksimuma talasne dužine od temperature (slika 37), nađene vrednosti za temperature topljenja bile su 72,74; 72,69;

73,01; 73,23 i 72,97 °C za lizozim i konjugate sa **I**, **Ia**, **Ib** i **Ic**, redom. Iako razlike nisu velike, generalno postoji trend da su temperature topljenja modifikata veće u odnosu na temperaturu topljenja samog lizozima što ukazuje na slabu stabilizaciju strukture dobijenih modifikata.



**Slika 37.** Promena maksimuma fluorescencije sa temperaturom

### 3.5.3 Antibakterijska aktivnost modifikata lizozima - određivanje vrednosti MIC

Lizozim pokazuje aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama. S obzirom na dobijene rezultate enzimske aktivnosti, proverili smo antibakterijsku aktivnost dobijenih modifikata prema izabranim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama određivanjem vrednosti MIC. U mikrotitar ploče sa Mueller Hinton-ovim bujonom, tehnikom dvostrukog razblaženja<sup>87</sup> nanosene su određene koncentracije hinonskih jedinjenja, modifikata lizozima, standardnog antibiotika amikacina i slepe probe.

U bunarčiće su potom zasejane određene kulture bakterija, mikrotitar ploče su termostahirane 24 h na 37 °C a nakon toga su turbidimetrijski određene MIC vrednosti za sva ispitivana jedinjenja. Rezultati MIC vrednosti prema gram-pozitivnim i prema gram-negativnim bakterijama dati su u tabelama 13 i 14, redom, dok su u zagradama date MIC vrednosti preračunate na derivate.

**Tabela 13.** Antibakterijska aktivnost avarona, njegovih derivata i modifikata lizozima—MIC vrednosti

Jedinjenje	MIC ( $\mu\text{M}$ )					
	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Streptosporangium longisporum</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>I</b>	20,03	40,06	20,03	20,03	20,03	80,13
<b>Ia</b>	36,55	36,55	36,55	36,55	18,27	36,55
<b>Ib</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Ic</b>	469,21	3812,32	3812,32	3812,32	3812,32	967,74
<b>I-L</b>	168,23 (3,59)	5,47 (0,12)	168,23 (3,59)	168,23 (3,59)	336,46 (7,18)	168,23 (3,59)
<b>Ia-L</b>	95,54 (2,23)	3,07 (0,07)	191,09 (4,46)	191,09 (4,46)	191,09 (4,46)	191,09 (4,46)
<b>Ib-L</b>	102,38 (2,38)	1,71 (0,04)	402,68 (9,37)	204,75 (4,77)	204,75 (4,77)	204,75 (4,77)
<b>Ic-L</b>	95,55 (2,22)	1,54 (0,04)	395,85 (9,21)	197,92 (4,61)	197,92 (4,61)	197,92 (4,61)
Tretirani L	223,57	27,94	111,79	447,15	223,57	111,79
Lizozim	202,61	12,58	405,23	405,23	817,44	202,61
Amikacin	3,42	18,78	3,42	111,00	25,61	71,72

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 13 može se uočiti da:

1. Hinonska jedinjenja **I** i **Ia** pokazuju prema soju *S. longisporum* skoro 5 puta jače antibakterijsko dejstvo u odnosu na antibiotik amikacin dok je prema soju *C. sporogenes* njihova aktivnost neznatno veća od dejstva amikacina.
2. Jedinjenje **Ib** ne pokazuje antibakterijsku aktivnost, dok jedinjenje **Ic** ima neznatnu antibakterijsku aktivnost prema svim odabranim bakterijskim sojevima.
3. Svi modifikati lizozima pokazuju antibakterijsku aktivnost prema svim odabranim bakterijskim kulturama, pri čemu i lizozim modifikovan jedinjenjem **Ib** takođe pokazuje antibakterijsku aktivnost, iako samo jedinjenje **Ib** ne pokazuje aktivnost prema bakterijama.
4. Prema bakteriji *S. aureus* lizozim i njegovi modifikati pokazuju veće antibakterijsko dejstvo nego ispitivani amikacin.

5. Svi dobijeni modifikati lizozima pokazuju jače antibakterijsko dejstvo u poređenju sa nemodifikovanim enzimom osim prema soju *B. subtilis* gde i osnovni enzim i njegovi modifikati pokazuju približno iste aktivnosti.

**Tabela 14.** Antibakterijska aktivnost avarona, njegovih derivata i modifikata lizozima prema gram-negativnim bakterijama—MIC vrednosti

Jedinjenje	MIC (µM)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<b>I</b>	440,96	27,56	13,78	55,12
<b>Ia</b>	877,20	109,65	438,60	877,20
<b>Ib</b>	-	-	-	-
<b>Ic</b>	-	-	-	-
<b>I-L</b>	11,11 (0,24)	22,22 (0,47)	88,88 (1,90)	11,11 (0,24)
<b>Ia-L</b>	266,16 (6,21)	2,14 (0,05)	266,16 (6,21)	68,25 (1,59)
<b>Ib-L</b>	81,90 (1,91)	156,98 (3,65)	122,85 (2,86)	307,13 (7,15)
<b>Ic-L</b>	5,12 (0,12)	10,24 (0,24)	20,48 (0,48)	40,96 (0,95)
Tretirani L	27,94	27,94	223,57	223,57
Lizozim	>740,58	>740,58	188,64	370,29
Amikacin	8,54	11,95	85,38	13,66

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 14 može se zaključiti da:

1. Hinonska jedinjenja **Ia** i **Ic** pokazuju slabu antibakterijsku aktivnost u poređenju sa antibiotikom amikacinom.
2. Jedinjenje **I** pokazuje jaku antibakterijsku aktivnost osim prema soju *E. coli*. Prema soju *P. aeruginosa* njegova aktivnost je skoro 7 puta jača u odnosu na standardni antibiotik amikacin.
3. Lizozim modifikovan jedinjenjem **I** pokazuje sličnu antibakterijsku aktivnost prema gram-negativnim bakterijama kao i amikacin.

4. Modifikat **Ia**—lizozim prema soju *P. vulgaris* pokazuje skoro šest puta veću aktivnost nego kontrolni antibiotik.
5. Neočekivane vrednosti za antibakterijsku aktivnost dobijene su za lizozim modifikovan jedinjenjem **Ic**. Hinonsko jedinjenje nema aktivnost prema *E. coli* i *P. vulgaris* dok je aktivnost prema *P. aeruginosa* i *S. enteritidis* zanemarljiva. Modifikat lizozima ovim jedinjenjem pokazuje skoro dva puta veću aktivnost prema *E. coli* i skoro četiri puta veću aktivnost prema *P. aeruginosa* u odnosu na amikacin.

Iz svih dobijenih rezultata može se zaključiti da lizozim modifikovan avaronom i njegovim derivatima pokazuje antibakterijsku aktivnost prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama sa MIC vrednostima nižim nego za nemodifikovani enzim. Najjače sinergističko dejstvo ispoljava se kao antibakterijsko dejstvo prema soju *S. aureus* gde svi modifikati pokazuju jaču aktivnost i u odnosu na same derivate i u odnosu na nemodifikovani lizozim i kontrolni antibiotik amikacin. Dobijene MIC vrednosti izražene kao koncentracije hinonske komponente konjugata su nekoliko puta niže nego MIC vrednosti za sama hinonska jedinjenja, što ukazuje na intramolekulski sinergizam obeju komponenti konjugata hinon—lizozim.

#### **3.5.4 Brine shrimp test toksičnosti avarona, njegovih derivata, lizozima i njegovih modifikata**

*Brine shrimp* testom je određena toksičnost hinonskih jedinjenja, lizozima i njegovih modifikata na račiće *Artemia salina*. U staklene bočice sa rastvorom u kojem se nalaze izlegnuti račići *A. salina* stavljene su redom određene koncentracije hinonskih jedinjenja, lizozima i njegovih modifikata. U bočice je zatim dodato par kapi suspenzije kvasca, a potom je sadržaj u bočicama ostavljen na sobnoj temperaturi 24 h uz osvetljavanje i aeraciju. Po isteku ovog vremena u svakoj bočici su prebrojani živi i mrtvi račići i određena je vrednost LC<sub>50</sub>. Dobijene LC<sub>50</sub> vrednosti su zatim preračunate na derivate i na lizozim. Sve vrednosti LC<sub>50</sub> date su u tabeli 15.

**Tabela 15.** LC<sub>50</sub> vrednosti *Brine shrimp* testa

Jedinjenje	LC <sub>50</sub> (ppm)	LC <sub>50</sub> (ppm) računato na derivate	LC <sub>50</sub> (ppm) računato na lizozim
<b>I—L</b>	0,0016	0,000034	0,00156
<b>Ia—L</b>	0,00223	0,000052	0,002178
<b>Ib—L</b>	0,00542	0,000126	0,005294
<b>Ic—L</b>	0,01334	0,00031	0,01303
<b>L</b>	0,00063	-	-
<b>I</b>	0,14	-	-
<b>Ia</b>	0,02	-	-
<b>Ib</b>	0,34	-	-
<b>Ic</b>	2,40	-	-

Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti:

1. Svi ispitivani modifikati lizozima pokazuju manju toksičnost na račiće *Artemia salina* u odnosu na nemodifikovani lizozim.
2. Dobijene LC<sub>50</sub> računane na lizozim pokazuju, takođe, manju toksičnost na račiće u odnosu na nemodifikovani lizozim.

Dobijeni rezultati veće toksičnosti nemodifikovanog lizozima u odnosu na njegove modifikate nisu iznenađujući. S obzirom na antibakterijsku aktivnost lizozima i na činjenicu da račići *A. salina* žive u simbiozi sa nekih vrstama bakterija<sup>88</sup>, toksičnost lizozima se najverovatnije ogleda u liziranju ćelijskog zida bakterija prisutnih u digestivnom traktu račića. U skladu sa dobijenim rezultatima da modifikati lizozima imaju manju enzimsku aktivnost posle modifikacije u poređenju sa nemodifikovanim enzimom, modifikati pokazuju i manju toksičnost na ispitivane račiće. Dobijene LC<sub>50</sub> vrednosti se ne mogu u potpunosti korelisati sa enzimskom aktivnošću modifikata, jer se aktivnost enzima određuje prema liofilizovanom, neaktivnom bakterijskom supstratu, dok su u digestivnom traktu račića aktivni bakterijski sojevi.

### 3.5.5 Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

#### 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avarona i njegove toksičnosti *Brine shrimp* testom

Nakon što je dokazano vezivanje avarona i njegovih derivata za lizin-97 lizozima, pretpostavili smo da ovaj enzim može biti nosač hinonskih aktivnih jedinjenja. U organizmu, pod uticajem hidrolitičkih enzima, dolazilo bi do stvaranja peptidnih fragmenata koji bi imali potencijalnu biološku aktivnost.

Radi predviđanja antibakterijske aktivnosti peptida koji na sebi ima aktivnu hinonsku komponentu, sintetisano je jedinjenje 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avaron kao model jedinjenje peptidnog fragmenta s obzirom na to da je  $\alpha$ -amino grupa lizina zaštićena Boc grupom, a lizinski deo za hinonsko jezgro avarona vezan preko  $\epsilon$ -amino grupe.

Antibakterijska aktivnost dobijenog jedinjenja je ispitivana prema izabranim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama određivanjem MIC vrednosti. U mikrotitar ploče sa Mueller Hinton-ovim bujonom, tehnikom dvostrukog razblaženja, nanese su određene koncentracije 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avarona, standardnog antibiotika amikacina i slepe probe. Nakon zasejavanja određenih bakterijskih kultura u bunarčiče i termostatiranja, očitane su MIC vrednosti. Dobijeni rezultati antibakterijske aktivnosti date se u tabeli 16.

Za sintetisano jedinjenje ispitivana je i toksičnost na račiče *Artemia salina*, *Brine shrimp* testom po proceduri koja je korišćena i za hinonska jedinjenja i za proteinske adukte. Dobijena  $LC_{50}$  vrednost za 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avaron izražena u ppm je 0,058.

**Tabela 16.** Antibakterijska aktivnost  
4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avarona

Bakterija	MIC ( $\mu\text{M}$ )	Amikacin
<i>S. lutea</i>	1124,10	3,42
<i>S. aureus</i>	< 4,32	18,78
<i>M. flavus</i>	1124,10	3,42
<i>S. longisporum</i>	2248,20	111,00
<i>C. sporogenes</i>	562,05	25,61
<i>B. subtilis</i>	2248,20	71,72
<i>E. coli</i>	<4,32	8,54
<i>P. vulgaris</i>	2248,20	11,95
<i>P. aeruginosa</i>	2248,20	85,38
<i>S. enteritidis</i>	>8992,81	13,66

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da model jedinjenje peptidnog fragmenta generalno pokazuje slabu antibakterijsku aktivnost osim prema sojevima *S. aureus* i *E. coli* gde je aktivnost veća od kontrolnog antibiotika amikacina.

### 3.6 Interakcije avarona i njegovih derivata sa plazmidima pBR322 i pUC18 iz *Escherichia coli*

Sposobnost avarona i njegovih derivata da alkiluju ćelijske nukleofile dokazana je reakcijom sa model enzimom lizozimom. Međutim, pored enzima, hinoni mogu da modifikuju i nukleinske kiseline. Prvenstveno, moguće je alkilovanje nukleinskih baza: guanina u položaju N-1, N-2 ili N-7, adenina u položaju N-6, citozina u N-4 ili timina u položaju N-3<sup>89</sup>. Ovim mehanizmom, primera radi, deluju mitomicin, porfiromicin, karbazilhinon<sup>90</sup>.

S obzirom na rezultate antitumorske i antioksidativne aktivnosti za avaron i derivate, pretpostavljeno je da će se hinonska jedinjenja vezivati za nukleinske kiseline uz stvaranje kiseoničnih radikala koji će usloviti oštećenje lanca DNA ili njegovu fragmentaciju. Uzimajući u obzir samu strukturu avarona i njegovih derivata, jedinjenja nisu pogodna da budu klasični interkalanti DNA, jer pored ravne hinonske farmakofore



imaju i seskviterpenski deo koji bi onemogućavao njihovu interkalaciju u DNA. Prema takvoj strukturi, moguće je njihovo vezivanje za malu brazdu DNA.

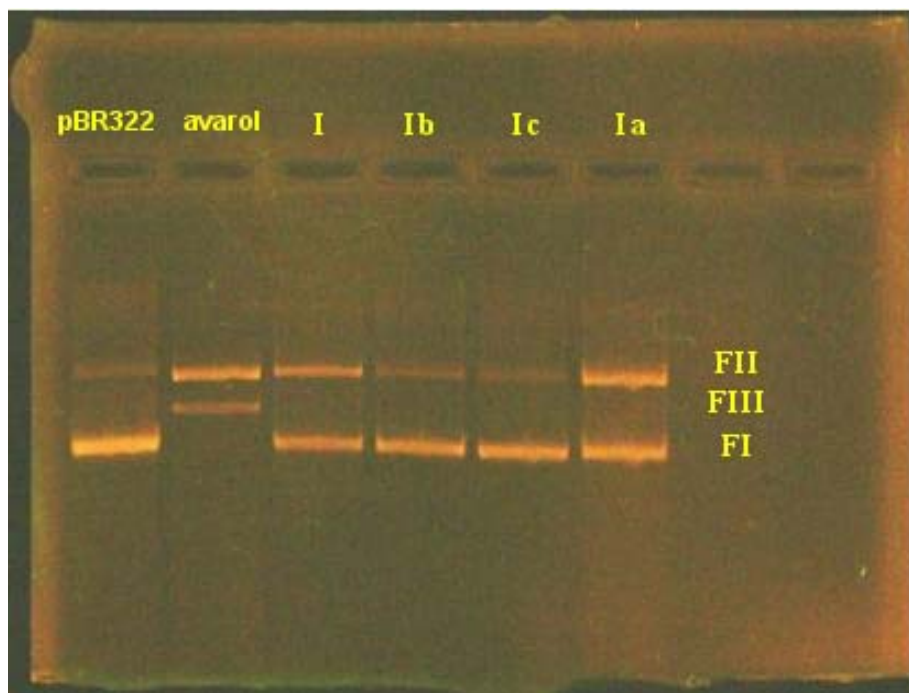
Mogućnost avarona i njegovih izabranih derivata da modifikuju nukleinske kiseline praćena je reakcijom sa plazmidima pBR322 i pUC18 iz *Escherichia coli*.

Plazmid pBR322 je jedan od prvih veštačkih plazmida koji se koristi za tehnike kloniranja i uopšte za proučavanje reakcija sa DNA. Sastavljen je od preko 80% superuvijene DNA koja se sastoji od 4361 bazna para, a sadrži gene odgovorne za rezistentnost na tetraciklin i ampicilin.

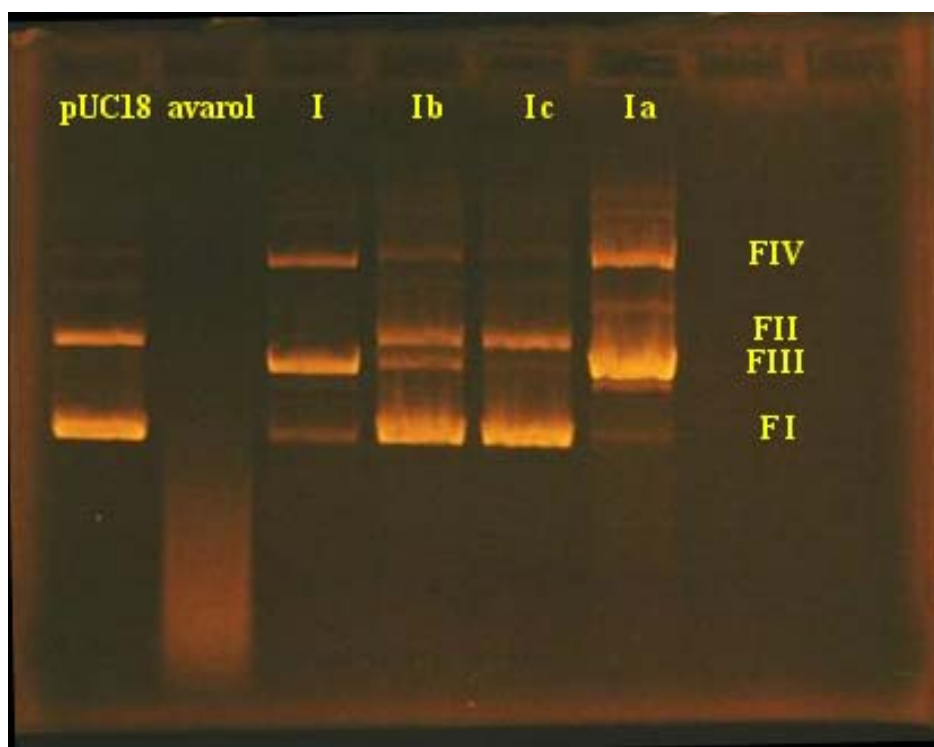
Plazmid pUC18 je, takođe, sastavljen od superuvijene DNA. Manje je mase od plazmida pBR322. Sadrži 2686 baznih parova i gen odgovoran za rezistentnost na ampicilin.

Avaron i njegovi derivati rastvoreni su u etanolu dok su plazmidi rastvoreni u bikarbonatnom puferu pH 8,4. Određena količina plazmida (0,5 µg) je mešana sa različitim koncentracijama avarona i njegovih derivata, a dobijena smeša je termostatorana 1,5 h na 37 °C uz povremeno mešanje.

Nakon isteka predviđenog vremena, interakcija avarona i njegovih derivata je prekinuta dodavanjem pufera za nanošenje uzoraka i dalje proučavana elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Nakon elektroforeze, trake DNA su vizualizovane potapanjem gela u vodeni rastvor etidijum-bromida, gelovi su potom obezbojeni, osvetljeni na UV transiluminatoru i slikani digitalnom kamerom. Dobijeni gelovi prikazani su na slikama 38 i 39.



**Slika 38.** Agarozni gel posle modifikacije pBR322 avarolom, avaronom i njegovim derivatima



**Slika 39.** Agarozni gel posle modifikacije pUC18 avarolom, avaronom i njegovim derivatima

Dobijeni rezultati mogu se sumirati u nekoliko tačaka:

1. Interakcija avarola, avarona i njegovih derivata je izraženija sa plazmidom pUC18 nego sa plazmidom pBR322 ukazujući na to da je reakcija povoljnija sa cirkularnom DNA manje molekulske mase.
2. U interakciji plazmida pBR322 sa avarolom dolazi do stvaranja linearne forme DNA sa dvolančanim prekidima (FIII) i otvorene cirkularne forme (FII) uz potpuni nestanak superuvijene forme (FI).
3. Interakcija plazmida pBR322 sa avaronom **I** dovodi do stvaranja otvorene cirkularne forme (FII).
4. Pri interakciji avarola sa plazmidom pUC18 dolazi do potpunog cepanja molekula DNA uz stvaranje fragmenata DNA manje molekulske mase.
5. U reakciji avarona **I** sa plazmidnom pUC18 DNA, dolazi do stvaranja linearne forme (FIII) sa dvolančanim prekidima i stvaranja sporije forme (FIV) uz pojavu minorne količine superuvijene forme (FI).
6. Interakcija plazmida pBR322 sa 3'-metoksi-avaronom **Ia** dovodi do transformacije superuvijene forme (FI) u otvorenu cirkularnu formu (FII) sa jednolančanim prekidima.
7. Inkubiranje plazmidne pUC18 DNA sa **Ia** dovodi do intenzivnog cepanja dvolančane DNA stvarajući linearnu formu (FIII) u najvećoj količini uz postajanje i sporije forme (FIV), ali i otvorene cirkularne forme (FII).
8. Interakcijom plazmida pUC18 sa metilamino-derivatima avarona **Ib** i **Ic** ostaju forme (FI) i (FII), ali su kod derivata **Ib** prisutne i linearna forma (FIII) i sporija forma (FIV) koje izostaju pri interakciji plazmida sa derivatom **Ic**.

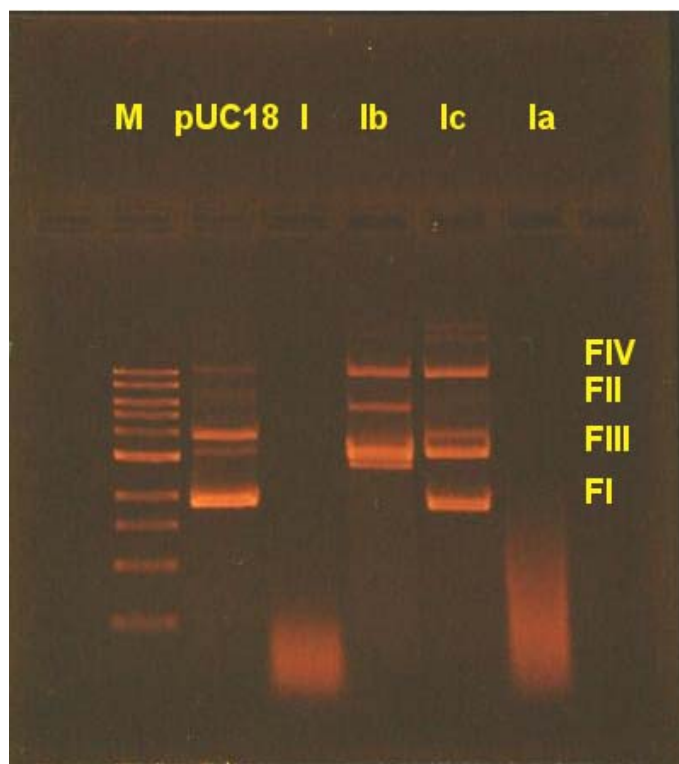
9. Pri interakciji plazmida pBR322 sa jedinjenjima **Ib** i **Ic** dolazi do stvaranja otvorene cirkularne forme (FII) u manjoj količini.

Raniji rezultati<sup>49</sup> za interakciju avarola sa plazmidnom pBR322 DNA pokazuju da avarol uzrokuje pretvaranje superhelikoidne forme DNA (FI) u linearnu formu (FIII) sa jednonlačanim prekidima jedino u prisustvu O<sub>2</sub>. Bez prisustva kiseonika, odnosno u atmosferi N<sub>2</sub>, ne dolazi do transformacija na plazmidu pri čemu se ne javlja ni gašenje fluorescencije etidijum-bromida. Pređašnji rezultati ukazuju na to da je u odsustvu kiseonika onemogućena oksidacija avarola u avaron i nukleofilna Michael-ova adicija neke od nukleinskih baza na hinonsko jezgro te da se u odsustvu kiseonika ne formiraju kiseonični radikali.

Interakcija avarona i njegovih derivata sa plazmidnom pUC18 DNA praćena je i bez prisustva kiseonika. Da bi se uklonio prisutni kiseonik iz reakcione smeše, kroz rastvor je barbotiran azot koji je prethodno propušten kroz ispiralice napunjene baznim rastvorom pirogalola. Reakcione smeše su potom termostatirane 1,5 h na 37 °C uz povremeno mešanje, a nakon isteka predviđenog vremena reakcija je prekinuta dodavanjem pufera za nanošenje uzoraka. Uzorci su analizirani elektroforezom na agaroznom gelu, trake vizualizovane rastvorom etidijum-bromida, a dobijeni gel, nakon osvetljavanja na transiluminatoru i slikanja digitalnom kamerom, dat je na slici 40.

Dobijeni rezultati na gelu mogu se sumirati u nekoliko tačaka:

1. Interakcija jedinjenja **I** i **Ia** sa pUC18 plazmidnom DNA dovodi do potpunog cepanja plazmida. Pri dnu gela, javlja se razmaz koji potiče od DNA fragmenata manjih molekulskih masa.
2. Jedinjenja **Ib** i **Ic** dovode do stvaranja u najvećoj količini linearne forme sa dvolančanim prekidima (FIII) uz povećanje količine sporije forme (FIV). Jedinjenje **Ib** u reakciji sa plazmidom pUC18 dovodi i do stvaranja otvorene cirkularne forme sa jednonlačanim prekidima uz potpuni nestanak superuvijene forme (FI).



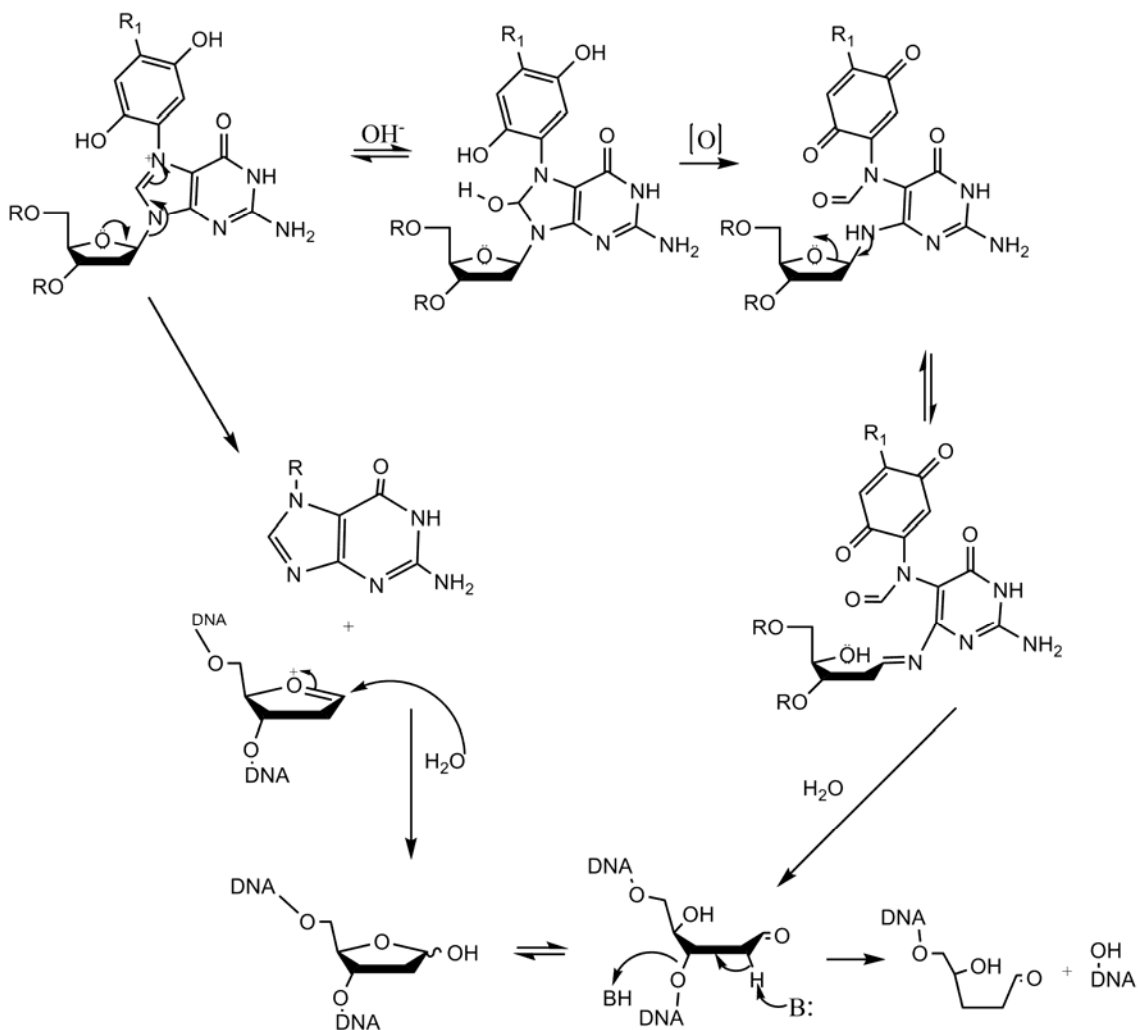
**Slika 40.** Agarozna elektroforeza plazmidne pUC18 DNA i njenih hinonskih modifikata bez prisustva kiseonika

S obzirom na to da u ovom eksperimentu nije bilo kiseonika, a samim tim ni stvorenih kiseoničnih radikalskih vrsti, dobijeni rezultati se mogu objasniti jedino nukleofilnom adicijom neke od nukleinskih baza na hinonsko jezgro uz oksidaciju dobijenog hidrohinoskog intermedijera prisutnim hinonom. Interesantan rezultat dobijen za modifikaciju plazmidne DNA jedinjenjem **Ic**, u poređenju sa jedinjenjem **Ib**, može se objasniti slobodnim 4' položajem na hinonskom jezgru u jedinjenju **Ic** koji je aktiviraniji za nukleofilni napad od slobodnog položaja 3' jedinjenja **Ib**. Veće oštećenje lanca DNA uočava se u eksperimentima koji su rađeni u atmosferi azota.

U eksperimentima koji su rađeni u prisustvu kiseonika, oksidacija hidrohinoskog intermedijera stvorenog nakon nukleofilnog napada je moguća i prisutnim kiseonikom.

Na osnovu dobijenih rezultata, razumno je pretpostaviti da dejstvo hinona na DNA počinje prvo nukleofilnim napadom na hinonsko jezgro pri čemu se stvaraju hidrohinoski intermedijeri (shema 14). U odsustvu kiseonika, stvoreni hidrohinoski intermedijeri podležu depurinaciji, dok u prisustvu kiseonika dolazi do njihove oksidacije, bilo hinonom bilo prisutnim kiseonikom. Tako stvoreni hinonski derivati

DNA ne podležu depurinaciji, ali mogu da dovedu do oštećenja plazmidne DNA stvarajući jednolančane ("nicking") i dvolančane ("cutting") prekide. U prisustvu kiseonika moguće je i stvaranje superoksidnog anjon-radikala koji može generisati visoko reaktivne hidroksi radikale koji oštećuju plazmidnu DNA.



**Shema 14.** Predloženi mehanizam oštećenja plazmidne DNA pod dejstvom hinonskih jedinjenja u prisustvu i odsustvu kiseonika

### 3.7 Interakcija avarona i njegovih derivata sa DNA iz timusa teleta

Uobičajeni pristup izučavanju promena na molekulu DNA je analiza elektroforegrama mikrobne superuvijene plazmidne DNA ili ispitivanje spektroskopskih karakteristika visokomolekulske DNA sisara. Za ispitivanje interakcija avarona i njegovih derivata na linearnu DNA izabrana je DNA iz timusa teleta.

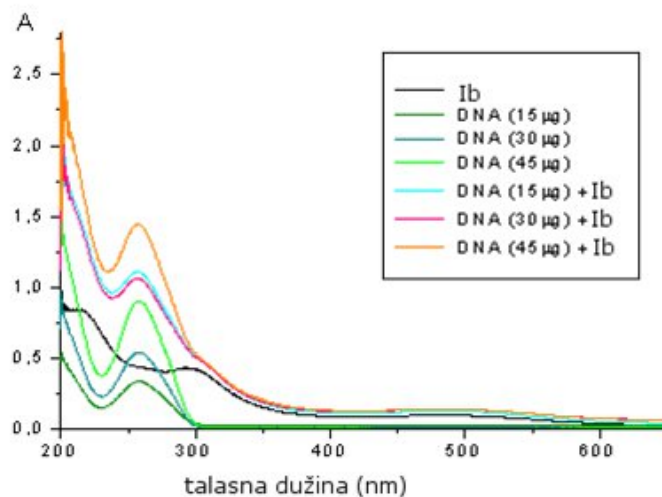
DNA iz timusa teleta rastvorena je u 20 mM Tris-HCl pH 7,5 uz prisustvo 20 mM NaCl i ostavljena preko noći na 4 °C. Koncentracija osnovnog rastvora DNA je puferom podešena na 3 mg/mL ( $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Odnos apsorbancija  $A_{260}/A_{280}$  je iznosio 1,89-2,01, ukazujući na to da je DNA bez proteina.

U bikarbonatni rastvor DNA iz timusa teleta dodavan je etanolni rastvor avarona i njegovih derivata. Dobijena su tri različita rastvora u kojima je količina DNA bila 15 µg, 30 µg i 45 µg redom, količina hinonskih modifikata je u svim rastvorima bila 30 µg a finalna zapremina reakcione smeše bila je 500 µL. Dobijeni rastvori su inkubirani 2 h na 37 °C, a potom centrifugirani na 12000 ob/min. Supernatanti su korišćeni za praćenje interakcija između izabranih hinona i DNA snimanjem apsorpcionih spektara na UV/Vis spektrofotometru i fluorescentnih spektara.

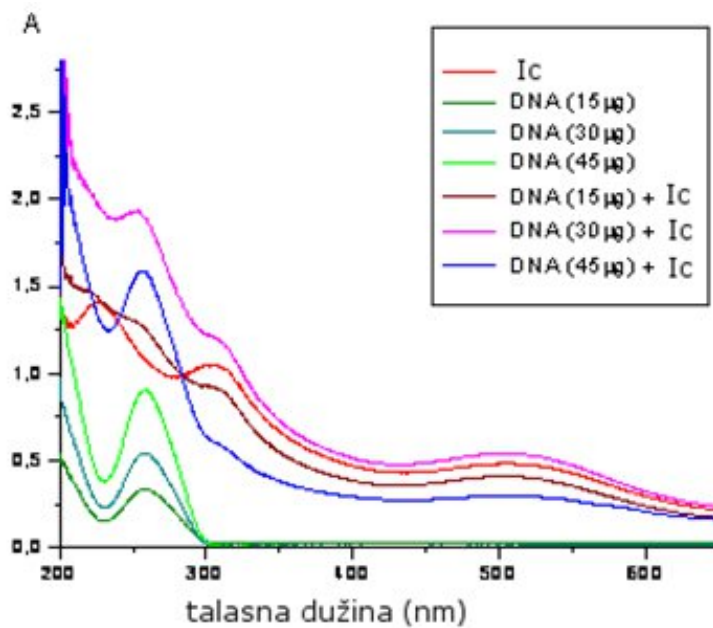
#### 3.7.1 Apsorpcioni spektri hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta

S obzirom na to da se dva DNA lanca međusobno drže vodoničnim vezama između komplementarnih baza, steking interakcije između nukleinskih baza i formirane vodonične veze ograničavaju rezonanciju aromatičnih prstenova, te se kao posledica toga javlja niski apsorpcioni maksimum za nativnu DNA. Kada se dvostruki heliks DNA naruši, bilo termalnom denaturacijom bilo hemijskim agensima, raskidaju se i steking interakcije i jedan deo vodoničnih veza. U tom slučaju nukleinske baze se nalaze u slobodnoj formi pa dolazi do povećanja apsorbancije DNA sa razdvojenim lancima, što se naziva hiperhromni efekat. Pokazano je da je apsorbancija za jednolančanu DNA oko 40% veća nego za dvostruki heliks DNA pri istim koncentracijama.

Rastvori hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta iskorišćeni su za snimanje apsorpcionih spektara DNA nakon modifikacije i upoređeni sa apsorpcionim spektrom nemodifikovane DNA. Dobijeni apsorpcioni spektri dati su na slikama 41, 42 i 43.

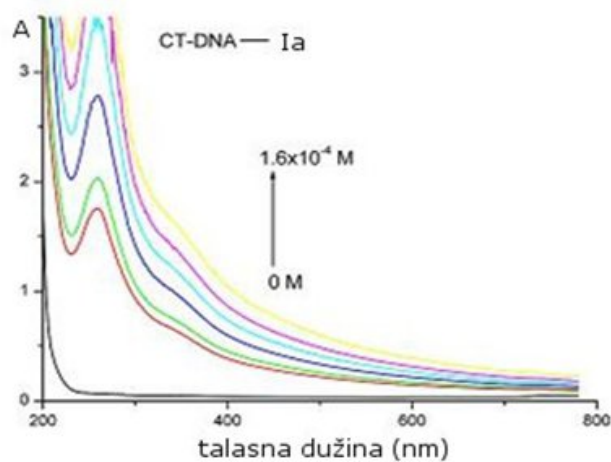


**Slika 41.** UV/Vis apsorpcioni spektri za konjugat 4'-(metilamino)-avarona i DNA iz timusa teleta



**Slika 42.** UV/Vis apsorpcioni spektri za konjugat 3'-(metilamino)-avarona i DNA iz timusa teleta





**Slika 43.** UV/Vis apsorpcioni spektri za konjugat 3'-metoksi-avarona i DNA iz timusa teleta

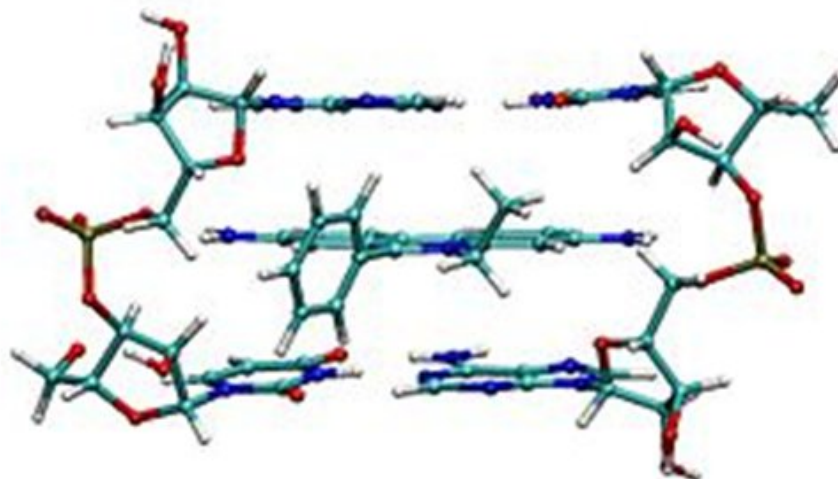
Iz dobijenih spektara se može uočiti da:

1. Postoji razlika u spektrima DNA iz timusa teleta i dobijenih modifikata DNA.
2. Kod apsorpcionih spektara svih modifikata DNA dolazi do porasta u apsorpciji DNA, odnosno javlja se hiperhromni efekat. Dobijeni rezultati ukazuju na to da hinonski derivati dovode do promena na molekulu DNA pri čemu indukcija hiperhromnog efekta ukazuje na vezivanje hinona u maloj brazdi DNA, uzimajući u obzir i samu strukturu hinona.

### 3.7.2 Fluorescentni spektri hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta

Proučavanjem intenziteta fluorescencije etidijum-bromida nakon reakcije sa DNA, dokazano je da se fenil prsten nalazi izvan ravni nukleinskih baza (slika 44). U stvari, fenil grupa je skoro normalna na ravan nukleinskih baza i rotira oko jednostuke veze pronalazeći položaj u kojem minimalno ometa sistem prstenova. Veruje se da je hidrofobno okruženje koje se nalazi između baznih parova odgovorno za fluorescenciju. Naime, smeštanjem etidijum-bromida u hidrofobno okruženje nukleinskih baza, etidijum katjon je primoran da odbaci hidratni sloj vode kojim je bio okružen.

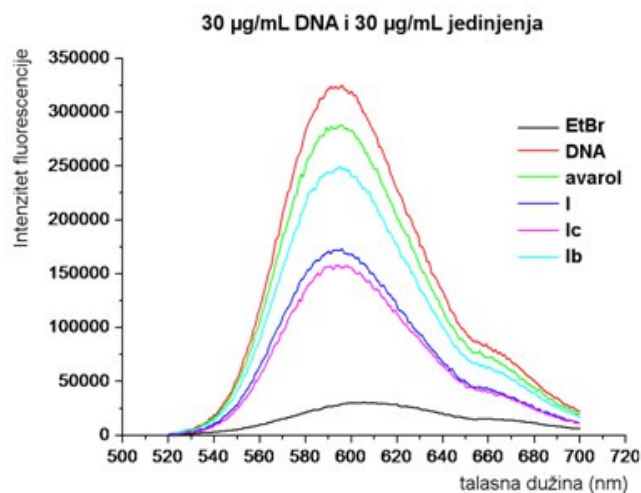
S obzirom na to da voda visoko efikasno gasi fluorescenciju, uklanjanje ovih molekula vode omogućava da etidijum-bromid fluorescira.



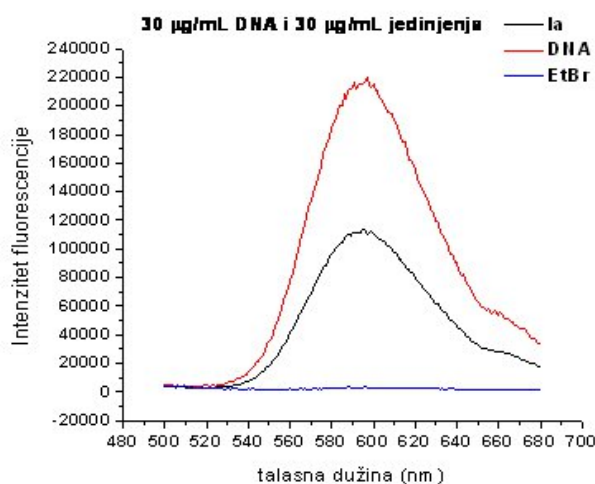
**Slika 44.** Način interkalacije molekula etidijum-bromida između dva adenin–timin bazna para

Interakcije malih molekula i molekula DNA mogu se proučavati merenjem fluorescencije native DNA i dobijenih konjugata. Ukoliko dolazi do interakcije, vezivanje malih molekula za molekul DNA onemogućava interkalaciju molekula etidijum-bromida, što dovodi do smanjenja fluorescencije.

Interakcija avarola, avarona i njegovih hinonskih derivata sa DNA iz timusa teleta praćena je snimanjem fluorescentnih spektara. Za snimanje su korišćeni obrađeni supernatanti nakon reakcija hinonskih jedinjenja i molekula DNA u kojima je i koncentracija DNA i koncentracija hinonskih jedinjenja bila 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dobijeni spektri dati su na slikama 45 i 46.



**Slika 45.** Fluorescentni spektri etidijum-bromida, DNA iz timusa teleta i hinonskih modifikata DNA avarolom i jedinjenjima **I**, **Ib** i **Ic**



**Slika 46.** Fluorescentni spektri etidijum-bromida, DNA iz timusa teleta i modifikata DNA jedinjenjem **Ia**

Iz dobijenih spektara može se uočiti da avarol, avaron i svi ispitivani hinonski derivati dovode do gašenja fluorescencije etidijum-bromida. Očigledno da interakcija hinonskih jedinjenja sa molekulom DNA onemogućava interkalaciju molekula etidijum-bromida. Najverovatnije mesto vezivanja hinonskih jedinjenja jeste mala brazda DNA.

Na osnovu do sada dobijenih rezultata može se zaključiti da avaron i njegovi derivati dovode do oštećenja DNA iz timusa teleta u smislu narušavanja dvostrukog heliksa DNA.

U skladu sa redoks potencijalima za avaron i njegove derivate, biološka aktivnost ovih jedinjenja je povezana sa njihovom mogućnošću da podležu reverzibilnim oksido-redukcionim reakcijama uz stvaranje semihinonskih intermedijera i sposobnošću alkilovanja ćelijskih nukleofila.

Jednoelektronskom oksidacijom semihinonskih intermedijera ili samog hidrohina sa kiseonikom mogu nastati superoksidni anjon-radikal  $O_2^{\cdot -}$ , njegova konjugovana kiselina hidroperoksidni radikal  $HO_2^{\cdot}$  i hidroksil radikal  $OH^{\cdot}$ . Semihinonski intermedijeri i reaktivne kiseonične vrste mogu da reaguju brzo sa bilo kojim dostupnim ćelijskim makromolekulom izazivajući niz ozbiljnih oštećenja poznatih kao oksidativni stres.

Na osnovu dobijenih rezultata za citotoksičnost avarona i njegovih derivata na tumorske ćelije i na osnovu podataka o njihovoj antioksidativnosti i narušavanju dvostrukog heliksa DNA može se pretpostaviti da generisanje kiseoničnih radikalskih vrsta nastaje nakon nukleofilne adicije nukleinskih baza na hinonsko jezgro. Dejstvo hinonskih jedinjenja je manje izraženo u prisustvu  $O_2$ , što potvrđuju i rezultati eksperimenta modifikovanja DNA u atmosferi  $N_2$ .

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

Spisak hemikalija i opreme korišćene u radu:

- Za hromatografiju na koloni korišćen je silika-gel: Kieselgel 60, granulacije 0,063-0,200 mm, Merck.
- UV/Vis spektri su snimani na CINTRA 40 spektrofotometru.
- $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$  spektri za derivate 3'-metoksi-avaron, 4'-(metilamino)-avaron i 3'-(metilamino)-avaron su snimani na OXFORD NMR YH 200 MHz, u deuterohloroformu i sa tetrametil-silanom (TMS) kao inertnim standardom.
- $^1\text{H-NMR}$  i  $^{13}\text{C-NMR}$  spektri za 4'-lizil-avaron su snimani na OXFORD NMR YH 200 MHz, u deuterometanolu i sa tetrametil-silanom (TMS) kao internim standardom.
- Maseni spektri su snimani na masenom spektrometru 6210 Time of Flight LC-MS sistem, Agilent Technologies.
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  vrednosti merene su na Rudolph research analytical polarimetru, Autopol IV.
- Elementalna analiza određena je na Elementar Analysensysteme GmbH VARIO EL III CHNOS.
- Tačke topljenja hinonskih jedinjenja određene su na Boetius PMHK.
- Stepen modifikacije lizozima praćen je na HPLC Äkta purifier, Amersham Pharmacia Biotech, uz korišćenje kolone Water Spherisorb C18 (RP; ODS2, 4,6x250 mm; 2  $\mu\text{m}$  Analytical column).
- Stepen čistoće modifikata lizozima određen je korišćenjem HPLC/MSD ESI TOF Agilent technologies system 1200 series, uz korišćenje kolone Zorbax Eclipse Plus C18 (RP; 100x2,1 mm; 1,8  $\mu\text{m}$ ).
- Tačke topljenja modifikata lizozima određene su korišćenjem luminiscentnog spektrometra LS 50 (Perkin Elmer, USA).

- MALDI TOF spektri modifikata lizozima snimljeni su na Bruker Daltonics Autoflex MALDI TOF masenom spektrometru.
- SDS elektroforeza rađena je na Hoefer SE 600 Ruby sistemu za elektroforezu.
- Eppendorf minifuga Model 5414S upotrebljavana je za centrifugiranje uzoraka.
- Za termostatiranje uzoraka korišćen je Eppendorf Thermostat Model 5320
- Osvetljavanje gelova za snimanje rađeno je na UV transilluminator Vilber-Lourmat France.
- Agarozni gelovi slikani su Panasonic DMC-LZ 5 Lumix Digital Camerom
- Sub-Cell GTDNA Electrophoresis Cell, Bio Rad, USA upotrebljavana je za agaroznu elektroforezu.
- Za snimanje fluorescentnih spektara korišćen je Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon Horiba, Paris, France).

## 4.1 Oksidacija

### 4.1.1 Dobijanje avarona

Rastvoreno je 2 g avarola u 250 mL etra, a zatim je dodato 1,7 g sveže napravljenog  $\text{Ag}_2\text{O}$  u porcijama, uz stalno mešanje. Mešanje je nastavljeno još jedan sat, potom je dodat anhidrovani  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i rastvor ostavljen da se suši preko noći. Talog je odvojen ceđenjem preko infuzorijske zemlje, etar je uparen, a sirovi proizvod nanesen na kolonu napravljenu od 100 g silika-gela (0,063-0,200 mm). Eluirano je toluolom. Dobijeno je 1,95 g avarona (98%). Tačka topljenja je 63 °C.

## 4.2 Dobijanje derivata avarona

### 4.2.1 Dobijanje 3'-metoksi-avarona

U 20 mL metanola rastvoreno je 320 mg avarona, a potom je dodato 400 mg anhidrovanog  $\text{ZnCl}_2$ . Refluktovano je uz mešanje oko dva sata, zatim je rastvor ekstrahovan hloroformom, hloroformska frakcija je isprana vodom, potom 5%  $\text{NaHCO}_3$  pa opet vodom do neutralne reakcije. Dobijeni rastvor je sušen preko anhidrovanog  $\text{MgSO}_4$ . Hloroformski rastvor je zatim uparen do suva. Sirovi proizvod je nanesen na kolonu napravljenu od 80 g silika-gela (0,063-0,200 mm). Eluirano je benzolom. Dobijeno je 252 mg (72%) proizvoda koji je okarakterisan  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , masenim i UV/Vis spektrima kao 3'-metoksi-avaron. Tačka topljenja je 94 °C. Izmerena vrednost  $[\alpha]_D^{20}$  je bila +21,11° (koncentracija  $9 \cdot 10^{-4}$  g/mL u hloroformu).

#### 4.2.2 Dobijanje 4'-(metilamino)-avarona i 3'-(metilamino)-avarona

Rastvoreno je 300 mg avarona u 400 mL smeše etanol-voda (1:1). U smešu je dodato 1,5 g metilamin-hlorhidrata i 3 mL piridina. Posle 16 h mešanja na sobnoj temperaturi alkohol je uparen, a ostatak je ekstrahovan hloroformom. Hloroformski ekstrat je osušen preko anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i uparen. Dobijeni tamnocrveni proizvod (1,65 g) nanesen je na kolonu napravljenu od 80 g silika-gela (0,063-0,200 mm). Eluirano je hloroformom. Dobijeno je više frakcija. Prva (287 mg) je rehromatografisana na koloni načinjenoj od 14 g silika-gela. Dobijen je proizvod mase 112 mg (34%) koji je okarakterisan <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, masenim i UV/Vis spektrima kao 4'-(metilamino)-avaron ili DA. Tačka topljenja DA je 160 °C. Izmerena vrednost [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> je bila +116,25 ° (koncentracija 8·10<sup>-4</sup> g/mL u hloroformu).

Druga frakcija (223 mg), takođe tamnocrvene boje, rehromatografisana je na koloni napravljenoj od 11 g silika-gela (0,063-0,200 mm). Dobijeni proizvod tamnocrvene boje, mase 85 mg (27%) okarakterisan je <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, masenim i UV/Vis spektrima kao 3'-(metilamino)-avaron ili DB. Tačka topljenja DB je 152 °C. Izmerena vrednost [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> je bila +120° (koncentracija 5·10<sup>-4</sup> g/mL u hloroformu).

#### 4.2.3 Dobijanje 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)-amino)avarona

U 24 mL etanola rastvoreno je 80 mg avarona a u 84 mL vode rastvoreno je 60 mg lizin-*α-tert*-Boc-a. Rastvori su pomešani i u finalno dobijeni rastvor dodat je NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> do konačne koncentracije 50 mM. Smeša je ostavljena 48 sati na sobnoj temperaturi uz mešanje a potom je ekstrahovana hloroformom. Hloroformski rastvor je ostavljen da se suši iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nakon uparavanja hloroforma, sirovi proizvod je prečišćavan višestrukim hromatografijama na koloni u toluenu, hloroformu i metanolu. Dobijeni proizvod je konačno prečišćen tankoslojnom preparativnom hromatografijom uz metanol kao eluent. Dobijeno je 17 mg (40%) čistog jedinjenja, koje je okarakterisano <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, masenim i UV/Vis spektrima kao 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avaron. Tačka topljenja dobijenog jedinjenja je 129-131 °C. Izmerena vrednost [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> je bila -39° (koncentracija 10<sup>-3</sup> g/mL u metanolu).



### 4.3 Ispitivanje antimikrobnog dejstva prema odabranim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijskim kulturama i prema odabranim gljivicama disk-difuzionom metodom

Antibakterijska aktivnost avarona i njegovih derivata testirana je prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijskim kulturama. Korišćene su sledeće gram-pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Streptosporangium longisporum* (ATCC 25212), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) i sledeće gram-negativne bakterije: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Antifungalna aktivnost derivata testirana je prema *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Candida albicans* (ATCC 10231) i *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

Prema propisu proizvođača, napravljen je hranljivi agar i razliven u Petri šolje. Na sterilne papirne diskove prečnika 8 mm naneto je po 50  $\mu$ L rastvora ispitivanih jedinjenja u DMSO tako da je količina jedinjenja bila 1 mg/disk. Diskovi su stavljeni u Petri šolje na agar koji je prethodno zasejan suspenzijom testiranih mikroorganizama. Sadržaj je termostatiran 24 h na 37 °C za bakterijske kulture odnosno 48 h na 30 °C za kulture gljivica. Standardni diskovi tetraciklina i nistatina, koncentracije 30  $\mu$ g/disk, su korišćeni kao pozitivne kontrole, dok je disk sa nanesenih 50  $\mu$ L čistog DMSO-a korišćen kao negativna kontrola. Antibakterijska i antifungalna aktivnost je izražena kao prečnik zone inhibicije rasta u milimetrima. Svaki test urađen je u triplikatu.

## 4.4 Test biološke aktivnosti – "*Brine shrimp*"

Jedna kašičica liofilizovanih jaja *Artemia salina* stavljena je u 1 L veštačke morske vode, dodato je par kapi suspenzije kvasca (3 mg suvog kvasca u 5 mL dest. vode) i pomoću pumpe prođivan je vazduh kroz vodu tokom 24 h uz osvetljavanje pomoću stone lampe.

Napravljeni su rastvori u DMSO avarona i njegovih derivata. U staklene bočice je stavljeno po 5 mL veštačke morske vode, 1-2 kapi suspenzije kvasca, unet je određeni broj razvijenih račića (10-20 račića) i rastvori svih derivata do njihove konačne koncentracije 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL i 0,3 mg/mL. Ovako pripremljene probe ostavljene su na sobnoj temperaturi uz osvetljavanje 24 h. Po isteku ovog vremena u svakoj bočici prebrojani su živi i mrtvi račići i rezultat je izražen kao procenat uginulih rakova. Sve probe su urađene u triplikatu. Posle statističke obrade određene su  $LC_{50}$ .

## 4.5 Ispitivanje antitumorskog dejstva

### 4.5.1 Čelijske linije

Za ispitivanje čelijskog rasta korišćeno je pet čelijskih linija: HL 60 -humana promijelocitna leukemija, Jurkat - humana leukemija T ćelija, , MDA-MB-231 - humani adenokarcinom dojke negativan za estrogen-receptor (ER-), MCF7 - humani adenokarcinom dojke pozitivan za estrogen-receptor (ER+) i MRC-5 - humani fibroblasti pluća.

Medijum za gajenje kultura DMEM i RPMI1640 (Sigma) sadrži antibiotike: penicilin (100 IJ/mL) i streptomycin (100 µg/mL) (ICN Galenika). Sve čelijske linije održavaju se u sudovima za kulturu (Costar, 25 cm<sup>2</sup>) na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlage i 5% CO<sub>2</sub> (Heraeus).

U eksperimentima su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja.

Ćelije koje rastu u jednom sloju (MRC-5, HL 60, MDA-MB-231 i MCF-7), presađuju se po postizanju konfluencije od 80-90%. Disocijacija jednog sloja (tripsinizacija) je vršena dodavanjem 0,1 mL 0,5% rastvora tripsina, nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma, pri čemu komponente seruma inaktiviraju tripsin. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta na 1500 o/min, a ćelijski talog resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost testom odbacivanja boje sa tripan-plavim (*dye exclusion test – DET*)<sup>91</sup>.

Ćelije koje rastu u suspenziji (Jurkat). Ćelijska suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 1500 o/min, a ćelijski talog resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost DET testom.

#### 4.5.2 Određivanje broja ćelija i vijabilnosti

U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su DET testom. Tripan-plavo je boja koja ulazi u ćeliju ukoliko je narušen integritet ćelijske membrane. Žive ćelije odbacuju boju. Pri tome se mrtve ćelije boje u plavo, pa je na ovaj način moguće razlikovati žive od mrtvih ćelija. Ćelijska suspenzija (50 µL) je razblažena sa 200 µL 0,5% rastvora tripan-plavog i ćelije su odmah brojane u hemocitometru (komorica za brojanje krvnih elemenata) na invertnom mikroskopu.

Broj ćelija u 1 mL suspenzije izračunat je prema sledećoj formuli, uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5$$

$N$  = ukupan broj živih ćelija u 1 ml suspenzije;

$N_0$  = broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra;

5 = faktor dilucije;

$10^4$  = korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u mL).

Vijabilnost ćelija je izračunata prema sledećoj formuli:

$$V(\%) = (N_0/N_0+M_0) \times 100$$

$N_0$  = broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra;

$M_0$  = broj mrtvih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra.

Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%.

#### 4.5.3 Kolorimetrijski SRB test<sup>92</sup>

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min/200xg) i izbrojane u 0,1% tripan-plavom. Vijabilne ćelije su posejane u kvadriplikatu u mikrotitar-ploče sa 96 otvora, tako da je u 180  $\mu$ L medijuma bilo  $5 \times 10^3$  ćelija po otvoru (MRC-5, HL 60, MDA-MB-231 i MCF-7), odnosno  $1 \times 10^4$  ćelija po otvoru (Jurkat). Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5% CO<sub>2</sub> naredna 24 h. Po isteku inkubacije, u sve otvore osim kontrolnih (ćelije u medijumu), dodato je po 20  $\mu$ L ispitivane supstance odgovarajuće koncentracije i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku 48 h. Nakon 48 h vrši se fiksiranje ćelija dodatkom 50  $\mu$ L 50% TCA (MRC-5, HL 60, MDA-MB-231 i MCF-7) ili dotakom 50  $\mu$ L 80% TCA (Jurkat) po jednom otvoru. Ćelije se drže 1 h na +4 °C i ispiraju pet puta destilovanom vodom da bi se uklonili proteini seruma, medijum i lakši metaboliti. Zatim se vrši bojenje pomoću 0,4% rastvora SRB u 1% sirćetnoj kiselini. Nakon 30 minuta vrši se ispiranje viška boje sa 1% sirćetnom kiselinom. Ploče se zatim suše na vazduhu. Boja se neposredno pred merenje ekstrahuje TRIS-om (10 mmol/dm<sup>3</sup>), pH 10,5. Merenje apsorbancije vrši se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Kao kontrola pri očitavanju rezultata korišćene su ćelije bez dodatka ispitivane supstance. Slepa proba bio je rastvor medijuma bez ćelija ("blank").

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$$CI = (1 - A_s/A_k) \cdot 100$$

$A_k$  = apsorbancija kontrolnih uzoraka

$A_s$  = apsorbancija uzoraka sa ispitivanom supstancijom.

## 4.6 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom

Antioksidativna aktivnost jedinjenja merena je DPPH testom. Test se zasniva na merenju gubitka ljubičaste boje 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil slobodnog radikala u reakciji sa potencijalnim antioksidantima na 517 nm. Hinoni su rastvoreni u metanolu u koncentraciji 1 mg/mL, a zatim razblaženi metanolom u odnosu 1:20. U 1800  $\mu\text{L}$  svežeg metanolnog rastvora DPPH koncentracije 0,1 mM dodato je po 200  $\mu\text{L}$  metanolnih rastvora hinona. Dobijeni rastvori su promešani, ostavljeni 30 min u mraku i nakon toga je merena apsorbancija na 517 nm. Svi uzorci su urađeni u triplikatu.

Procenat inhibicije DPPH radikala izračunat je prema formuli:

$$I(\%) = \frac{[A_0 - A_{\text{slupe probe}} - A_{\text{uzorka}}]}{A_0} \times 100$$

gde je

$A_0$  početna apsorbancija rastvora DPPH radikala bez hinona

$A_{\text{slupe probe}}$  apsorbancija samih hinona u metanolu (s obzirom na to da su obojena jedinjenja)

$A_{\text{uzorka}}$  apsorbancija DPPH nakon reakcije sa hinonima.

## **4.7 Hemijska modifikacija lizozima iz belanceta jajeta avaronom i njegovim derivatima**

### **4.7.1. Hemijska modifikacija lizozima. Optimizacija uslova**

Lizozim iz belanceta jajeta (EC 3.2.1.17) kupljen je od Sigmee. Uslovi za modifikaciju lizozima optimizovani su praćenjem reakcije lizozima i avarona u 20% etanolu i 20% DMSO u prisustvu 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  u normalnoj i atmosferi azota. Stepenn modifikacije lizozima praćen je HPLC-om (HPLC Äcta purifier, Amersham Pharmacia Biotech). Na kolonu Waters Spherisorb C18 (RP 18; ODS2, 4,6x250 mm; 2 µm Analytical column) naneto je 10 µL uzorka. Temperatura kolone bila je 25 °C dok je brzina protoka bila 200 µL/min. Eluent (A) bio je 0,2% mravlja kiselina u vodi, a eluent (B) acetonitril. Nakon 25 min hromatografija je prekinuta. Postupak je ponovljen za sve avarolske i avaronske modifikate lizozima. Najveći stepenn modifikacije lizozima avaronom uočen je u 20% etanolu u normalnoj atmosferi u prisustvu 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pa su ti uslovi korišćeni za dalje modifikacije lizozima avaronskim derivatima.

Napravljena smesa finalne zapremine 1,2 mL sadrži 960 µL vodenog rastvora proteina i 240 µL rastvora avarona i derivata u 96% etanolu, tako da je konačna koncentracija proteina bila 5 mg/mL i hinona 2 mg/mL u 20% etanolu. U smesu je dodat  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  u koncentraciji 50 mM.

Modifikacija enzima je trajala 48 h na sobnoj temperaturi uz neprestano mućkanje na šejkeru. Svi uzorci su centrifugirani 5 min na 14000 ob/min. Supernatanti su korišćeni za SDS elektroforezu.

### **4.7.2 SDS elektroforeza**

Napravljeni su potrebni rastvori po osnovnom uputstvu<sup>93</sup>. Za rad je korišćen 10% gel za razdvajanje i 4% gel za koncentrovanje, a sam naćin pripreme je dat u tabeli 17.



**Tabela 18.** Priprema pufera za obradu uzorka<sup>94</sup>

Rastvori za PUZ	1 X
0,5 M Tris HCl pH 6,8	3,12 mL
99 % Glicerol	2,50 mL
10 % SDS	5 mL
0,1 % Brom fenol plavo	0,5 mL
Voda do	23,75 mL
Komercijalni $\beta$ -ME	1,25 mL

**Tabela 19.** Detekcija proteinskih traka<sup>95</sup>

Faza	Rastvor	Vreme (min)
Ispiranje	destilovana voda	1
Fiksiranje	za fiksiranje	20
Bojenje	boja CBB R-250	20
Obezbojavanje	za obezbojavanje	20
Obezbojavanje	za obezbojavanje	preko noći

Nakon završene elektroforeze gel se pažljivo prenese u staklenu šolju, kratko ispere destilovanom vodom, a zatim fiksira rastvorom (50% metanol, 10% sirćetna kiselina). Gel sa fiksiranim proteinskim trakama se boji organskom bojom Coomassie brilliant blue (CBB R-250) 0,1%. Višak boje uklanja se rastvorom za obezbojavanje (5% metanol, 7% sirćetna kiselina).

#### 4.7.3 Provera čistoće modifikovanog lizozima HPLC-om

Supernatanti modifikovanog lizozima su naneti na kolonice napunjene Sephadex-om G-50. Enzimi su eluirani destilovanom vodom. Sakupljene su frakcije modifikovanog enzima (silazi u  $V_0$ ).

Čistoća modifikata proveravana je na sistemu HPLC/MSD ESI TOF Agilent technologies system 1200 series. Na kolonu Zorbax Eclipse Plus C18



(RP; 100x2,1 mm; 1,8  $\mu\text{m}$ ) injektovano je po 1  $\mu\text{L}$  nemodifikovanog lizozima i lizozima modifikovanog avaronom. Temperatura kolone bila je 40  $^{\circ}\text{C}$ , a brzina protoka 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Eluent (A) je bio 0,2% mravlja kiselina/voda a eluent (B) acetonitril. Nakon 20 min hromatografija je stopirana. Retenciono vreme za nemodifikovani lizozim bilo je 6,325 min a za modifikovani lizozim 6,361 min.

#### **4.7.4 Snimanje masenih spektara modifikovanog lizozima**

LC/MS analize su rađene na masenom spektrometru 6210 Time-of-Flight LC-MS system (Agilent Technologies). Vodeni rastvori uzoraka modifikovanog lizozima su u struji mobilne faze (0,2% mravlja kiselina u vodi-acetonitril=50:50) protoka 0,2 mL/min u maseni spektrometar unošeni pomoću Agilent Technologies 1200 Series HPLC instrumenta (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) sa binarnom pumpom, autosamplerom, kolonskim odeljkom (sa ZDV ćelijom umesto kolone) i DAD detektorom.

Maseni spektri su snimani u pozitivnom modu u sledećim uslovima: napon kapilare 4000 V, temperatura gasa 350  $^{\circ}\text{C}$ , protok gasa za sušenje 12 L/min, pritisak rasprskivača 45 psig, napon fragmentora 200 V, opseg masa 100–3200 m/z.

Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je MassHunter Workstation programski paket.

#### **4.7.5 Snimanje MALDI TOF modifikata lizozima**

Prosečne molekulske mase nemodifikovanog i modifikovanog lizozima snimane su na Bruker Daltonics Autoflex MALDI-TOF masenom spektrometru u linearnom modu pozitivnih jona. Za snimanje je kao matriks korišćena sinapinska kiselina u 30% acetonitrilu uz dodatak 0,1% trifluorosirćetne kiseline.

Proteinske trake lizozima i modifikata lizozima na elektroforetskom gelu su bojene Coomassie brilliant blue G-250 bojom, nakon čega je urađena tripsinska digestija proteinskih traka u gelu. Identični uslovi snimanja (sinapinska kiselina u 30% acetonitrilu uz dodatak 0,1% trifluorosirćetne kiseline) su korišćeni i za snimanje

prosečne molekulske mase peptidnih fragmenata nemodifikovanog i modifikovanog lizozima.

Za sakupljanje i obradu dobijenih podataka korišćen je programski paket Flex analysis i baza podataka Swiss prot.

#### **4.7.6 Određivanje koncentracije lizozima nakon modifikacije Bradford-ovom metodom**

Metoda se zasniva na vezivanju boje Coomassie brilliant blue G-250 za protein, pri čemu se maksimum boje pomera sa 465 nm (kada nema proteina) na 595 nm (kompleks protein—boja). Meri se porast apsorbancije na 595 nm.

Potrebni rastvori:

1. Koncentrovana boja, Coomassie brilliant blue G-250

CBB G-250	100 mg
95% etanol	50 mL
konc. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mL
vode do	200 mL

Boja se rastvori u etanolu, pa se dodaju redom kiselina i voda do finalne zapremine.

2. Bradford-ov reagens

rastvor 1	100 mL
vode do	500 mL

U 100 µL proteinskog rastvora doda se 5 mL razblaženog rastvora boje, promeša se na vorteksu i nakon 5 minuta se meri apsorbancija na 595 nm.

Prvo je urađena standardna serija različitih koncentracija BSA merenjem apsorbancije na 595 nm, a zatim je na isti način određena apsorbancija proteina u datim uzorcima. Koncentracija proteina se očitava sa standardne krive koncentracije BSA.

#### 4.7.7 Određivanje enzimске aktivnosti lizozima nakon modifikacije

Enzimska aktivnosti lizozima nakon modifikacije je određena standardnim postupkom za određivanje aktivnost lizozima. Jedna enzimska jedinica jednaka je smanjenju apsorbancije rastvora od 0,001 nm u minutu na 450 nm, pH 7,0 i 25 °C.

Potrebni reagensi:

1. 0,1 M kalijum-fosfatni pufer pH 7,0
2. ćelije *Micrococcus luteus*

Suspenduje se 9 mg *Micrococcus luteus*-a u 25 mL 0,1 M kalijum-fosfatnom puferu pH 7,0, a zatim razblaži do 30 mL istim puferom.

Lizozim se rastvori u hladnoj destilovanoj vodi tako da koncentracija enzima bude 1 mg/mL. Pre samog merenja, takav enzimski rastvor se razblaži vodom do koncentracije enzima od 150-500 UI/mL (promene apsorbancije u minutu 0,015-0,040).

U kivetu za merenje apsorbancije se otpipetira 2,9 mL suspenzije *Micrococcus luteus*-a, doda se 0,1 mL enzima odgovarajućeg razblaženja, a zatim meri promena apsorbancije na 450 nm u toku jednog minuta.

Enzimska aktivnost se određuje prema formuli

$$\text{IU/mg} = \frac{\Delta A_{450/\text{min}} \times 1000}{\text{mg enzima u reakcionoj smesi}}$$

Kao kontrola, određena je i enzimska aktivnost lizozima tretiranog pod istim uslovima kao i modifikovani lizozim, ali bez dodatka avarona i njegovih derivata.

#### 4.7.8 Određivanje tačke topljenja lizozima i njegovih modifikata

Temperature topljenja lizozima i njegovih modifikata određene su fluorescentnom spektroskopijom korišćenjem luminiscentnog spektrometra LS 50 (Perkin Elmer, USA) sa termostatom i kivetom od 1 cm. Merena je unutrašnja emisiona fluorescencija na 340 nm uz ekscitaciju na 280 nm uz korišćenje proreza širine 5 nm i za ekscitaciju i za emisiju. Merenja su rađena u temperaturnom opsegu od 10-95 °C uz

radni hod od 0,5 °C/min. Koncentracija lizozima i njegovih modifikata bila je 0,04 mg/mL.

#### **4.7.9 Određivanje MIC vrednosti za avaron, njegove derivate, lizozim i njegove modifikate<sup>87</sup>**

MIC vrednosti određivane su za avaron, njegove derivate, tretirani lizozim bez prisustva hinonskih jedinjenja, lizozim i njegove modifikate prema gram-pozitivnim bakterijama: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Streptosporangium longisporum*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea* i *Staphylococcus aureus* i prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enteritidis*.

Napravljeni su 1% hranljivi bujon Mueller Hinton po upustu proizvođača i osnovni rastvori svih ispitivanih jedinjenja. U mikrotitar-ploče sa 96 mesta uneto je po 100 µL hranljivog bujona. U prvi bunarčić dodato je 100 µL rastvora ispitivanog jedinjenja i sadržaj je izmešan. Iz tog bunara je potom uzeto 100 µL rastvora, koji je prenesen u sledeći bunarčić i sadržaj je izmešan. Postupak dvostrukog razblaživanja je ponavljan dok se nisu ispunili svi bunarčići u jednom redu. Istim postupkom je ostatak bunarčića u mikrotitar-ploči ispunjen ostalim derivatima, vodom kao slepom probom za lizozim i njegove modifikate, DMSO-om kao slepom probom za avaron i njegove derivate i kontrolnim antibiotikom amikacinom. U svaki od bunarčića je dodato po 10 µL odgovarajuće bakterijske kulture ( $1 \times 10^8$  ćelija/mL), mikrotitar-ploče su zatvorene i sadržaj u njima je termostatiran 24 h na 37 °C. Nakon termostatiranja, turbidimetrijskom metodom su određeni bunarčići u kojima ne postoji rast bakterijske kulture. MIC odgovara koncentraciji jedinjenja u onom bunaru gde se po prvi put ne javlja rast bakterijske kulture.

## 4.8 Dejstvo avarona i njegovih derivata na cirkularnu i linearnu DNA<sup>96</sup>

U eksperimentima su korišćeni plazmidi pBR322 i pUC18 iz *Escherichia coli* RRI kupljeni od Sigma-Aldrich, SAD koji sadrže preko 80% superhelikoidne DNA i DNA iz timusa teleta kupljen od Serva, Heidelberg.

### 4.8.1 Interakcije avarona i njegovih derivata sa plazmidom pBR322 i plazmidom pUC18

Potrebni rastvori:

1. Osnovni rastvor 0,5 M etilendiamin-tetrasirćetne kiseline (EDTA)
  - 93,05 g EDTA se rastvori u 400 mL destilovane vode
  - 10 % rastvorom NaOH se pH podesi na 8,0
  - dobijeni rastvor se destilovanom vodom razblaži do konačne zapremine od 500 mL
2. Osnovni rastvor TAE (50x)
  - 242 g Tris-HCL se rastvori u 750 mL destilovane vode
  - pažljivo se doda 57,1 mL glacijalne sirćetne kiseline i 100 mL napravljenog 0,5 M rastvora EDTA pH 8,0
  - dobijeni rastvor se destilovanom vodom razblaži do konačne zapremine od 1 L
3. TAE radni pufer (1x)
  - jedna zapremina osnovnog rastvora TAE se razblaži 50 puta destilovanom vodom
  - dobijeni rastvor je 40 mM Tris-acetat i 1 mM EDTA pH 8,24
4. Pufer za nanošenje uzoraka
  - 25 mg bromfenol plavo (0,25 %)
  - 25 mg ksilen-cijanola (0,25 %)
  - 3 mL glicerola (0,30 %)
  - doda se destilovana voda do 10 mL

Avaron i njegovi derivati su rastvoreni u etanolu u koncentraciji 10 mg/mL. Interakcije hinonskih jedinjenja sa plazmidima pBR322 i pUC18 rađene su u bikarbonatnom puferu (40 mM, pH 8,4).

Reakciona smeša ukupne zapremine 20  $\mu$ L se sastojala od 495 ng plazmida pBR322 u prisustvu 30  $\mu$ g avarona i njegovih derivata u bikarbonatnom puferu.

Reakciona smeša ukupne zapremine 20  $\mu$ L se sastojala od 227 ng plazmida pUC18 u prisustvu 30  $\mu$ g avarona i njegovih derivata u bikarbonatnom puferu.

Ispitivani rastvori su inkubirani 2 h na 37 °C uz povremeno mućkanje. Interakcija avarona i njegovih derivata sa plazmidom DNA prekinuta je dodavanjem 5  $\mu$ L pufera za nanošenje uzoraka. Dobijeni uzorci su dalje ispitivani elektroforezom na agaroznom gelu i do elektroforeze čuvani na 4 °C.

#### **4.8.2 Interakcije avarona i njegovih derivata sa plazmidom pUC18 bez prisustva kiseonika**

Avaron i njegovi derivati su rastvoreni u etanolu u koncentraciji 10 mg/mL dok je pUC18 rastvoren u bikarbonatnom puferu (40 mM, pH 8,4).

Napravljen je bazni rastvor pirogalola rastvaranjem 30 g pirogalola u 200 mL 50% rastvora NaOH.

Kroz ispiralice napunjene baznim rastvorom pirogalola, propuštan je azot da bi se uklonili tragovi kiseonika eventualno prisutni u komercijalno kupljenom gasu. Da bi se uklonio prisutni kiseonik iz reakcione smeše, kroz bikarbonatni rastvor plazmida je barbotiran prečišćen azot. U rastvor plazmida su potom, takođe u struji azota, dodavani rastvori avarona i njegovih derivata, redom. Kroz tako dobijene rastvore je još neko vreme barbotiran azot, Eppendorf kivete su zatvorene pod azotom, a ispitivani rastvori inkubirani 2 h na 37 °C uz povremeno mućkanje.

Reakciona smeša ukupne zapremine 20  $\mu$ L se sastojala od 227 ng plazmida pUC18 u prisustvu 30  $\mu$ g avarona i njegovih derivata u bikarbonatnom puferu.

Interakcija avarona i njegovih derivata sa plazmidom DNA prekinuta je dodavanjem 5  $\mu$ L pufera za nanošenje uzoraka. Dobijeni uzorci su dalje ispitivani elektroforezom na agaroznom gelu i do elektroforeze čuvani na 4 °C.

### 4.8.3 Elektroforeza na agaroznom gelu<sup>97</sup>

Agarozna je pripravljena tako što je 1 g agaroze suspendovan u 100 mL redestilovane vode i sadržaj prokuvan u mikrotalasnoj pećnici do potpunog rastvaranja. Rastvor je potom ohlađen do 65 °C, naliven u kalup sa postavljenim češljevima i ostavljen da očvrstne. Kada je gel očvrstnuo, češljevi su pažljivo izvađeni i kalup je postavljen u kadu za horizontalnu elektroforezu sa TEA puferom. Na gel je nanoseno 10 µL nemodifikovanog rastvora plazmida (pBR322 u jednom i pUC18 u drugom slučaju) i po 10 µL plazmida modifikovanog avaronom i njegovim derivatima.

Elektroforeza je rađena na konstantnom naponu od 80 V oko 1,5 h dok brom-fenol-plavo nije prešlo oko 75% gela.

Po završetku elektroforeze, gel je potopljen 30 min u vodeni rastvor etidijum-bromida (2 µL 10% rastvora je rastvoreno u 40 mL destilovane vode), radi bojenja traka DNA, a potom obezbojavan 5 min u sterilnoj destilovanoj vodi.

Obojeni gelovi su posmatrani na UV transiluminatoru pod ultraljubičastim svetlom na 312 nm i fotografisani digitalnom kamerom.

### 4.8.4 Interakcija avarona i njegovih derivata sa DNA iz timusa teleta

DNA iz timusa teleta rastvorena je u 20 mM Tris-HCl pH 7,5 koji sadrži 20 mM NaCl i ostavljena preko noći na 4 °C.

UV spektrofotometrijom određen je odnos apsorbancije za DNA iz timusa teleta na 260 nm i 280 nm. Dobijeni odnos  $A_{260}/A_{280}$  od 1,89-2,01 ukazuje na to da je DNA čista i bez prisustva proteina. Koncentracija DNA je, takođe, određena UV spektrofotometrijom, merenjem apsorbancije rastvora DNA na 260 nm. Dobijeno je da jedna optička jedinica dvostruko uvijene DNA odgovara 50 µg/mL, s obzirom na činjenicu da je molarni apsorpcioni koeficijent  $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ <sup>98</sup>. Koncentracija DNA je puferom podešena na 5 mg/mL. Ovakav osnovni rastvor je čuvan u frižideru i stabilan je nekoliko dana.

Od napravljenog osnovnog rastvora DNA iz timusa teleta uzeto je po 3 µL, 6 µL i 9 µL i razblaženo sa 494 µL, 491 µL i 488 µL pufera, redom. U te rastvore je zatim dodato po 3 µL etanolnih osnovnih rastvora hinona.

Dobijena su tri različita rastvora u kojima je količina DNA bila 15 µg, 30 µg i 45 µg, redom, količina hinonskih modifikata je u svim rastvorima bila 30 µg, a finalna zapremina reakcione smeše bila je 500 µL. Dobijeni rastvori su inkubirani 2 h na 37 °C uz povremeno mešanje. Uzorci su čuvani na 4 °C i dalje korišćeni za snimanje UV/Vis apsorpcionih spektara i fluorescentnih spektara.

#### **4.8.5 Snimanje UV/Vis apsorpcionih spektara hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta**

Rastvori dobijeni nakon obrade uzoraka modifikovane DNA iz timusa teleta korišćeni su za snimanje UV/Vis apsorpcionih spektara. Za snimanje spektara korišćen je Cintra 40 UV/Vis spektrofotometar i kvarcne kivete. Spektri su snimani u opsegu talasnih dužina od 200-800 nm, a dobijene vrednosti obrađene korišćenjem programa Origin 8.

#### **4.8.6 Snimanje fluorescentnih spektara hinonskih modifikata DNA iz timusa teleta**

Rastvori dobijeni nakon obrade uzoraka modifikovane DNA iz timusa teleta korišćeni su i za snimanje fluorescentnih spektara.

U rastvore modifikovane DNA, pre snimanja fluorescentnih spektara dodat je po 1 µL 0,1 % rastvora etidijum-bromida.

Za snimanje spektara je korišćen Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon Horiba, Paris, France) opremljen ksenonskom lampom jačine 450 W. Za ekscitaciju i emisiju korišćen je prorez širine 2 nm (uz radni hod od 1 nm) i kvarcna kiveta sa optičkim putom od 1 cm.

Spektri su snimani u opsegu talasnih dužina od 500—700 nm, a dobijene vrednosti obrađene korišćenjem programa Origin 8.



## 5. ZAKLJUČAK

Hinonsko/hidrohinoski par avaron/avarol pokazuje niz bioloških efekata, uključujući antileukemijsku aktivnost *in vitro* i *in vivo*, i dejstvo na virus AIDS-a. Cilj ovog rada bio je dobijanje derivata avarona sa elektron-donorskim supstituentima na hinonskom jezgru i proveravanje njihove biološke aktivnosti. Nakon utvrđivanja biološke aktivnosti, kao novi cilj se nametnulo proučavanje mehanizma biološkog dejstva dobijenih derivata, odnosno proučavanje alkilovanja ćelijskih nukleofila kao i dobijanje bioaktivnih konjugata. Kao ćelijski nukleofili izabrani su: enzim lizozim iz belanceta jajeta, DNA bakterijskog porekla (pBR322 i pUC18) i DNA sisarskog porekla (iz timusa teleta).

Derivati su dobijeni nukleofilnom adicijom Michael-ovog tipa, uz naknadnu oksidaciju nastalih hidrohina prisutnim kiseonikom ili polaznim hinonom.

Dobijena su tri derivata avarona: 4'-(metilamino)-avaron, 3'-(metilamino)-avaron i 3'-metoksi-avaron. Svi derivati su okarakterisani <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, masenim i UV/Vis spektrima.

Antibakterijska aktivnost dobijenih derivata je ispitivana prema gram-pozitivnim bakterijama: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Streptosporangium longisporum*, *Micrococcus flavus*, *Sarcina lutea* i *Staphylococcus aureus*, prema gram-negativnim bakterijama: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* i prema kulturama gljivica: *Aspergillus niger*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* disk difuzionom metodom. Prema ispitivanim bakterijskim sojevima, najveće antibakterijsko dejstvo pokazuje avaron, umerenu antibakterijsku aktivnost pokazuje jedinjenje 3'-metoksi-avaron dok jedinjenje 4'-(metilamino)-avaron ne pokazuje antibakterijsku aktivnost ni prema jednom od ispitivanih sojeva.

Od ispitivanih sojeva gljivica, nijedno od ispitivanih jedinjenja ne pokazuje aktivnost prema *S. cerevisiae* dok prema sojevima *A. niger* i *C. albicans* avaron i 3'-metoksi-avaron pokazuju antifungalno dejstvo.

“*Brine shrimp*“ testom je određena toksičnost derivata na račiće *Artemia salina*. Izuzev derivata 3'-(metilamino)-avarona, ostali derivati pokazuju znatnu toksičnost. Toksičnost 3'-metoksi-avarona je čak sedam puta veća od samog avarona.

Za avarol, avaron i sintetisane avaronske derivate određena je antitumorska aktivnost na osam vrsta ćelija raka: ćelijske linije raka grlića materice (HeLa), melanoma (Fem-X), leukemije (K562), raka dojke pozitivnog na estrogenski receptor (MCF7), raka dojke negativnog za estrogenski receptor (MDA-MB-231), raka pluća (MRC5), leukemije T-ćelija (Jurkat) i promijelocitne leukemije (HL60). Osim prema ćelijama raka pluća (MRC5), prema ostalim ispitivanim ćelijskim linijama svi derivati pokazuju antitumorsku aktivnost. Uočava se određena selektivnost derivata prema ćelijama leukemije (K562) i leukemije T-ćelija (Jurkat). Dobijene IC<sub>50</sub> vrednosti prema ovim ćelijskim linijama bile su manje od 10 μM, što predstavlja jaku antitumorsku aktivnost sličnu aktivnosti komercijalnih antitumorskih lekova topotekan, gemcitabin i cisplatin. Jedinjenje 4'-(metilamino)-avaron pokazuje najveću aktivnost prema ćelijama melanoma (Fem-X). Vrednost IC<sub>50</sub> za ovo jedinjenje (2,41 μM) je manja od IC<sub>50</sub> vrednosti za komercijalna jedinjenja korišćena pri lečenju melanoma daunorubicin (12 μM), karmustin (37 μM) i gosipol (8,2 μM).

Određena je i citotoksičnost prema limfocitima (PBMC – mononuklearne ćelije periferne krvi), kako nestimulisanim tako i stimulisanim fitohemaglutininom u cilju pojačanog imunog odgovora. Dobijene IC<sub>50</sub> vrednosti ukazuju na to da, osim 4'-(metilamino)-avarona, svi derivati pokazuju slične vrednosti citotoksičnosti i prema stimulisanim i prema nestimulisanim ćelijama limfocita. Citotoksičnost na PBMC za derivat 4'-(metilamino)-avaron nije detektovana ni pri koncentracijama višim od 100 μM, što ovaj derivat svrstava u red potencijalnih lekova prema ćelijama melanoma, s obzirom na to da prema njima pokazuje visoku selektivnost (2,41±0,54 μM).

Antioksidativna aktivnost avarola, avarona i njegovih derivata ispitivana je DPPH testom. Analizom dobijenih rezultata uočava se da avaron i sintetisani derivati imaju zanemarljivu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa standardnim antioksidativnim jedinjenjima troloxom i BHT-om što je u skladu sa tim da u ispitivanim sekviterpenskim hinonskim jedinjenjima ne postoji deo molekula koji bi mogao da donira radikal vodonika prisutnom DPPH radikalu. Hidrohinon avarol je pokazao umerenu antioksidativnu aktivnost.

Dobijeni rezultati bioloških testova se nisu mogli u potpunosti objasniti direktnom korelacijom između elektrohemijskih parametara i mogućnosti stvaranja superoksidnih anjon-radikala. Izvesna odstupanja mogla su se objasniti drugim mehanizmom dejstva hinona — mehanizmom alkilovanja ćelijskih nukleofila.

Kao prvi model-sistem ćelijskog nukleofila izabran je enzim lizozim iz belanceta jajeta. Mogućnost kovalentnog vezivanja modifikujućih avaronskih agenasa za enzim, praćena je UV/Vis spektrofotometrijom, SDS elektroforezom, HPLC hromatografijom i masenom spektrometrijom.

Rezultati dobijeni UV/Vis spektrofotometrijom, ukazuju na to da se protein modifikuje. Promena boje reakcione smeše iz žute u crvenu je odmah vidljiva za avaron i 3'-metoksi-avaron dok je za metilamino-derivate manje očigledna, jer predstavlja prelaz između dve nijanse crvene boje. Na UV/Vis spektrima uočava se pomeranje apsorpcionog maksimuma ka većim talasnim dužinama, a promena boje u crvenu ukazuje na to da u reakciji najverovatnije učestvuju amino-grupe proteina.

Na SDS elektroforegramu i za nemodifikovani lizozim i za njegove modifikate hinonskim jedinjenjima uočavaju se dve trake: na 14 kD i na 28 kD. S obzirom na to da hinonska jedinjenja mogu biti bifunkcionalni umrežavajući agensi, očekivalo se da dolazi do umrežavanja lizozima. Međutim, umrežavanje enzima nije zapaženo pa ovi rezultati nisu mogli da objasne šta se desilo nakon reakcije lizozima i hinonskih jedinjenja.

Nakon prečišćavanja reakcionih smeša na Sephadex kolonicama, čistoća modifikata je određena HPLC-om. Na dobijenom HPLC-hromatogramu za avaronski modifikat uočava se jedan pik za modifikovani lizozim na retencionom vremenu od 6,361 min, što je ukazivalo na dobru čistoću modifikata. Retenciono vreme za nemodifikovani lizozim bilo je 6,325 min.

Svim modifikatima lizozima snimljeni su maseni spektri. Svi maseni spektri modifikata imali su dva pika: jedan pik na 14305,4481 Da i drugi pik na masi koja odgovara masi lizozima uvećanoj za masu svakog od derivata umanjenoj za masu dva atoma vodonika. Ovi rezultati su potvrdili da se po jedan molekul avarona i njegovih hinonskih derivata vezao za jedan molekul lizozima.

Mesto vezivanja hinonskih jedinjenja za molekul lizozima određeno je MALDI TOF analizom posle tripsinske digestije. Upoređivanjem peptidnih fragmenata

dobijenih nakon tripsinske digestije nativnog i modifikovanog lizozima uočeno je postojanje novog pika nakon tripsinske digestije modifikata. Na osnovu mase novog peptidnog fragmenta i sagledavanjem mesta lizinskih ostataka koji mogu biti potencijalna mesta vezivanja, došlo se do zaključka da je mesto vezivanja hinonskih jedinjenja za molekul lizozima Lys-97.

Lizozimu i svim modifikatima određena je enzimska aktivnost prema *Micrococcus luteus*. Enzimska aktivnost je urađena i za lizozim tretiran pod istim uslovima modifikacije bez prisustva hinonskih jedinjenja. Dobijene vrednosti su ukazivale na to da se najveći procenat enzimске aktivnosti gubi usled primenjenih uslova za modifikaciju, dok se manji procenat aktivnosti gubi usled vezivanja hinona za molekul lizozima. Dobijeni rezultati su u skladu sa položajem lizina-97 koji se nalazi sa suprotne strane molekula lizozima u odnosu na aktivni centar lizozima, te vezivanje hinona za Lys-97 ne dovodi do inaktivacije enzima.

Temperature topljenja modifikata lizozima su nešto veće od temperature topljenja nemodifikovanog lizozima, što ukazuje na slabu stabilizaciju strukture modifikata.

Za lizozim, lizozim tretiran pod istim uslovima modifikacije bez prisustva hinona i lizozimske modifikate određena je MIC vrednost prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijskim sojevima. Najjače sinergističko dejstvo ispoljava se kao antibakterijsko dejstvo prema soju *S. aureus* gde svi modifikati pokazuju jaču aktivnost i u odnosu na same derivate i u odnosu na nemodifikovani lizozim i kontrolni antibiotik amikacin. Za lizozim i njegove hinonske modifikate je određena i toksičnost prema račićima *Artemia salina*. Uočeno je da je toksičnost modifikata manja od nemodifikovanog lizozima što se može objasniti manjom enzimskom aktivnošću modifikata.

Pod pretpostavkom da lizozim može biti nosač hinonskih jedinjenja i da u organizmu dolazi do hidrolize lizozima, stvarali bi se peptidni fragmenti koji bi mogli imati biološku aktivnost. Da bismo predvideli antibakterijsku aktivnost peptida koji na sebi ima aktivnu hinonsku komponentu, sintetisano je jedinjenje 4'-((5-((tert-butoksidkarbonil)amino)-5-karboksipentil)amino)avaron kao model jedinjenje peptidnog fragmenta s obzirom na to da je  $\alpha$ -amino grupa lizina zaštićena Boc grupom, a lizinski deo za hinonsko jezgro avarona vezan preko  $\epsilon$ -amino grupe. Dobijene MIC vrednosti za

ovo jedinjenje ukazivale su na generalno slabu antibakterijsku aktivnost, osim prema sojevima *E. coli* i *S. aureus* gde je aktivnost bila veća od kontrolnog antibiotika amikacina.

Avaronom i njegovim hinonskim derivatima su modifikovani plazmidi pBR322 i pUC18. Nakon agarozne elektroforeze, dobijeni rezultati su ukazivali na oštećenja na samim plazmidima posle reakcije sa hinonskim jedinjenjima.

Plazmid pUC18 je modifikovan avaronom i njegovim derivatima u atmosferi azota. Jedinjenja **I** i **Ia** dovode do potpunog cepanja plazmida, dok jedinjenja **Ib** i **Ic** u najvećoj količini dovode do stvaranja linearne forme sa dvolančanim prekidima. Ovakve promene na plazmidu u odsustvu kiseonika ukazuju na sposobnost hinonskih jedinjenja da nukleofilnom adicijom ili *in situ* stvorenim semihinonskim radikalima oštećuju molekule plazmida.

Avaronom i njegovim derivatima modifikovana je i DNA iz timusa teleta. Na snimljenim apsorpcionim spektrima za dobijene modifikate uočava se promena u odnosu na nemodifikovanu DNA. Kod apsorpcionih spektara svih modifikata DNA dolazi do porasta u apsorpciji DNA, odnosno javlja se hiperhromni efekat. Dobijeni rezultati ukazuju na to da hinonski derivati dovode do promena na molekulu DNA pri čemu sama indukcija hiperhromnog efekta ukazuje na vezivanje hinona u maloj brazdi DNA.

Snimljeni su i fluorescentni spektri modifikata DNA iz timusa teleta. Iz dobijenih spektara može se uočiti da avarol, avaron i svi ispitivani hinonski derivati dovode do gašenja fluorescencije etidijum-bromida. Očigledno da interakcija hinonskih jedinjenja sa molekulom DNA onemogućava interkalaciju molekula etidijum-bromida. Najverovatnije mesto vezivanja hinonskih jedinjenja jeste mala brazda DNA.

Na osnovu svih dobijenih rezultata može se zaključiti da avaron i njegovi derivati imaju dvostruki mehanizam dejstva: arilovanje ćelijskih nukleofila i radikalski mehanizam. U hipoksičnim uslovima, inicijalni mehanizam jeste adiranje ćelijskih nukleofila na hinonsko jezgro, što omogućava stvaranje semihinonskih aktivnih intermedijera, koji nakon toga reaguju radikalskim mehanizmom i oštećuju molekule DNA.

## 6. LITERATURA

1. S. Wakaki, H. Marumo, K. Tomioka, G. Shimizu, E. Kato, H. Kamada, S. Kudo, Y. Fujimoto, *Antibiot. Chemother.*, **8**, 228–240, 1958
2. A. Volpe, M. Racioppi, D. D'Agostino, E. Cappa, A. Filianoti, P.F. Bassi, *Minerva Urol. Nefrol.*, **62**, 133–144, 2010
3. S.R. Kim, Y.J. Yuh, B.S. Sohn, S.H. Yang, *Tumori*, **97**, 698–703, 2011
4. J. Kruth, J. Nissen, T. Ernst, M. Kripp, N. Lukan, K. Merx, W.K. Hofmann, A. Hochhaus, R.D. Hofheinz, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **136**, 1845–1851, 2010
5. G. Chong, J.L.B. Dickson, D. Cunningham, A.R. Norman, S. Rao, M.E. Hill, T.J. Price, J. Oates, N. Tebbutt, *British J. Cancer*, **93**, 510–514, 2005
6. J. Chung, B. Connolly, J. Langer, M. Marcon, M. Temple, J.G. Amaral, *J. Vasc. Interv. Radiol.*, **21**, 152–155, 2010
7. W. Budach, F. Paulsen, S. Welz, J. Classen, H. Scheithauer, P. Martin, C. Belka, M. Bamberg, *British J. Cancer*, **86**, 470–476, 2002
8. C. DeBoer, A. Dietz, N.E. Lummis, *Antimicrobial Agents Annual. Plenum Press, New York* 17–22, 1960
9. B.F. Haffty, L.D. Wilson, Y.H. Son, E.I. Cho, R.J. Papac, D.B. Fisher, S. Rockwell, A.C. Sartorelli, D.A. Ross, C.T. Sasaki, J.J. Fisher, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **61**, 119–128, 2005
10. S.R. mcKeown, R.L. Cowen, K.J. Williams, *Clinical Oncology*, **19**, 427–442, 2007
11. G. Edan, S. Morrissey, E. Le Page, *J. Neurol. Sci.*, **223**, 35–39, 2004
12. S.H. Lee, D.S. Kong, H.J. Seol, D.H. Nam, J.I. Lee, *J. Neurooncol.*, **104**, 545–551, 2011
13. P.J. O'Brein, H.K. Kaul, A.M. Rauth, *Cancer Res.*, **50**, 1516–1520, 1990
14. E. Smitskamp-Wilms, H.R. Hendriks, G.J. Peters, *General Pharmacol.*, **27**, 421–429, 1996
15. S. Aamdal, B. Lund, I. Koier, M. Houten, J. Wanders, J. Verweij, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **45**, 85–88, 2000

16. S. Rahimipour, G. Gescheidt, I. Bilkis, M. Fridkin, L. Weiner, *Appl. Magn. Reson.*, **37**, 629–648, 2010
17. Y. Ishihara, S. Ishi, Y. Sakai, N. Yamamura, Y. Onishi, N. Shimamoto, *J. Appl. Toxicol.*, **31**, 173–178, 2011
18. J.Y. Kim, A.V. Patterson, I.S. Stratford, J.H. Hendry, *Anticancer drugs*, **15**, 71–77, 2004
19. S. Nesnow, G. Nelson, W.T. Padgett, M.H. George, T. Moore, L.C. King, L.D. Adams, J.A. Ross, *Chem. Biol. Interact.*, **186**, 157–165, 2010
20. P. Lin, J. Nakamura, S. Yamaguchi, S. Asakura, J.A. Swenberg, *Carcinogenesis*, **24**, 1134–1141, 2003
21. Q. Zhang, T. Tu, D.A. d'Avignon, M.L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 1067–1076, 2009
22. A. Wouters, B. Pauwels, F. Lardon, J.B. Vermorken, *The Oncologist*, **12**, 690–712, 2007
23. W.R. Wilson, M.P. Hay, *Nature Reviews Cancer*, **11**, 393–410, 2011
24. M.M. Paz, *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1663–1668, 2009
25. S. Jongberg, N.E. Gislason, M.N. Lung, L.H. Skibsted, A.L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 6900–6905, 2011
26. A.S. Tan, M.V. Berridge, *BioFactors*, **34**, 183–190, 2009
27. K.S. Gates, *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1747–1760, 2009
28. T.W. Gant, M. d'Arcy Doherty, D. Odowole, K.D. Sales, G.M. Cohen, *Febs Lett.*, **201**, 296–298, 1986
29. W. Wang, B. Thomas, R. Sachdeva, L. Arterburn, L. Frye, P.G. Hatcher, D.G. Cornwell, J. Ma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 3604–3609, 2006
30. B.S. Parker, T. Buley, B.J. Evison, S.M. Cutts, G.M. Neumann, M.N. Iskander, D.R. Philips, *J. Biol. Chem.* **279**, 18814–18823, 2004
31. A. Agialis, N. Mihopoulos, M. Tsoukatou, L. Marinos, C. Vagias, C. Harvala, V. Roussis, *Z. Naturforsch.*, **55C**, 425, 2000
32. D. Sladić, M.J. Gašić, *Molecules*, **11**, 1–33, 2006
33. I.S. Marcos, A. Conde, R.F. Moro, P. Basabe, D. Diez, J.G. Urones, *Reviews in Organic Chemistry*, **7**, 230–254, 2010

34. R. Talpir, A. Rudi, Y. Kashman, S. Loya, A. Hizi, *Tetrahedron*, **50**, 4179–4184, 1994
35. D.J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 1–49, 2001
36. F.J. Schmitz, V. Lakshmi, D.R. Powell, D. Van der Helm, *J. Org. Chem.*, **49**, 241–244, 1984
37. R.E. Longley, O.J. McConell, E. Essich, D. Harmody, *J. Nat. Prod.*, **56**, 915–920, 1993
38. J. Kobayashi, T. Madono, H. Shigemori, *Tetrahedron*, **51**, 10867–10874, 1995
39. M. Gordaliza, *Mar. Drugs*, **8**, 2849–2870, 2010
40. D. Skropeta, N. Pastro, A. Zivanovic, *Mar. Drugs*, **9**, 2131–2154, 2011
41. S. Aoki, D. Matsui, K. Rachmat, M. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 935–937, 2004
42. T. Oda, W. Wang, K. Ukai, T. Nakazawa, M. Mochizuki, *Mar. Drugs*, **5**, 151–156, 2007
43. K.W. L. Yong, A. Jankam, J.N.A. Hooper, A. Suksamram, M.J. Garson, *Tetrahedron*, **64**, 6341–6348, 2008
44. W.E.G. Müller, R.K. Zahn, M.J. Gašić, H.C. Schröder, D. Heidemann, A. Bernd, B. Kurelec, E. Eich, G. Seibert, *Cancer Res.*, **45**, 4822–4826, 1985
45. M.A. Belisario, R. Pecce, M. Maturo, S. De Rosa, *Toxicology*, **86**, 89–108, 1994
46. I. Novaković, Z.M. Vujčić, T.T. Božić, N.M. Božić, N.B. Milosavić, D.M. Sladić, *J. Serb. Chem. Soc.*, **68**, 243–248, 2003
47. M. Tsoukatou, J.P. Marechal, C. Hellio, I. Novakovic, S. Tufegdžic, D. Sladic, M.J. Gasic, A.S. Clare, C. Vagias, V. Roussis, *Molecules*, **12**, 1022–1034, 2007
48. T. Božić, I. Novaković, M.J. Gašić, Z. Juranić, T. Stanojković, S. Tufegdžić, Z. Kljajić, D. Sladić, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 923–929, 2010
49. W.E.G. Müller, D. Sladić, R.K. Zahn, K.H. Bassler, N. Dogović, H. Gerner, H.C. Schröder, M.J. Gašić, *Cancer Res.*, **47**, 6565–6571, 1987
50. D. Sladić, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1991

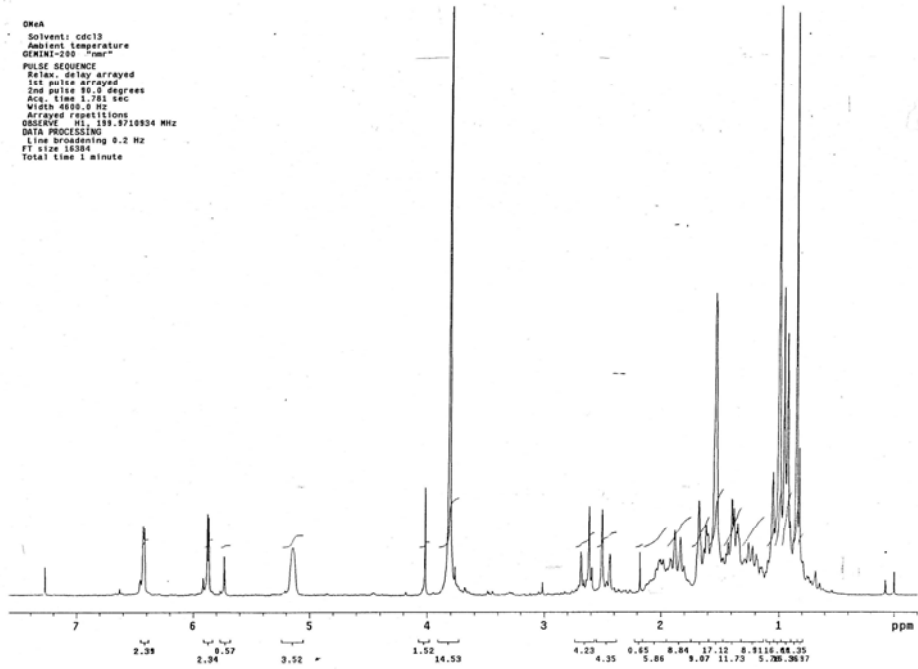


51. W.E.G. Müller, M. Geisert, R.K. Zahn, A. Maidhof, M. Bachmann, H. Umezawa, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19**, 665–671, 1983
52. P.S. Sarin, D. Sun, A. Thornton, W.E.G. Müller, *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 663–669, 1987
53. H.C. Schröder, M.E. Begin, R. Klocking, E. Matthes, A.S.C. Sarma, M.J. Gašić, W.E.G. Müller, *Virus Res.*, **21**, 213–223, 1991
54. M.A. Belisario, M. Maturo, G. Avagnale, S. De Rosa, F. Scopacasa, M. De Caterina, *Pharmacology and Toxicology*, **79**, 300–304, 1996
55. I. Santa-Maria, M.A. Smith, G. Perry, F. Hernández, J. Avila, F.J. Moreno, *Biochem. Biophys. Acta*, **1740**, 472–480, 2005
56. A. Yamauchi, Y. Hatanaka, T. Muro, O. Kobayashi, *Macromol. Biosci.*, **9**, 875–883, 2009
57. M.T. Labenski, A.A. Fisher, H.H. Lo, T.J. Monks, S.S. Lau, *Drug metab. Dispos.*, **37**, 1211–1218, 2009
58. L.S. Tsuruda, M.W. Lamé, A.D. Jones, *Arch. Toxicol.*, **69**, 362–367, 1995
59. J. Yuasa, T. Suenobu, S. Fukuzumi, *ChemPhysChem.*, **7**, 942–954, 2006
60. K. Gates, *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1747–1760, 2009
61. K.S. Gates, T. Nooner, S. Dutta, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 839–856, 2004
62. S. Yamano, M. Shibata, H. Kita, K. Matsusue, S. Narimatsu, K. Taguchi, Y. Kumagai, *J. Health Sci.*, **57**, 107–114, 2011
63. R.H.D. Lyngdoh, H.F. Schaefer III, *Accounts of Chemical Research*, **42**, 563–572, 2009
64. G. Chowdhury, V. Junnutula, J.S. Daniels, M.M. Greenberg, K.S. Gates, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12870–12877, 2007
65. P. Mazzer, L. Maurmann, R.N. Bose, *J. Inorganic. Biochem.*, **101**, 44–55, 2007
66. M. Zlatović, Diplomski rad, Univerzitet u Beogradu, 1987
67. I. Trifunović, Diplomski rad, Univerzitet u Beogradu, 1985
68. S. De Rosa, L. Minale, R. Riccio, G. Sodano, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1408–1415, 1976
69. R. Cozzolino, S. De Rosa, G. Strazzulio, M.J. Gašić, D. Sladić, M. Zlatović, *J. Nat. Prod.*, **53**, 699–702, 1990

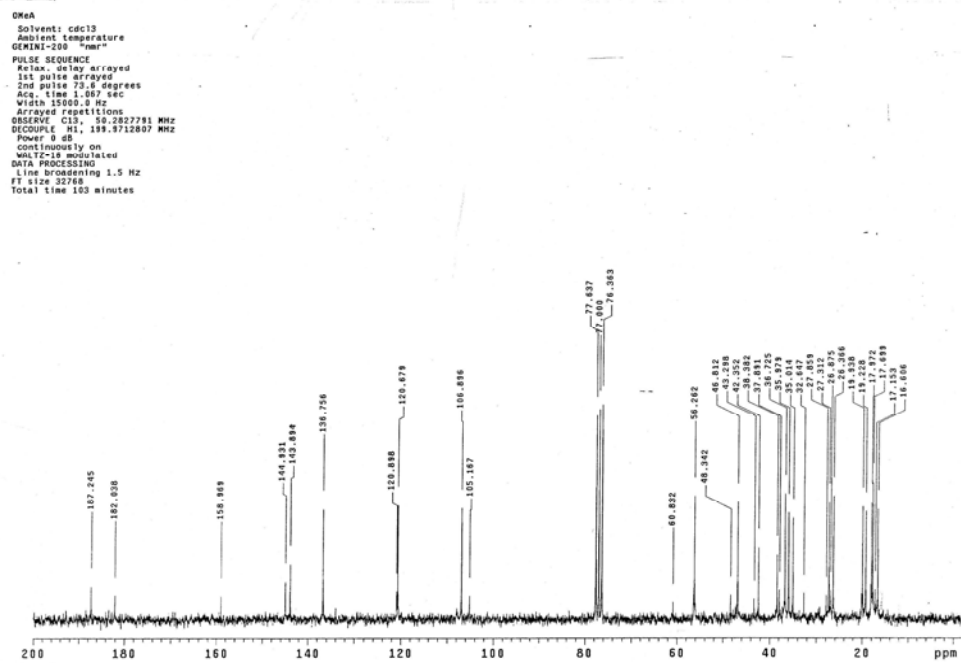
70. D.N. Mejer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, *Planta Med.*, **45**, 31–34, 1982
71. W.E.G. Müller, R.K. Zahn, M.J. Gašić, H.C. Schröder, D. Heidemann, A. Bernd, B. Kurelec, E. Eich, G. Seibert, *Cancer Res.*, **45**, 4822–4826, 1985
72. T. Božić, Magistarski rad, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2002
73. S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, L. Carreño-Fuentes, R. Moreno-Sánchez, *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**, 29–48, 2009
74. C.G. Ferreira, C. Tolis, S.W. Spain, G.J. Peters, T. Van Lopk, A.J. Kummer, H.M. Pinedo, G. Giaccone, *Clin. Can. Res.*, **6**, 203–212, 2000
75. M.A. Nogueira, E.G. Magalhães, A.F. Magalhães, D.N. Biloti, A.Laverde Jr., F.B.T. Pessine, J.E. Carvalho, L.K. Kohn, M.A. Antônio, A.J. Marsaioli, *Il Farmaco*, **58**, 1163–1169, 2003
76. M.S. Blois, *Nature*, **181**, 1199–1200, 1958
77. C. Maidment, A. Dyson, J. Beard, *Nutr. Food Sci.*, **39**, 29–35, 2009
78. Y.G. Gao, S. Zang, S. Krentz, S. Darius, J. Power, G. Lagarde, *Aust. J. Grape Wine Res.*, **8**, 76–83, 2002
79. A. Fernández, D. Cava, M.J. Ocio, J.M. Lagarón, *Trends in Food Science and Technology*, **19**, 198–206, 2008
80. R. Cegielska-Radziejewska, G. Leśnierowski, J. Kijowski, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **58**, 5–10, 2008
81. D. Desai, W.A. Faubion, W.J. Sandborn, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **25**, 247–255, 2006
82. I. Novaković, Z. Vujčić, T. Božić, N. Božić, N. Milosavljević, D. Sladić, *J. Serb. Chem. Soc.*, **68**, 243–248, 2003
83. B. Maroufi, B. Ranjbar, K. Khajeh, H. Naderi-Manesh, H. Yaghoubi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1043–1049, 2008
84. M.M. Bradford, *Analyt. Biochem.*, **72**, 248–254, 1976
85. D. Shugar, *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 302–309, 1952
86. C.A. Teske, R. Simon, A. Neibisch, J. Hubbuch, *Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 193–200, 2007

87. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2000) Approval standard document M7-A5, Villanova, Pa, USA
88. S.A. Soto-Rodriguey, N. Simões, D.A. Jones, A. Roque, B. Gomey-Gil, *J. Microbiol. Methods*, **52**, 101–114, 2003
89. C.S. Rossiter, E. Modica, D. Kumar, S.E. Rokita, *Chem. Commun.*, **47**, 1476–1478, 2011
90. A. Begleiter, *Front. Biosc.*, **5**, 153–171, 2000
91. V.V. Baltić, Indukcija diferencijacije. Novi Sad: Medicinski fakultet, Institut za onkologiju, Sremska Kamenica, 1991
92. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, M.R. Boyd, *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**, 1107–1112, 1990
93. Z. Vujčić, Praktikum iz eksperimentalne hemije, Rantec, Beograd, str. 85, 2002
94. Ibid, str. 83
95. Ibid, str. 88
96. M. Vujčić, S. Tufegdžić, Z. Vujčić, M.J. Gašić, D. Sladić, *J. Serb. Chem. Soc.*, **72**, 1265–1269, 2007
97. M. Vujčić, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2007
98. M.E. Reichmann, S.A. Rice, C.A. Thomas, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3047–3053, 1954

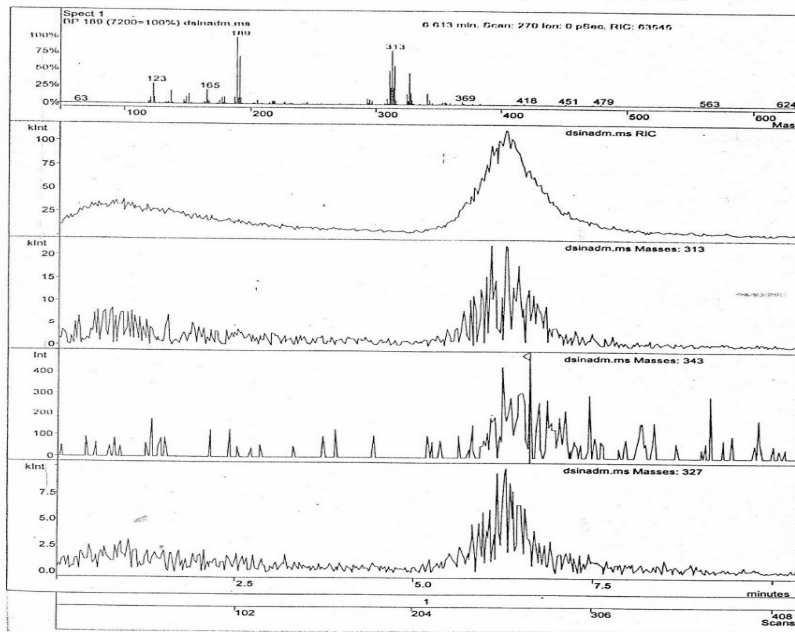
## **7. PRILOG**



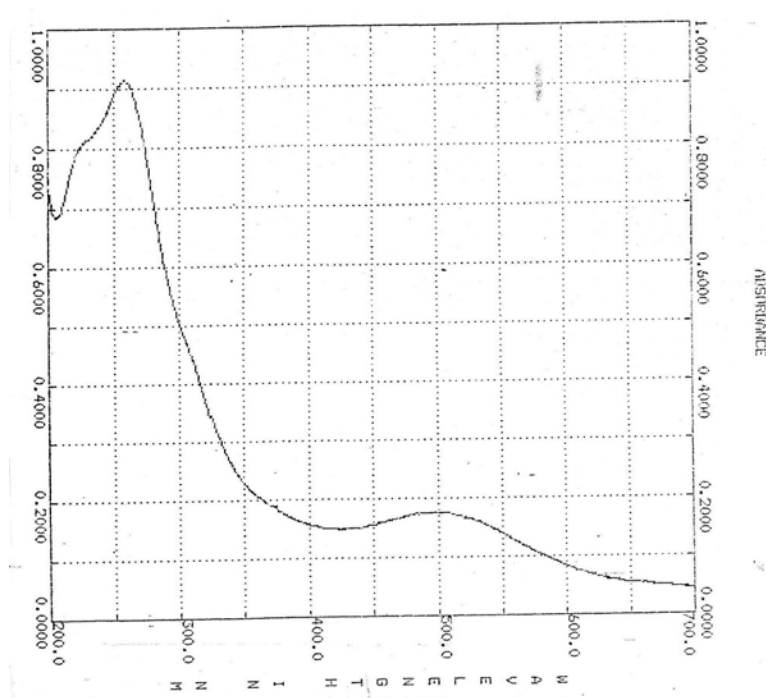
Slika P1.  $^1\text{H-NMR}$  spektar 3'-metoksi-avarona



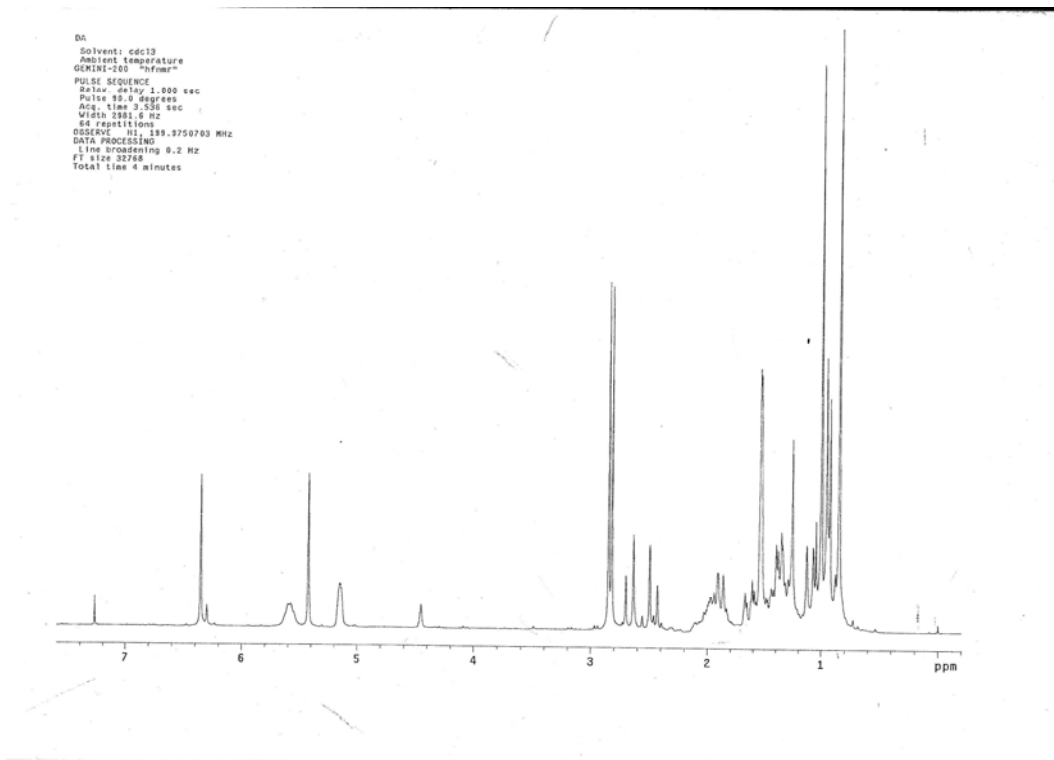
Slika P2.  $^{13}\text{C-NMR}$  spektar 3'-metoksi-avarona



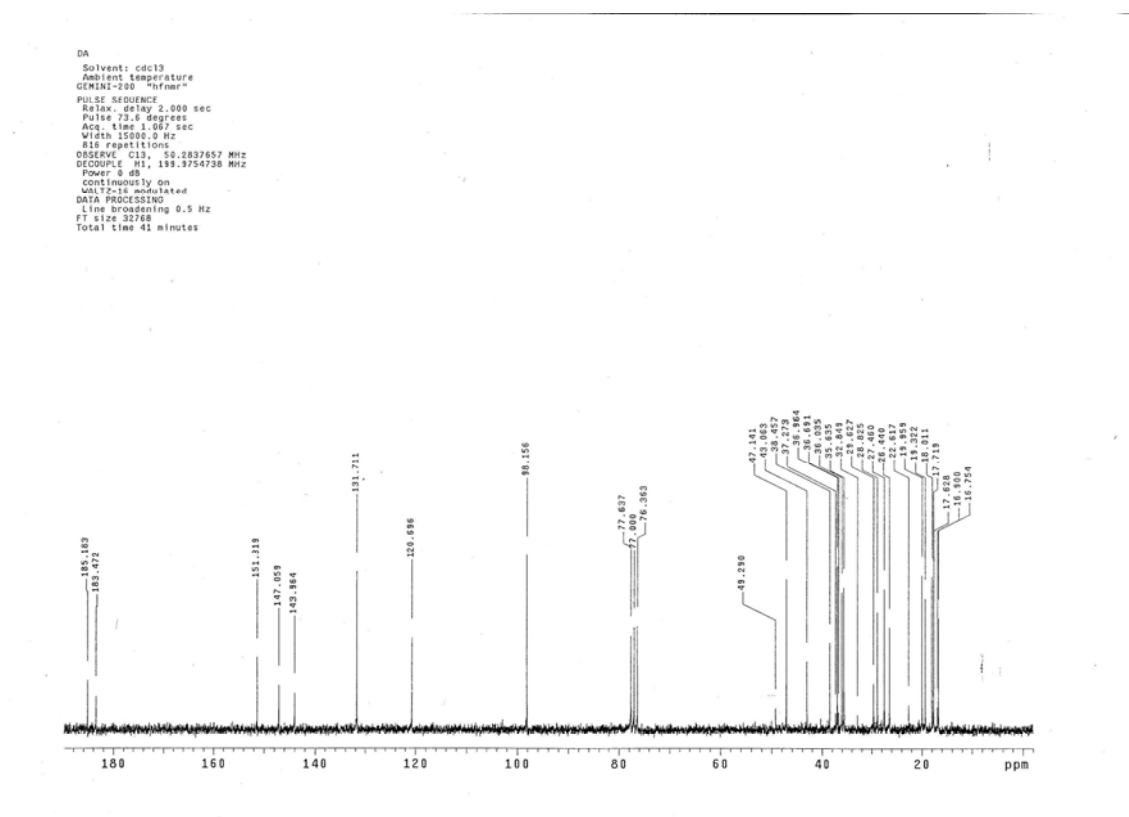
Slika P3. Maseni spektar 3'-metoksi-avarona



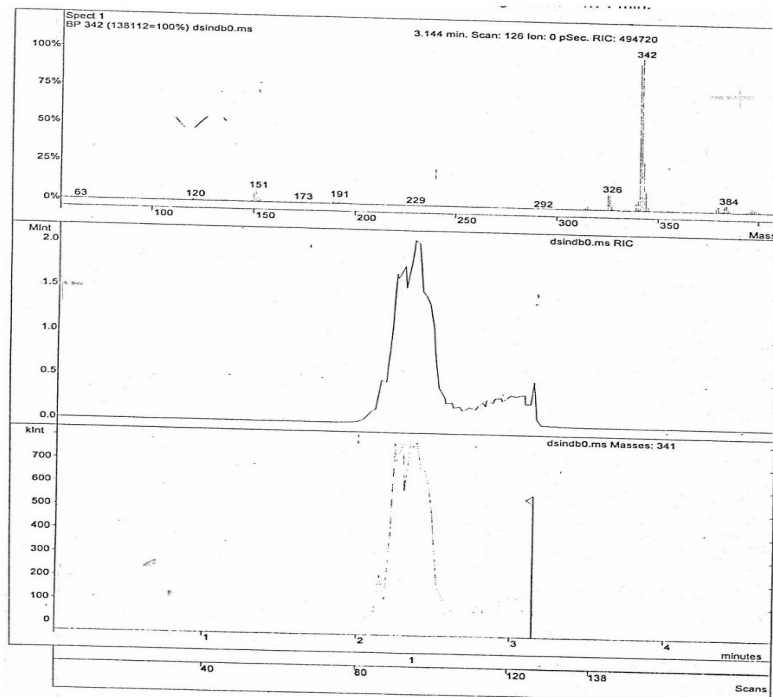
Slika P4. UV/Vis spektar 3'-metoksi-avarona



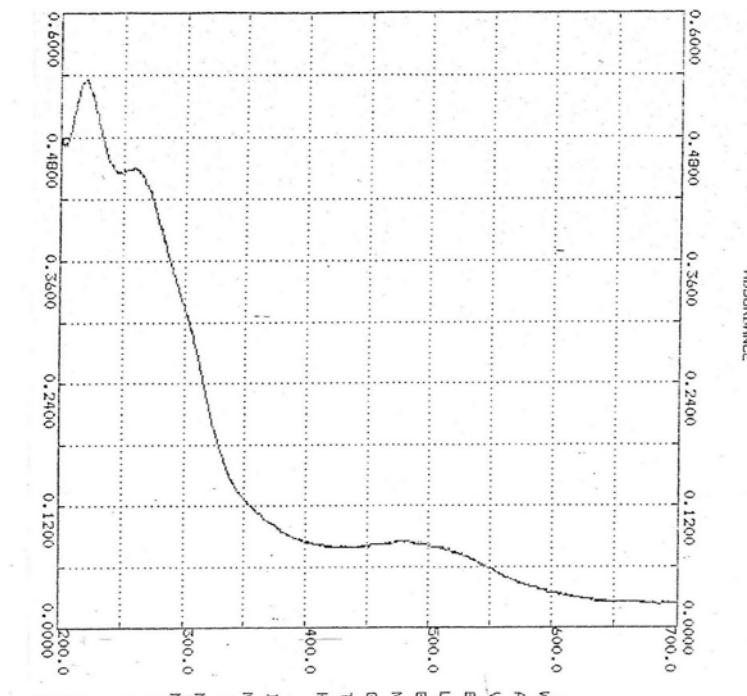
Slika P5.  $^1\text{H}$ -NMR spektar 4'-(metilamino)-avarona



Slika P6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spektar 4'-(metilamino)-avarona

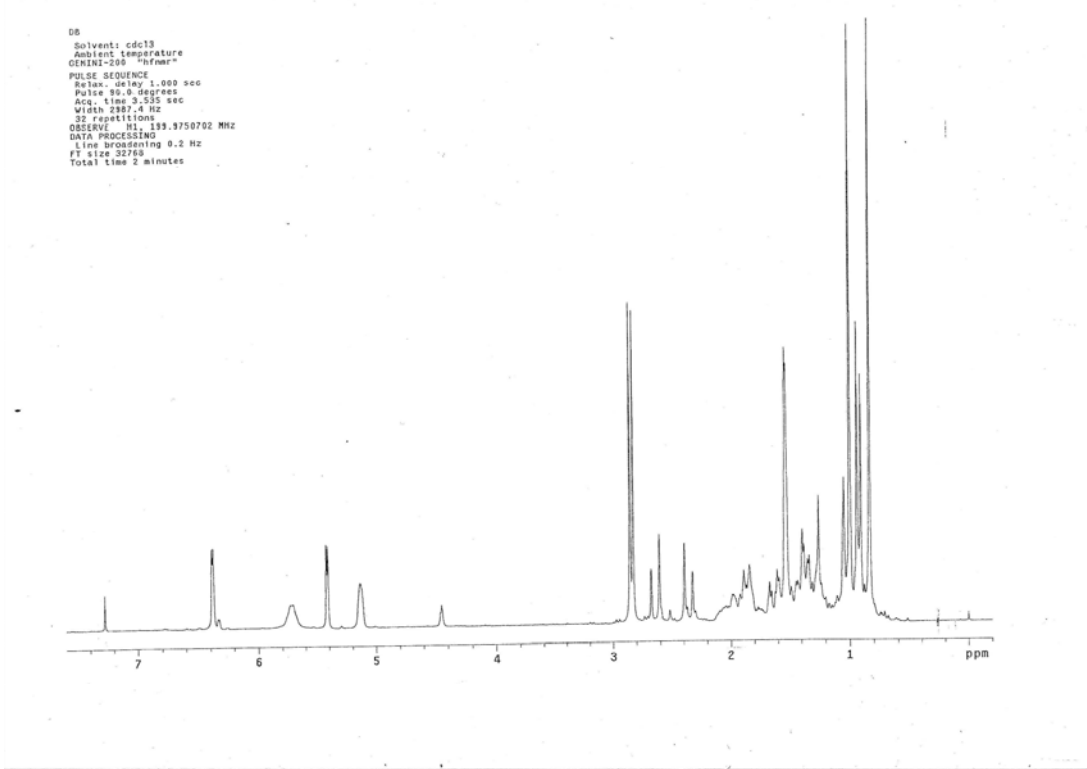


Slika P7. Maseni spektar 4'-(metilamino)-avarona

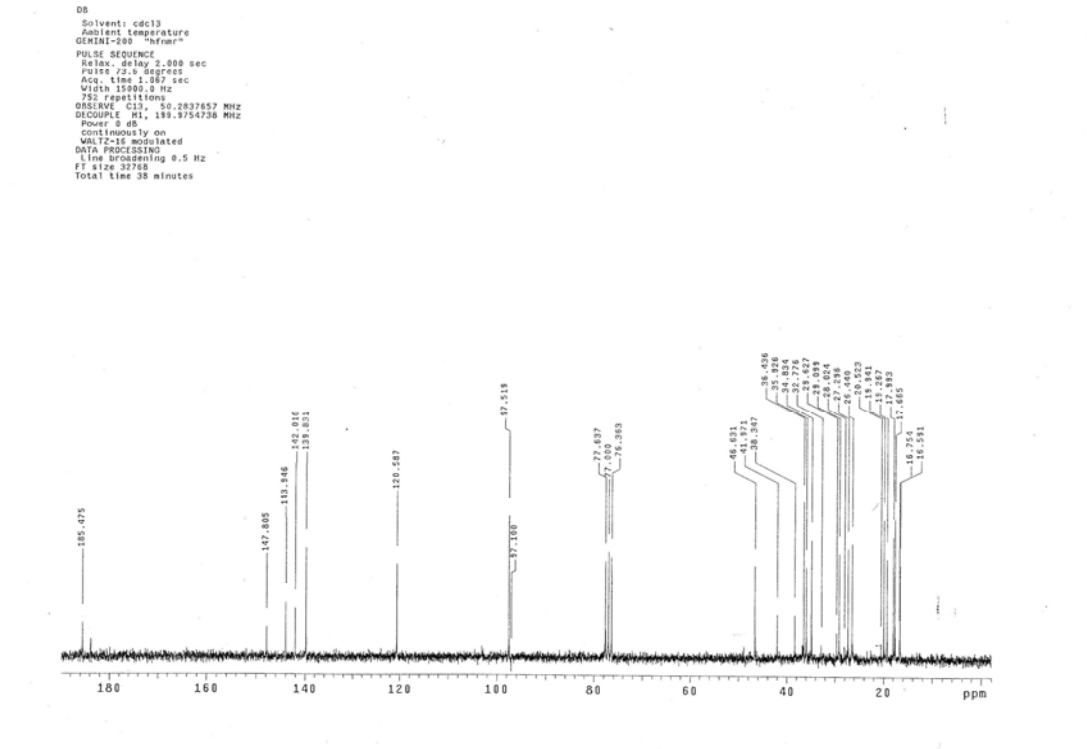


Slika P8. UV/Vis spektar 4'-(metilamino)-avarona

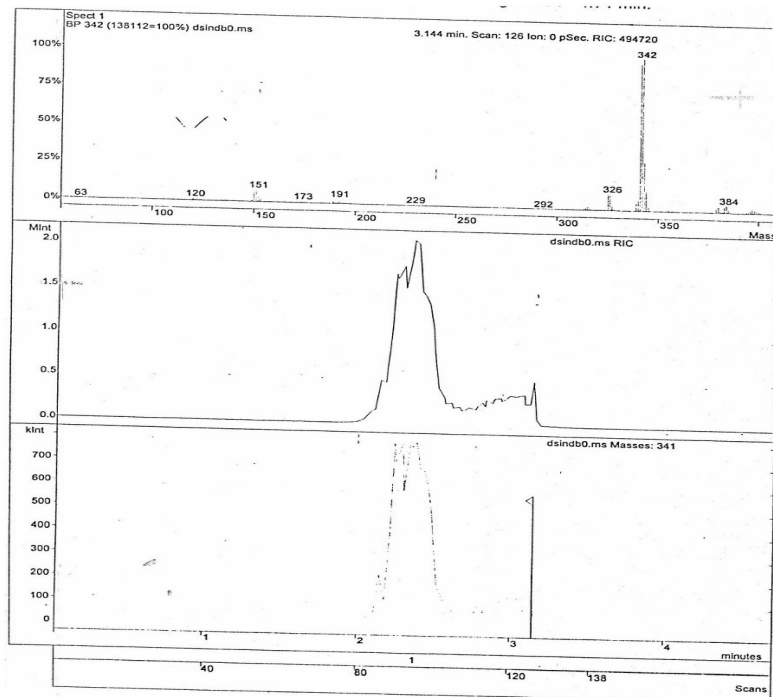




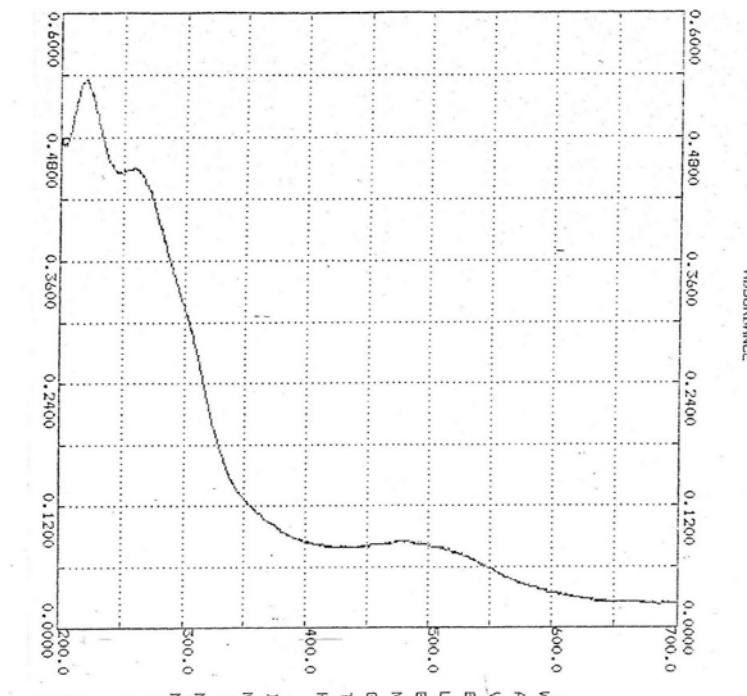
Slika P9. <sup>1</sup>H-NMR spektar 3'-(metilamino)-avarona



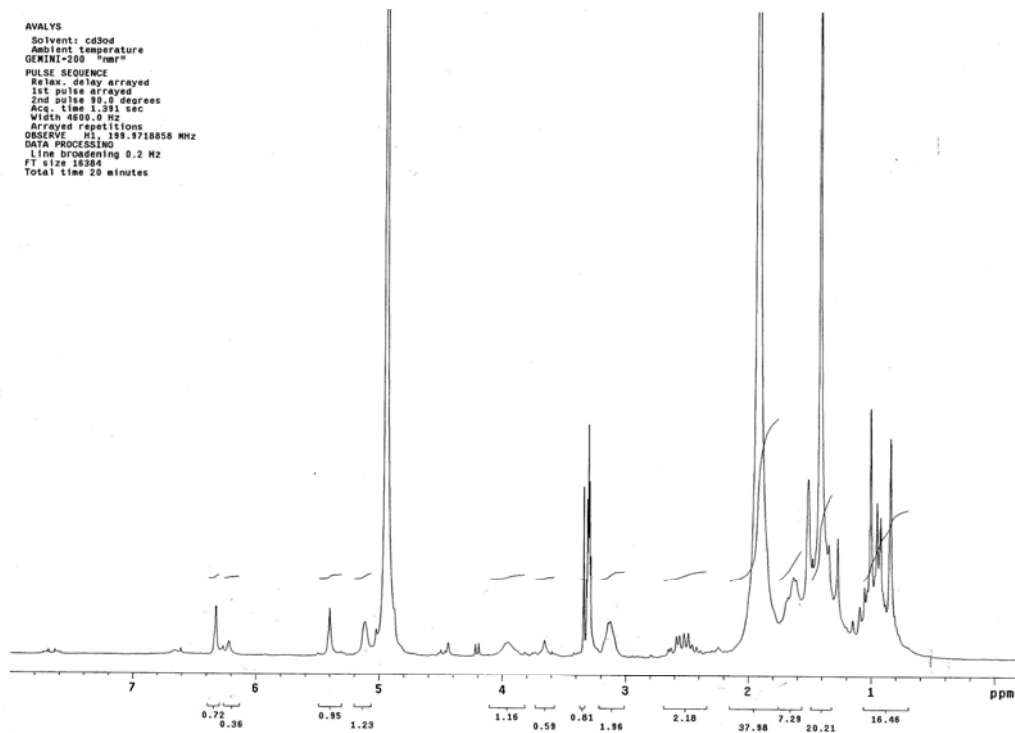
Slika P10. <sup>13</sup>C-NMR spektar 3'-(metilamino)-avarona



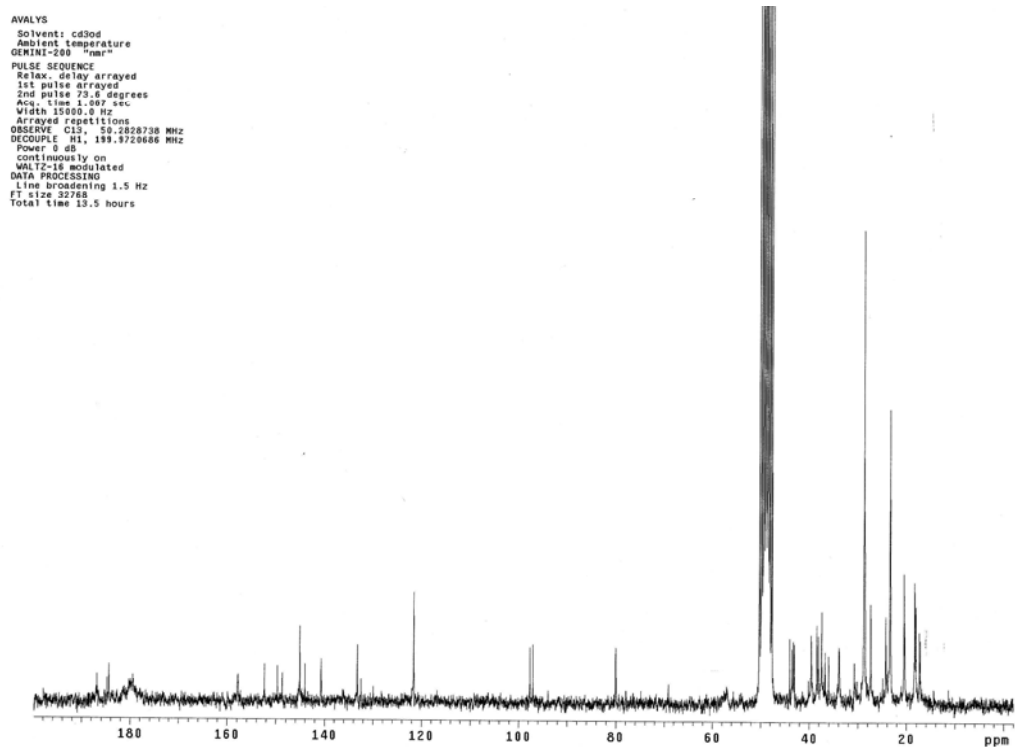
Slika P11. Maseni spektar 3'-(metilamino)-avarona



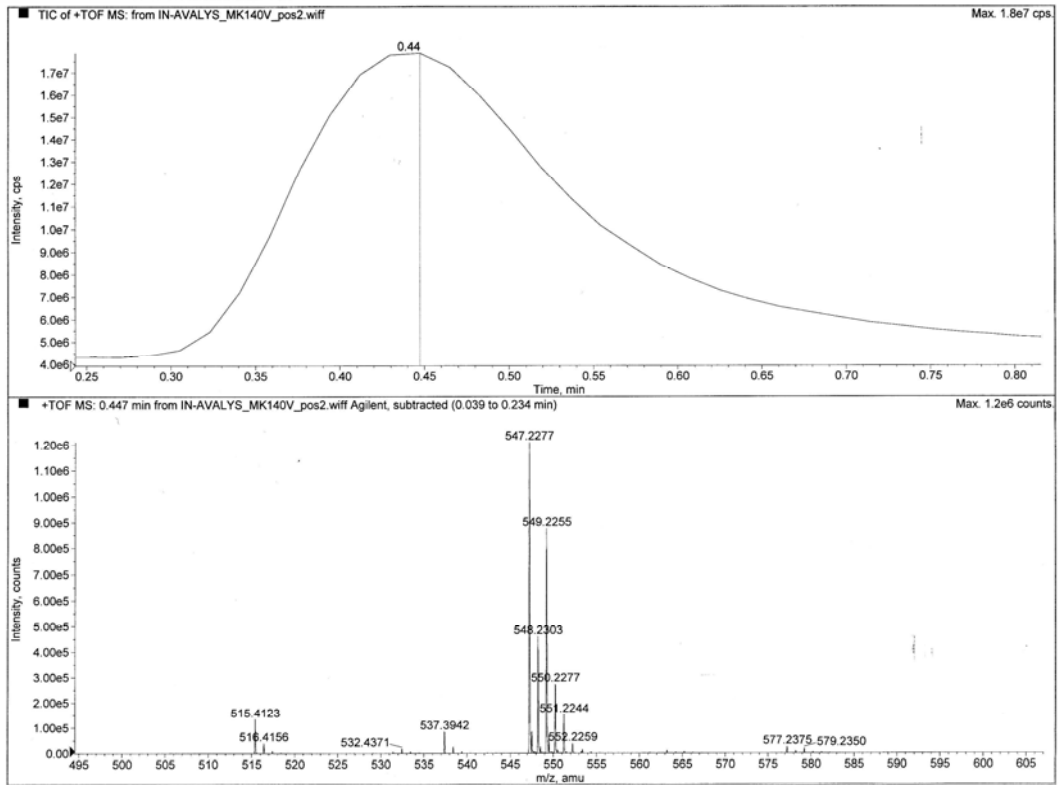
Slika P12. UV/Vis spektar 3'-(metilamino)-avarona



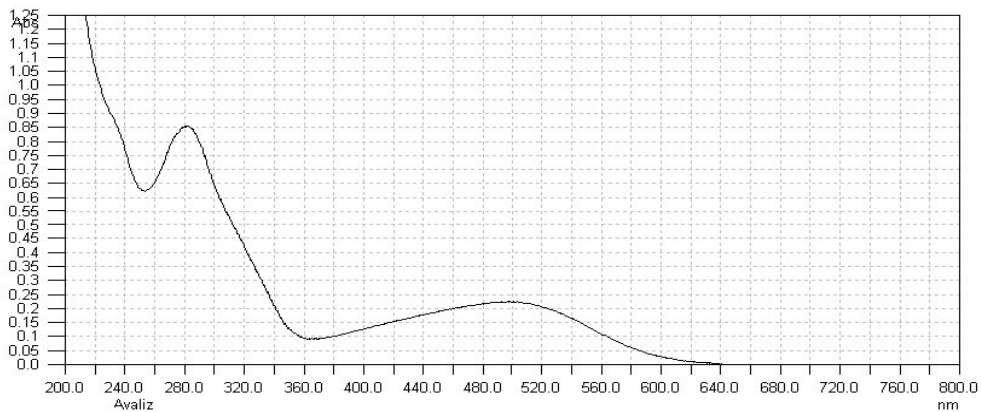
**Slika P13.**  $^1\text{H}$ -NMR spektar 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)-amino)avarona



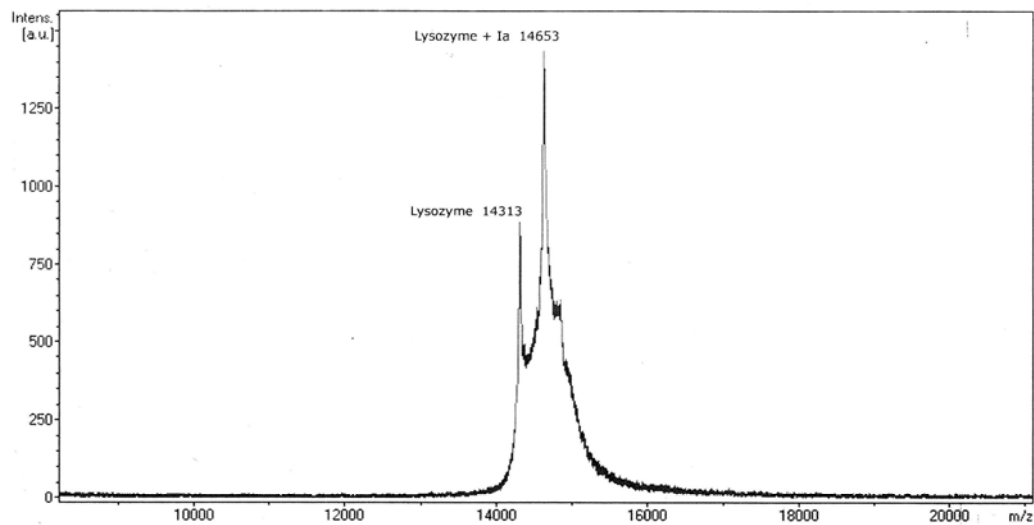
**Slika P14.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spektar 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)-amino)avarona



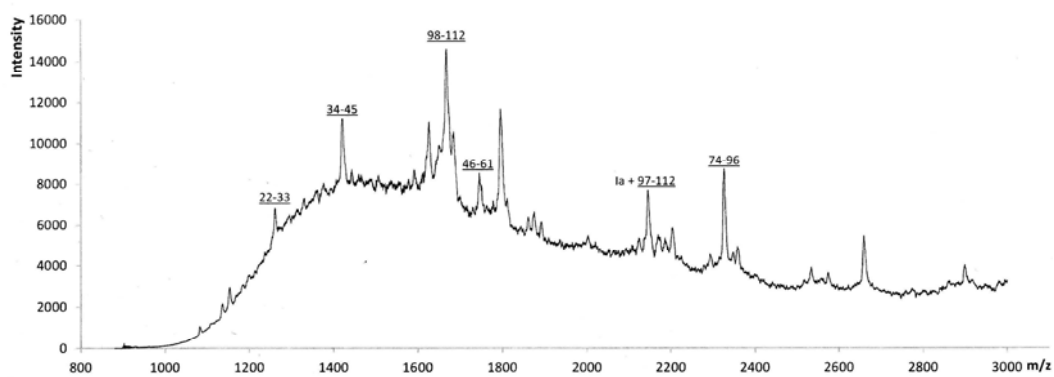
**Slika P15.** Maseni spektar 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)-amino)avarona



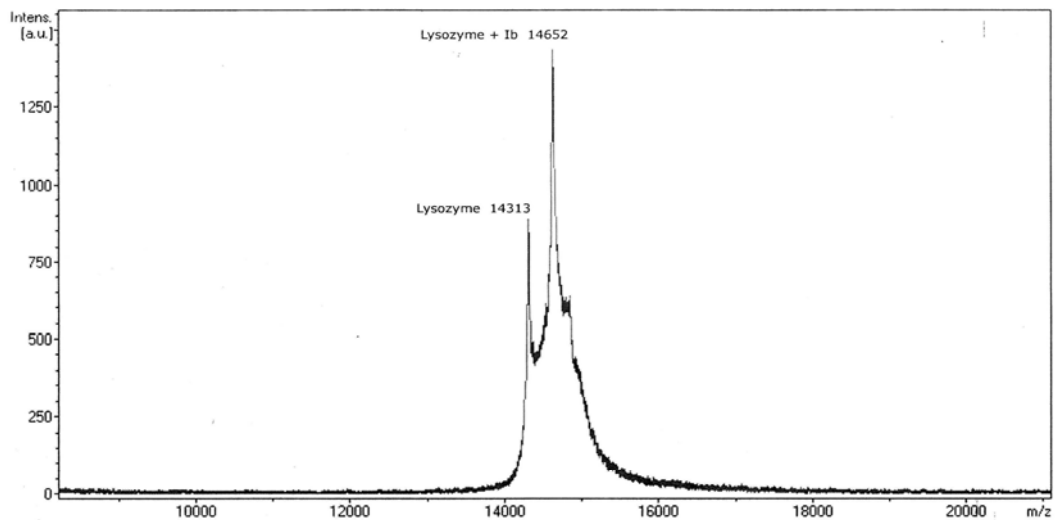
**Slika P16.** UV/Vis spektar 4'-((5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-5-karboksipentil)-amino)avarona



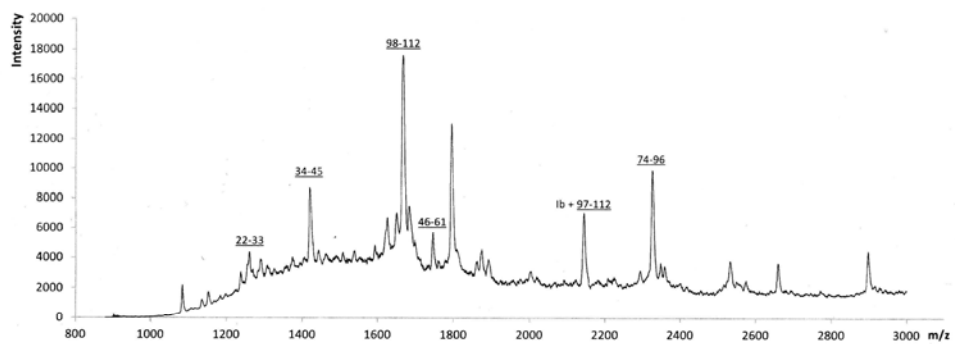
**Slika P17.** Maseni spektar konjugata lizozima i 3'-metoksi-avarona



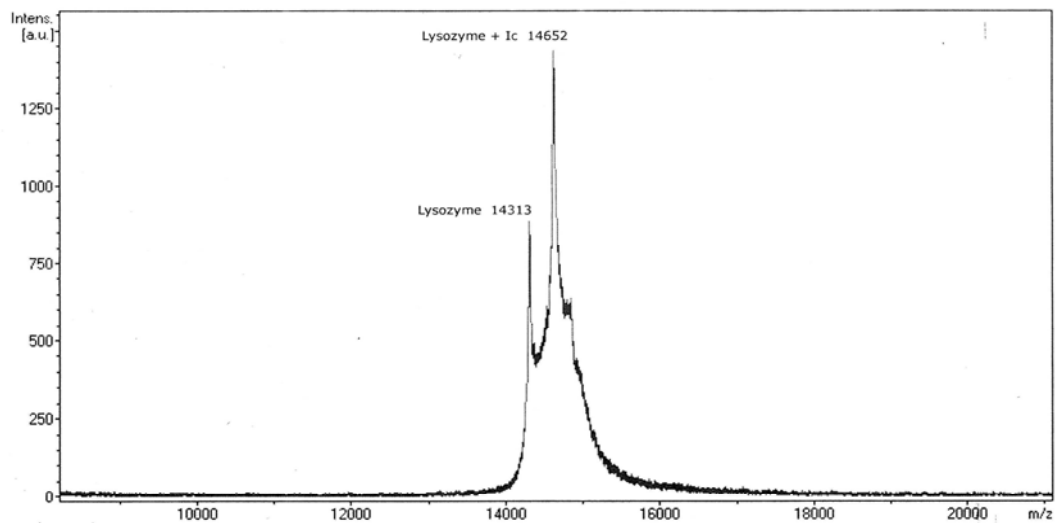
**Slika P18.** MALDI TOF spektar konjugata lizozima i 3'-metoksi-avarona nakon tripsinske digestije



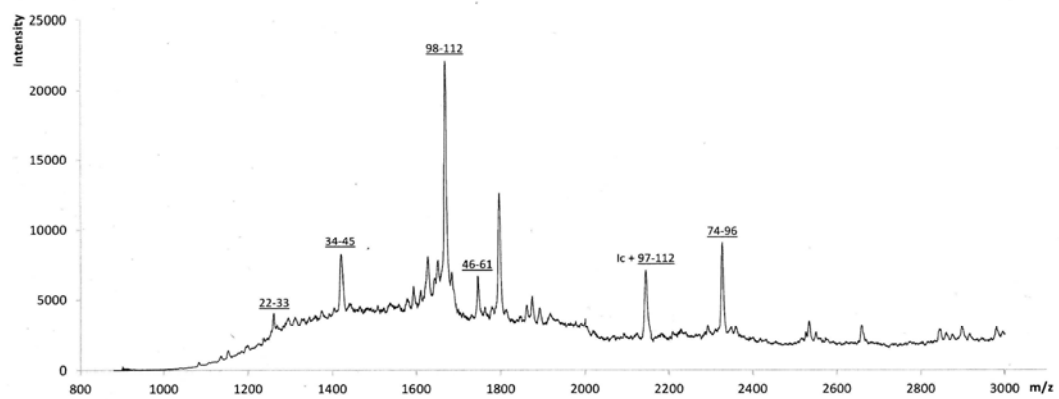
**Slika P19.** Maseni spektar konjugata lizozima i 4'-(metilamino)-avarona



**Slika P20.** MALDI TOF spektar konjugata lizozima i 4'-(metilamino)-avarona nakon tripsinske digestije



**Slika P21.** Maseni spektar konjugata lizozima i 3'-(metilamino)-avarona



**Slika P22.** MALDI TOF spektar konjugata lizozima i 3'-(metilamino)-avarona nakon tripsinske digestije

## Изјава о ауторству

Потписани-а            **Ирена Новаковић**  
број уписа                **167**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Проучавање интеракција биолошки активног хинона аварона и његових деривата са лизозимом, линеарном и циркуларном дезоксирибонуклеинском киселином**

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

Потпис докторанда





**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора **Ирена Новаковић**  
Број уписа **167**  
Студијски програм **Хемија**  
Наслов рада **Проучавање интеракција биолошки активног хинона аварона и његових деривата са лизозимом, линеарном и циркуларном дезоксирибонуклеинском киселином**  
Ментор **др Душан Сладић**, редовни професор Хемијског факултета  
Универзитета у Београду

Потписани **Ирена Новаковић**

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 10. 04. 2012. године



## Изјава о коришћењу

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

**Проучавање интеракција биолошки активног хинона аварона и његових деривата са лизозимом, линеарном и циркуларном дезоксирибонуклеинском киселином**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10. 04. 2012. године

*Урша Масаковић*

## 8. BIOGRAFIJA

Mr Irena T. Novaković, diplomirani hemičar, rođena je 3. februara 1975. godine u Skoplju, Makedonija. Osnovnu i srednju školu završila je u Vranju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1993. godine gde je diplomirala 2000. godine na katedri za organsku hemiju. Godine 2001. upisala je poslediplomske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu gde je specijalistički rad pod naslovom „Modifikacije  $\beta$ -laktoglobulina hinonima" odbranila 2003. godine. Magistarski rad pod naslovom „Hemijske modifikacije  $\beta$ -laktoglobulina biološki aktivnim hinonima" odbranila je 2005. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i time stekla titulu magistra hemijskih nauka.

Od septembra 2001. godine radi kao istraživač-pripravnik u IHTM-Centar za hemiju. Posle magistriranja 2005. godine dobila je zvanje istraživač saradnik i u tom zvanju i danas radi u istoj ustanovi.

Mr Irena Novaković se povremeno angažuje na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao asistent na vežbama iz predmeta Hemija studentima Biološkog fakulteta. U zimskom semestru školske 2009/2010. godine kao asistent je angažovana na vežbama iz predmeta Hemija studentima Rudarsko-geološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od 2003. godine, mr Irena Novaković je član Republičke komisije za takmičenje učenika srednjih škola iz hemije.

Mr Irena Novaković je do sada učestvovala u realizaciji tri naučno-istraživačka projekta finansirana od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Član je Srpskog hemijskog društva.