

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Aleksandra M. Bondžić

**Interakcija bpiridinskih kompleksa
zlata(III) i polioksovolframata sa Na⁺/K⁺-
ATPazom i acetilholinesterazom**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Aleksandra M. Bondžić

**The interaction of bipyridyl gold(III)
complexes and polyoxotungstates with
Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase**

doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

Mentori:

dr Ana Popović-Bijelić, docent
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Ana Popović-Bijelić, docent
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

dr Miloš Mojović, vanredni profesor
Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Mirjana Čolović, naučni saradnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze: _____

Ova teza je urađena u Laboratoriji za fizičku hemiju u okviru projekta „Ispitivanje interakcije enzima sa toksičnim i farmakološki aktivnim jedinjenjima“ pod rukovodstvom dr Vesne Vasić, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Zahvaljujem se:

mentoru, docentu dr Ani Popović-Bjelić za korisne savete koje sam dobila u toku izrade i pisanja ove doktorske disertacije,

mentoru, dr Vesni Vasić što mi je omogućila da radim na ovom interesantnom projektu, davala korisne savete i ideje tokom njene izrade i pisanja ali i slobodu za nezavisan rad,

dr Milošu Mojoviću, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, jer je pristao da bude član komisije za odbranu i ocenu ove doktorske disertacije,

prof. dr Luigi Messori-ju za komplekse zlata koji su korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji,

prof. dr Tatjani Parac-Voght sa Departmenta za hemiju, KU Leuven, Belgija, jer mi je omogućila da provedem određeno vreme u njenoj istraživačkoj grupi,

dr Mirjani Čolović, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na uvođenju u problematiku enzimologije i stručnim savetima tokom izrade i interpretacije rezultata iz ove oblasti,

dr Goranu Janjiću naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju za studije molekuskog modelovanja urađene u ovoj doktorskoj disertaciji,

dr Andreji Leskovic i dr Sandri Petrović višim naučnim saradnicima Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, za testiranje genotoksičnih efekata jedinnjenja korišćenih u ovoj disertaciji,

svim kolegama iz Laboratorije za fiziču hemiju-050 Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na podršci koju su mi pružali u toku izrade ove teme.

Takođe, želim da se zahvalim svom ocu i sestrama na podršci koju sam imala sve ovo vreme.

Na kraju, ali ne i najmanje važno, zahvaljujem se suprugu Bojanu i našoj Anđeli, koji su delili i dele sa mnom i dobro i loše, koji su mi bili najveća podrška i bez čije vere u mene ne bih bila ovde gde sam.

Aleksandra

Andeli i Bojanu na bezgraničnoj ljubavi i podršci !!!

*U sećanju na
Zoru Milenković (1956 – 2011†)*

Naslov doktorske disertacije:

Interakcija bipyridinskih kompleksa zlata(III) i polioksovolframata sa Na^+/K^+ -ATPazom i acetilholinesterazom

Rezime

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je uticaj antitumorskih mononuklearnih i binuklearnih kompleksa zlata(III) (AubipyC, Aubipy(OH)₂, Aupy(OAc)₂, Auoxo6, Au₂bipyC i Au₂phen) na Na^+/K^+ -ATPazu, kao i uticaj polioksometalata, 12-volframsilicijumove i 12-volframfosforne kiseline (WSiA i WPA) na acetilholinesterazu (AChE). Primenom različitih fizičko-hemijskih metoda (UV/Vis i fluorescentna spektroskopija, cirkularni dihroizam, elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija) u kombinaciji sa molekulskim modelovanjem, dobijen je detaljan uvid u njihovu interakciju na molekulskom nivou. Ispitivanjem uticaja ovih jedinjenja na antioksidativne enzime i na nivo malondialdehida, procenjeni su njihovi toksični potencijali, a merenjem učestalosti mikronukleusa i indeksa ćelijske proliferacije procenjeni su njihovi genotoksični i citotoksični efekti.

Kompleksi zlata(III) predstavljaju novu generaciju antitumorskih jedinjenja koji biološke efekte ostvaruju interakcijom sa proteinima. Poslednjih godina je pokazano da je jedan od proteina koji predstavlja potencijalnu metu za ove komplekse enzim Na^+/K^+ -ATPaza. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su pokazali da binuklearni kompleksi zlata (Auoxo6, Au₂bipyC i Au₂phen) umereno jako inhibiraju Na^+/K^+ -ATPazu. Kinetičke studije su pokazale da Auoxo6 i Au₂bipyC inhibiraju Na^+/K^+ -ATPazu akompetitivnim mehanizmom, dok je za Au₂phen dobijen mešoviti tip inhibicije (II tip). Metodom fluorescentne spektroskopije je pokazano da svi ispitivani kompleksi gase Trp fluorescenciju Na^+/K^+ -ATPaze, zbog građenja adukta enzim/kompleks. Primenom modifikovane Stern-Volmer-ove jednačine je dobijeno da vezivanje kompleksa za enzim izaziva konformacione promene u njemu, koje za posledicu imaju gašenje fluorescencije hidrofobnih Trp ostataka. Upotrebom metode cirkularnog dihroizma pokazano je da svi ispitivani kompleksi zlata dovode do promene u sekundarnoj strukturi enzima koja se ogleda u redukovanom sadržaju α -heliksa i β -ravni i povećanom udelu nasumične strukture. Primenom Hill-ovog, i modela „dva vezivna mesta“ na saturacione grafike, određena je stehiometrija vezivanja kao i konstante

disocijacije nastalih adukata enzim/kompleks. Ovi podaci ukazuju da se više od jednog mola zlata vezuje po molu enzima i da dolazi do formiranja stabilnih enzim/kompleks adukata. Korelacijom rezultata dobijenih fluorescentnim i kinetičkim merenjima sa studijama molekuskog modelovanja nađeno je da do inhibicije enzima dolazi nezavisno od konformacije enzima, osim u slučaju binuklearnih kompleksa Au₂oxo6 i Au₂bipyC, čija je inhibitorna moć Na⁺/K⁺-ATPaze vezana za njenu E2P konformaciju. Studije molekuskog modelovanja su pokazale da se mononuklearni kompleksi Aubipy(OH)₂ i AubipyC vezuju u ekstracelularnom delu Na/K jonskog kanala, dok se kompleks Aupy(OAc)₂ vezuje između A i P domena u citosolnom delu enzima, u susedstvu vezivnog mesta K⁺ jona. Binuklearni kompleksi se vezuju u transmembranskom delu α -podjedinice, između α -M2 i α -M6 heliksa, tzv. jonskog kanala, dok se Au₂phen može vezati i u ekstracelularnom delu enzima, između β -podjedinice i γ -transmembranskog heliksa. Merenjem aktivnosti antioksidativnih enzima (katalaze i glutation peroksidaze) i nivoa malondialdehida u neprečišćenim sinaptozomima izolovanim iz mozga pacova, procenjene su prooksidativne osobine kompleksa zlata. Takođe, pokazano je da u kulturama humanih limfocita, ispitivana jedinjenja imaju genotoksične i citotoksične osobine.

U drugom delu doktorske disertacije je proučavana interakcija polioksovolframata, WSiA i WPA, sa enzimom AChE. Polioksometalati predstavljaju negativno naelektrisane klastere metala koji imaju važnu ulogu u medicinskoj hemiji zbog sposobnosti da inhibiraju različite grupe enzima. AChE predstavlja glavnu terapijsku metu u lečenju neurodegenerativnih oboljenja, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest. Smatra se da jedinjenja koja su sposobna da reverzibilno inhibiraju aktivnost ovog enzima mogu predstavljati potencijalne lekove. Polioksometalati ispitani u ovoj disertaciji inhibiraju aktivnost AChE u submikromolarnom opsegu koncentracija. Metodom EPR spektroskopije je pokazano da se mehanizmi inhibicije ova dva polioksometalata razlikuju i da inhibicija 12-volframsilicijumovom kiselinom uključuje reverzibilnu redukciju W⁶⁺ jona do W⁵⁺, dok oksidaciono stanje W⁶⁺ jona u WPA ostaje nepromenjeno. Metodom cirkularnog dihroizma pokazano je da ispitivani polioksometalati ne utiču na sekundarnu strukturu enzima dok je metodom fluorescentne spektroskopije pokazano da ispitivana jedinjenja ne utiču na Trp fluorescenciju enzima. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da se ispitivana jedinjenja ne vezuju u aktivnom

mestu AChE. Studije molekuskog modelovanja su bile u saglasnosti sa ovim rezultatima predviđajući vezivanje ovih jedinjenja na površini enzima elektrostatičkim interakcijama sa pozitivno naelektrisanim aminokiselinama.

Razumevanje mehanizma inhibicije Na^+/K^+ -ATPaze kompleksima zlata, kao i mehanizma inhibicije acetilholinesteraze poliokso metalatima, značajno unapređuje razumevanje prednosti i mana njihove primene u antitumorskoj terapiji, odnosno u terapiji neurodegenerativnih bolesti. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji u velikoj meri doprinose budućem dizajnu novih jedinjenja, koja će pokazati bolju efikasnost i manju toksičnost.

Ključne reči: kompleksi zlata, Na^+/K^+ -ATPaza, poliokso volframati, acetilholinesteraza, fluorescentna spektroskopija, cirkularni dihroizam, EPR spektroskopija, oksidativni stres, genotoksičnost, citotoksičnost.

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Biofizička hemija

UDK: 577.151

Title of doctoral dissertation:

The interaction of bipyridyl gold(III) complexes and polioxotungstates with Na^+/K^+ -ATPase and acetylcholinesterase

Abstract

In this doctoral dissertation, the interaction of antitumor mononuclear and binuclear gold(III) complexes (AubipyC, Aubipy(OH)₂, Aupy(OAc)₂, Auoxo6, Au₂bipyC and Au₂phen) with Na^+/K^+ -ATPase as well as the interaction of polioxotungstates, 12-tungstosilicic acid and 12-tungstophosphoric acid (WSiA and WPA), with acetylcholinesterase have been investigated. Various spectroscopic methods (UV/Vis and fluorescent spectroscopy, circular dichroism, electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy) in combination with docking studies were used in order to obtain detailed insight into their interaction on the molecular level. By investigating the influence of these compounds on the antioxidative enzymes and the level of malondialdehyde, their toxic potentials were evaluated. Furthermore, their genotoxic and cytotoxic effects were estimated by measuring the incidence of micronuclei and the cytokinesis-block proliferation index in human lymphocyte cultures.

The gold(III) complexes represent a new generation of antitumor compounds which exert their biological and pharmacological effects through the interaction with proteins. During the past few years, Na^+/K^+ -ATPase has been recognized as a potential target of various metal based compounds. The results from this thesis show that binuclear gold(III) complexes (Auoxo6, Au₂bipyC and Au₂phen) exhibit a moderately strong Na^+/K^+ -ATPase inhibition. The kinetic studies pointed out an uncompetitive inhibition for Auoxo6 and Au₂bipyC, and mixed inhibition (type II) for the Au₂phen complex. Fluorescent spectroscopy measurements showed that all investigated complexes quench Trp fluorescence of Na^+/K^+ -ATPase due to the enzyme/complex adduct formation. The results obtained by using the modified *Stern-Volmer* equation showed that binding of complexes to the enzyme induced conformational changes of the enzyme, thus causing quenching of fluorescence of hydrophobic Trp residues. The results obtained by circular dichroism measurements revealed that all investigated gold(III) complexes induced changes in the secondary structure of the enzyme, reducing α -helix and β -sheet content while increasing the random coil content. By applying the *Hill*, and the „two sites

binding“ models on the saturation plots, reaction stoichiometry was obtained, as well as the dissociation constants of enzyme/complex adducts. These data showed that more than one mole of gold binds per mole of enzyme, and that stable enzyme/complex adducts were formed. Correlation of results obtained by fluorescent and kinetic measurements with docking studies showed that enzyme inhibition is independent of its conformation, except for the binuclear complexes, Auoxo6 and Au₂bipyC, for which the inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase refers to the enzyme's E2P conformation. The docking studies showed that mononuclear complexes Aubipy(OH)₂ and AubipyC bind at the the extracellular Na/K ion exchange channel, while Aupy(OAc)₂ binds between A and P domains in the cytosol part of the enzyme next to the K⁺ ion binding spot. Binuclear complexes bind in the transmembrane part of the α -subunit, between α-M2 and α-M6 helices of the so called ion channel, while Au₂phen can also bind in the extracellular part of the enzyme, between the β-subunit and γ- transmembrane helix. The prooxidative properties of the gold complexes were estimated by measuring the activity of the antioxidative enzymes (catalase and glutation peroxidase) and the level of malondialdehyde in crude synaptosome fraction isolated from the rat brain. Furthermore, the results indicated that the investigated compounds possess genotoxic and cytotoxic properties in human lymphocyte cultures.

The second part of this thesis deals with the interaction of polioxotungstates, WSiA and WPA, with AChE. Polioxometalates are negatively charged metal clusters which are getting an important role in medicinal chemistry due to their ability to inhibit various groups of enzymes. AChE is the main therapeutic target in the treatment of neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. Compounds which are capable to reversibly inhibit this enzyme may represent potential drugs for the treatment of these diseases.

It was shown that the investigated polioxotungstates inhibit the activity of AChE in the submicromolar concentration range. EPR spectroscopy pointed out to different mechanisms of inhibition of AChE by these two polioxometalates. Inhibition with WSiA includes reversible reduction of W⁶⁺ ion to W⁵⁺, while the oxidation state of the W⁶⁺ ion in WPA stays unchanged. Circular dichroism measurements indicated that these polioxometalates did not affect the secondary structure of the enzyme, while fluorescence quenching measurements showed that these polioxometalates did not

affect Trp fluorescence of the enzyme. Based on these results it was concluded that these compounds did not bind at the active site of the enzyme. Docking studies were in agreement with these results predicting the binding of these compounds at the surface of the enzyme through electrostatic interactions with positively charged amino acid residues.

The understanding of mechanism of interaction and inhibition of the investigated gold(III) complexes with Na^+/K^+ -ATPase, and the mechanism of interaction of polioxometalates with acetylcholinesterase, could significantly improve the possibility of their application in antitumor therapy, and in the therapy of neurodegenerative diseases, respectively. The results obtained in this thesis are likely to give further insight for the future design of a new generation of therapeutic compounds that could show better efficacy and lower toxicity.

Key words: gold complexes, Na^+/K^+ -ATPase, polioxotungstates, acetylcholinesterase, fluorescent spectroscopy, circular dichroism, EPR spectroscopy, oxidative stress, genotoxicity, cytotoxicity.

Scientific field: Physical chemistry

Field of research: Biophysical chemistry

UDK: 577.151

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kompleksi zlata kao potencijalni antikancerogeni lekovi	2
1.1.1. Struktura ispitivanih kompleksa zlata(III)	3
1.1.2. Inhibicija tioredoksin reduktaze kompleksima zlata	4
1.1.3. Citotoksičnost kompleksa zlata	6
1.2. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaza	6
1.2.1. Struktura Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze	7
1.2.2. Reakcioni ciklus Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze	9
1.2.3. Inhibitori Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze	13
1.2.3.1. Kardijačni glikozidi kao inhibitori Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze	13
1.2.3.2. Cisplatin kao inhibitor Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze	13
1.3. Polioksometalati	16
1.3.1. Struktura polioksometalata	16
1.3.2. Polioksometalati u medicinskoj hemiji	17
1.3.2.1. Distribucija polioksometalata u ćeliji	18
1.3.2.2. Inhibicija enzima polioksometalatima	19
1.3.2.2.1. Inhibicija fosfataza	19
1.3.2.2.2. Inhibicija ektonukleotidaza	19
1.3.2.2.3. Inhibicija kinaza	20
1.3.2.2.4. Inhibicija sulfo- i silaliltransferaza	20
1.3.2.2.5. Inhibicija histondeacetilaza	21
1.3.2.2.6. Inhibicija holinesteraza	21
1.3.2.2.7. Inhibicija nukleaza i polimeraza	21
1.4. Acetilholinesteraza	22
1.4.1. Struktura acetilholinesteraze	24
1.4.2. Inhibitori acetilholinesteraze	25
1.4.2.1. Lekovi u tretmanu Alchajmerove bolesti	26
1.4.2.2. Organofosforna jedinjenja	26
1.5. Fluorescencija proteina	27
1.5.1. Spektralne karakteristike proteinskih fluorofora	28
1.5.2. Gašenje fluorescencije protein	29

1.5.3. Raspodela triptofana u Na^+/K^+ -ATPazi	31
1.6. Toksični efekti slobodnih radikala i antioksidativna zaštita	32
1.6.1. Toksični efekti slobodnih radikala – lipidna peroksidacija	33
1.6.2. Antioksidativna zaštita	34
1.6.2.1. Katalaza	34
1.6.2.2. Glutation peroksidaza	35
1.7. Testiranje genotoksičnosti određivanjem učestalosti mikronukleusa	36
2. CILJ	38
3. MATERIJALI I METODE	39
3.1. Hemikalije	39
3.1.1. Kompleksi zlata(III) i polioksometalati	39
3.1.2. Enzimi	39
3.1.3. Hemikalije za ispitivanje genotoksičnosti i citotoksičnosti	39
3.1.4. Ostale hemikalije	40
3.2. Metode	40
3.2.1. UV/Vis spektrofotometrija	40
3.2.2. Centrifugiranje	40
3.2.3. Mikroskopija	41
3.2.4. Cirkularni dihiroizam	41
3.2.5. Fluorescentna spektroskopija	41
3.2.6. Elektronska paramagnetna rezonatna (EPR) spektroskopija	41
3.2.7. Ostala laboratorijska oprema	42
3.3. Priprema rastvora kompleksa zlata(III) i polioksovolframata	42
3.4. Priprema rastvora enzima	42
3.5. Određivanje particionog koeficijenta	43
3.6. Izolovanje sinaptozoma iz mozga pacova	44
3.7. Kulture limfocita	45
3.8. Enzimski testovi	45
3.8.1. Ispitivanje Na^+/K^+ -ATPaze	45
3.8.1.1. Određivanje aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze	45
3.8.1.2. Kinetičke studije	46
3.8.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze	46

3.8.3	Određivanje aktivnosti katalaze	47
3.8.4.	Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze	47
3.8.5.	Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze	48
3.8.6.	Određivanje sadržaja malondialdehida	48
3.9.	Ispitivanje genotoksičnosti	49
3.9.1.	Citokinezis-blok mikronukleusni test	49
3.9.2.	Citokinezis-blok proliferativni indeks	49
3.10.	Određivanje koncentracije protein	50
3.11.	Statistička obrada rezultata	50
3.12.	Teorijski proračuni (molekulsko modelovanje)	51
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	52
4.1.	Interakcija kompleksa zlata(III) sa Na^+/K^+ -ATPazom	52
4.1.1.	Stabilnost kompleksa zlata(III) na pH 7,4	52
4.1.2.	Particioni koeficijent kompleksa zlata(III)	54
4.1.3.	Teorijski proračuni dipolnog momenta, raspodele naelektrisanja, površine i zapremine zlata(III) kompleksa	55
4.1.4.	Inhibicija Na^+/K^+ -ATPaze	60
4.1.5.	Mehanizam inhibicije Na^+/K^+ -ATPaze	63
4.1.6.	Uticaj kompleksa zlata(III) na fluorescenciju Na^+/K^+ -ATPaze	68
4.1.6.1.	Uticaj mononuklearnih kompleksa zlata(III) na fluorescenciju Na^+/K^+ -ATPaze	70
4.1.6.2.	Uticaj binuklearnih kompleksa zlata(III) na fluorescenciju Na^+/K^+ -ATPaze	77
4.1.7.	Uticaj kompleksa zlata(III) na sekundarnu strukturu Na^+/K^+ -ATPaze	80
4.1.8.	Evaluacija parametara interakcije kompleksa zlata(III) i enzima	82
4.1.8.1.	<i>Scatchard</i> -ova analiza	82
4.1.8.2.	Analiza saturacionih krivih	85
4.1.8.2.1.	Analiza saturacionih krivih mononuklearnih kompleksa	86
4.1.8.2.2.	Analiza saturacionih krivih binuklearnih kompleksa	89

4.1.9. Teorijsko predviđanje potencijalnih mesta vezivanja kompleksa zlata(III) za enzim	91
4.1.9.1. Potencijalna mesta vezivanja mononuklearnih kompleksa zlata(III) za enzim	91
4.1.9.1.1. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja mononuklearnih kompleksa u E1 konformaciji enzima	92
4.1.9.1.2. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja mononuklearnih kompleksa u E2P konformaciji enzima	94
4.1.9.2. Potencijalna mesta vezivanja binuklearnih kompleksa zlata(III) za enzim	96
4.1.9.2.1. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja binuklearnih kompleksa u E2P konformaciji enzima	96
4.1.9.2.2. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja binuklearnih kompleksa u E1 konformaciji enzima	97
4.1.10. Distribucija aminokiselinskih ostataka enzima u vezivnim mestima kompleksa	100
4.1.11. Toksični efekti kompleksa zlata(III) testirani na sinaptozimima iz mozga pacova	102
4.1.11.1. Citotoksični efekti kompleksa zlata(III)	102
4.1.11.2. Prooksidativna svojstva kompleksa zlata(III)	104
4.1.11.3. Uticaj kompleksa zlata(III) na lipidnu peroksidaciju	108
4.1.12. Genotoksični efekti binuklearnih kompleksa zlata(III) testirani na humanim limfocitima	110
4.2. Interakcija poliooksovolframata sa acetilholinesterazom	112
4.2.1. Stabilnost poliooksovolframata na pH 3,5 i 8	112
4.2.2. Particioni koeficijent poliooksovolframata	116
4.2.3. Teorijski proračuni dipolnog momenta, raspodele naelektrisanja, površine i zapremine poliooksovolframata	117
4.2.4. Inhibicija acetilholinesteraze	118
4.2.5. Uticaj poliooksovolframata na fluorescenciju acetilholinesteraze	120
4.2.6. Uticaj poliooksovolframata na sekundarnu strukturu acetilholinesteraze	122

4.2.7. EPR spektroskopsko proučavanje interakcije polioksovolframata sa acetilholinesterazom	124
4.2.8. Teorijsko predviđanje potencijalnih mesta vezivanja polioksovolframata na acetilholinesterazi	125
4.2.9. Toksični efekti polioksovolframata testirani na sinaptosomima iz mozga pacova	129
4.2.9.1. Citotoksični efekti polioksovolframata	129
4.2.9.2. Prooksidativna svojstva polioksovolframata	131
4.2.9.3. Uticaj polioksovolframata na lipidnu peroksidaciju	133
4.2.10. Genotoksični efekti polioksovolframata testirani na kulturama humanih limfocita	134
5. ZAKLJUČAK	137
6. LITERATURA	141
7. PRILOZI	161
BIOGRAFIJA I IZJAVE	167

Lista skraćenica

ACh, acetilholin
AChE, acetilholinesteraza
ASChI, acetiltioholin-jodid
ATP, adenzin-trifosfat
BN, binukleus
BSA, goveđi serum albumin (*bovine serum albumin*)
BuChE, butirilholinesteraza
CAT, katalaza
CB, citokinezis-blok
CBPI, citokinezis-blok proliferativni indeks, indeks ćelijske proliferacije
CYP450, citohrom 450
DLC, lipofilni katjoni sa delokalizovanom elektronskom gustinom
DNK, dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB, 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina)
EDTA, etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina
FP, fosfatni pufer
GPx, glutation peroksidaza
GSH, glutation redukovani
GSSG, glutation-disulfid, oksidovani glutation
HPK, heteropoli kiseline
LDH, laktat dehidrogenaza
LP, lipidna peroksidacija
M, adendni atom
MDA, malondialdehid
MN, mikronukleusi
NADH, nikotinamid adenin dinukleotid redukovani
NAD⁺, nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat redukovani
NBS, *N*-bromo-sukcinimid
OP, organofosforna jedinjenja

P, particioni koeficijent

PAM, periferno anjonsko mesto

PDB, proteinska banka podataka

PNMK, polinezasićene masne kiseline

POM, polioksometalat

ROS, reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*)

SDS, natrijum-dodecil-sulfat

TcAChE, acetil holinesteraza iz električne raže roda *Torpedo californica*

TRIS, tris(hidroksimetil)aminometan

TrxR, tioredoksin reduktaza

X, heteroatom

1. UVOD

Uprkos mnogim naučnim dostignućima na polju biologije, hemije i medicine, čiji su rezultat efikasniji tretmani za dijagnozu i lečenje inflamatornih i neurodegenerativnih bolesti, i dalje, tumori, Alchajmerova i Parkinsonova bolest, kao i amiotrofična lateralna skleroza predstavljaju izazov za istraživače. U poslednje dve decenije se pojavio veliki broj naučnih radova o sintezi i karakterizaciji novih jedinjenja sa ciljem da se pronađu ona koja će pokazivati veću aktivnost od već postojećih, ali s druge strane i veću selektivnost i manju toksičnost. Međutim, razumevanje mehanizama delovanja ovih jedinjenja je neophodno za uspešan dizajn lekova koji mogu da dospeju u pretklinička ispitivanja.

U ovoj doktorskoj disertaciji su ispitane dve grupe jedinjenja na bazi metala kao potencijalni lekovi, kompleksi zlata(III) i polioksovolframati, i njihova interakcija sa enzimima, Na^+/K^+ -ATPazom i acetilholinesterazom (AChE), redom.

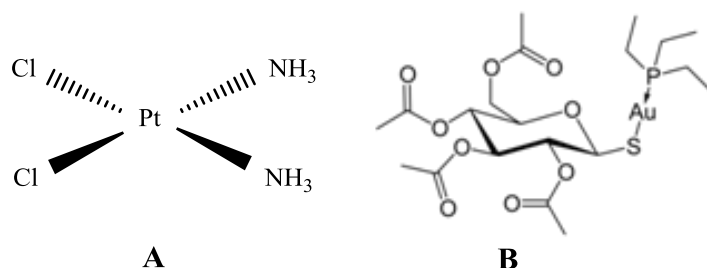
Interesovanje za komplekse zlata, u oblasti medicinske hemije, značajno raste zbog njihovih obećavajućih rezultata u tretmanu kancera. Veliki broj ovih kompleksa je sintetisan sa ciljem da zamene antikancerogene lekove na bazi platine, koji pokazuju izraženu toksičnost, a kod duže primene tumori postaju otporni na njihovo delovanje [1]. Za razliku od platinskih kompleksa koji svoju antitumorsku aktivnost ostvaruju, uglavnom, interakcijom sa dezoksiribonukleinskom kiselinom (DNK) [2,3], smatra se da je molekulska osnova antitumorskog delovanja kompleksa zlata izmena aminokiselinskih ostataka na površini proteina koja dovodi do gubitka njihovih funkcija [4,5]. Dosadašnja istraživanja su pokazala da kompleksi zlata inhibiraju aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze. Ovaj enzim predstavlja heterodimerni transmembranski protein čija je primarna uloga održavanje jonskog i osmotskog balansa koristeći energiju dobijenu hidrolizom adenozin trifosfata (ATP) [6]. Novija istraživanja pokazuju da Na^+/K^+ -ATPaza interakcijom sa proteinima učestvuje u unutarćelijskom kaskadnom prenosu signala ka organelama. Ovo svojstvo Na^+/K^+ -ATPaze objašnjava njeno učešće u patogenezi tumora i migraciji tumorskih ćelija [7,8]. Pored toga, promene u ukupnoj aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze i relativnoj zastupljenosti podjedinica su uočene u ćelijskim linijama karcinoma dobijenih iz različitih tkiva. S tim u vezi, Na^+/K^+ -ATPaza može predstavljati potencijalno ciljno mesto dejstva antitumorskih lekova.

Drugi tip jedinjenja na bazi metala ispitanih u ovoj tezi su polioksometalati (POM). Polioksometalati su negativno naelektrisana neorganska jedinjenja koja u svom sastavu imaju jone prelaznih metala u najvišem oksidacionom stanju – W^{6+} , Mo^{6+} , V^{5+} . Ova jedinjenja su najpre našla primenu u magnetnim, elektronskim i svetlosnim uređajima, kao i u katalizi hemijskih reakcija [9]. Poslednjih godina značaj ovih jedinjenja u biomedicinskim istraživanjima je značajno porastao zahvaljujući otkriću njihovih antiviralnih, antikancerogenih, antimikrobnih i antidijabetskih svojstava [10-12]. Međutim, mehanizam njihove biološke aktivnosti još uvek nije dovoljno jasan, ali je poznato da deluju kao inhibitori aktivnosti različitih klasa enzima: esteraza, fosfataza, kinaza, sulfotransferaza, nukleotid zavisnih enzima [13-17]. U ovoj tezi je ispitana interakcija polioksovolframata sa acetilholinesterazom. Acetilholinesteraza (AChE) je serinska hidrolaza koja učestvuje u prenosu impulsa u holinergičkim sinapsama katalizujući hidrolizu neurotransmitera acetilholina (ACh) [18]. Reverzibilni inhibitori AChE imaju primenu u terapiji neuroloških oboljenja [19], dok se toksični efekti dovode u vezu sa ireverzibilnim modulatorima aktivnosti enzima [20]. Inhibicija AChE u mozgu je glavna terapijska meta u tretmanu Alchajmerove bolesti koju karakteriše gubitak holinergičkih neurona u mozgu i smanjen nivo acetilholina [21].

1.1. Kompleksi zlata kao potencijalni antikancerogeni lekovi

Otkrićem cisplatina (cis-diamindihloroplatina(II), Slika 1A) šesdesetih godina prošlog veka [22], jedinjenja na bazi metala počinju da se ispituju kao potencijalni antikancerogeni lekovi. Cisplatin se pokazao kao veoma uspešan u lečenju brojnih vrsta tumora, kao što su tumori testisa, jajnika, grlića materice, glave, vrata i pluća [23]. Mehanizam kojim ovaj lek ostvaruje svoju antitumorsku aktivnost bazira se na interakciji sa DNK iz ćelija tumora [3,4]. Vezivanjem za DNK u N7 poziciji guanina, cisplatin formira adukte DNK-Pt(II), koji aktiviraju nekoliko signalnih puteva (ATR, p53, p73) koji dovode do programirane ćelijske smrti (apoptoze) [24]. Međutim, cisplatin interaguje i sa enzimima, što za posledicu ima značajnu nefrotoksičnost, neurotoksičnost i ototoksičnost [25,26]. Pored toga, dužom upotrebom cisplatina u lečenju određenih tumora, razvija se rezistencija na ovaj lek. Zbog svega ovoga, i pored vrlo uspešne kliničke primene cisplatina, teži se sintezi novih jedinjenja sa ciljem da se

prevaziđu opisani nedostaci. Međutim, i novo sintetisana jedinjenja na bazi platine(II), kao što su karboplatin i dicikloplatin, su imala sličan mehanizam delovanja i sličan rezistentni profil ka tumorskim ćelijama [27,28].

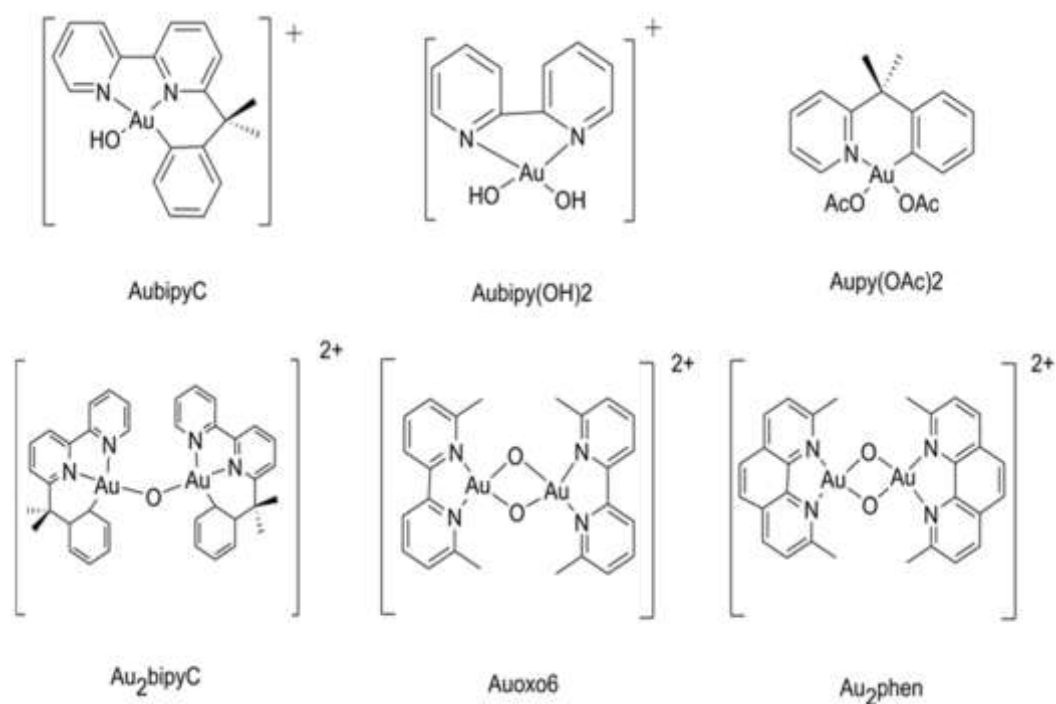


Slika 1. Šematski prikaz strukturne formule A) cisplatina; B) auranofina.

Poznato je da upotreba kompleksa zlata u medicinske svrhe datira još iz drevnog Egipta. U početku su se koristili kao antiinfektivni i antituberkulozni agensi, dok u današnje vreme imaju veoma ograničenu primenu u medicini. Najpoznatiji lek na bazi Au(I) jona, auranofin (Slika 1B) se koristi jedino u lečenju reumatoidnog artritisa, mada pokazuje i značajne antikancerogene efekte [29,30]. Kako Au(III) jon ima d^8 konfiguraciju ($[Xe4f^{14}5d^8]$) i gradi komplekse koji su izoelektronski i izostrukturalni sa cisplatinom, sintezom novih kompleksa zlata(III) bi se dobila jedinjenja koja će takođe pokazivati izražene citotoksične efekte ali će pritom imati manju toksičnost i rezistentnost u odnosu na cisplatin.

1.1.1. Struktura ispitivanih kompleksa zlata(III)

Novosintetisani kompleksi zlata sa multidentatnim ligandima koji sadrže azot, ugenik ili sumpor kao donorski atom (ditiokarbamati, porfirini, polipiridini), su pokazivali poboljšanu stabilnost pri fiziološkim uslovima a u isto vreme i obećavajuće antikancerogene efekte, kako u pogledu selektivnosti tako i u pogledu efikasnosti [31-34]. Biološka aktivnost sintetisanih polipiridil kompleksa zlata(III), korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji (Slika 2) [34-36] je detaljno ispitana, pri čemu je nađeno da dati kompleksi pokazuju značajnu aktivnost ka tumorskim ćelijama [37,38]. Prema broju Au(III) jona ovi kompleksi su podeljeni u dve grupe, na mononuklearne i binuklearne.



Slika 2. Šematski prikaz strukturnih formula ispitivanih kompleksa zlata(III).

Oksidaciono stanje metalnog jona u svim ispitivanim kompleksima je +3, kompleksi su kvadratno planarne geometrije sa neznatnom kvadratno-piramidalnom distorzijom kod binuklearnih kompleksa. Helatni karakter liganda obezbeđuje zadovoljavajuću stabilnost pri fiziološkim uslovima, dok prisustvo $\sigma(\text{M-C})$ (metal-ugljenik) veze u kompleksima AubipyC i Au_2bipyC dodatno stabilizuje Au(III) jon, sprečavajući redukciju Au(III) pri ispitivanim uslovima. Koordinacionu sferu kompleksa zlata(III) pored helatnog liganda čine i jedna -OH grupa prisutna u kompleksu AubipyC, dve -OH grupe kod $\text{Aubipy}(\text{OH})_2$ i dva acetatna liganda kod kompleksa $\text{Aupy}(\text{OAc})_2$. Au(III) joni u binuklearnim kompleksima grade okso mostove, koji kod kompleksa Auoxo6 i Au_2phen formiraju rigidni, planarni sistem Au_2O_2 , tzv. „dijamantsko jezgro“.

1.1.2. Inhibicija tioredoksin reduktaze kompleksima zlata

Mehanizam delovanja kompleksa zlata, za razliku od mehanizma kojim cisplatin ostvaruje svoju antitumorsku aktivnost, uključuje interakciju sa proteinima, posebno proteinima odgovornim za mitohondrijalnu aktivnost. Težnja kompleksa zlata da se

vezuju za proteine može se objasniti činjenicom da se oba jona, Au(III) i Au(I), lako vezuju za tiolne i imidazolske grupe u aminokiselinskim ostacima proteina. Na osnovu saznanja koje postoji o auranofinu, predloženi mehanizam delovanja kompleksa zlata(III) kao prolekova u mitohondrijama uključuje selenoenzim tioredoksin reduktazu (TrxR) [39] čije aktivno mesto sadrži -Se-Cys- (selenocistein) koji ima veliki afinitet ka Au(I) jonima. Ispitivani kompleksi zlata(III) su efikasni inhibitori citosolnog oblika TrxR (TrxR1) sa IC_{50} vrednostima u nanomolarnim (nM) opsezima. Međutim, najbolju efikasnost u inhibiciji TrxR su pokazali oni kompleksi zlata koji kao ligand imaju Cl^- jon, koji lako disosuje iz kompleksa i omogućava redukciju Au(III) do Au(I). Au(I) jon je meka kiselina (veliki metalni jon, teških prelaznih metala, nižeg oksidacionog broja, sklon polarizaciji) zbog čega ima daleko veći afinitet za Se nego Au(III) jon, što je ključni razlog njihove efikasnije inhibicije TrxR. Da je vezivanje za Se u aktivnom mestu TrxR odgovorno za citotoksičnost kompleksa Au, pokazale su i studije u kojim je ispitivana citotoksičnost kompleksa zlata na mutirani oblik TrxR (Se je zamenjen Cys) u kojima je opaženo smanjenje citotoksičnosti ovih kompleksa [40]. Iz literaturnih podataka je poznato da je vezivanje za TrxR ispitivano na molekularskom nivou koristeći MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight*, eng.) i ESI-MS (*Electrospray Mass Spectrometry*, eng.) spektrometriju i biohemijske eseje [39] pri čemu je nađeno da postoji više mesta vezivanja Au jona za ovaj enzim. Vezivanje Au(I) jona za enzim je favorizovan proces, dok u slučaju Au(III) jona dolazi do oksidacije selenol/cistein grupa, pa su prihvatljivi i drugi mehanizmi. Ispitivana je i interakcija auranofina, kompleksa $AuOxO_6$ i kompleksa $NaAuCl_4$ sa sintetičkim peptidom Ac-Gly-[-Cys-Sec-]-Gly-NH₂ koji predstavlja model C-terminalnog motiva TrxR [41] gde je nađeno da auranofin predominantno formira zlato(I)-selenolat kompleks sa ovim tetrapeptidom uz otpuštanje tiošećernog liganda dok ostala dva kompleksa daju isti proizvod koji je identifikovan kao $(Au(I))_2$ /tetrapeptidni adukt koji potvrđuje da se ovaj Au(III) kompleks aktivira redukcijom do Au(I) jona.

1.1.3. Citotoksičnost kompleksa zlata

Kompleksi ispitivani u ovoj tezi (Slika 3) pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost čije se IC_{50} vrednosti nalaze u submikromolarnom opsegu koncentracija, dok su neki od njih citotoksični čak i u nM koncentracijama [37,38]. Takođe ova jedinjenja su aktivna i prema ćelijskim tumorskim linijama koje su rezistentne na cisplatin, kao što su ćelijske linije karcinoma jajnika [35].

Uporedna algoritamska analiza *COMPARE* [42] urađena za ispitivane komplekse na 36 tumorskih linija potvrdila je da se mehanizam delovanja ovih kompleksa razlikuje od mehanizma potvrđenog za cisplatin, i da DNK nije bio molekulska meta ovih jedinjenja [38,43]. Pokazano je da su mete ispitivanih jedinjenja enzimi, kao što su histonska deacetilaza, protein kinaza C kao i ciklin zavisna kinaza. Kao superiorniji od ostalih kompleksa su se pokazali binuklearni kompleksi $Au_{2}O_{10}^{6-}$ i $Au_{2}phen$ zbog odličnih antiproliferativnih efekata (sposobnosti da uspore rast, diferencijaciju i deobu ćelija) [38,43,44]. $Au_{2}phen$ kompleks je bio čak i selektivniji ka ćelijskim linijama tumora pluća, prostate i jajnika sa srednjim IC_{50} vrednostima $0,032 \mu M$ i srednjim IC_{70} vrednostima $0,22 \mu M$, dok je manja selektivnost primećena ka bubrežnim tumorskim ćelijama. Na osnovu *COMPARE* analize, najverovatnija meta $Au_{2}phen$ kompleksa je histonska deacetilaza, pošto ovaj kompleks inhibira njenu aktivnost. Takođe, pokazano je da i superoksidizmutaza (SOD) može biti moguća meta jer dolazi do metalacije (vezivanja metalnog jona za enzim) u slučaju kompetitivnih studija sa ubikvitinom i citohromom c. Mononuklearni $Au_{2}bipyC$ kompleks pokazivao je značajnu citotoksičnu aktivnost ka ćelijskim linijama tumora jajnika (A2780/S) i njihovim varijantama rezistentnim ka cisplatinu (A2780/R) sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 1 do $9 \mu M$ [45]. Ovaj kompleks može indukovati apoptozu u većem obimu nego cisplatin koji dovodi samo do delimične izmene ćelijskog ciklusa.

1.2. Na^{+}/K^{+} -ATPaza

Na^{+}/K^{+} -ATPaza ili Na/K-pumpa je transmembranski enzim koji pripada P tipu familije ATPaza (poznata kao E1-E2 ATPaza) i odgovoran je za aktivni transport Na^{+} i K^{+} jona kroz plazma membranu uz pomoć energije dobijene hidrolizom terminalne fosfatne grupe adenzintrifosfata (ATP) [6]. Po jednom enzimskom ciklusu uz utrošak jednog

mola ATP, 3Na⁺ jona se ispumpa iz ćelije dok se 2K⁺ jona upumpa u nju, suprotno njihovom koncentracionom gradijentu. Reakcija hidrolize koju katalizuje ovaj enzim data je jednačinom (1):



Na⁺_{ekstracelularno} i Na⁺_{citosol} predstavljaju Na jone u ekstracelularnom i citosolnom delu ćelije, K⁺_{ekstracelularno} i K⁺_{citosol} predstavlja K jone u ekstracelularnom i citosolnom delu ćelije, redom, P_i predstavlja H₂PO₄⁻ jon oslobođen hidrolizom ATP.

Koncentracioni gradijent Na⁺ i K⁺ je neophodan za održavanje membranskog potencijala, zapremine ćelije, kao i za održavanje sekundarnog aktivnog transporta drugih rastvorenih supstanci, koje su uključene u transport određenih jona, metala i masti kroz plazma membranu sisara. Pored transportne uloge, poslednjih godina Na⁺/K⁺-ATPazi se pripisuje i uloga u inicijaciji kancera, njegovom rastu i metastazama [46,47].

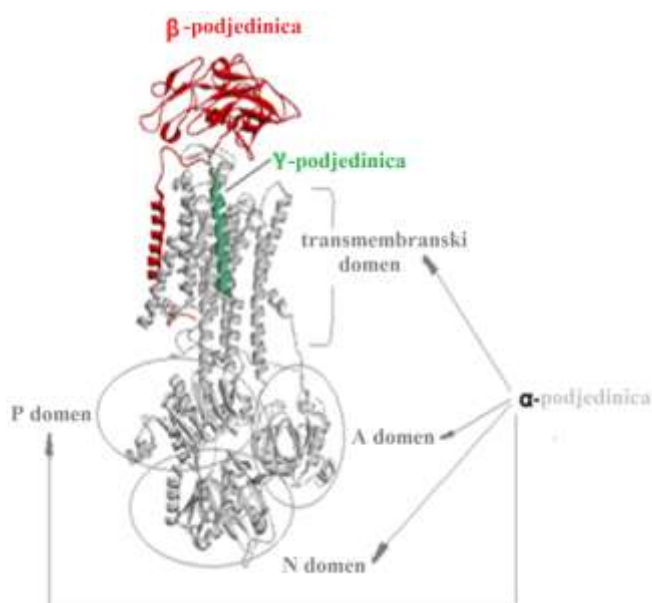
1.2.1. Struktura Na⁺/K⁺-ATPaze

Na⁺/K⁺-ATPaza je najveći proteinski kompleks u P familiji katjonskih pumpi. Minimalna funkcionalna jedinica je heterodimerni protein sastavljen od α- i β-podjedinica [48] koji takođe može da sadrži i još jedan mali regulatorni protein koji je tkivno specifičan tzv. FXYD protein ili γ-podjedinica (Slika 3). α-podjedinica je prosečne mase oko 112 kDa, u njen sastav ulazi oko 1000 aminokiselina i ima katalitičku ulogu. Slabo pokretna glikozilovana β-podjedinica je prosečne mase 50 kDa i sastavljena je od oko 300 aminokiselina. Ima ulogu u stabilizaciji α-podjedinice i usmeravanju pri ugradnji u membranu. FXYD protein je sastavljen od 70 – 180 aminokiselina prosečne mase 10 kDa i učestvuje u moduliranju funkcije Na⁺/K⁺-ATPaze prema specifičnim zahtevima tkiva [49]. Veliki broj aminokiselina koje ulaze u sastav α-podjedinice grupisano je u 10 heliksa (M1 – M10) koji se nalaze u membranskom delu enzima i u tri domena (A (*actuator*, eng.), P (*phosphorylation*, eng.) i N (*nucleotide-binding*, eng.)) koji se nalaze u citosolnom delu enzima. Domen A sadrži N-terminalni završetak polipeptidnog lanca i umetnut je između M2 i M3 heliksa α-podjedinice, dok su P i N domeni smešteni između M4 i M5 domena. Na α-

podjedinici se nalazi vezivno mesto za ATP, Na⁺ i K⁺ jone, kao i za kardijačne glikozide. β-podjedinica čini ekstracelularni deo enzima dok se FXYD protein nalazi u membranskom delu.

U ćelijama sisara je identifikovano 4 različitih α izoformi (α1, α2, α3, α4), tri β izoforme (β1, β2, β3) i četiri izoformi FXYD proteina. Ekspresija izoformi je tkivno specifična i takođe varira između ljudi i glodara [50]. Izoforma FXYD proteina eksprimirana u bubrezima (FXYD1) je nazvana γ podjedinica (Slika 3).

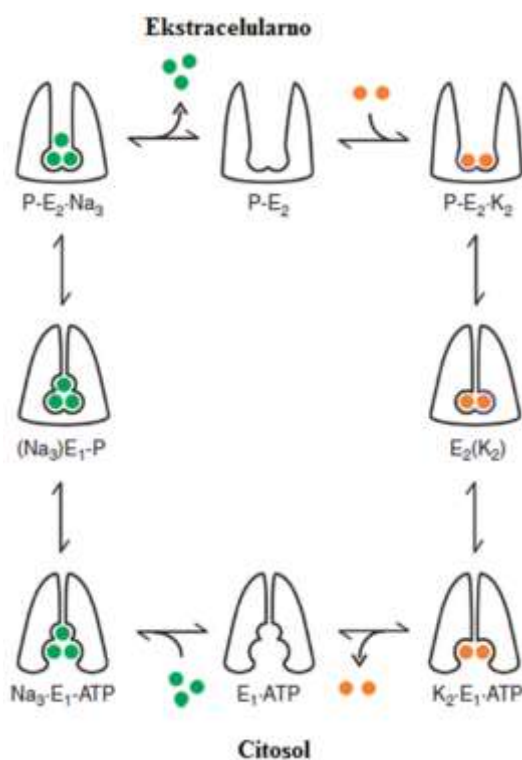
U ćelijama tumora je opažena povećana ekspresija α1, α3 i β1 izoformi Na⁺/K⁺-ATPaze [50-52]. Kako ovaj enzim učestvuje u intracelularnom kaskadnom prenosu signala ka organelama interakcijama sa drugim proteinima, može se pretpostaviti da ima doprinosa u patogenezi tumora i migraciji tumorskih ćelija [7,8]. Iz tog razloga bi selektivno vezivanje potencijalnih antikancerogenih lekova na visoko eksprimiranim izoformama Na⁺/K⁺-ATPaze u ćelijama tumora predstavljalo obećavajuću terapiju u tretmanu kancera [7,8,52].



Slika 3. Struktura Na⁺/K⁺-ATPaze (prilagođeno iz Bondžić et al. Na/K-ATPase as a target for anticancer metal based drugs: insights into molecular interactions with selected gold(III) complexes. *Metallomics*, **2017**, 9, 292-300) [53].

1.2.2. Reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze

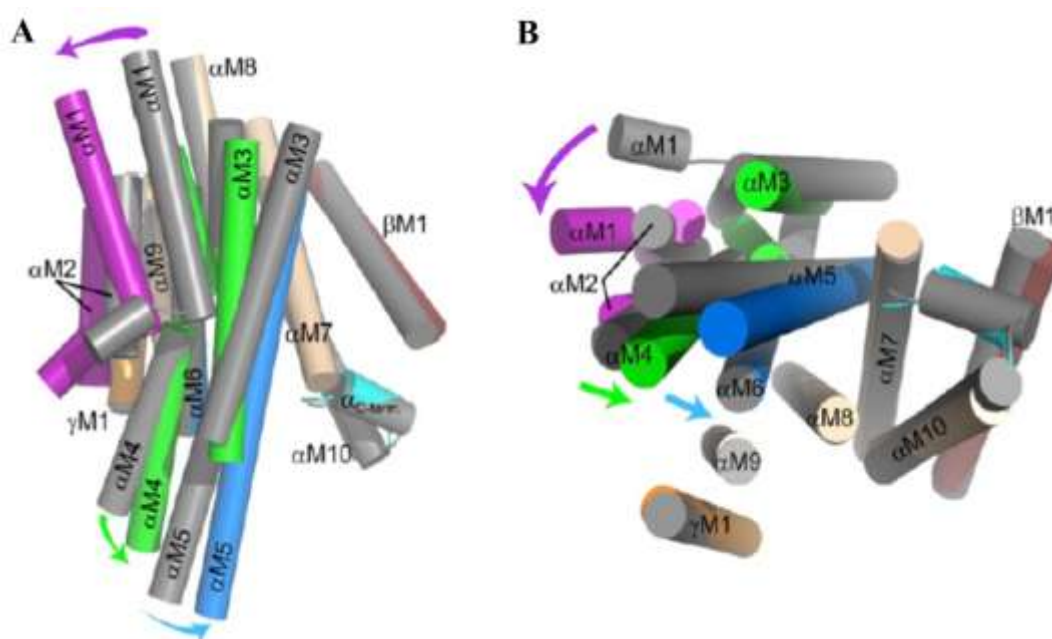
Veliki broj studija koje su rađene na Na^+/K^+ -ATPazi po pitanju transporta Na^+ i K^+ jona kroz ćelijsku membranu, uključujući i definisanje fosforilovanih intermedijera enzima [54,55] i konformacionih promena nastalih u enzimu obezbedile su osnovne informacije o mehanizmu rada ovog enzima [48,56]. Reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze je poznat i kao *Albers-Post* mehanizam koji uključuje faze prikazane na Slici 4.



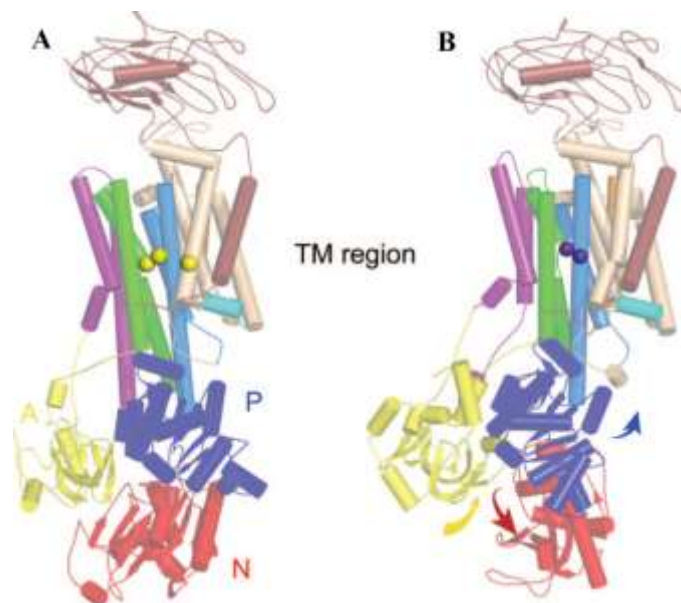
Slika 4. Šematski prikaz reakcionog ciklusa Na^+/K^+ -ATPaze (prilagođeno iz Castillo et al. Mechanism of potassium ion uptake by the Na^+/K^+ -ATPase. *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 7622-7629) [57].

Reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze započinje vezivanjem tri jona natrijuma ($\text{Na}^+_{\text{citosol}}$) za deo enzima koji se nalazi u citoplazmi. U sledećem koraku dolazi do $\text{Na}^+_{\text{citosol}}$ -zavisne fosforilacije enzima i okludovanja $\text{Na}^+_{\text{citosol}}$ jona, ovaj korak je istovremeno praćen konformacionim promenama enzima. Otpuštanje Na^+ jona u sledećem reakcionom koraku je kuplovano sa $\text{E1P} \leftrightarrow \text{E2P}$ konformacionom promenom unutar enzima, za

kojim sledi vezivanje dva K^+ _{ekstracelularno} jona iz ekstracelularne tečnosti. Sledeća faza je K^+ _{ekstracelularno} - aktivirana defosforilacija i okluzija dva jona K^+ _{ekstracelularno}. Otpuštanjem okludovanih K^+ jona u unutrašnjost ćelije završava se jedan reakcioni ciklus Na^+/K^+ -ATPaze [57]. Tokom reakcionog ciklusa Na^+/K^+ -ATPaze dolazi do značajnih konformacionih promena enzima koje su rezultat migracija heliksa unutar transmembranskog dela (Slika 5) i pomeranja domena u citosolu (Slika 6).



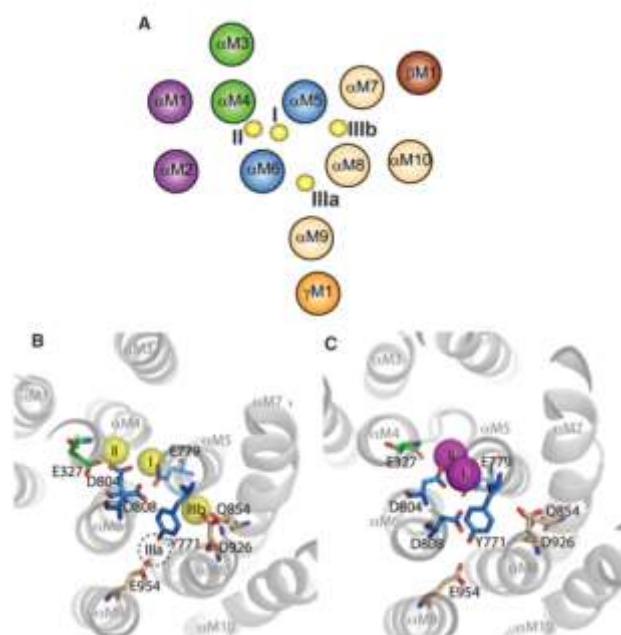
Slika 5. Konformacione promene Na^+/K^+ -ATPaze unutar transmembranskog dela pri prelazu iz E1P u E2P konformaciju. Slikoviti prikaz transmembranskih heliksa E1P konformacije (obojeni heliksi) i E2P konformacije (sivi heliksi) sa A) ekstracelularne bočne strane; B) sa citosolne strane (prilagođeno iz Nyblom et al. Crystal Structure of Na^+,K^+ -ATPase in the Na^+ -Bound State, *Science*, **2013**, 342, 123-127) [58].



Slika 6. Grafički prikaz pomeranja domena Na⁺/K⁺-ATPaze u toku prelaza E1P (A) → E2P (B). Domeni A, P i N su obojeni žuto, plavo i crveno, redom, TM-transmembranski domen. Žuto obojeni krugovi predstavljaju okludovane Na⁺ jone, dok su K⁺ joni obeleženi plavim krugovima (prilagođeno iz Nyblom et al. Crystal Structure of Na⁺,K⁺-ATPase in the Na⁺-Bound State, *Science*, **2013**, 342, 123-127) [58].

Približavanjem A, P i D domena citosola u E1P konformaciji enzima, dolazi do aktiviranja fosforilacionog mesta (Slika 6A). U odnosu na P domen, A domen podleže rigidnoj rotaciji i premeštanju, izmeštanjem za 45 Å Tyr-Gly-Glu-Ser motiva uključenog u proces defosforilacije Asp369. Isto tako se i N domen rotira za oko 80° ka P domenu. P domen se rotira za 35° u odnosu na segment αM7 do αM10 i pomera se zajedno sa αM6-αM7 petljom ka transmembranskom regionu na C terminalnom kraju [58]. Transmembranski domen koji formira vezivna mesta za jone i transportni kanal je formiran od αM1-αM10, βM i γM heliksa. Dok su membranski heliksi αM7 do αM10 rigidne strukture, heliksi αM1 do αM6 su odgovorni za značajna strukturna razmeštanja pri prelasku iz Na⁺ vezane u K⁺ vezanu konformaciju enzima (Slika 5). Par αM1-αM2 membranskih heliksa podleže rigidnoj rotaciji ka αM5-αM6 paru i pomeranju ka citosolnoj strani, dok se citosolni deo αM5-αM6 para neznatno pomera ka P domenu, dok njegov ekstracelularni deo ostaje nepromenjen [58]. U starijoj literaturi, kada nije bila poznata kristalna struktura Na⁺/K⁺-ATPaze u E1P konformaciji, navodilo se da i β podjedinica podleže značajnim konformacionim promenama u odnosu na α i γ

podjedinicu tokom $E1P \rightarrow E2P$ prelaza [59]. Međutim nakon što je određena kristalna struktura $Na_3E1-AlF_4$ koja oponaša $E1P$ konformaciju enzima pokazano je da se položaj β i γ podjedinica u $E1P$ konformaciji značajno ne menja u odnosu na $E2P$ konformaciju [58]. Na^+/K^+ -ATPaza u reakcionom ciklusu vezuje 3 jona Na^+ u unutarmembranskom delu enzima [60]. Vezivna mesta I i II se nalaze na $\alpha M4 - \alpha M6$ (Slika 7A) [58,61] dok vezivno mesto trećeg Na^+ jona još uvek nije pouzdano identifikovano. Biohemijskim i elektrofiziološkim studijama su predložena dva moguća vezivna mesta za treći Na^+ jon: vezivno mesto IIIa koje se nalazi između $\alpha M6$, $\alpha M8$ i $\alpha M9$ heliksa i vezivno mesto IIIb smešteno između $\alpha M5$, $\alpha M7$ i $\alpha M8$ heliksa (Slika 9A) [62,63]. Vezivna mesta I i II za Na^+ jone se poklapaju sa vezivnim mestima I i II za K^+ jone (Slika 7 B i C) [58].



Slika 7. A) Šematski prikaz transmembranskih heliksa u $E1P$ konformaciji enzima, pozicija Na^+ jona je prikazana žutim krugovima; B) Aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju Na^+ jona; C) Aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju K^+ jona. Pozicija K^+ jona je prikazana roze krugovima (prilagođeno iz Nyblom et al. Crystal Structure of Na^+,K^+ -ATPase in the Na^+ -Bound State, *Science*, **2013**, 342, 123-127) [58].

1.2.3. Inhibitori Na⁺/K⁺-ATPaze

Kardijačni glikozidi predstavljaju specifične modulatore Na⁺/K⁺-ATPaze, koji se koriste u tretmanima srčanih oboljenja, ali pored toga imaju i značajne antikancerogene efekte koji se dovde u vezu sa inhibicijom Na⁺/K⁺-ATPaze. Imajući u vidu ovu činjenicu, sinteza selektivnih inhibitora Na⁺/K⁺-ATPaze mogla bi biti jedna od strategija u budućoj terapiji tumora.

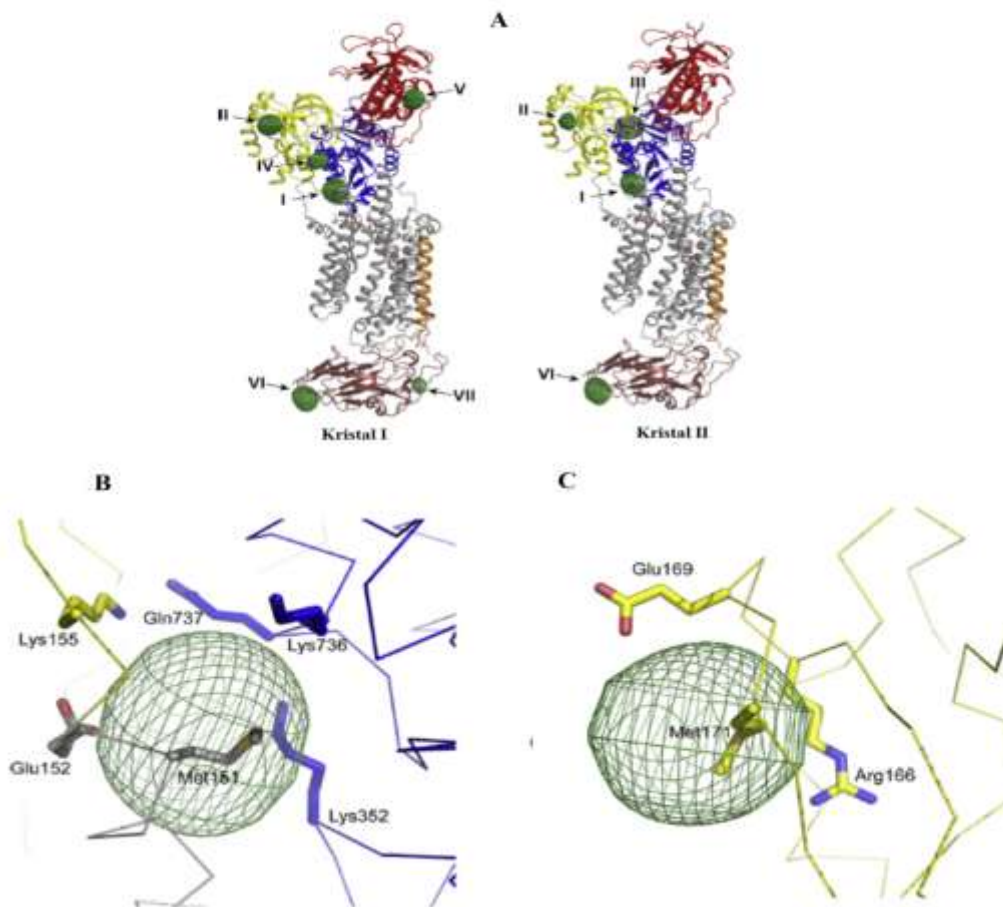
1.2.3.1. Kardijačni glikozidi kao inhibitori Na⁺/K⁺-ATPaze

Kardijačni glikozidi predstavljaju grupu najpoznatijih specifičnih inhibitora Na⁺/K⁺-ATPaze koji se već jako dugo koriste u medicini u terapiji kardiovaskularnih oboljenja. Ova jedinjenja inhibiraju Na⁺/K⁺-ATPazu vezivanjem za njenu α -podjedinicu u regionu poznatom kao jonski kanal, spečavajući na taj način aktivni transport Na⁺ i K⁺ jona kroz membranu. Poslednjih godina ovim jedinjenjima se pripisuje i antikancerogeni efekat koji je povezan takođe sa njihovom sposobnošću inhibicije Na⁺/K⁺-ATPaze. U toku maligne transformacije zdrave ćelije, aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze se značajno povećava ukazujući da ovaj enzim može biti biomarker kao i terapijska meta [64]. Upotreba kardijačnih glikozida, pojedinačno ili češće u kombinaciji sa drugim antikancerogenim agensima [65], u *in vitro* studijama, kao i u nekoliko faza I i II kliničkih ispitivanja sa digoksinom i anvirzelom, pokazala je da oni imaju prihvatljiv toksikološki profil, kao i veću efikasnost čak i pri nižim koncentracijskim dozama. Smatra se da je mehanizam njihovog delovanja povezan sa ometanjem signalnih puteva koje Na⁺/K⁺-ATPaza reguliše nakon vezivanja na ovaj enzim. Ovaj efekat inhibira ćelijsku proliferaciju i indukuje ćelijsku smrt apoptozom.

1.2.3.2. Cisplatin kao inhibitor Na⁺/K⁺-ATPaze

Metalni kompleks platine, paladijuma i zlata, pokazali su se takođe kao dobri inhibitori Na⁺/K⁺-ATPaze u *in vitro* uslovima [66-70]. Konstante stabilnosti, K_s ($K_s=1/K_i$) ovih kompleksa rastu u smeru Pt < Pd < Au ukazujući na činjenicu da kompleksi zlata imaju najveći afinitet ka vezivanju za ispitivani enzim. Za komplekse paladijuma je nađeno da

inhibiraju Na^+/K^+ -ATPazu nekompetitivnim mehanizmom, dok je mehanizam inhibicije cisplatinom kompetitivan [66-68]. Ove razlike u mehanizmima inhibicije ukazuju da se ispitivani kompleksi vezuju na različitim mestima na enzimu. Rentgeno-strukturnom analizom je utvrđeno da pri vezivanju cisplatina za E2P konformaciju enzima postoji sedam vezivnih mesta, koja su uglavnom smeštena u citosolnom delu enzima dok se samo dva mesta nalaze u ekstracelularnom delu (Slika 8A) [71]. Sva mesta se nalaze u neposrednoj blizini Cys ili Met, što je u saglasnosti sa generalno prihvaćenom činjenicom da cisplatin lako reaguje sa aminokiselinama koje sadrže S atom. Dva vezivna mesta, preko kojih je moguće objasniti mehanizam inhibicije Na^+/K^+ -ATPaze cisplatinom, su α -Met151 (vezivno mesto **I**) i α -Met171 (vezivno mesto **II**) su prikazana na Slici 8B. Vezivno mesto **I** se nalazi u citosolnom delu, na granici između α M2 heliksa i P domena, i okruženo je Glu ostacima kao i sa tri Lys ostatka, koji dodatno stabilizuju vezivanje cisplatina. Vezivno mesto **II** je smešteno na Met171 na površini A domena, i okruženo je Arg i Glu ostacima (Slika 8C).



Slika 8. A) Vezivna mesta cisplatina u E2P konformaciji Na^+/K^+ -ATPaze, dobijena rentgeno-strukturnom analizom. Napomena: vezivna mesta **III**, **IV**, **V** i **VII** su vidljiva samo u jednom od kristala. A, P i N domen enzima su obojeni u žuto, plavo i crveno, redom. Ostatak α -podjedinice je obojen u sivo. β i γ podjedinice su obojene braon i narandžasto, redom. Zeleni krug predstavlja cisplatin. Aminokiselinsko okruženje vezivnih mesta cisplatina na Na^+/K^+ -ATPazi; B) vezivno mesto **I**; C) vezivno mesto **II** (prilagođeno iz Huliciak et. al. Crystals of Na^+/K^+ -ATPase with bound cisplatin. *Biochem. Pharmacol.*, **2014**, 92, 494-498) [71].

Treba napomenuti da se nefrotoksičnost cisplatina povezuje sa ireverzibilnom inhibicijom Na^+/K^+ -ATPaze. Ovaj enzim je visoko eksprimiran u bubrezima i predstavlja jedini protein koji generiše koncentracijski gradijent Na^+ jona kroz membranu i koji obezbeđuje energiju za pokretanje svih sekundarnih aktivnih transporta

odgovornih za reapsorpciju esencijalnih nutrijenata nazad u krvotok. Stoga ireverzibilna inhibicija Na^+/K^+ -ATPaze dovodi do prestanka reapsorpcije nutrijenata u bubrezima [25].

1.3. Poliokso-metalati

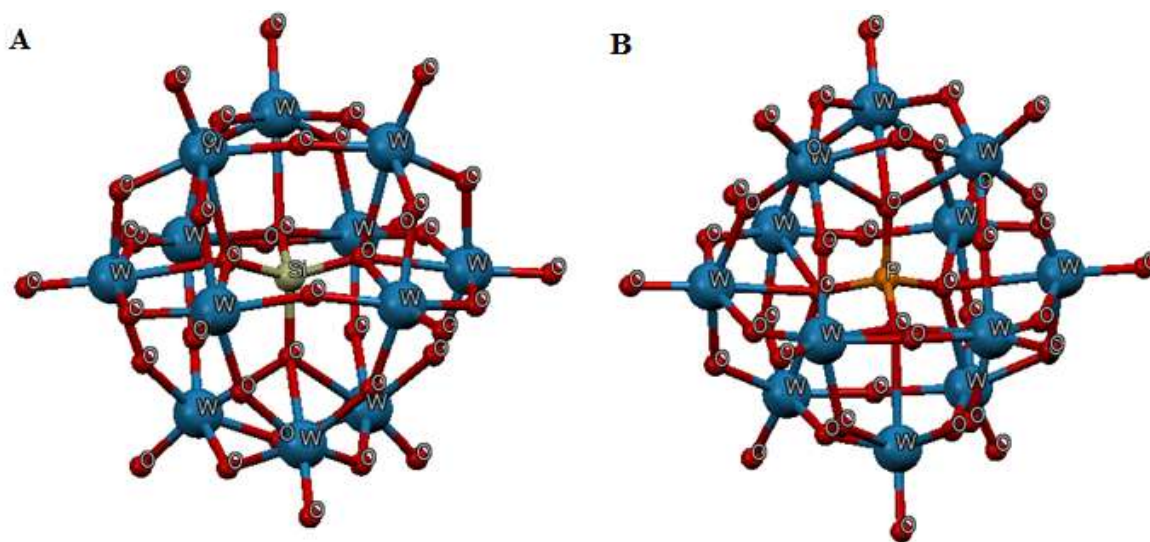
Poliokso-metalati (POM) predstavljaju veliku grupu kompleksnih anjonskih molekula, koji su najpre našli primenu u magnetnim, elektronskim i svetlosnim uređajima, zatim u katalizi hemijskih reakcija a poslednjih godina i u medicini [9-12]. Prvi POM koji je pokazivao biološku aktivnost otkriven je 1971, kada je pokazano da 12 volframsilicijumova kiselina (WSiA) inhibira virus leukemije miševa *in vitro* [72]. Danas je poznato da POM-ovi pokazuju značajnu antiviralnu aktivnost naročito prema virusu HIV (virus humane imunodeficijencije) [73], antibakterijsku [12] i antikancerogenu efikasnost [10,11].

1.3.1. Struktura poliokso-metalata

POM-ovi su prema broju metala koji sadrže u svojoj strukturi podeljeni u dve osnovne grupe: izopolijedinja, koja sadrže jedino d metal i kiseonikove atome, i heteropolijedinjenja, koja sadrže još najmanje jedan heteroatom iz p , d , ili f bloka periodnog sistema [74]. Heteropolijedinjenja su brojnija i lakša za modifikaciju, a zbog svojih karakteristika, kao što su polarnost, redoks potencijal, distribucija površinskog naelektrisanja, oblik i kiselost, predstavljaju dominantniju klasu u medicinskoj hemiji [75]. Strukturno se mogu razlikovati dve najznačajnije strukture heteropolijedinjenja: *Keggin*-ova i *Dawson*-ova, koje predstavljaju i važne gradivne blokove za ostale strukture sličnih oblika. Uklanjanje pojedinačnog atoma u ovim strukturama dovodi do lokalne distorzije u njima, pri čemu se dobija lakunarna forma ovih struktura. Lakunarne forme *Keggin*-ovih POM-ova zbog razlike u simetriji u odnosu na *Keggin*-ove početne oblike imaju drugačije osobine a naročito naelektrisanje i polarnost. Sa biomedicinskog aspekta *Keggin*-ova struktura predstavlja najvažniju strukturu heteropolijedinjenja.

Strukture POM-ova ispitivanih u ovoj doktorskoj disertaciji, 12-volframsilicijumova (WSiA) i 12-volframfosforna kiselina (WPA), prikazane su na Slici 9. Ova jedinjenja

pripadaju klasi heteropolianjona (HPA), podklase heterododekametalata, opšte strukturne formule $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$, gde je X heteroatom (najčešće P^{5+} , Si^{4+} ili B^{3+}), M je dodati atom ili tzv. adendni atom (najčešće W ili Mo) a O je kiseonik [74], koja je i najznačajnija podklasa u ovoj klasi. Za ova jedinjenja je karakteristično da imaju *Keggin*-ovu strukturu [76] koja ujedno predstavlja i najstabilniju strukturu u ovoj klasi. Ispitivana jedinjenja sadrže Si (WSiA) ili P (WPA) kao heteroatom koji je okružen sa četiri atoma kiseonika u obliku tetraedra, dok W^{6+} ima ulogu adendnog atoma. Heteroatom se nalazi u centru cele structure, okružen sa 12 oktaedarskih WO_6^- jedinica koje su međusobno povezane susednim atomima kiseonika. Ovo znači da postoji 24 premošćujućih atoma kiseonika koji povezuju 12 adendnih atoma (W atoma). Adendni atomi su u 12 oktaedara raspoređeni na sferama, najčešće na istom međusobnom rastojanju, u četiri W_3O_{13} jedinice, dajući strukturu tetraedarske simetrije [74].



Slika 9. Strukture ispitivanih polioksometalata: A) 12-volframsilicijumova (WSiA) i B) 12-volframfosforna kiselina (WPA).

1.3.2. Polioksometalati u medicinskoj hemiji

Nakon sinteze 12-volframsilikata, prvog POM-a koji je pokazivao biološku aktivnost, došlo je do ekspanzije otkrića vezanih za antiviralna, antibakterijska i antitumorska svojstva ovih jedinjenja [10-12]. Međutim, mehanizam kojim ova jedinjenja ostvaruju

svoju biološku aktivnost još uvek nije dovoljno jasan, ali je poznato da mogu da deluju kao inhibitori aktivnosti različitih klasa enzima, npr. esteraza, fosfataza, kinaza, sulfotransferaza, nukleotid zavisnih enzima [13-17].

1.3.2.1. Distribucija poliokso-metalata u ćeliji

POM-ovi su jedinjenja nanometraskih dimenzija (1 nm – 3 nm) koje karakteriše veliko negativno naelektrisanje (-3 do -20). Ova karakteristika POM-ova ograničava u velikoj meri njihovo prodiranje u ćeliju zbog elektrostatičkog odbijanja negativno naelektrisane ćelijske membrane [77]. S obzirom da je POM-ove moguće koristiti kao agense za oslikavanje tj. imidžing (*imaging*, eng.), njihova raspodela u ćeliji se može vrlo lako pratiti [78,79]. Prve studije ćelijske distribucije POM-ova urađene su koristeći ramansku i rentgensku fluorescenciju [80] i obe tehnike su jasno pokazale da POM, ($[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^{18-}$) ulazi u fibroblaste mišjih tumor rezistentnih ćelijskih linija, C3HBi. Ramanskom spektroskopijom je detektovana traka na 947 cm^{-1} koja je pripisana W-O-W istežućoj vibraciji (u rastvoru ili čvrstom stanju ova traka se nalazi na 937 cm^{-1}). Korišćenjem tehnike elektronske mikroprobe (*electron probe microanalyzer*, eng.) ovaj POM je lociran u lizozomima različitih makrofaga nakon intravenskog davanja pacovima [81]. Tehnikom skenirajuće protonске mikroprobe (*scanning proton microprobe*, eng.) je pokazano da se $[\text{Co}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$ nalazi u mononukleusima limfocita periferne krvi [82]. Koristeći fluorescentnu mikroskopiju, skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM, *scanning electron microscopy*, eng.) i transmisiju elektronsku mikroskopiju (TEM, *transmission electron microscopy*, eng.) ispitivana je lokalizacija POM-ova $[\text{P}_2\text{W}_{12}\text{O}_{48}]^{14-}$, $[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{Zn}_4(\text{H}_2\text{O})_2\text{O}_{68}]^{10-}$ i $[\text{Si}_2\text{W}_{18}\text{Nb}_6\text{O}_{77}]^{8-}$ u makrofazima ćelijske linije miša J774, koja je poznata po svojoj sposobnosti da eliminiše anjonske supstrate, pri čemu je dobijeno da su ispitivani POM-ovi uhvaćeni makrofagom i da se nalaze u citoplazmi [83]. S druge strane, kod bakterija *Staphylococcus aureus* tretiranih $[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$ pokazano je da je POM smešten na površini ćelije [84]. Štaviše, postoji verovatnoća da glavni mehanizam antiviralne aktivnosti POM-ova nije inhibicija intracelularnih enzima, kao što su proteaze (HIV proteaze) ili DNK polimeraze (HIV reverzne transkriptaze) već da ova jedinjenja

inhibiraju vezivanja virusa na receptore ćelijskih membrana, na primer interakcijom sa virusnim omotačem glikoproteinom gp120 [85].

Sumirano, POM-ovi pod određenim uslovima mogu da prodru u unutrašnjost ćelije, obično u ćelije čistače, kao što su makrofazi. S druge strane, smatra se da je prodiranje u unutrašnjost većine drugih ćelija teško zbog elektrostatičkih odbijanja od strane negativno naelektrisane ćelijske membrane. Stoga je verovatnije da ekstracelularni proteini kao i proteini ugrađeni u ćelijsku membranu sa vezivnim mestima sa ekstracelularne strane imaju glavnu ulogu u farmakološkim efektima POM-ova koji su opaženi *in vivo*.

1.3.2.2. Inhibicija enzima polioksometalatima

POM-ovi su jedinjenja koja pokazuju brojne farmakološke efekte, ali njihov mehanizam delovanja jos uvek nije razjašnjen. Međutim, brojne studije ukazuju da je njihovo delovanje usmereno ka inhibiciji određenih familija enzima (fosfataze, ektonukleotidaze, kinaze, sulfo- i silaliltransferaze, histondeacetilaze, holinesteraze, nukleaze i polimeraze) koji se uglavnom nalaze u ekstracelularnom prostoru i ne zahtevaju prolaz kroz ćelijsku membranu. Inhibitorska moć POM-ova kreće se u opsegu od mikromolarnih do nanomolarnih koncentracija [13-16,85].

1.3.2.2.1. Inhibicija fosfataza

Fosfataze su enzimi koji se nalaze u ekstracelularnom delu ćelije pa mogu biti inhibirani POM-ovima i bez njihovog prodiranja u ćelijsku membranu. Literaturni podaci pokazuju da su POM-ovi dobri inhibitori različitih fosfataza: alkalne i kisele fosfataze, protein-tirozinska fosfataze i glukoza-6-fosfataze i da je mehanizam inhibicije kompetitivan [13].

1.3.2.2.2. Inhibicija ektonukleotidaza

Ektonukleotidaze su enzimi koji su smešteni na ćelijskoj membrani ali se njihov katalitički domen nalazi u ekstracelularnom prostoru ćelije. Neke ektonukleotidaze

moгу da se otkaae sa membrane i da funkcionišu kao rastvorni ekstracelularni enzimi. POM-ovi ove enzime inhibiraju u mikromolarnim koncentracijama a kao efektivni i dobar inhibitor ovih enzima pokazao se POM Keginove strukture, $[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}]^{8-}$ što je iskorišćeno kao farmakološka alatka za ispitivanje uloge ovih enzima u mozgu [17]. Veliku inhibitornu sposobnost ka ovim enzimima je pokazao i komercijalno dostupni POM, $[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]^{6-}$ koji je stabilan više dana na fiziološkom pH. Ovaj POM je korišćen u studijama koje su proučavale ulogu ovih enzima u kardiovaskularnim bolestima i tumorima jetre [86]. Pokazano je da inhibicijom NTPD1 enzima (enzim iz familije ektonukleotidaza) ovim POM-om dolazi do inhibicije rasta tumora metastaza u jetri kod miševa [87].

1.3.2.2.3. Inhibicija kinaza

Kinaze katalizuju fosforilaciju hidroksilne grupe. Različite vrste kinaza uključujući heksokinaze, fosfofruktokinaze i protein kinaze CK2 mogu biti inhibirane POM-ovima nekompetitivnim mehanizmom [14]. Protein kinaza CK2 se nalazi u mnogim ćelijama tumora pa je postavljena hipoteza da njenom inhibicijom ova jedinjenja ostvaruju svoj antikancerogeni efekat. POM, $[\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$, inhibira protein kinazu CK2 u subnanomolarnom opsegu i visoko je selektivan u odnosu na ostale kinaze [14]. U ovom trenutku nije poznato da li je za ovako veliku inhibitornu moć ovog jedinjenja odgovoran sam netaknut POM ili fragmenti nastali njegovim razlaganjem. Inače ovaj POM se vezuje na mestu koje je udaljeno od katalitičkog mesta.

1.3.2.2.4. Inhibicija sulfo- i silalil- transferaza

Sulfo- i silalil- transferaze su enzimi koji imaju ulogu u modifikaciji šećerne komponente koja se nalazi na površini ćelijske membrane. Mikroorganizmi koriste ovako modifikovane glukane kao inicijalni korak u procesu infekcije. Sulfotransferaze se mogu naći i u citosolu ćelije. Brojni POM-ovi, prvenstveno na bazi volframata i vanadata, mogu da reverzibilno inhibiraju ove enzime sa IC_{50} vrednostima u niskom nanomolarnom opsegu [15]. Kao rezultat njihove patofiziološke uloge, ekstracelularne

lokacije, kao i velike inhibitorne moći POM-ova, sulfo- i silalil- transferaze su prepoznate kao mete POM-ova kao potencijalnih antibakterijskih lekova.

1.3.2.2.5. Inhibicija histondeacetilaza

Histondeacetilaze su klasa enzima koji uklanjaju acetil grupe iz ϵ -N-acetil-lizin aminokiseline histona dozvoljavajući histonima da čvrsto obmotaju DNK. Na stotine ispitivanih POM-ova su se pokazali kao dobri inhibitori histondeacetilaza čime je potvrđen i njihov uticaj na inhibiciju rasta ćelija kancera kako *in vitro* tako i *in vivo* [88]. Pretpostavlja se da fragmenti nastali degradacijom POM-ova doprinose njihovom antikancerogenom efektu.

1.3.2.2.6. Inhibicija holinesteraza

Aktivnost acetil- i butiril- holinesteraze može biti inhibirana različitim POM-ovima u submikromolarnom opsegu koncentracija [89]. Kako se inhibitori acetilholinesteraze koriste u terapiji Alchajmerove bolesti, aktivnost POM-ova bi mogla biti proširena i na ovu oblast. Međutim, trenutni problem u primeni u terapiji Alchajmerove bolesti je njihov transport do mozga kako bi dospeli do svoje mete.

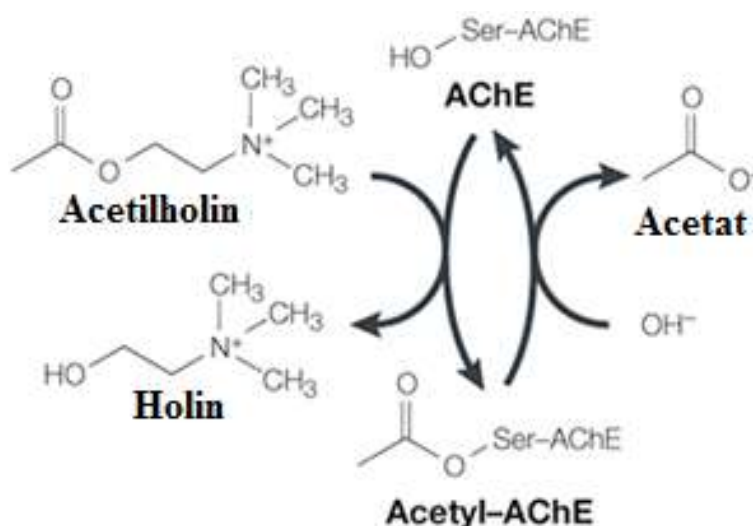
1.3.2.2.7. Inhibicija nukleaza i polimeraza

Brojna *in vitro* ispitivanja su pokazala da su POM-ovi dobri inhibitori nukleaza kao i DNK- i RNK-polimeraza [90]. Naročito je dobro ispitana inhibicija HIV reverzne transkriptaze (HIV-RT), i RNK-zavisne virusne DNK polimeraze. Većina POMova je pokazivala alosternu inhibitorску moć u mikromolarnoj koncentraciji. Međutim u velikom broju studija nije nađena veza između HIV-RT i anti HIV aktivnosti [90]. Ovi rezultati su u saglasnosti sa činjenicom da POM-ovi ne mogu lako da dospeju do svoje intracelularne mete, kakva je DNK polimeraza implicirajući na verovatnoću postojanja drugog mehanizma kojim ova jedinjenja ostvaruju svoju antiviralnu aktivnost.

1.4. Acetilholinesteraza

Acetilholinesteraza (AChE) je enzim koji pripada grupi serinskih hidrolaza i ključna je komponenta holinergičnih sinaptozoma i neuromišićnih vlakana gde ima ulogu u regulaciji holinergične transmisije. Inibitori AChE se već dugo koriste u tretmanu Alchajmerove bolesti a poslednjih godina je pokazano da AChE učestvuje i u seriji drugih procesa kao što su: regulacija cerebralnog protoka krvi, aktivacija i ekspresija APP95 proteina kao i u procesu agregacije β -amiloida [91,92]. Smatra se da AChE interaguje sa β -amiloidom, vodeći do formiranja stabilnog kompleksa i formiranja plakova [91].

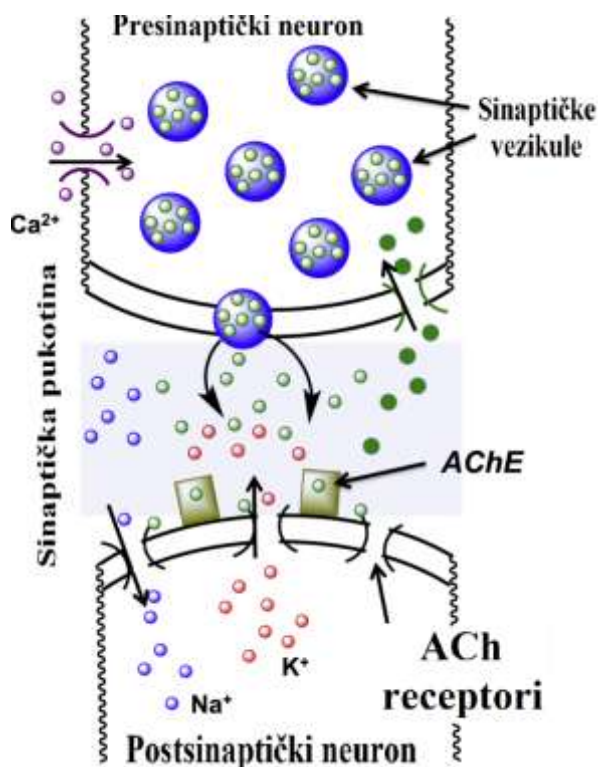
Osnovna uloga ovog enzima je završetak prenosa impulsa u holinergičnim sinapsama brzom hidrolizom neurotransmitera acetilholina (ACh) do acetata i holina (Slika 10).



Slika 10. Hidroliza acetilholina katalizovana acetilholinesterazom.

Acetilholin (ACh) je neurotransmiter centralnog i perifernog nervnog sistema koji učestvuje u procesu prenosa nervnog impulsa od presinaptičkog do postsinaptičkog neurona (Slika 11). Sinteza acetilholina se odvija u citoplazmi presinaptičkih neurona iz holina i acetil koenzima A u prisustvu enzima holin acetiltransferaze. Prisustvo holin acetiltransferaze je marker holinergičnog neurona. ACh je u nervnim završecima (neuronima) smešten u vezikulama i u maloj koncentraciji u citosolu. Tokom prenosa

nervnih impulsa ACh se oslobađa iz sinaptičke vezikule i procesom egzocitoze izbacuje u sinaptičku pukotinu. U sinaptičkoj pukotini ACh se vezuje na receptore koji se nalaze na membrani postsinaptičkog neurona i šalje signal. AChE koja se nalazi na postsinaptičkoj membrani hidrolizom ACh završava prenos signala. Holin koji je nastao hidrolizom ACh se ponovo unosi u presinaptički neuron čime započinje novi ciklus (Slika 11) [93].



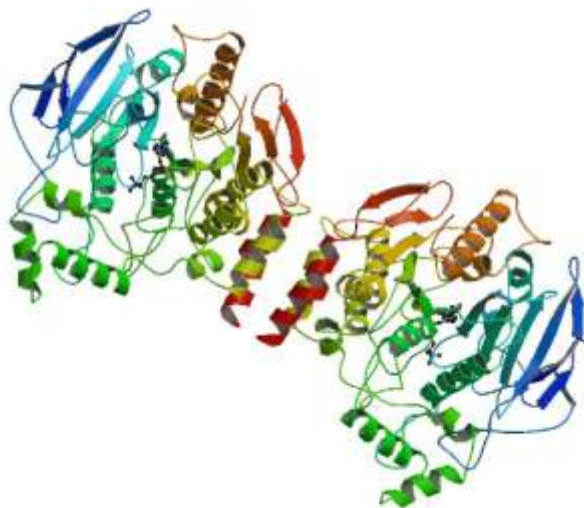
Slika 11. Mehanizam dejstva AChE u prenošenju nervnog impulsa (prilagođeno iz Becker Basic and Clinical Pharmacology of Autonomic Drugs. *Anesthesia Progress*, 2012, 59, 159-169) [93].

Alchajmerova bolest se odlikuje progresivnim gubitkom sinapsi i neurona poremećajem acetilholinske transmisije, koje ima za posledicu značajno smanjenje nivoa neurotransmitera acetilholina. Upotrebom reverzibilnih inhibitora acetilholinesteraze, kao enzima odgovornog za razgradnju acetilholina, u lečenju Alchajmerove bolesti se povećava i produžava delovanje nedostajućeg acetilholina u sinaptičkim prostorima

(sinaptička pukotina) obolelih od Alchajmerove bolesti i smanjuje formiranje neurotičnih plakova i neurofibrilnih vlakana.

1.4.1. Struktura acetilholinesteraze

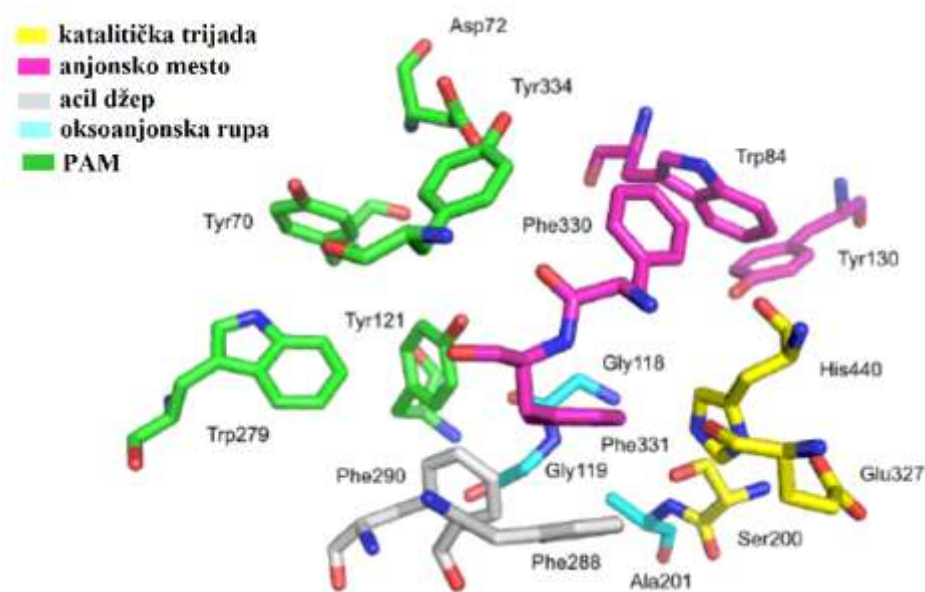
Struktura AChE je određena 1991. godine kada su dobijeni kristali iz električnog organa električne raže *Torpedo californica* (TcAChE) [94]. TcAChEaza sadrži 537 aminokiselina organizovanih u 12 β -pločica i 14 α -heliksa.



Slika 12. Šematski prikaz trodimenzionalne dimerne strukture AChE izolovane iz električne raže (*Torpedo californica*), PDB kod 1E66.

Reakcija hidrolize ACh se odigrava u katalitičkom mestu koje je locirano na dnu uskog kanala dubine 20 Å i širine 5 Å, koga čine aromatične aminokiseline. Najvažnije mesto, tzv. estarsko mesto, sadrži tri aminokiseline Ser200, His400 i Glu327 (TcAChE) koje formiraju katalitičku trijadu (Slika 13) [95]. Ove aminokiseline učestvuju u transferu acetil grupe iz ACh do Ser200. Anjonsko mesto AChE, koga čine aminokiseline Trp84, Tyr130, Phe330 i Phe331, je odgovorno za pravilno pozicioniranje ACh u aktivnom mestu enzima za šta su odgovorne katjon π -interakcije između navedenih aromatičnih kiselina i kvaternerne amonijum grupe acetilholina. Tokom enzimske reakcije formira se prelazni kompleks koji se stabilizuje građenjem vodoničnih veza sa aminokiselinama

prisutnim u tzv. oksoanjonskom udubljenju AChE (Gly118, Gly119 i Ala201). Oblik acil džepa (*acil pocket, eng.*) određuju dve aminokiseline Phe288 i Phe290 koje sprečavaju prolaz velikih molekula do katalitičkog centra. Periferno anjonsko mesto (PAM) čini 5 aminokiselina, Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 i Tyr334. PAM je smešten na ulazu u kanal i odgovoran je za vezivanje alosteričnih inhibitora kao i za interakciju sa β -amiloidom [96]. Vezivanjem za PAM, ligand inhibira enzimsku aktivnost ili blokirajući kretanje drugih liganada kroz kanal, ili pak dovodi do alosterne promene katalitičke trijade [97].



Slika 13. Aktivno mesto AChE iz *Torpedo californica* (PDB kod 1EVE) (prilagođeno iz Bajda et. al. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, 14, 5608-5632 [95]).

1.4.2. Inhibitori acetilholinesteraze

Inhibitori acetilholinesteraze su podeljeni u dve grupe: reverzibilne i ireverzibilne. Reverzibilni inhibitori, kompetitivni ili nekompetitivni, uglavnom imaju primenu u terapijske svrhe dok su toksični efekti nekog jedinjenja povezani sa ireverzibilnom inhibicijom AChE.

1.4.2.1. Lekovi u tretmanu Alchajmerove bolesti

U reverzibilne inhibitore AChE spadaju jedinjenja sa različitim funkcionalnim grupama (karbamati, kvaterni i tercijarni amini) i koriste se u dijagnostici ili tretmanu različitih bolesti kao što su: Alchajmerova bolest, miastenija gravis, glaukom i kao protivotrov kod antiholinergičnog predoziranja [20].

Lekovi kao inhibitori AChE (rivastigmin, donepezil, galantamin) održavaju određeni nivo ACh smanjujući brzinu njegove hidrolize. Na ovaj način oni povećavaju neurotransmisiju u prednjem delu mozga i kompenzuju gubitak funkcionisanja moždane ćelije. Međutim, nijedan od lekova nema indikaciju za odlaganje ili zaustavljanje progresije bolesti [20]. Donepezil je selektivni, reverzibilni inhibitor AChE koji se vezuje na perifernom anjonskom mestu enzima i deluje na taj način što odlaže stvaranje amiloidnog plaka [20]. Rivastigmin je moćan karbamatni inhibitor koji blokira aktivnost AChE vezivanjem za estarski deo aktivnog mesta ovog enzima. Dok donepezil selektivno inhibira AChE, rivastigmin inhibira i AChE ali i BuAChE (butirilholinesteraza). Ovaj lek se koristi u tretmanu blage do umerene Alchajmerove bolesti. Galantamin je alkaloid izolovan iz biljke *Galanthus woronowii* koji se takođe koristi u tretmanu blage do umerene Alchajmerove bolesti. On je selektivan, kompetitivan inhibitor AChE koji interaguje sa anjonskim mestom kao i sa aromatičnim kanalom [20].

1.4.2.2. Organofosforna jedinjenja

Organofosforna jedinjenja (OP) su estri ili tioli fosforne, fosfinske ili fosfoamidne kiseline. Toksični efekti OP jedinjenja povezani su sa nereverzibilnom fosforilacijom estera u centralnom nervnom sistemu [20] dok je za njihovu akutnu toksičnost odgovorna ireverzibilna inaktivacija AChE [20,98]. U stvari, OP jedinjenja su inhibitori koji su po svojoj strukturi analogni ACh i zbog toga neometano ulaze u aktivno mesto enzima vezujući se za hidroksilnu grupu Ser [98]. Kao i ACh, i organofosfati se razlažu i fosforiluju enzim kovalentno se vezujući za -OH grupu Ser. Međutim, dok se formirani acil enzim brzo hidrolizuje i regeneriše do slobodnog enzima, defosforilacija je veoma spor proces. Kako fosforilovani enzim ne može da hidrolizuje neurotransmiter

(ACh) dovodeći do njegovog nakupljanja, post-sinaptička membrana ostaje depolarizovana i sinaptička transmisija ne funkcioniše [98,99].

Okso oblici organofosfata (P=O) jesu i do nekoliko stotina puta moćniji inhibitori AChE u poređenju sa analognim tio oblicima (P=S) [100]. Kod sisara, metabolizam tio organofosfata odvija se aktivacijom u odgovarajući okson najvećim delom u prisustvu citohroma P450 (CYP450), a zatim hidrolizom i kovalentnim vezivanjem za proteine. Kod insekata je takođe dominantan mehanizam aktivacije u odgovarajuće oksone u prisustvu izoenzima CYP450, ali kod njih nema hidrolize organofosfata, pa je zbog toga toksičnost ovih jedinjenja selektivno veća u odnosu na sisare [101].

1.5. Fluorescencija proteina

Fluorescentna spektroskopija je metoda koja se u velikoj meri koristi pri proučavanju strukture, funkcije i konformacionih promena proteina ali i pri proučavanju ligand-protein interakcija, prvenstveno zbog svoje visoke senzitivnosti i tačnosti [102]. Pod fluorescencijom se podrazumeva emisija elektromagnetnog zračenja atoma ili molekula koja nastaje kao posledica prelaza elektrona sa osnovnog vibracionog nivoa prvog pobuđenog singletnog stanja molekula na neki (bilo koji) od vibracionih nivoa osnovnog elektronskog stanja. Jedinjenja koja mogu da fluoresciraju nazivaju se fluorofore i obično sadrže konjugovane π sisteme. Proteini su jedini biomolekuli koji poseduju sopstvene (unutrašnje) fluorofore i ne zahtevaju ugradnju spoljašnjih fluorofora (na primer organske boje), kao bi mogli biti korišćeni u fluorescentnoj spektroskopiji. Nasuprot tome, za ispitivanje lipida, membrana i šećera tehnikom fluorescentne spektroskopije potrebno je uvođenje spoljašnjih fluorofora.

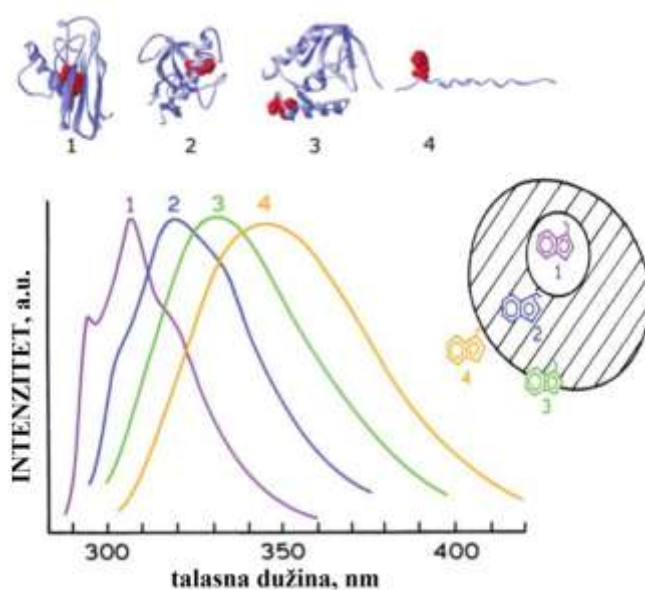
Aminokiseline triptofan (Trp), tirozin (Tyr) i fenilalanin (Phe) predstavljaju unutrašnje fluorofore proteina. Zastupljenost ovih aminokiselina je jako mala u proteinima (svega oko 1%). Važna karakteristika unutrašnje fluorescencije proteina je visoka osetljivost indolovog prstena Trp na promenu polarnosti njegovog lokalnog okruženja. Usled promene polarnosti okruženja Trp, dolazi do promena u njegovom emisionom spektru kao odgovor na nastale konformacione promene u proteinu, asocijaciju podjedinica proteina, vezivanja liganda ili denaturaciju.

Interpretacija fluorescencije proteina u prisustvu više vrsta fluorescentnih aminokiselina nije jednoznačna jer je okolina svake aminokiseline drugačija i spektralne karakteristike svake od njih se razlikuju. S druge strane, apsorpcioni i emisioni spektri Trp sa različitim lokalnim okruženjem u proteinu se uglavnom poklapaju i jako je teško odvojiti spektralni doprinos svakog Trp u multitriptofanskom proteinu.

1.5.1. Spektralne karakteristike proteinskih fluorofora

Kao što je spomenuto, tirozin, triptofan i fenilalanin predstavljaju aminokiseline koje doprinose fluorescenciji nekog proteina. Phe ima emisiju na 282 nm a Tyr na 303 nm. Emisioni maksimum Trp u vodenoj sredini je na 350 nm i njegov položaj jako zavisi od polarnosti i okruženja u kome se nalazi.

Emisija proteina se obično dobija ekscitacijom na talasnoj dužini od 280 nm pri čemu se pobuđuju Tyr i Trp, dok Phe koji ne apsorbuje na ovoj talasnoj dužini ne doprinosi ukupnoj fluorescenciji. Selektivna ekscitacija Trp ostataka se postiže na talasnim dužinama u opsegu od 295 – 305 nm jer na ovim talasnim dužinama apsorpcija u proteinu potiče uglavnom od Trp. Položaj ovako dobijenog emisionog maksimuma zavisi isključivo od polarnosti njegove okoline. Proteini u kojima se Trp nalazi u nepolarnoj sredini pokazuju emisione maksimume na nižim talasnim dužinama od onih u kojima se Trp nalazi u polarnoj sredini (Slika 14). Kod multitriptofanskih proteina u kojima Trp nejednako doprinose ukupnoj emisiji proteina ukupni emisioni spektar predstavlja usrednjenu vrednost okruženja Trp.



Slika 14. Efekat okruženja Trp na emisijski spektar proteina. Emisioni spektri 1) apoazurin, 2) ribonukleaza, 3) stafilokokalne nukleaza i 4) glukagon. Apoazurin predstavlja protein u kome se Trp nalazi u hidrofobnoj sredini. U smeru 1 → 4 polariznost Trp okruženja raste. (prilagođeno iz Eftink M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. *Methods Biochem. Anal.*, **1990**, 35,117–129) [103].

1.5.2. Gašenje fluorescencije proteina

Gašenje fluorescencije predstavlja bilo koji proces koji dovodi do smanjenja njenog intenziteta. Različite molekulske interakcije mogu dovesti do gašenja fluorescencije: reakcije u pobuđenom stanju, molekulska razmeštanja, transfer energije, građenje kompleksa u osnovnom stanju kao i gašenje sudarima.

Koliziono (dinamičko) gašenje fluorescencije nastaje kada se pobuđeno stanje fluorofore deaktivira kontaktom sa nekim drugim molekulom, tzv. gasiocem fluorescencije. Bitno je naglasiti da u ovom slučaju, ne dolazi do hemijske promene.

Do smanjenje intenziteta fluorescencije, može doći i zbog statičkog gašenja. Ovakvo gašenje je rezultat formiranja kompleksa između fluorofore i gasioca, koji nakon apsorpcije fotona vraćanjem u osnovno stanje ne emituje fotone.

Statičko i dinamičko gašenje se mogu razlikovati na osnovu njihove različite zavisnosti od temperature ili pak merenjem vremena života fluorescencije fluorofore. Na višim

temperaturama dolazi do brže difuzije i prema tome većeg kolizionog gašenja, a sa druge strane više temperature dovode i do disocijacije slabo vezanog kompleksa i prema tome do statičkog gašenja manjeg intenziteta.

Takođe, moguće je razlikovati statičko od dinamičkog gašenja pažljivim ispitivanjem apsorpcionog spektra fluorofore. Koliziono kvenčovanje jedino utiče na pobuđeno stanje fluorofore i stoga ne dovodi do promene u njenom apsorpcionom spektru. Za razliku od kolizionog, kod statičkog gašenja usled formiranja kompleksa dolazi do promena u apsorpcionom spektru fluorofore.

Kod interakcije proteina sa ligandima je mnogo češći slučaj gašenja fluorescencije kombinacijom dinamičkog i statičkog gašenja.

Još jedan važan proces koji dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije je fluorescentni rezonantni prenos energije (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*, eng.). Teorija rezonantnog prenosa energije je bazirana na konceptu fluorofore kao oscilujućeg dipola koji izmenjuje energiju sa drugim dipolom slične rezonantne frekvencije. FRET se dešava između donora (u proteinima Trp) u pobuđenom stanju i akceptora (ligand) u osnovnom stanju. Do ovog procesa uvek dolazi kada se emisijski spektar fluorofore (donora) preklapa sa apsorpcionim spektrom molekula akceptora [104]. FRET smanjuje intenzitet fluorescencije donora i vrši prenos energije na akceptor. Bitno je naglasiti da akceptor može, ali i ne mora biti fluorescentni molekul. FRET ne uključuje emisiju svetlosti od strane donora i ne treba ga tumačiti kao emisiju koju je akceptor preuzeo od donora. Obim prenosa energije je određen rastojanjem između donora i akceptora kao i obimom spektralnog preklapanja.

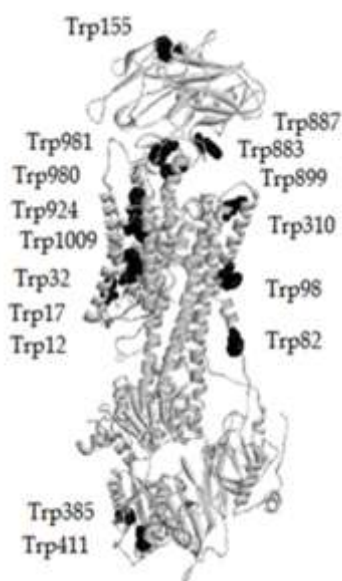
Efikasnost prenosa energije za jedan donor-akceptorski par na konstantnom rastojanju je dat jednačinom (2):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2)$$

gde je r rastojanje između donora i akceptora, R_0 je *Förster*-ovo rastojanje (rastojanje na kojem je efikasnost prenosa energije 50 %) Stoga, efikasnost transfera energije zavisi od rastojanja r . Kako su *Förster*-ova rastojanja uporediva sa veličinom bioloških makromolekula (30 do 60 Å) FRET se koristi kao tzv. „spektrometrijski lenjir“ za merenje rastojanja unutar proteina.

1.5.3. Raspodela triptofana u Na⁺/K⁺-ATPazi

Na⁺/K⁺-ATPaze je enzim koji sa 16 Trp u svojoj strukturi pripada grupi multitriptofanskih proteina. 12 Trp se nalazi u α -podjedinici, 4 je deo β -podjedinice dok u γ -podjedinici Na⁺/K⁺-ATPaze nema Trp. Dva Trp (Trp385 i Trp411) iz α -podjedinice, su smeštena u ATP vezujućem regionu N domena van membranskog dela, dok se ostalih 10 Trp (Trp82, Trp98, Trp310, Trp883, Trp887, Trp899, Trp924, Trp980, Trp981 i Trp1009) nalazi u transmembranskom delu. Tri Trp ostatka (Trp12, Trp17 i Trp32) iz β -podjedinice su locirana u transmembranskom domenu dok se jedan Trp ostatak nalazi u ekstracelularnom delu β -podjedinice [105]. Raspodela Trp ostataka u Na⁺/K⁺-ATPazi je prikazana na Slici 15. 16 Trp u strukturi Na⁺/K⁺-ATPaze je grupisano u nekoliko klastera koji se razlikuju u položaju emisionog maksimuma dajući zbog toga širok emisioni spektar Na⁺/K⁺-ATPaze (oko 59 nm).



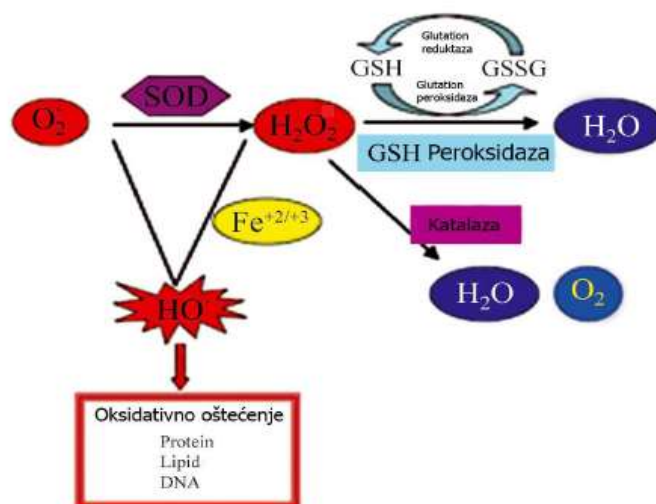
Slika 15. Raspodela Trp u Na⁺/K⁺-ATPazi (PDB kod 4HQJ). (prilagođeno iz Bondžić et al. Na/K-ATPase as a target for anticancer metal based drugs: insights into molecular interactions with selected gold(III) complexes. *Metallomics*, **2017**, 9 (3) 292-300) [53].

Zbog sadržaja velikog broja Trp u enzimu, koji su grupisani u gusto pakovane klasterne [105], usled konformacionih promena enzima može doći do inter-Trp rezonantnog

transfera energije (inter-FRET) [105] koji dovodi do smanjenja intenziteta emisije i pomeranja položaja emisionog maksimuma. Inter FRET u Na^+/K^+ -ATPazi je podeljen u dve podgrupe: homo FRET, do kojeg dolazi kada se indolovi prstenovi Trp nađu na udaljenosti manjoj od 10 Å i hetero FRET do kojeg dolazi na udaljenosti indolovih prstenova do 15 Å. Bitno je naglasiti da se oba, homo- i hetero- FRET, dešavaju između identičnih hemijskih fluorofora (Trp), ali koje se razlikuju po sastavu aminokiselinskog okruženja. Konformacione promene koje dovode do homo-FRET ogledaju se u pomeranju emisionog maksimuma proteina od 1 – 2 nm usled manjih razlika u polarnosti lokalnog Trp-skog okruženja. Za razliku od homo-FRET, konformacione promene koje dovode do hetero-FRET generišu veća pomeranja maksimuma u emisionom spektru zbog veće razlike u polarnosti lokalnog okruženja Trp-skih ostataka koji učestvuju u ovom prenosu energije.

1.6. Toksični efekti slobodnih radikala i antioksidativna zaštita

Oksidativni stres se definiše kao stanje u kome dolazi do disbalansa između slobodnih radikala - reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS/RNS, *reactive oxygen/nitrogen species*, eng.) i antioksidanasa koji imaju ulogu u njihovom „neutralisanju“. Oksidativni stres može da prouzrokuje oštećenja ćelijskih komponenti i biomolekula, kao što su proteini, lipidi, ugljeni hidrati i DNK [106] (Slika 16).



Slika 16. Šematski prikaz stvaranja ROS koji mogu dovesti do ćelijskih oštećenja. (prilagođeno iz Wakamatsu et al. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq. Bras. Oftalmol.*, **2008**, 71,72-79) [107].

U organizmu dolazi do konstantnog stvaranja slobodnih radikala koji u niskim koncentracijama imaju fiziološku ulogu u organizmu koja se ogleda u učestvovanju u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, fagocitozi, aktivaciji leukocita, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, ćelijskom rastu i programiranoj ćelijskoj smrti - apoptozi [108]. Međutim, u situacijama u kojima dolazi do njihovog povećanog stvaranja i/ili neadekvatnog uklanjanja, slobodni radikali ispoljavaju svoj negativni efekat koji dovodi do oštećenja biomolekula (Slika 16) [106].

1.6.1. Toksični efekti slobodnih radikala – lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LP) predstavlja proces oksidativnog oštećenja lipida do kojeg može doći na ćelijskim membranama kao i na membranama subćelijskih organela. Posledica LP je smanjenja fluidnosti membrane, povećana propustljivosti za jedno- i dvovalentne jone, inaktivacija membranskih enzima i gubitak integriteta. Takođe, usled probijanja lizozomskih membrana dolazi do oslobađanja hidrolitičkih enzima, što dovodi do vitalnih ćelijskih poremećaja i na kraju do smrti ćelije [109].

Nastali proizvodi LP imaju dug poluživot, veoma su reaktivni prema biomolekulima, usled čega imaju proinflamatorno, toksično, mutageno i kancerogeno dejstvo [110,111]. Lipidna peroksidacija nezasićenih masnih kiselina se odigrava kroz tri stupnja: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. U procesu inicijacije dolazi do pokretanje lančanih reakcija kada se generišu lipidni radikali (R^\cdot - alkil radikal). Nakon nje sledi propagaciona faza koja podrazumeva reakciju lipidnog radikala (R^\cdot) sa molekularnim kiseonikom (O_2), pri čemu nastaje peroksil radikal (ROO^\cdot). Peroksil radikal je nosilac dalje propagacije lipidne peroksidacije, koji brzo i lako reaguje sa sledećom masnom kiselinom. Lipidna peroksidacija se završava pretvaranjem vodonik peroksida u sekundarne neradikalne molekule – ugljovodonike, aldehide, alkohole i ketone ili stvaranjem polimera. Malondialdehid (MDA) predstavlja marker LP, jer nastaje kao krajnji produkt oksidativnog oštećenja nezasićenih masnih kiselina, a koji se dalje može vezivati za proteine i fosfolipidne membrane [112].

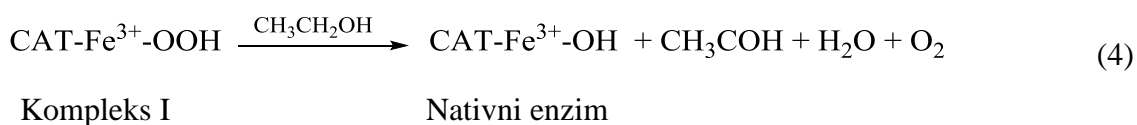
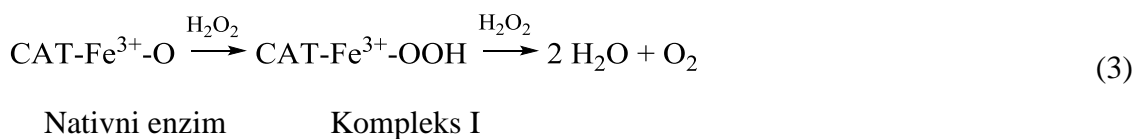
1.6.2. Antioksidativna zaštita

Antioksidativna zaštita predstavlja mehanizam odbrane svih aerobnih organizama u slučajevima prekomernog stvaranje kiseoničnih radikala (O_2^\cdot , H_2O_2 , OH^\cdot i O_2) u metaboličkim procesima [113]. Antioksidanti predstavljaju jedinjenja koja u malim koncentracijama imaju sposobnost da odlože ili inhibiraju oksidaciju drugih materija [114]. Antioksidativni enzimski sistem čine sledeći enzimi: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), kao i enzimi glutation redoks ciklusa u kome centralno mesto zauzima glutation peroksidaza (GPx) [115,116]. S obzirom da je u ovoj tezi merena aktivnost katalaze i glutation peroksidaze u cilju određivanja citotoksičnosti ispitivanih metalnih kompleksa, u tekstu će biti detaljnije opisana ova dva enzima.

1.6.2.1. Katalaza

Katalaza (CAT) je enzim koji svoju antioksidativnu ulogu ostvaruje deaktivacijom H_2O_2 pretvarajući ga u H_2O i O_2 [117]. U slučajevima niskih koncentracija H_2O_2 , uz razlaganje H_2O_2 dolazi i do oksidacije alkohola (ROH) do aldehida. U zavisnosti od

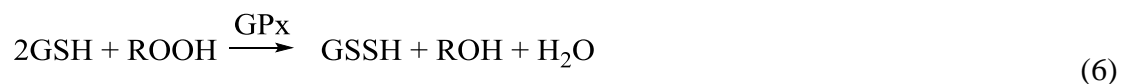
koncentracije supstrata (H_2O_2) odvija se katalazni (3) ili peroksidazni (4) tip reakcije [118]:



Prvi stupanj reakcije je isti za oba procesa i počinje redukcijom vodonik peroksida do H_2O uz obrazovanje kompleksa I (kompleks između CAT i H_2O_2). U drugom stupnju katalaznog procesa donor elektrona je H_2O_2 dok u peroksidaznom procesu donori elektrona mogu biti organska jedinjenja kao što su alkoholi i formaldehid. Pri nižoj koncentraciji H_2O_2 dominantan je peroksidazni tip reakcije dok pri višim koncentracijama H_2O_2 dominira katalazni tip reakcije [118].

1.6.2.2. Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (GPx) je enzim koji katalizuje reakciju razgradnje vodonik peroksida ili organskih hidroperoksida (ROOH) redukcijom u prisustvu redukovanog glutationa (GSH) koji tom prilikom prelazi u oksidovani glutation (GSSH):



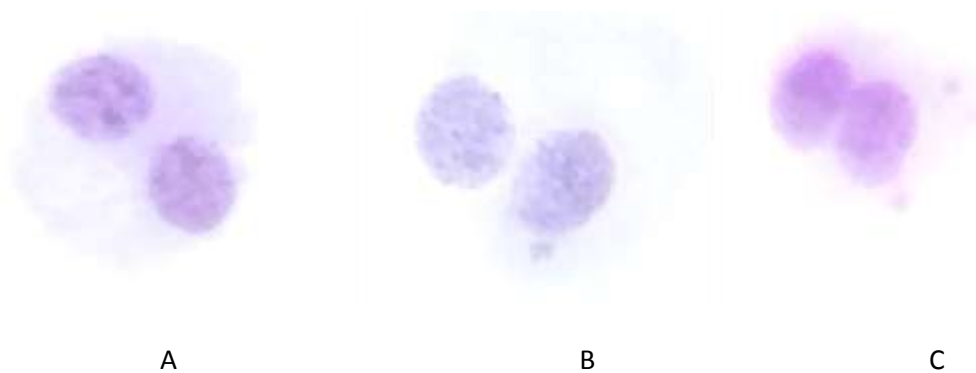
gde je R-alkil grupa. H_2O_2 se ovom prilikom redukuje u H_2O dok se hidroperoksidi redukuju do H_2O i alkohola (ROH). GSH je u ovom procesu donor vodonika i stalno se regeneriše aktivnošću glutation reduktaze (GR):



Kao enzim koji uklanja vodonik peroksid i koji može da deaktivira i lipidne i druge perokside, GPx predstavlja jedan od glavnih zaštitnika ćelije pri niskim koncentracijama ovih slobodnih radikala. GPx ima značajnu ulogu u inhibiciji inicijalnog stadijuma lipidne peroksidacije koja je pokrenuta difuzibilnim H_2O_2 , imajući u vidu činjenicu da razlaže vodonik peroksid koji može u prisustvu metala da inicira proces lipidne peroksidacije. GPx se nalazi u citosolu i mitohondrijama.

1.7. Testiranje genotoksičnosti određivanjem učestalosti mikronukleusa

Parametar citogenetskog oštećenja (pojava hromozomskih aberacija) nastalog u prisustvu ispitivanog jedinjenja je učestalost pojave mikronukleusa. Naime, deobom ćelija koje sadrže strukturne hromozomske aberacije u citoplazmi ćerki ćelija dolazi do formiranja mikronukleusa (strukturne hromozomske aberacije koje egzistiraju odvojeno od glavnog jedra, formirane u citoplazmi ćerki ćelija). Mikronukleusi nastaju tokom metafaze ili anafaze ćelijske deobe, a vode poreklo uglavnom od acentričnih hromozomskih fragmenata ili celih hromozoma koji se tokom mitoze nisu inkorporisali u glavno jedro i unutar ćelije egzistiraju odvojeno od njega [119]. Mikronukleusi su okruglog oblika, istog inteziteta obojenosti i veličine između 1/16 do 1/3 dijametra ćelijskog jedra. Na slici 17 su prikazane mikrografije binukleusnih ćelija bez i sa mikronukleusima.



Slika 17. Mikrografija binukleusnih ćelija: A) bez mikronukleusa; B) sa jednim mikronukleusom; C) sa dva mikronukleusa.

Za analizu mikronukleusa najčešće se koristi citokinezis-blok mikronukleus test (CBMN) [120]. Metodologija citokinezis-blok mikronukleus testa je zasnovana na principu blokiranja citokineze (deobe citoplazme) limfocita periferne krvi *in vitro* upotrebom citohalazina B kao aktinskog inhibitora, bez remećenja biohemijskih procesa unutar ćelije, nakon čega se u ćelijama koje su prošle kroz jednu deobu formiraju mikronukleusi (prepoznaju se po binuklearnom izgledu – binukleusne ćelije).

CBMN testom može se analizirati nekoliko hiljada ćelija, što ovu metodu čini preciznom i statistički pouzdanom. Ovaj test se može koristiti i za proučavanje mitotičkog statusa, vijabilnog statusa i hromozomske nestabilnosti uzrokovane egzogenim genotoksinima, kao i genetičkim defektima, što ga danas čini jednim od najsvestranijih citogenetičkih testova [121].

CBMN test takođe omogućava procenu genotoksičnosti i citotoksičnosti na osnovu izračunavanja proliferativnog potencijala vijabilnih ćelija (citokinezis-blok proliferativni indeks – CBPI), koji je indikator citotoksičnih efekata ispitivanih agenasa i mitogenog odgovora kao važnog biomarkera imunološke funkcije limfocita [122].

2. CILJ

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje interakcija na molekulskom nivou izabranih kompleksa zlata(III) sa Na^+/K^+ -ATPazom i izabranih poliooksovolframata sa acetilholinesterazom (AChE), enzimima koji predstavljaju potencijalne mete u antitumorskoj i terapiji Alchajmerove bolesti, redom. U tu svrhu korišćene su različite fizičkohemijske metode u kombinaciji sa teorijskim modelovanjem, kako bi se dobila temeljna studija ovih interakcija. Prvo je ispitana stabilnost datih jedinjenja pri fiziološkim uslovima, određen je njihov lipofilni karakter i urađena je njihova teorijska karakterizacija sa ciljem dobijanja vrednosti dipolnog momenta, površine i zapremine datih jedinjenja. Dalje, ispitan je inhibitorski potencijal ovih jedinjenja ka odabranim enzimima, a određen je mehanizam inhibicije, odnosno način vezivanja inhibitora za enzim u odnosu na supstrat, određene su vrednosti konstante inhibicije i IC_{50} vrednosti. U cilju daljeg rasvetljavanja prirode interakcije izabranih jedinjenja sa Na^+/K^+ -ATPazom i AChE, tehnikama cirkularnog dihroizma i fluorescentne spektroskopije su praćene konformacione promene u enzimima nastale usled vezivanja inhibitora. Izračunat je stehiometrijski odnos vezivanja inhibitora za enzim, konstanta vezivanja, konstanta gašenja fluorescencije enzima i procenat triptofana (Trp) u enzimu izložen inhibitoru. U cilju praćenja promena u oksidacionom stanju metalnog jona polioksometalata korišćena je tehnika elektronske paramagnetne rezonancije. Jedan od ciljeva je bio i predlaganje potencijalnih mesta vezivanja pomenutih inhibitora za enzim, kombinovanjem rezultata eksperimentalnih metoda i teorijskih proračuna. Na kraju, još jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bio *in vitro* ispitivanje toksičnih potencijala odabranih kompleksa zlata i poliooksovolframata, određivanjem njihovih prooksidativnih svojstava, citotoksičnih i genotoksičnih efekata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Hemikalije

3.1.1. Kompleksi zlata(III) i polioksometalati

Kompleksi zlata(III), $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2$ ($[\text{Au}(\text{OH})_2(\text{bipy})][\text{PF}_6]$), gde je bipy = 2,2'-bipiridin); $\text{Au}(\text{py})(\text{OAc})_2$ ($[\text{Au}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{pydmb-H})]$), gde je pydmb-H=deprotovani 6-(1,1-dimetilbenzil)-piridin); $\text{Au}(\text{bipyC})(\text{OH})$ ($[\text{Au}(\text{bipydmb-H})(\text{OH})][\text{PF}_6]$), gde je bipydmb-H = deprotovani 6-(1,1-dimetilbenzil)-2,2'-bipiridin); $\text{Au}_2(\text{bipyC})$ ($[\text{Au}_2[(\text{bipydmb-H})_2(\mu\text{-O})][\text{PF}_6]_2]$); $\text{Au}_2(\text{bipy}^{2\text{Me}})$ ($[(\text{bipy}^{2\text{Me}})_2\text{Au}_2(\mu\text{-O})_2][\text{PF}_6]_2$) gde je $\text{bipy}^{2\text{Me}}$ = 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridin) i $\text{Au}_2(\text{phen})$ ($[\text{Au}_2(\text{phen}^{2\text{Me}})_2(\mu\text{-O})_2][\text{PF}_6]_2$) gde je $\text{phen}^{2\text{Me}}$ = 6,6'-dimetil-1,10-phenanthroline) su sintetisani u laboratoriji profesora dr Luigi Messori-ja sa Departmenta za hemiju, Univerziteta u Firenci, Italija. 12-volframsilicijumova kiselina i 12-volframfosforna kiselina su dobijeni od Sigma Chemicals Co. (Nemačka).

3.1.2. Enzimi

Na^+/K^+ -ATPaza iz cerebralnog korteksa svinje (specifična aktivnost 0,1 IU/mg čvrste supstance), acetilholinesteraza (AChE), iz električne jegulje (specifična aktivnost 288 IU/mg čvrste supstance, 408 IU/mg proteina), glutation reduktaza (GR) iz pekarskog kvasca (*Sacharomyces cerevisiae*) (205 units/mg proteina, 2,2 mg proteina/ml) su dobijeni od Sigma Chemicals Co. (Nemačka).

3.1.3. Hemikalije za ispitivanje genotoksičnosti i citotoksičnosti

PB-max karyotyping medijum je dobijen od Invitrogen-Gibco (Velika Britanija). Metanol i sirćetna kiselina su dobijeni od VWR (Nemačka). Citohalazin B i Gimzasu su dobijeni od Sigma Chemicals Co. (Nemačka).

3.1.4. Ostale hemikalije

Adenozin-trifosfat (ATP), acetilthioholin-jodid (ASChI), 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB), redukovani glutation (GSH), etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina (EDTA), redukovani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), tiobarbiturna kiselina, goveđi serum albumin (BSA), glicerol, sumporna kiselina, amonijum-molibdata $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O})$, n-oktanol, n-butanol i dimetilsulfoksid (DMSO) su dobijeni od Sigma Chemicals Co. (Nemačka). Magnezijum-hlorid, tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS, natrijum-hlorid, kalijum-hlorid, kalaj-hlorid, kalijum-hidrogen-fosfat, natrijum-piruvat, amonijum-molibdat, natrijum-dodecil-sulfat (SDS), natrijum-dihidrogen-fosfat, natrijum-karbonat, natrijum-kalijum-tartarat, bakar(II)-sulfat, *Folin* i *Ciocalteu's* fenol reagens, natrijum-piruvat, triton X, vodonik-peroksid (30%), saharoza, natrijum-hidroksid, hlorovodonična kiselina, perhlorna kiselina, acetonitril su dobijeni od Merck (Nemačka). Za pripremu vodenih rastvora korišćena je dejonizovana voda.

3.2. Metode

3.2.1. UV/Vis spektrofotometrija

Spektrofotometrijska merenja su rađena na UV/Vis Perkin Elmer Lambda 35 spektrofotometru, u kvarcnoj staklenoj kiveti sa svetlosnim putem 1 cm.

3.2.2. Centrifugiranje

Za centrifugiranje je korišćena centrifuga minispin plus (Eppendorf, Nemačka), centrifuga 5702 (Eppendorf, Nemačka), Sorvall centrifuga (FisherScientific, SAD) i ultracentrifuga Beckman L7-55 (SAD). Centrifugiranje se primenjivalo kod izolovanja sinaptozoma iz mozga pacova i pripreme limfocita iz humane krvi.

3.2.3. Mikroskopija

Za mikroskopska merenja je korišćen mikroskop sa uvećanjem 400× ili 1000× (AxioImager A1, Carl Zeiss, Nemačka), koja su neophodna za određivanje učestalosti mikronukleusa u kultivisanim limfocitima.

3.2.4. Cirkularni dihroizam

CD spektri su snimani na Jasco 1500 spektrofotopolarimetru sa Peltier-ovim termostatičkim sistemom pod konstantnim protokom N₂, na 37 °C, u kvarcnim kivetama optičkog puta 0,1 cm. CD spektar svakog uzorka je sniman tri puta, sa brzinom skeniranja od 10 nm/min, u opsegu talasnih dužina od 200-260 nm. Kao bazna linija korišćen je rastvor pufera. Koncentracija enzima je držana konstantnom, dok je koncentracija inhibitora povećavana u jednakim inkrementima. Inkubaciono vreme je bilo 5 min.

3.2.5. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentna merenja su urađena na instrumentu Photon Technology Quanta Master QM-6/2005 spektrofluorimetru, koristeći kvarcne kivete optičkog puta 1 cm. Spektri su snimani u puferovanim rastvorima proteina, na sobnoj temperaturi, prateći emisiju zračenja od 315 nm do 450 nm. Talasna dužina ekscitacije je bila 295 nm, kako bi se izbegla ekscitacija tirozinskih ostataka u enzimu.

3.2.6. Elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija

9.4 GHz (X bend) EPR spektri polioksovolframata su snimljeni na Bruker Elexsys-II EPR spektrometru sa Oxford Instruments ESR900 helijumskim kriostatom na 100 K. Parametri snimanja su bili: mikrotalasna snaga 3,2 mW, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 10 G. Uzorci su snimani u kvarcnim kivetama (Wilmad-Lab Glass, USA). Spektri su analizirani korišćenjem Bruker Xepr software-a.

3.2.7. Ostala laboratorijska oprema

Analitička vaga Mettler i tehnička vaga Mettler su korišćene za odmeravanje. Za mešanje uzorka pri konstantnoj temperaturi korišćena je mehanička mešalica Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-bio dok je u ostalim slučajevima korišćena magnetna mešalica VELP scientific. Za merenje pH vrednosti rastvora korišćen je pH metar Metrohm 713 sa kombinovanom elektrodom, a za homogenizovanje tkiva homogenizer ručno izrađen na Institutu za hemiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

3.3. Priprema rastvora kompleksa zlata(III) i poliooksovolframata

Kao osnovni rastvori kompleksa zlata(III) korišćeni su rastvori u DMSO koncentracije 1×10^{-2} M koji su nakon pripreme čuvani u zamrzivaču na -20 °C. Radni rastvori su pripremani razblaživanjem osnovnih rastvora vodom do željenih koncentracija. Osnovni rastvori poliooksovolframata koncentracije 1×10^{-2} M su pripremani u vodi neposredno pre eksperimenta i razblaživani do željene koncentracije.

3.4. Priprema rastvora enzima

U svim eksperimentima su korišćeni sveže pripremljeni osnovni rastvori enzima u odgovarajućem puferu. Osnovni rastvor Na^+/K^+ -ATPaze je rastvor preparata u 50 mM TRIS-u, pH 7,4, koncentracije 5mg/ml. Procenat Na^+/K^+ -ATPaze u preparatu je prema specifikaciji proizvođača bio 14,4 %. Za izračunavanje molarne koncentracije Na^+/K^+ -ATPaze je korišćena molekulska masa $\alpha\beta$ monomera od 156626,89 Da dobijena na osnovu aminokiselinske sekvence iz 4HQJ strukture u PDBu. Za komercijalne preparate uz koje nije dobijena specifikacija proizvoda, koncentracija Na^+/K^+ -ATPaze je određena koristeći Markweel-ovu [123] metodu koja predstavlja modifikovanu Lowry metodu [124]. Za fluorescentna merenja bilo je neophodno dovesti Na^+/K^+ -ATPazu u stanja analogna E1 ili E2P konformacijama, što je postignuto dodavanjem 1 M rastvora NaCl ili KCl u enzimski rastvor do finalne koncentracije od 100 mM, redom [125]. Osnovni rastvor AChE u fosfatnom puferu, pH 8, specifične aktivnosti 2 IU/mg preparata je korišćen za enzimski test i fluorescentna merenja. Prema specifikaciji proizvođača

preparat AChE je sadržao 63 % čistog enzima. Koncentracija AChE u osnovnom rastvoru je dobijena koristeći molekulsku masu jednog $\alpha\beta$ monomera, 70000 Da dobijenu na osnovu aminokiselinske sekvence 1C2B iz PDB stukture.

3.5. Određivanje particionog koeficijenta

Vrednosti particionog koeficijenta, odnosno njegovog logaritma, određene su tzv. *shake-flask* metodom (metodom mućkanja u bočici) korišćenjem standardnog dvofaznog sistema n-oktanol/dejonizovana voda i merenjem apsorpcije na maksimumu apsorpcije u vodenoj fazi kako bi se odredila koncentracija ispitivanog jedinjenja u njoj [126]. Smeša voda/n-oktanol u zapreminskom odnosu 50:50, je mešana 24 h na 25° C na 250 rpm kako bi se rastvori saturisali. 60 μL osnovnog rastvora kompleksa zlata(III) koncentracije 1×10^{-2} M u DMSO je dodato prethodno saturisanoj smeši voda/n-oktanol pri čemu su finalne koncentracije kompleksa bile 1×10^{-4} M. Osnovni rastvori POM koncentracija 1×10^{-2} M su pravljani u vodi i 60 μL ovih rastvora je dodato u 6 ml saturisane smeše voda/n-oktanol kako bi njihova finalna koncentracija bila 1×10^{-4} M.

Dobijeni rastvori su bili mešani koristeći mehaničku mešalicu na 25 °C, 30 min na 250 rpm, zatim su bili centrifugirani na 3000 rpm 20 min kako bi bila omogućena potpuna separacija faza. Nakon toga merena je apsorpcija na maksimumu apsorpcije (λ_{max}) u vodenoj i organskoj fazi za svako od ispitivanih jedinjenja. Koncentracija ispitivanih jedinjenja je određena iz standardne prave, odnosno linearne zavisnosti $A_{\lambda_{\text{max}}}$ od koncentracije ispitivanog jedinjenja (Prilog Slike P1 i P2).

Logaritam vrednosti particionog koeficijenta ($\log P$) je izračunat prema jednačini (7):

$$\log P = \log \left(\frac{y-x}{x} \frac{V_{\text{voda}}}{V_{\text{oktnol}}} \right) \quad (7)$$

gde je P particioni koeficijent, y koncentracija ispitivanog jedinjenja u smeši n-oktanol/voda (1×10^{-4} M), x koncentracija ispitivanog jedinjenja u vodi, V_{voda} zapremina vodene faze i V_{oktnol} zapremina organske faze.

3.6. Izolovanje sinaptozoma iz mozga pacova

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar albino* starosti 90 dana, težine 300-350gr. Životinje su gajene u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura od 22 °C i veštačko osvetljenje od 7-19 h) i imale su slobodan pristup hrani i vodi. Eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa Etičkim komitetom za korišćenje laboratorijskih životinja Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, koji prati upustva registrovanog „Srpskog društva za korišćenje životinja u istraživanju i obrazovanju“ dozvola broj 323-07-04610/2016-05. U jutarnjim časovima pacovima je intraperitonealno injektiranja anestezija ketamin/ksilazin (100/5 mg/kg) i transkardijalno perfundovana krv fiziološkim rastvorom, nakon čega su žrtvovani dekapitovanjem pomoću giljotine (Hardvard Apparatus). Celi mozgovi su odmah nakon toga izvađeni i isprani (10 ml hladne puferisane 0,32 M saharoze, pH 7,4) a zatim i homogenizovani u 10 ml hladne puferisane 0,32 M saharoze, pH 7,4 pomoću staklenog homogenizera sa teflonskim klipom. Brzina homogenizacije je bila 900 rpm, sa dvadeset zaveslaja tučkom. Sve faze izolovanja sinaptozoma rađene su na ledu (4 °C). Tkivo je nakon homogenizacije centrifugirano na 1000×g u centrifugi Sorvall, čime su staložena jedra. Dobijeni supernatant je odliven i ostavljen na ledu dok se talog morao isprati još nekoliko puta sa 10 ml hladne puferisane 0,32 M saharoze i centrifugirati na isti način. Nakon svakog završenog centrifugiranja, supernatant se odlivao i spajao sa ranije dobijenim supernatatom. Spojeni supernatanti, koji sadrže sinaptozome (presinaptičke nervne završetke), su zatim bili centrifugirani 20 minuta na 10000×g (ultracentrifuga) na 4 °C. Talog dobijen na ovaj način predstavlja neprečišćenu sinaptozomalnu frakciju u kojoj se nalaze sinaptozomi, mitohondrije i membranski fragmenti [127,128].

Talog neprečišćenih sinaptozoma je resuspendovan u 3 ml puferisane 0,32 M saharoze i tretiran odgovarajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja tokom 1,5 h na 37 °C. Neposredno nakon tretmana, određivana je aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) u uzorcima sinaptozoma, dok je ostatak tretiranih i netretiranih suspenzija (kontrola) čuvano na temperaturi od -70 °C za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima, sadržaja malondialdehida i koncentracije proteina.

3.7. Kulture limfocita

Uzorak krvi je dobijen od zdravog donora, starosti 35 godina, nepušača u zdravstvenoj ustanovi u skladu sa važećim medicinskim i etičkim regulativama Republike Srbije [129]. Krv je uzeta venepunkcijom, u vakutanere sa heparinom kao antikoagulansom. Alikvoti od 0,5 ml heparinizirane krvi su zasađeni u 4,5 ml hranljivog medijuma za kulturu ćelija (*PB-max karyotyping medium*). Postavljeni su setovi ćelijskih kultura u koje su dodate odgovarajuće zapremine ispitivanih jedinjenja (kompleksa Auoxo6, Au₂phen, AubipyC, WSiA i WPA) kako bi se postigle odgovarajuće finalne koncentracije. Sve kulture limfocita postavljene su u triplikatu. Netretirani uzorci služili su kao kontrola.

3.8. Enzimski testovi

3.8.1. Ispitivanje Na⁺/K⁺-ATPaze

3.8.1.1. Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze

Aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze je određena po modifikovanoj metodi autora Seals i saradnika [130], praćenjem promene koncentracije ortofosfata koji se oslobađa tokom enzimske hidrolize ATP. U 50 µl inkubacione smeše, koja sadrži 50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl i 20 mM KCl je dodano 50 µl komercijalnog enzimskog preparata koncentracije 5 mg/ml i 50 µl rastvora ispitivanog kompleksa Au(III) odgovarajuće koncentracije. Smeša je preinkubirana 10 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi od 37 °C, nakon čega je dodano 20 µl 20 mM ATP kako bi se započela enzimska reakcija. Nakon isteka vremena inkubacije (10 minuta), takođe na 37 °C, reakcija je zaustavljena dodavanjem 22 µl 3 M hladne perhlorne kiseline i držanjem na ledu. U slepoj probi inkubaciona smeša nije sadržala Mg²⁺, Na⁺ i K⁺ jone, već samo enzim u TRIS puferu, pH 7,4. Finalna zapremina reakcione smeše je iznosila 200 µl, i postizana je dodavanjem odgovarajuće zapremine dejonizovane vode. U reakcionu smešu, koja sadrži ortofosfat i ADP, koji su oslobođeni tokom hidrolize ATP katalitičkim delovanjem Na⁺/K⁺-ATPaze, dodato je 4,5 ml vode.

Koncentracija oslobođenog ortofosfata određena je bojenom reakcijom koristeći 200 μ l 0,2 M amonijum-molibdata ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4 H₂O) u 30 % sumpornoj kiselini i dve kapi 2,5 % rastvora SnCl₂ u glicerolu. Aktivnost ATPaze je proporcionalna apsorbanciji formiranog rastvora plave boje, koja je merena na 690 nm. Aktivnost enzima je izražena kao relativna enzimaska aktivnost (REA), koja predstavlja procenat preostale aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u odnosu na aktivnost bez dodatog inhibitora (kontrolne vrednosti).

3.8.1.2. Kinetičke studije

Kinetička merenja su izvedena po modifikovanoj *Philips* metodi [131] koristeći komercijalni enzim. Eksperimentalno su merene početne brzine enzimski katalizovane reakcije hidrolize ATP do neorganskog fosfata u istom inkubacionom medijumu u funkciji različitih koncentracija (0,1 – 5 mM) supstrata (ATP). Merenja su urađena u odsustvu (kontrola) i prisustvu kompleksa zlata(III). Odabrane koncentracije kompleksa bile su bliske prethodno određenim IC₅₀ vrednostima za dati kompleks. Vreme inkubacije je bilo 2 minuta. Vrednosti maksimalne brzine (V_m) i *Michaelis Menten*-ove konstante (K_m) su određene linearnim fitom eksperimentalnih tačaka na *Lineweaver–Burk*-ovom grafiku i izražene kao μ molPi/h/mg proteina i mM, redom. Koncentracija oslobođenog fosfata određena je iz standardne prave za fosfate (Slika P3).

3.8.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze

Aktivnost AChE je merena modifikovanom *Ellman*-ovom metodom [132], 10 μ l komercijalnog enzimskog preparata (2 IU/ml) je dodano u 50 mM fosfatnog pufera, pH 8. Enzim je inkubiran sa različitim koncentracijama ispitivanih polioksometalata tokom 10 minuta na 37 °C. Enzimaska reakcija je startovala dodatkom supstrata, 10 μ l 0,075 M acetiltioholin-jododa (ASChI) u kombinaciji sa reagensom za bojenje, 20 μ l 0,1 mM DTNB. Proizvod enzimske reakcije, tioholin-jodid i DTNB daju jedinjenje žute boje, 5-tio-2-nitrobenzoevu kiselinu, čije je nastajanje praćeno spektrofotometrijski na 412 nm. Enzimaska reakcija je zaustavljena sa 50 μ l 0,01 M SDS. Vreme inkubacije na 37 °C, odnosno enzimske reakcije, je bilo 12 minuta (vizuelno je praćeno nastajanje žute boje) u zavisnosti od aktivnosti enzima u ispitivanom uzorku. Ukupna zapremina reakcione

smeše je bila 700 μ l. Slepa proba nije sadržavala enzim. Aktivnost AChE je izražena kao relativna enzimska aktivnost (REA), koja predstavlja procenat preostale aktivnosti AChE u odnosu na aktivnost bez dodatog inhibitora. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3.8.3. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) je merena esejom koji prati degradaciju H_2O_2 [133]. 50 μ l suspenzije sinaptozoma je dodato u kvarcnu staklenu kivetu na sobnoj temperaturi, koja je sadržavala 2,97 ml 50 mM fosfatnog pufera u 0,4 mM EDTA. Dodatak 30 μ l 3 % H_2O_2 u reakcionu smešu je predstavljao početak enzimske reakcije. Praćena je promena, odnosno smanjenje vrednosti apsorbancije, usled enzimske degradacije H_2O_2 , na 240 nm tokom 3 – 5 minuta. Aktivnost katalaze je izražena kao % aktivnosti katalaze u odnosu na aktivnost netretiranog uzorka (kontrola). Aktivnost kontrolnog uzorka je 100%.

3.8.4. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze

Za merenje aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx) bilo je potrebno najpre pripremiti reakcionu smešu koja je sadržavala: 8,9 ml fosfatnog pufera, pH 7 (50 mM NaH_2PO_4 + 0,40 mM EDTA), 50 μ l 200 mM GSH, 1 mg β -NADPH i 100 μ l 100 jedinica/ml glutacion reduktaze iz pekarskog kvasca (*Sacharomyces cerevisiae*). U kvarcnu staklenu kivetu (sobna temperatura) je dodato 3 ml reakcione smeše i 0,3 ml uzorka sinaptozoma. Kiveta je smeštena u spektrofotometar, a zatim je započeta enzimska reakcija dodatkom 50 μ l 0,042 % H_2O_2 ($A_{240} = 0,52 - 0,56$). Pad vrednosti apsorbancije je praćen ($\lambda = 340$ nm) sa vremenom oko 5 min tj. do prestanka promene. Aktivnost GPx je izražena kao % aktivnosti enzima u odnosu na aktivnost netretiranog uzorka (kontrola). Aktivnost kontrolnog uzorka se uzima da je 100 % [134].

3.8.5. Određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze

Promena aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) je merena praćenjem smanjenja apsorbanције na 340 nm. U reakcionu smešu koja je sadržavala: 2,8 ml 0,2 M pufera TRIS-HCl, pH 7,3, 0,1 ml 6,6 mM NADH u istom puferu i 0,1 ml 30 mM natrijum-piruvata je dodato 0,1 ml uzorka sinaptozoma. Odmah nakon dodavanja uzorka, merena je promena apsorbancije uzorka na 340 nm tokom 4 – 5 minuta, odnosno do stabilizacije njene vrednosti. Jedan od uzoraka sinaptozoma je tretiran sa 0,1% rastvorom tritona X (finalna koncentracija) koji razara ćelijske membrane. Vrednost aktivnosti LDH u prisustvu tritona X je uzeta kao maksimalna i predstavlja referentnu vrednost (100 %) sa kojom je poređena aktivnost enzima izmerena u analiziranim uzorcima sinaptozoma. Aktivnost LDH je izražena kao % aktivnosti LDH u odnosu na aktivnost uzorka tretiranog 0,1% rastvorom tritona X [135].

3.8.6. Određivanje sadržaja malondialdehida

Sadržaj malondialdehida (MDA) u uzorcima sinaptozoma je određen korišćenjem tiobarbiturnog eseja [136]. U 500 μ l uzorka je dodato 500 μ l 25 % HCl i 500 μ l 1 % tiobarbiturne kiseline u 50 mM NaOH. Smeša je zagrevana 10 minuta u ključalom vodenom kupatilu, a zatim ohlađena do sobne temperature. Ekstrakcija je rađena dodatkom 3 ml 1-butanola dodatkom u svaki od uzoraka i snažnim mućkanjem na vorteksu u toku 30 s. Kako bi se odvojile organska od vodene faze, uzorci su bili centrifugirani 10 minuta na 2000 \times g u centrifugi Sorvall. Spektrofotometrijskim merenjem apsorbancije organske faze (gornji sloj) na 532 nm je određen sadržaj MDA. Slepe probe su sadržavale 50 mM NaOH umesto tiobarbiturne kiseline, i pripremane se za svaki uzorak posebno. Vrednosti sadržaja MDA su izražene kao nmol MDA / mg proteina, a određene na osnovu izmerene vrednosti apsorbancije i molarnog apsorpcionog koeficijenta formiranog kompleksa MDA-tiobarbiturna kiselina.

3.9. Ispitivanje genotoksičnosti

3.9.1. Citokinezis-blok mikronukleusni test

Za određivanje učestalosti mikronukleusa u ljudskim limfocitima rađen je citokinezis-blok mikronukleusni test (CB MN test) [120]. Kulture limfocita su gajene 72 h na 37 °C, od čega poslednjih 28 h u prisustvu citohalazina B finalne koncentracije 4 µg/mL. Nakon toga ćelije su isprane blagim hipotoničnim rastvorom (0.56 % KCl : 0.9 % NaCl, 1:1), a zatim fiksirane u *McCarnoy* fiksativu (metanol: glacijalna sirćetna kiselina, 3:1) 3-4 puta. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min na 1800 rpm, a supernatant aspiriran. Preparati su pravljani nakapavanjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Na vazduhu osušeni preparati su obojeni 2%-tnim rastvorom alkalne Gimze. Analizirano je najmanje 1000 binukleusnih ćelija, tj. ćelija koje su prošle deobu, po uzorku upotrebom AxioImager A1 mikroskopa na uveličanju 400× ili 1000×, kako bi se procenio procenat ćelija sa mikronukleusima. Učestalost mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija je izračunata na osnovu određenog broja mikronukleusa u binukleusnim ćelijama.

3.9.2. Citokinezis-blok proliferativni indeks

Proliferativni potencijal ćelija *in vitro* procenjen je izračunavanjem citokinezis-blok proliferativnog indeksa (CBPI) [122]. CBPI je izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{CBPI} = \text{MI} + 2\text{MII} + 3[\text{MIII} + \text{MIV}] / \text{N} \quad (8)$$

gde MI – MIV predstavljaju broj ćelija sa jednim, dva, tri, odnosno četiri jedra, a N predstavlja ukupan broj prebrojanih ćelija.

Za određivanje CBPI korišćeni su isti preparati na kojima je izvršena analiza mikronukleusa, upotrebom AxioImager A1 mikroskopa na uveličanju 400×.

3.10. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina korišćena je *Markweel*-ova metoda [123] koja predstavlja modifikovanu *Lowry* metodu [124] adaptiranu za analizu membranskih proteina bez prethodne solubilizacije i ekstrakcije lipida, kao i za analizu uzoraka koji sadrže saharozu i EDTA.

Za određivanje koncentracije proteina u 890 μ l vode je dodato 10 μ l ispitivanog uzorka. Slepa proba je umesto uzorka sadržavala vodu. U sve uzorke je nakon toga dodavan 0,1 ml 1 M NaOH i rastvori su nakon toga ostavljeni na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon isteka ovog vremena dodato je 2 ml reagensa koji sadrži 4% CuSO_4 i smešu 2% Na_2CO_3 , 0,16% Na,K-tartarata ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$) i 1% SDS, u odnosu 1:100. Posle 15 minuta u ispitivane uzorke je dodato 0,3 ml *Folin & Ciocalteu* reagensa, prethodno razblaženog sa vodom u odnosu 1:1, nakon čega su rastvori ostavljeni na sobnoj temperaturi kako bi se razvila zelena boja. Apsorbancija rastvora je merena nakon 40 minuta na 750 nm. Koncentracija proteina se očitava iz standardne prave, na osnovu vrednosti izmerene apsorbancije. Standardna prava predstavlja linearnu zavisnost izmerenih apsorbancija na 750 nm od poznatih koncentracija proteina goveđeg serum albumina (BSA) (Prilog Slika P4).

3.11. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada je urađena za eksperimente koji su se odnosili na određivanje genotoksičnosti. Svi eksperimenti su rađeni u triplicatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri merenja, koja predstavlja aritmetičku sredinu vrednosti pojedinačnih merenja. Odstupanja od srednje vrednosti su predstavljena kao standardne devijacije srednje vrednosti (\pm S.E.M.). Za statističku obradu vrednosti učestalosti mikronukleusa u binukleusnim ćelijama i indeksa ćelijske proliferacije u tretiranim kulturama ćelija korišćeni su Studentov t-test i Produkt-Moment i parcijalne korelacije, softverski paket Statistics, verzija 6 Microsoft Windows. Vrednosti $p < 0,05$ su smatrane značajnim.

3.12. Teorijski proračuni (molekulsko modelovanje)

Optimizacija geometrije ispitivanih kompleksa zlata(III), adenzinotrifosfata (ATP), WSiA i WPA je urađena *wb97xd* metodom, uz korišćenje *def2-TZVP* bazisa za sve atome, a za zlato i volfram je korišćen i pseudo-potencijal. Vibracione frekvencije su izračunate na istom nivou teorije za sve optimizovane strukture, kako bi se potvrdila priroda određenih minimuma. Imaginarne frekvencije nisu nađene, što znači da struktura predstavlja minimum. Za kvantno-hemijske proračune je korišćen *Gaussian09* program [137].

Za potrebe molekulskog modelovanja, kristalne strukture Na^+/K^+ -ATPaze (PDB kodovi 4HQJ i 2ZXE) i kristalna struktura AChE (PDB kod 1C2B) su preuzete iz proteinske baze podataka (PDB, *Protein Data Bank, eng.*). Molekuli vode, zajedno sa svim drugim ligandima, su uklonjeni iz strukture, a dobijene strukture proteina su korišćene kao model sistem za enzime. Optimizovane strukture ispitivanih jedinjenja i strukture proteina su pripremljene za molekulsko modelovanje u *AutoDockTools* programu, dok su kalkulacije rađene u *AutoDock* programu [138,139]. Sistem je podešen tako da su svi proteinski ostaci rigidni dok su neke jednostruke veze podešene da budu rotabilne. Molekulsko modelovanje je urađeno na samo jednoj kutiji (prostoru određenih dimenzija), u kojoj se može smestiti ceo ispitivani protein, a u kojoj je smešten i ligand, s tom razlikom što ligand ima slobodu kretanja za vreme molekulskog modelovanja.

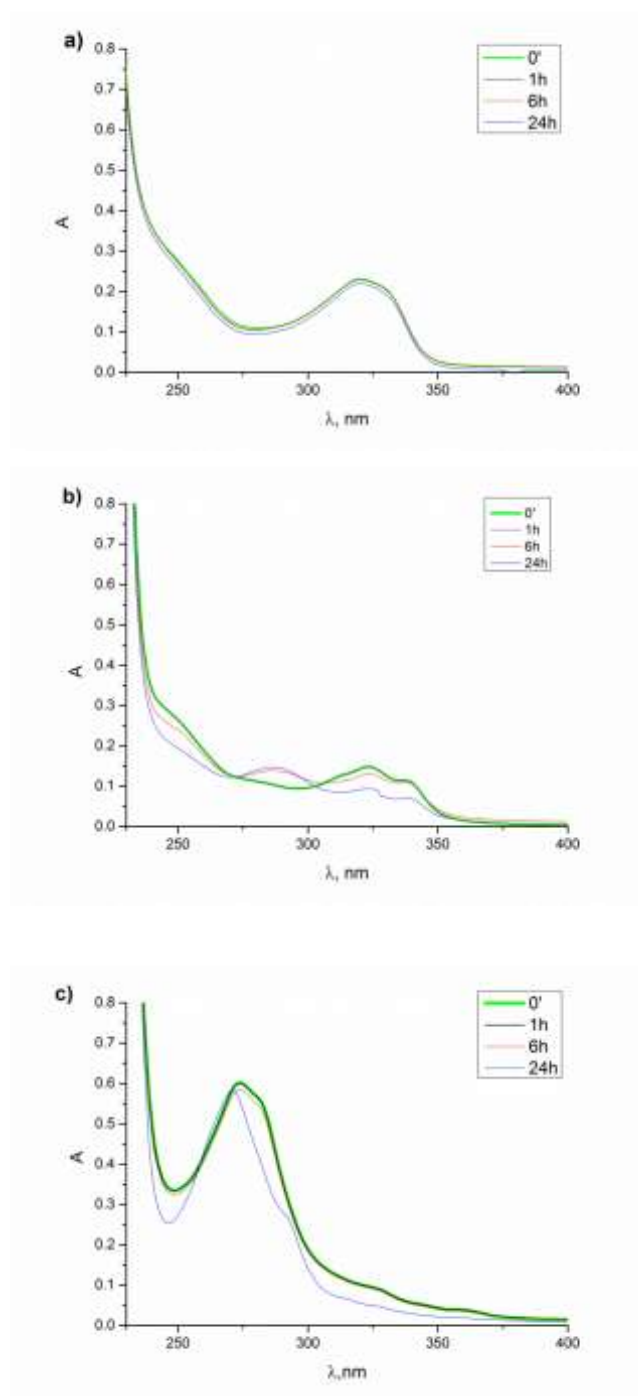
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Interakcija kompleksa zlata(III) sa Na⁺/K⁺-ATPazom

Kompleksi zlata pokazuju značajne antiproliferativne efekte ka tumorskim ćelijskim linijama na koje je cisplatin rezistentan [35]. Jedan od mehanizama kojim ovi kompleksi zlata(III) ostvaruju svoj antiproliferativni efekat je inhibicija aktivnosti enzima bogatih cisteinskim ostacima, kao što su tioredoksinreduktaza [140,141], glutationtransferaza [142] cistein proteaza [143] i Na⁺/K⁺-ATPaza [69,70]. Imajući u vidu ovu činjenicu, interakcija između kompleksa zlata(III) i Na⁺/K⁺-ATPaza kao njihove potencijalne mete je ispitana detaljnije koristeći različite spektroskopske metode u kombinaciji sa molekulskim modelovanjem.

4.1.1. Stabilnost kompleksa zlata(III) na pH 7,4

Strukture ispitivanih kompleksa zlata(III) korišćenih u ovoj studiji prikazane su na Slici 2 u Poglavlju 1.1.1. Stabilnost binuklearnih kompleksa u rastvoru koji sadrži 50 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 20 mM KCl i 5 mM MgCl₂ je praćena snimanjem UV/VIS spektara u toku vremenskog perioda od 24 h na temperaturi od 25°C. Dobijeni apsorpcioni spektri binuklearnih kompleksa su prikazani na Slici 18.



Slika 18. Apsorpcioni spektri 1×10^{-5} M Au₂bipyC (a); Auoxo₆ (b) i Au₂phen (c) u rastvoru 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 20 mM KCl i 5 mM MgCl₂ snimani u toku 24 h.

Sa Slike 18a se može videti da se apsorpcioni spektar kompleksa Au₂bipyC ne menja sa vremenom, što ukazuje da je ovaj kompleks stabilan u dužem vremenskom periodu. U apsorpcionim spektrima kompleksa Auoxo₆ (Slika 18b) i Au₂phen (Slika 18c) mogu se

uočiti spektralne promene nakon 6 h. Za Auoxo6 (Slika 18b) je primećeno smanjenje intenziteta apsorpcionog maksimuma na 323 nm i 339 nm, i pojava novog maksimuma na 287 nm posle 1 h. Kod kompleksa Au₂phen je evidentno da apsorpcioni maksimum na 274 nm i rame na 282 nm podležu hipsokromnom i batohromnom pomeranju, redom. Ove promene u apsorpcionim spektrima ispitivanih binuklearnih kompleksa ukazuju na vremenski zavisnu hemijsku transformaciju kompleksa pri fiziološkim uslovima. U ispitivanim uslovima dolazi do redukcije Au(III) do Au(I), koja vodi do cepanja okso mosta uz istovremeno otpuštanje liganda [43,144]. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su binuklearni kompleksi stabilni u intervalu do 6 h, što je dovoljno za ispitivanje njihovog uticaja na odabrani enzim. Ispitivanje stabilnosti mononuklearnih kompleksa je pokazalo da su i oni stabilni pri fiziološkim uslovima u toku 72 h [70].

4.1.2. Particioni koeficijent kompleksa zlata(III)

Lipofilnost nekog jedinjenja, koja se izražava kao logaritam particionog koeficijenta (logP) je osobina koja utiče na važne fiziološke osobine datog jedinjenja, kao što su transport kroz membranu kao i na njegovu interakciju sa određenim vezivnim mestima na biomolekulima.

Logaritam particionog koeficijenta je određen za svih šest kompleksa zlata(III) na temperaturi od 25°C u konvencionalnom dvofaznom sistemu n-oktanol/dejonizovana voda, korišćenjem standardne *shake-flask* metode (metoda mućkanja u bočici) [126]. Dobijene srednje logP vrednosti za tri merenja su prikazane u Tabeli 1.

Tabela 1. Vrednosti particionog koeficijenta ispitivanih kompleksa zlata(III).

Kompleks zlata(III)	logP
AubipyOH	-1,98
AubipyC	-0,78
Aupy(OAc) ₂	0,38
Auoxo6	-0,82
Au ₂ phen	-0,55
Au ₂ bipyC	-1,03

Na osnovu strukture ispitivanih jedinjenja i dobijenih vrednosti za logP može se zaključiti da polarnost kompleksa zlata(III) raste u nizu:



Većoj polarnosti kompleksa Aubipy(OH)_2 i AubipyC u odnosu na ostale komplekse zlata(III) doprinosi prisustvo polarne -OH grupe koja može učestvovati u građenju vodoničnih veza. Dobijene vrednosti logP za ispitivane komplekse zlata(III) leže u optimalnom opsegu particionog koeficijenta ($-2 < \log P < 2$) neophodnog za lako prolaženje kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane i selektivnu akumulaciju ove vrste jedinjenja u ćelijama tumora [145]. Pored pogodne lipofilnosti, ovi kompleksi poseduju i pozitivno naelektrisanje koje ih usmerava ka mitohondrijama gde se akumuliraju u značajno većoj koncentraciji nego u citosolu, zbog velikog mitohondrijskog membranskog potencijala, $\Delta\Psi_m$, proizvedenog u respiratornom ciklusu [146].

4.1.3. Teorijski proračuni dipolnog momenta, raspodele naelektrisanja, površine i zapremine kompleksa zlata(III)

Dalje proučavanje ispitivanih kompleksa baziralo se na teorijskim proračunima za procenu dipolnog momenta, raspodele naelektrisanja u kompleksima kao i na proračunima za procenu njihove ukupne površine i zapremine.

Proračuni za procenu dipolnog momenta ispitivanih kompleksa rađeni su na optimizovanim strukturama kompleksa, a dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 2.

Generalno, celokupna struktura ispitivanih kompleksa zlata(III) je rigidna, izuzev rotabilnih metil grupa i hidrokso i acetato liganada u mononuklearnim kompleksima. Važno je napomenuti da iako su -CH₃ grupe tretirane kao rotabilne, njihove konformacije nemaju veliki uticaj na dipolni momenat kompleksa. S druge strane, CH₃COO- i -OH ligandi imaju značajni uticaj na gore pomenuti parametar, naročito orijentacija -OH liganda.

Tabela 2. Izračunate vrednosti dipolnog momenta, zapremine i površine ispitivanih kompleksa zlata(III).

Kompleks zlata(III)	Dipolni momenat (D)	Zapremina (Å ³)	Površina (Å ²)
Aubipy(OH) ₂	594,99	195,1	222,2
AubipyC	589,37	298,1	315,9
Aupy(OAc) ₂	13,16	322,9	350,0
Auoxo6	5,89	409,3	395,8
Au ₂ phen	5,11	445,1	420,2
Au ₂ bipyC	19,99	588,9	493,8

Kao što se iz Tabele 2 može videti vrednosti izračunatih dipolnih momenta ispitivanih kompleksa rastu u nizu:



U poređenju sa drugim grupama (vezama) u ispitivanim kompleksima, najveći doprinos dipolnom momentu potiče od -OH grupa, pa orijentacija njihovih dipola u prostoru u velikoj meri doprinosi ukupnom dipolnom momentu kompleksa. Orijetacija dipolnih momenata u optimizovanim strukturama ispitivanih kompleksa je takva da je kod Aubipy(OH)₂ on najveći, jer je položaj -OH grupa takav da dovodi do superpozicije dipolnih momenata ovih grupa. S druge strane, orijentacija polarnih grupa u kompleksu Aupy(OAc)₂ omogućava da ovaj kompleks ima najniže vrednosti dipolnog momenta za mononuklearne komplekse.

Strukture binuklearnih kompleksa Auoxo6 i Au₂phen su jako rigidne, i ne sadrže rotabilne veze koje bi mogle da izazovu promene dipolnog momenta, pa izračunate vrednosti dipolnih momenata dobro opisuju trend polarnosti kompleksa. Vrednost dipolnog momenta optimizovane strukture kompleksa Au₂bipyC je nešto veća usled prisustva dve rotabilne Au-O veze, čiji se dipoli međusobno ne poništavaju.

Treba napomenuti da su vrednosti dipolnih momenata dobijene uzimajući energetski najpovoljniju konformaciju datog jedinjenja tj. konformaciju sa najnižom energijom. Dobro poznata činjenica je da vrednost ovog parametra u rastvoru varira sa prostornom orijentacijom polarnih rotabilnih veza ili grupa u jedinjenju, pa su stoga eksperimentalno dobijene vrednosti parametra logP prihvatljivije za opisivanje polarnosti jedinjenja.

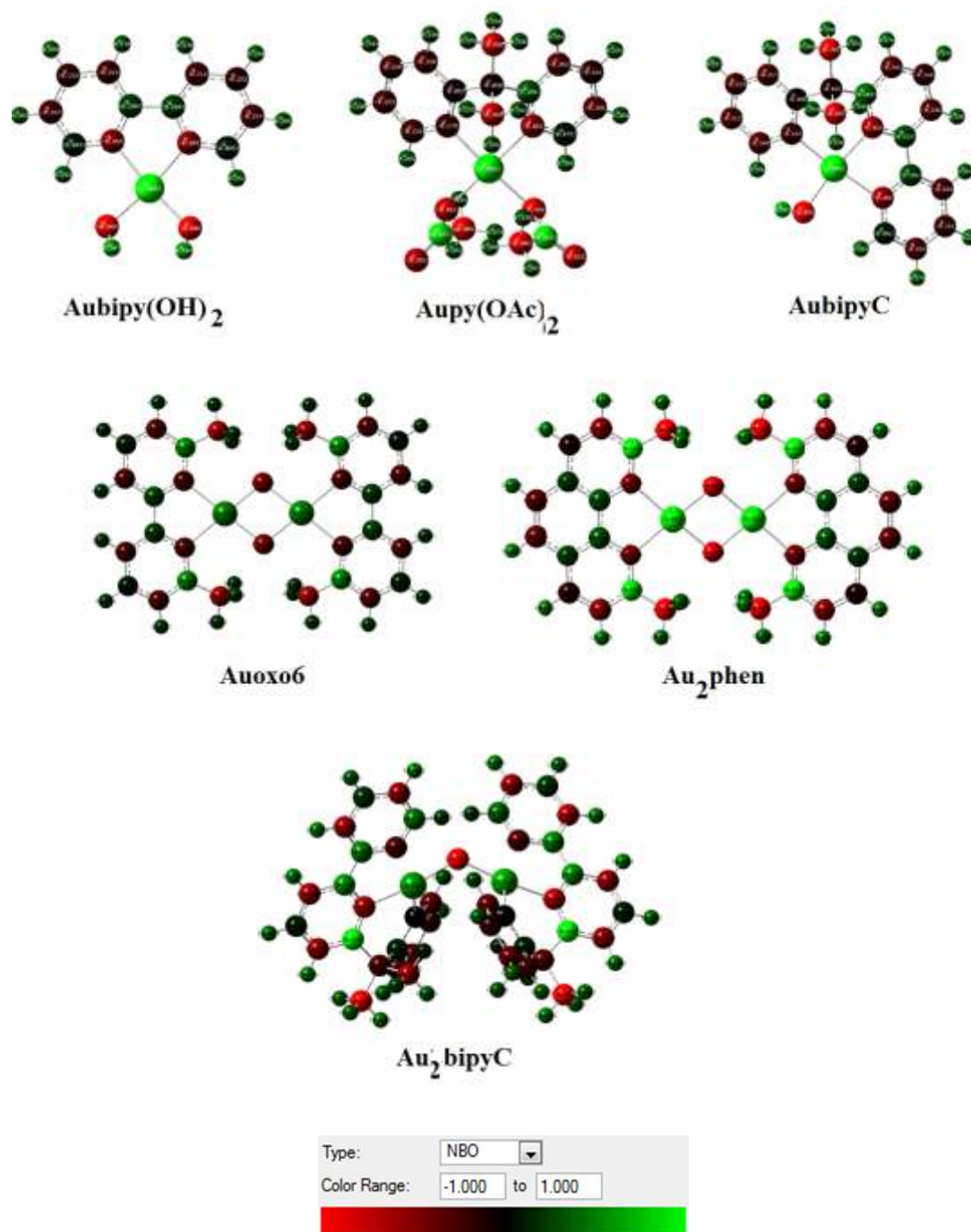
Slika 19 predstavlja rezultate proračuna za raspodelu NPA naelektrisanja (*Natural Population Analysis, eng.*) [147]. Zelena boja odgovara atomima sa pozitivnim parcijalnim naelektrisanjem, a u ovom slučaju to su atomi H i joni Au. Pojava elektronegativnog N atoma u aromatičnom prstenu i njegovo koordinativno vezivanje za jon Au dovodi do perturbacije elektronske gustine unutar aromatičnog liganda, rezultujući pozitivnim naelektrisanjem na C atomima. Naravno i pored ovog pomeranja elektronske gustine, neki C atomi zadržavaju negativno parcijalno naelektrisanje (crveno obojeni atomi na Slici 19), koje se javlja i na N i O atomima. Takođe se sa Slike 19 može zaključiti da joni Au imaju najpozitivnije vrednosti naelektrisanja, dok su atomi O kao i atomi C iz metil grupa najnegativniji.

Teorijskim proračunima izračunate su i *van der Waals*-ove površine i zapremine ispitivanih kompleksa zlata, a dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 2. Površina i zapremina ispitivanih kompleksa rastu u smeru:



Ovo ukazuje na trend porasta mogućnosti interakcija sa većim brojem aminokiselinskih ostataka i posledično veće vrednosti energija vezivanja za dati enzim. Međutim, treba napomenuti da na energiju vezivanja utiču i sterna faktori, pa treba očekivati da će ove energije biti niže kod jako voluminoznih kompleksa (Au₂bipyC) nego kod onih kod kojih je vezivanje za protein sterno olakšano (planarna geometrija kompleksa Auoxo6 i

Au₂phen). Kako su ligandi u ispitivanim kompleksima uglavnom aromatične prirode, treba očekivati da grade interakcije π -tipa (XH/ π interakcije i π - π steking inetrakcije), i da će ove interakcije biti zastupljenije od vodoničnih veza.



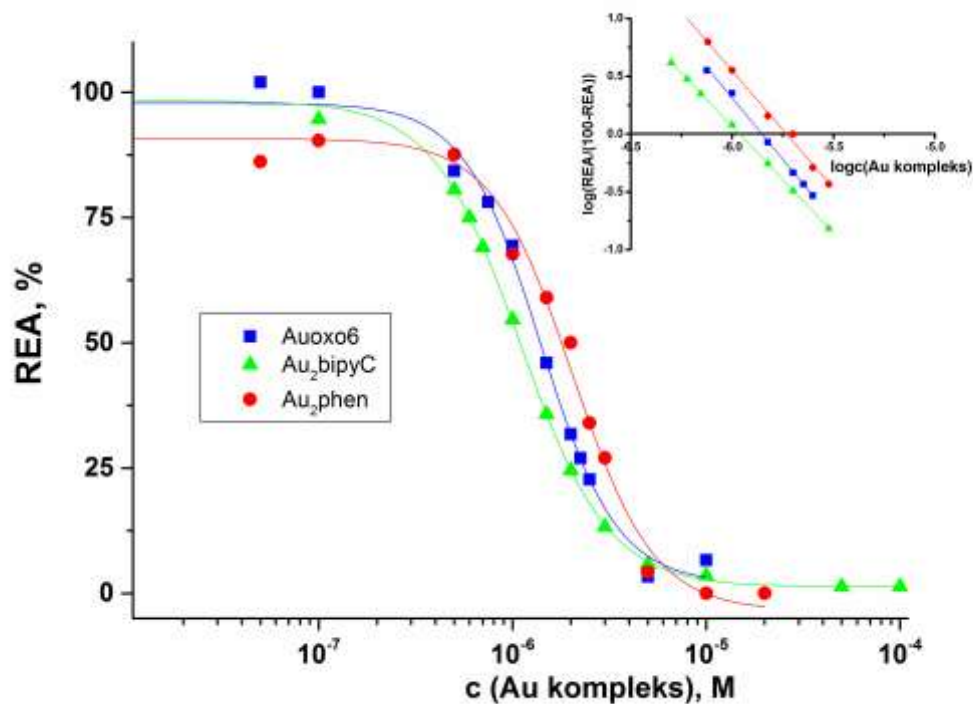
Slika 19. Distribucija NBO (*Natural Bond Orbital*, eng.) naelektrisanja za komplekse Aubipy(OH)_2 , Aupy(OAc)_2 , AubipyC , Auoxo6 , Au_2phen , i Au_2bipyC (pozitivno parcijalno naelektrisanje - zelena boja; negativno parcijalno naelektrisanje - crvena boja).

4.1.4. Inhibicija Na⁺/K⁺-ATPaze

Mononuklearni kompleksi zlata(III) inhibiraju Na⁺/K⁺-ATPazu već pri mikromolarnoj koncentraciji [70]. Binuklearni kompleksi, Au₂bipyC i Auoxo6 predstavljaju dimerne oblike ranije ispitanih mononuklearnih kompleksa i realno je bilo očekivati da će zbog sinergijskog delovanja dva Au(III) centra pokazivati prednosti u odnosu na mononuklearne komplekse, inhibirajući aktivnost datog enzima sa nižim IC₅₀ vrednostima. S tim ciljem je ispitan uticaj ovih kompleksa zlata(III) na enzim, Na⁺/K⁺-ATPazu u oblasti koncentracija kompleksa od 1 × 10⁻⁸ – 1 × 10⁻⁴ M. Relativna enzimaska aktivnost (REA), izražena kao procenat preostale aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u odnosu na aktivnost enzima bez dodatog inhibitora (kontrolna vrednost) predstavljena je u funkciji koncentracije dodatog inhibitora (Slika 20). Dobijena zavisnost je fitovana sigmoidalnom funkcijom prema jednačini (9):

$$REA = \frac{REA_{\max} - REA_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{[IC]_{50}}\right)^p} + REA_{\min} \quad (9)$$

gde je [I] koncentracija dodatog inhibitora a [IC]₅₀ koncentracija inhibitora koja dovodi do smanjenja enzimске aktivnosti za 50%, *p* je *Hill*-ov koeficijent, REA_{max} i REA_{min} maksimalna odnosno minimalna enzimaska aktivnost. Ovako dobijeni parametri inhibicije su prikazani u Tabeli 3.



Slika 20. Inhibicija Na^+/K^+ -ATPaze binuklearnim kompleksima zlata(III). Umetnuti grafik: *Hill*-ova analiza inhibicione krive.

Parametri inhibicije su takođe dobijeni i *Hill*-ovom analizom [148] inhibicione krive prema jednačini (10):

$$\log\left(\frac{\text{REA}}{100-\text{REA}}\right) = -n\log[I] + n\log C_{50} \quad (10)$$

a dobijeni rezultati su prikazani na umetnutom grafiku na Slici 26 i u Tabeli 3. Nagib n u jednačini (10) predstavlja *Hill*-ov koeficijent, koji ukazuje na stepen kooperativnosti reakcije.

Tabela 3. Parametri inhibicije Na⁺/K⁺-ATPaze (vrednosti IC₅₀ i *Hill*-ov koeficijent, *n*) kompleksima zlata(III) dobijeni fitovanjem sigmoidalne krive i *Hill*-ovom analizom.

Kompleks	Sigmoidalni fit	<i>Hill</i> -ova analiza	
	IC ₅₀ , M	IC ₅₀ , M	<i>n</i>
Auoxo6	$(1,40 \pm 0,07) \times 10^{-6}$	$(1,39 \pm 0,05) \times 10^{-6}$	2,12 ± 0,05
Au ₂ bipyC	$(1,09 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	$(1,06 \pm 0,05) \times 10^{-6}$	1,84 ± 0,01
Au ₂ phen	$(2,04 \pm 0,27) \times 10^{-6}$	$(1,90 \pm 0,10) \times 10^{-6}$	2,04 ± 0,24
Aubipy(OH) ₂ [70]	/	$(3,50 \pm 0,10) \times 10^{-6}$	1,10 ± 0,20
AubipyC [70]	/	$(7,30 \pm 0,10) \times 10^{-6}$	1,60 ± 0,30
Aupy(OAc) ₂ [70]	/	$(7,60 \pm 0,10) \times 10^{-6}$	1,60 ± 0,40

/ - literaturno nedostupni podaci

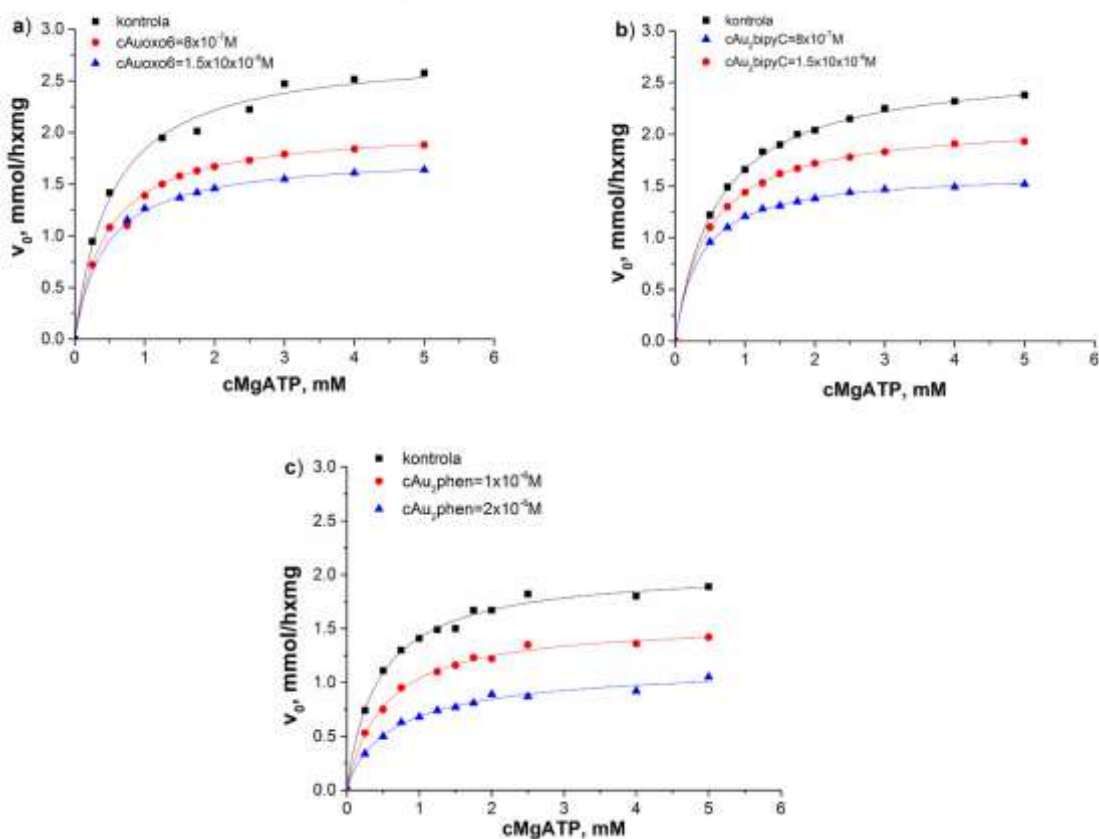
Kao što se vidi iz Tabele 3, rezultati dobijeni fitovanjem eksperimentalno dobijenih tačaka sigmoidalnom funkcijom se dobro slažu sa rezultatima dobijenim *Hill*-ovom analizom ukazujući da je i prethodni model dovoljno precizan u određivanju datih parametara. Dobijene IC₅₀ vrednosti za binuklearne komplekse zlata ukazuju na umereno jaku inhibiciju aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze sa vrednostima *Hill*-ovog koeficijenta ~ 2. Treba napomenuti, da ove vrednosti ne predstavljaju termodinamičke parametre, jer zavise od koncentracije enzima u reakcionoj smeši. Nešto niže IC₅₀ vrednosti za mononuklearne komplekse, u odnosu na binuklearne, su dokaz sinergijskog delovanja dva metalna centra u binuklearnim kompleksima. *Hill*-ov koeficijent ~ 2 ukazuje na pozitivno kooperativno vezivanje kompleksa zlata i na postojanje najmanje dva različita vezivna mesta na enzimu. Antikancerogeni Pt(II) kompleksi, cisplatin i nedaplatin [25,71,149], kao i drugi kompleksi na bazi Pt(II) jona [150] takođe inhibiraju aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze ali sa IC₅₀ vrednostima u milimolarnom opsegu koncentracija. U oba slučaja je nađeno da inhibicija zavisi, ne samo od koncentracije inhibitora, već i od vremena preinkubacije [1].

4.1.5. Mehanizam inhibicije Na⁺/K⁺-ATPaze

Mehanizam inhibicije Na⁺/K⁺-ATPaze binuklearnim kompleksima je ispitan za dve koncentracije kompleksa koje su bliske njihovoj IC₅₀ vrednosti za ovaj enzim, u zavisnosti od koncentracije supstrata (MgATP²⁻). Na osnovu izmerene apsorbance na 690 nm (Poglavlje 3.8.1.1.) i određenog ekstinkcionog koeficijenta za neorganski fosfat, P_i (kalibraciona kriva za fosfate Slika P3 u Prilogu), određena je početna brzina v₀ hidrolize supstrata, MgATP²⁻ do neorganskog fosfata, P_i (H₂PO₄⁻), izražena kao broj enzimskih jedinica (μM P_i/h) po mg proteina. Dobijeni podaci predstavljeni su na Slici 21, odakle se vidi da se u svim slučajevima dobijene zavisnosti mogu predstaviti *Michaelis-Menten*-ovim mehanizmom (11):

$$v_0 = V_m[S] / (K_m + [S]) \quad (11)$$

gde su v₀ izmerena početna brzina, V_m maksimalna brzina reakcije, K_m *Michaelis-Mentenova* konstanta, [S] koncentracija supstrata, MgATP²⁻.



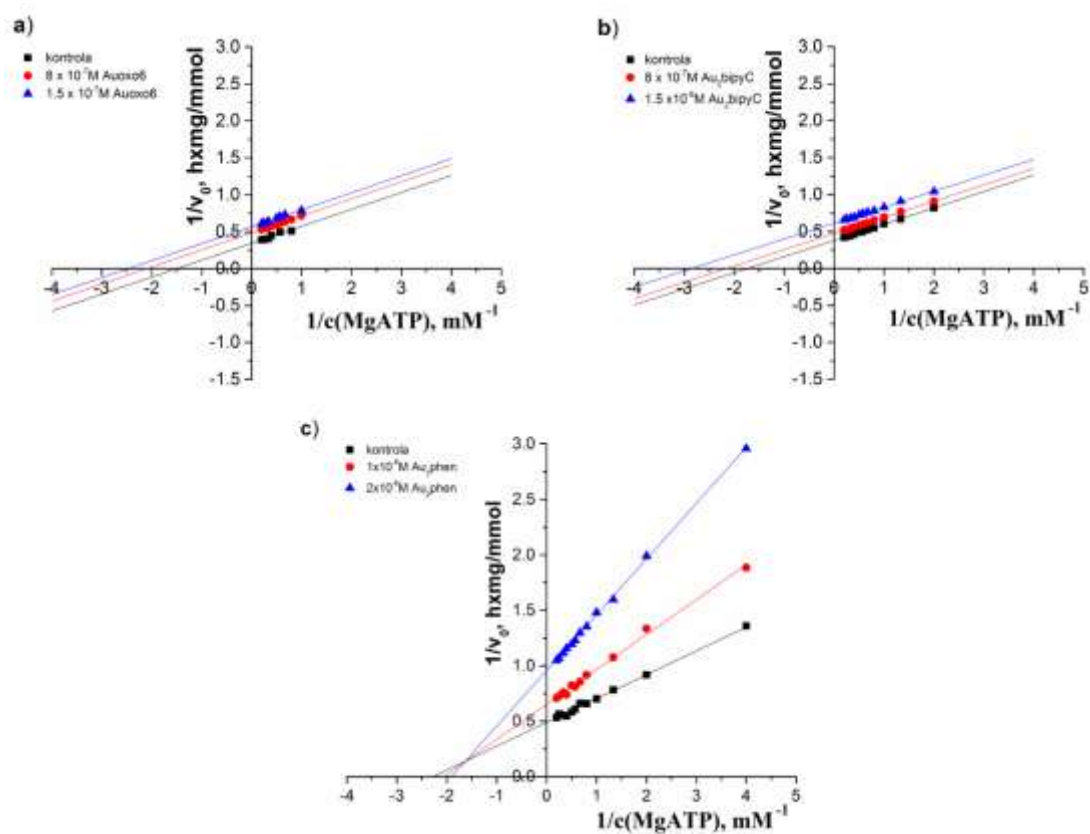
Slika 21. Zavisnost brzine enzimski katalizovane reakcije hidrolize $MgATP^{2-}$ od njegove koncentracije (0,25 mM – 5 mM) u odsustvu (kontrola) i prisustvu binuklearnih kompleksa zlata(III): a) Auoxo6; b) Au₂bipyC; c) Au₂phen.

Vrednosti K_m i V_m predstavljaju dva značajna kinetička parametra reakcije, koji se najčešće određuju iz linearne transformacije *Michaelis-Menten*-ove jednačine, pri čemu se dobija *Lineweaver-Burk*-ova (Lajnviver-Bark) jednačina. Ova jednačina predstavlja recipročni oblik *Michaelis-Menten*-ove jednačine i data je izrazom:

$$1/v_0 = K_m/V_m[S] + 1/V_m \quad (12)$$

Iz dobijenih parametara *Lineweaver-Burk*-ovih grafika (Slika 22) određene su vrednosti za K_m i V_{max} inhibiranog enzima za svaki od ispitivanih kompleksa, kao presek prave dobijene linearnim fitom experimentalnih tačaka, sa y osom ($1/V_{max}$) i x osom (K_m). Osim toga, iz *Lineweaver-Burk*-ove zavisnosti predstavljene za kontrolnu vrednost

aktivnosti enzima i aktivnosti u prisustvu više koncentracija inhibitora, određen je i tip inhibicije. Dobijeni rezultati za sve komplekse su prikazani u Tabeli 4.



Slika 22. Lineweaver–Burk-ova linearizacija Michaelis–Menten-ovih zavisnosti za interakciju binuklearnih kompleksa zlata(III): a) Auoxo6; b) Au₂bipyC; c) Au₂phen sa Na⁺/K⁺-ATPazom.

Tabela 4. Kinetička analiza aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u odsustvu i prisustvu binuklearnih zlato(III) kompleksa.

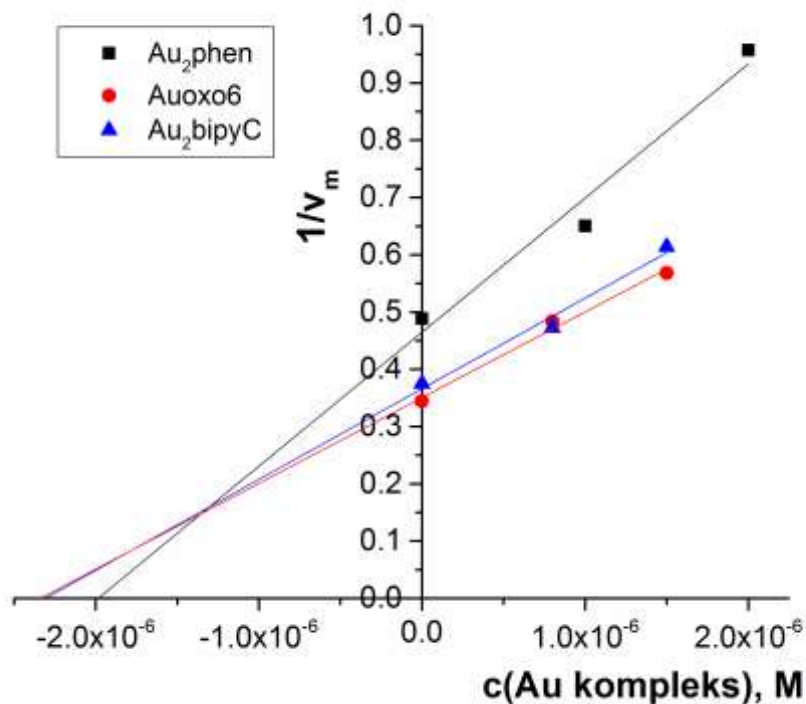
Inhibitor	c(kompleksa), M	Tip inhibicije	K _m , mM	V _{max} , μM P _i /h/mg	K _i , M
	0		0,52 ± 0,16	2,79 ± 0,07	
Auoxo6	8,7 × 10 ⁻⁷	akompetitivna	0,48 ± 0,07	2,06 ± 0,08	2,34 × 10 ⁻⁶
	1,5 × 10 ⁻⁶		0,41 ± 0,05	1,77 ± 0,04	
	0		0,82 ± 0,08	2,89 ± 0,09	
Au ₂ bipyC	8,7 × 10 ⁻⁷	akompetitivna	0,43 ± 0,08	2,11 ± 0,09	2,29 × 10 ⁻⁶
	1,5 × 10 ⁻⁶		0,26 ± 0,07	1,58 ± 0,08	
	0		0,44 ± 0,01	2,04 ± 0,05	
Au ₂ phen	1,0 × 10 ⁻⁶	mešovita tip II	0,48 ± 0,01	1,54 ± 0,04	1,99 × 10 ⁻⁶
	2,0 × 10 ⁻⁶		0,53 ± 0,01	1,05 ± 0,04	

Kinetički parametri dobijeni za binuklearne komplekse pokazuju da vrednost V_{max} opada u odnosu na kontrolu (enzim bez prisustva inhibitora) u prisustvu sva tri kompleksa. Međutim, vrednosti konstanti K_m opadaju sa porastom koncentracije

inhibitora za komplekse Auoxo6 i Au₂bipyC ukazujući na akompetitivnu inhibiciju aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze ovim kompleksima, dok je kod kompleksa Au₂phen zabeležen porast vrednosti K_m konstante implicirajući mešovitu inhibiciju II tipa (kompetitivna-nekompetitivna inhibicija).

Kod akompetitivne inhibicije (inhibicije bez kompeticije), inhibitor se vezuje isključivo za kompleks enzim-supstrat (ES) na mestu koje nije aktivno mesto enzima [149]. Vezivanje supstrata za enzim dovodi do konformacionih promena koje omogućavaju formiranje vezivnog mesta za kompleks zlata (Auoxo6 i Au₂bipyC). Formirani kompleks enzim-supstrat-inhibitor (ESI) nije u mogućnosti da formira reakcioni proizvod (neorganski fosfat, P_i) pa dolazi do inhibicije enzima. Dobijeni podaci za Auoxo6 i Au₂phen jasno pokazuju da se inhibicija aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze ovim kompleksima razlikuje od inhibicije izazvane njihovim monomernim derivatima koji se vezuju nespecifično i nezavisno od supstrata [70]. Kompleks Au₂phen se može vezati i za aktivno mesto enzima kao i za neko drugo mesto na enzimu [149].

Kako bi odredili vrednost konstante inhibicije K_i, tj. stabilnost kompleksa enzim – inhibitor, nacrtani su grafici zavisnosti 1/V_{max} od koncentracije inhibitora, tzv. sekundarni oblik *Lineweaver-Burk*-ove zavisnosti, Slika 23. Vrednosti K_i su dobijene iz preseka prave sa apscisom i prikazane su u Tabeli 3. Dobijeni rezultati za binuklearne komplekse zlata(III) ukazuju da su konstante stabilnosti K_s (K_s=1/K_i) kompleksa formiranih između njih i enzima istog reda veličine (10⁵ M) kao i za mononuklearne komplekse [70]. Poređenjem vrednosti K_s kompleksa formiranih između Na⁺/K⁺-ATPaze i Pd(II) ili Pt(II) kompleksa može se videti da su konstante stabilnosti za ove metale jedan do dva reda veličine manje, ukazujući na činjenicu da su kompleksi zlata(III) bolji inhibitori Na⁺/K⁺-ATPaze [1,67,68].



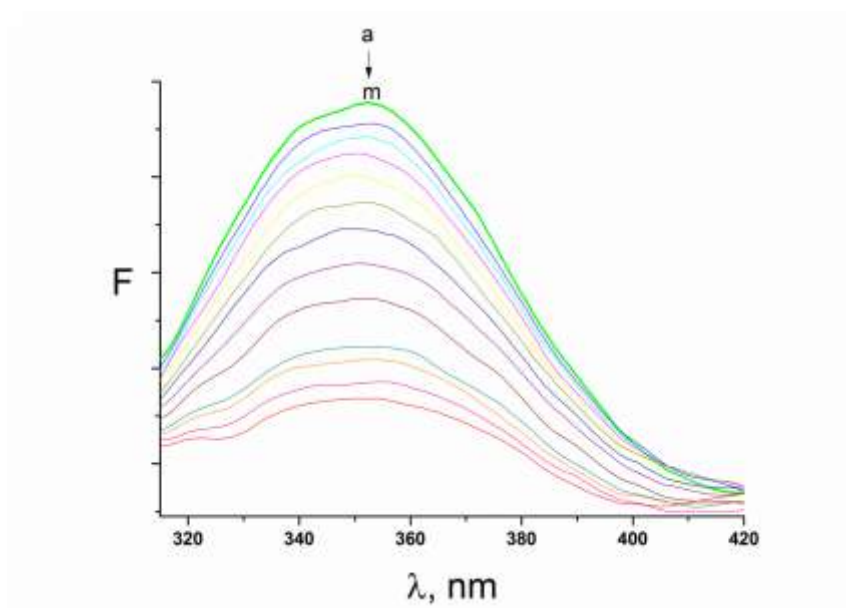
Slika 23. Sekundarni oblik *Lineweaver–Burk*-og grafika: Zavisnost recipročne vrednosti maksimalne brzine od koncentracije binuklearnih kompleksa: $1/v_m = f(c(\text{Au kompleks}))$.

4.1.6. Uticaj kompleksa zlata(III) na fluorescenciju Na⁺/K⁺-ATPaze

Uticaj kompleksa zlata(III) na unutrašnju fluorescenciju Na⁺/K⁺-ATPaze je praćen snimanjem fluorescentnih spektara enzima u zavisnosti od koncentracije kompleksa zlata(III) u uslovima koji omogućavaju da enzim zauzme takva stanja koja su analogna E1 ili E2P konformaciji enzima (Poglavlje 3.4.). U stanju analognom E1 konformaciji, enzim ima veliki afinitet ka Na⁺ jonu, pri čemu neorganski fosfat, P_i, još uvek nije vezan za enzim. U stanju analognom E2P konformaciji, Na⁺/K⁺-ATPaza ima veliki afinitet ka K⁺ jonima i još uvek sadrži vezan neorganski fosfat, P_i. Ekscitacijom na 295 nm postignuto je da je Trp ciljana fluorofora [151].

Na Slici 24 prikazani su kao primer, fluorescentni spektri enzima u prisustvu kompleksa AubipyC, u uslovima kada se enzim nalazi u E1 konformaciji, dok su za ostale slučajeve dobijeni slični rezultati. Fluorescentni spektar Na⁺/K⁺-ATPaze (Slika 24,

spektar **a)** pokazuje emisijski maksimum na 350 nm, ukazujući da je većina Trp pri uslovima snimanja fluorescentnih spektara izložena polarnom rastvaraču. Međutim postojanje širokog emisijskog pika je jasna indikacija da je jedan deo Trp uronjen u hidrofobnu unutrašnjost enzima i samim tim nedostupan gasiocu fluorescencije [105,125].



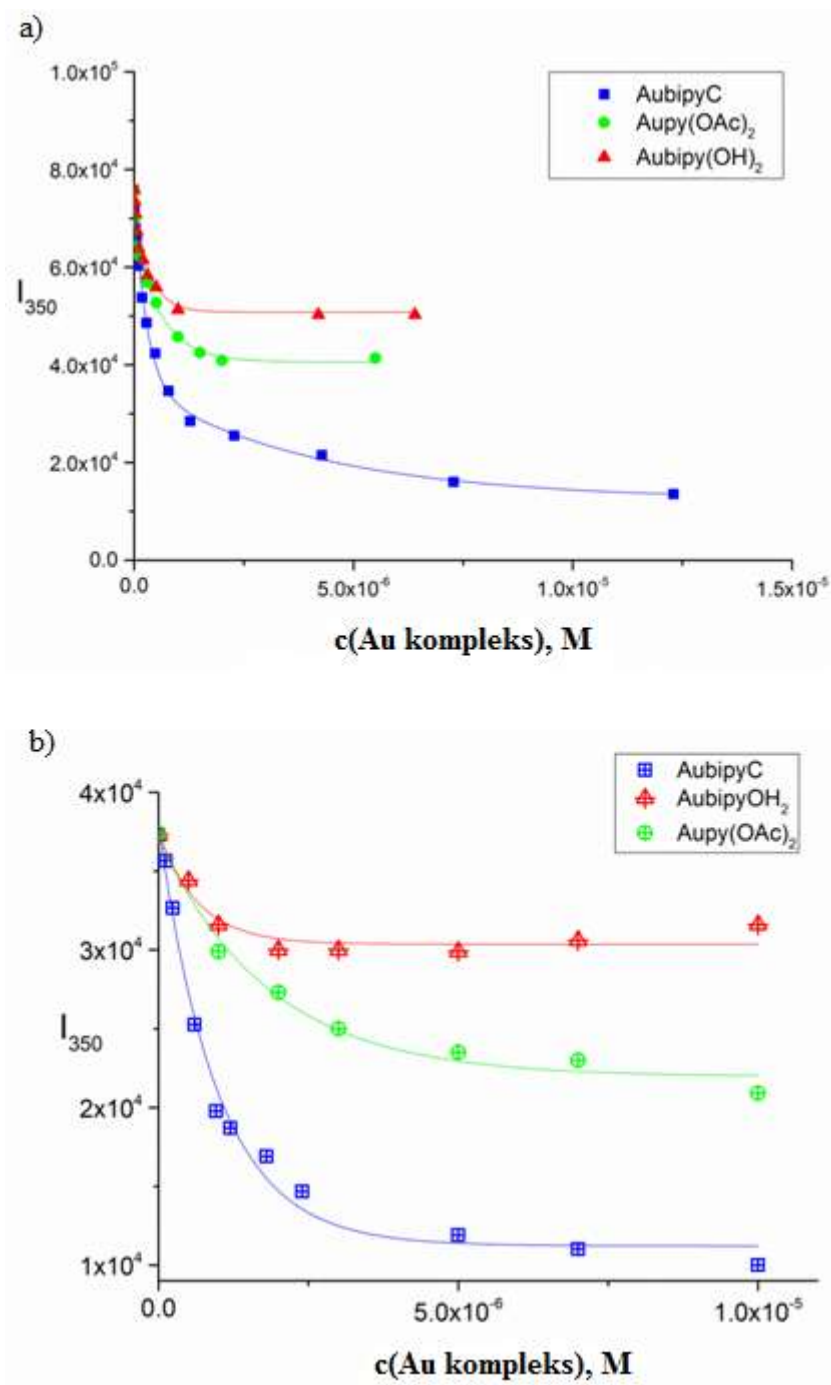
Slika 24. Fluorescentni spektar 1×10^{-7} M Na^+/K^+ -ATPaze u prisustvu različitih koncentracija mononuklearnog kompleksa AubipyC, a -bez kompleksa; b \rightarrow m, strelica označava smer porasta koncentracije kompleksa: 1, 3, 6, 10, 30, 50, 80, 100, 300, 500, 700 i 900×10^{-8} M.

Za svih šest ispitivanih kompleksa zlata(III), bez obzira na konformaciju enzima, dolazi do gašenja Trp fluorescencije enzima u zavisnosti od koncentracije kompleksa ali sa različitim efikasnošću. Najveća efikasnost gašenja fluorescencije je dobijena za AubipyC kompleks i njegov dimer, Au_2bipyC , gde je ugašeno preko 90% fluorescencije enzima. Kompleks $\text{Aubipy}(\text{OH})_2$ je pokazao najmanju efikasnost, gaseći svega oko 25% fluorescencije enzima. Razlika u efikasnosti gašenja Trp fluorescencije Na^+/K^+ -ATPaze je objašnjena razlikom u polarnosti koja postoji između kompleksa, njihovim naelektrisanjem, kao i doprinosom inter-FRET gašenja.

4.1.6.1. Uticaj mononuklearnih kompleksa zlata(III) na fluorescenciju Na⁺/K⁺-ATPaze

S obzirom da je pokazano da mononuklearni kompleksi zlata(III) inhibiraju Na⁺/K⁺-ATPazu vezivanjem nezavisno od vezivanja supstrata (nekompetitivno) [70], ispitivan je uticaj ovih kompleksa na unutrašnju fluorescenciju E1 i E2P konformacije enzima koje su uzete kao reprezentativni modeli slučaja kada supstrat nije vezan za kompleks, E1, i kada je supstrat vezan za kompleks E2P.

Grafici promena intenziteta fluorescencije na 350 nm u funkciji dodate koncentracije mononuklearnih kompleksa za E1 i E2P konformacije prikazani su na Slici 25. Iz ovih grafika se jasno vidi da ispitivani kompleksi gase unutrašnju fluorescenciju Na⁺/K⁺-ATPaze na koncentracijski zavistan način, dok se dobijeni eksperimentalni podaci (I_{350} u funkciji koncentracije kompleksa) mogu fitovati bifaznom eksponencijalnom funkcijom. Ovo ukazuje na činjenicu da postoji više od jednog vezivnog mesta za ispitivane komplekse na enzimu, kao i da njihovo vezivanje utiče na unutrašnju fluorescenciju enzima [152]. Međutim, kao što se sa Slike 25 može videti, ni u jednom od ispitivanih slučajeva ne dolazi do potpunog gašenja fluorescencije, čak i pri jako visokim koncentracijama kompleksa, što ukazuje da ipak jedan deo emisije Trp ostaje neugašen. Ova činjenica takođe govori da čak i jako visoka koncentracija kompleksa zlata(III) ne dovodi do potpune denaturacije enzima.

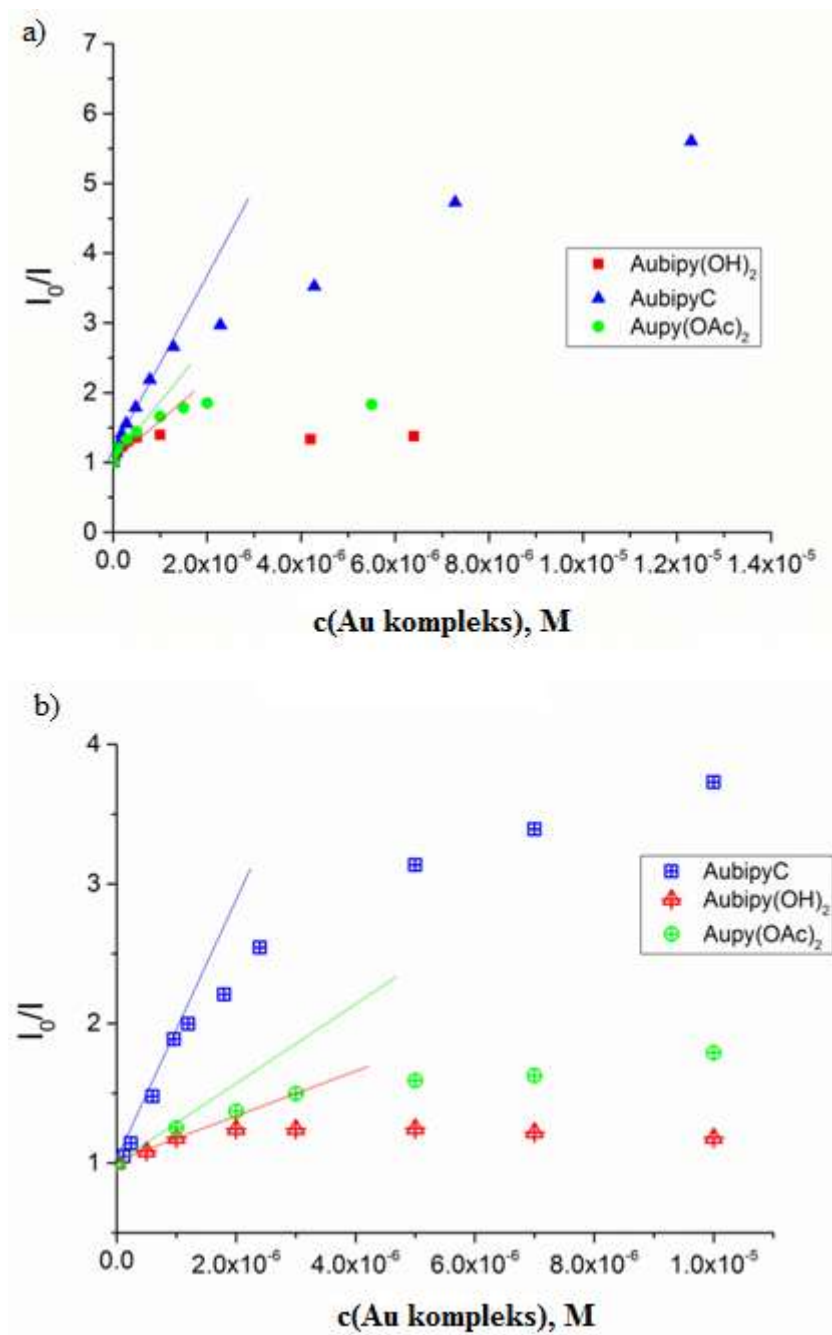


Slika 25. Zavisnost intenziteta fluorescencije Na^+/K^+ -ATPaze na 350 nm (I_{350}) od koncentracije kompleksa zlata(III), u a) E1 konformaciji i b) E2P konformaciji.

Kako bi se izračunale vrednosti *Stern-Volmer*-ove konstante gašenja fluorescencije, K_{sv} , na eksperimentalne podatke prikazane na Slici 25 primenjena je *Stern-Volmer*-ova (Štern-Folmer) zavisnost prikazana jednačinom (13):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [\text{Au}] = 1 + K_{sv} [\text{Au}] \quad (13)$$

gde su I_0 i I intenziteti fluorescencije u odsustvu i prisustvu kompleksa zlata, k_q bimolekularna konstanta gašenja fluorescencije, τ_0 vreme života fluorofore u odsustvu gasioca (vreme života Trp u proteinima je u opsegu od 1 – 10 ns), K_{sv} je *Stern-Volmer*-ova konstanta, a $[\text{Au}]$ koncentracija dodatog kompleksa zlata. Jednačina (13) za ispitivane sisteme pokazuje tzv. *downward* (savijanje ka x-osi) odstupanje od linearnosti u svim slučajevima (Slika 26).



Slika 26. Stern-Volmer-ov grafik gašenja fluorescencije Na⁺/K⁺-ATPaze u prisustvu rastućih koncentracija mononuklearnih kompleksa zlata(III) za a) E1 i b) E2P konformaciju enzima.

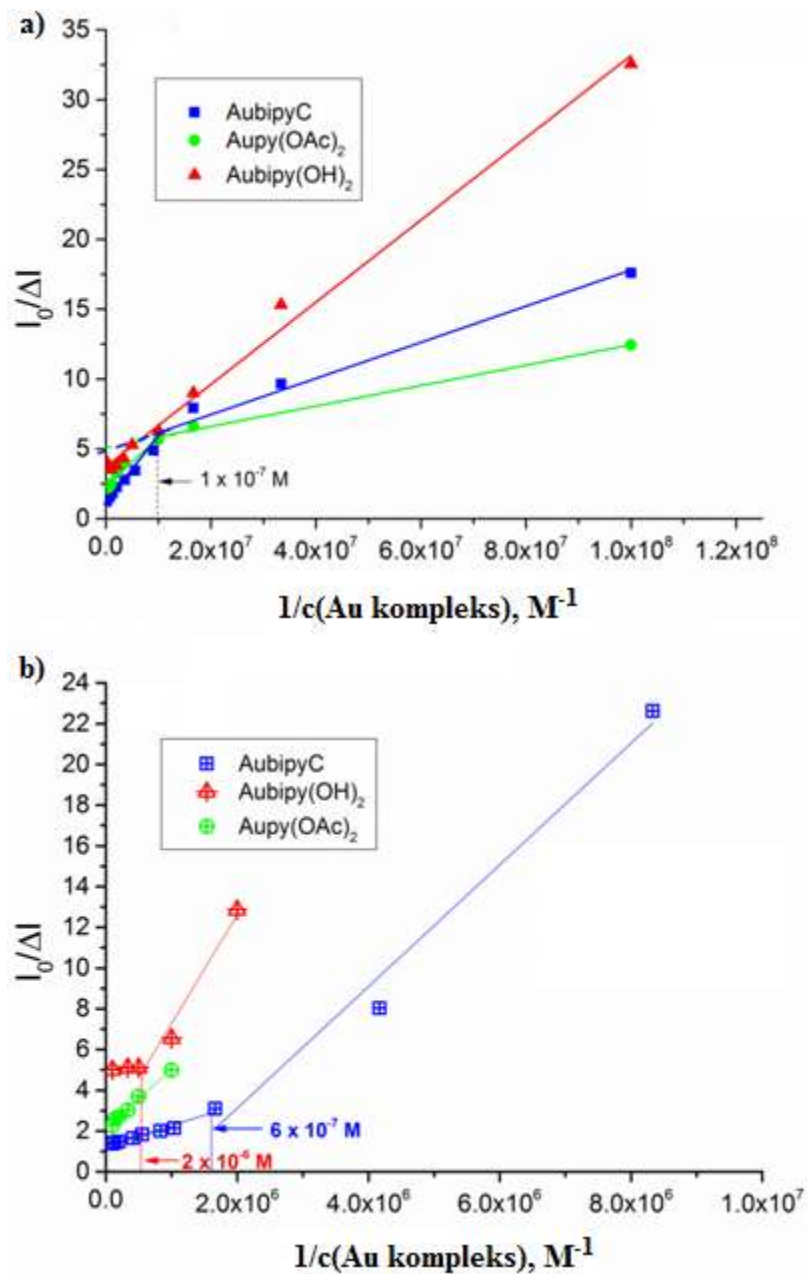
U protein-ligand fluorescentnim studijama ovakva promena fluorescencije ukazuje na postojanje najmanje dve vrste Trp: na one Trp koji su dostupni gasiocu fluorescencije, odnosno kompleksu zlata(III), i na one koji to nisu. Za izračunavanje Stern-Volmer-ove

konstante gašenja fluorescencije, K_{sv} , kao i za izračunavanje frakcije Trp čija je fluorescencija ugašena u ovakvim slučajevima je korišćena modifikovana *Stern-Volmer*-ova jednačina (14) [153].

Modifikovana *Stern-Volmer*-ova jednačina je data jednačinom (14):

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f} + \frac{1}{fK_{sv}[Au]} \quad (14)$$

u kojoj su I_0 i I intenziteti fluorescencije u odsustvu i prisustvu kompleksa zlata(III), K_{sv} *Stern-Volmerova* konstanta (u slučaju dostupnih Trp označena sa K_a (*accessible fraction*, eng.) a u slučaju nedostupnih sa K_b (*buried fraction*, eng.)), f , frakcija Trp izložena gasiocu, a $[Au]$ je koncentracija dodatog kompleksa zlata(III). Rezultati dobijeni primenom jednačine (14) na eksperimentalne podatke su prikazani na Slici 27 i u Tabeli 5. Iz izračunate vrednosti K_{sv} koristeći jednačinu (13) izračunata je bimolekularna konstanta gašenja fluorescencije, uzimajući u obzir da je vreme poluživota za Trp u proteinima, τ_0 , 1×10^{-10} s [151].



Slika 27. Modifikovani *Stern-Volmer*-ov grafik gašenja fluorescencije Trp Na^+/K^+ -ATPaze kompleksima zlata(III): a) E1 i b) E2P konformacija.

Tabela 5. Parametri gašenja fluorescencije Trp Na⁺/K⁺-ATPaze mononuklearnim kompleksima zlata(III).

		Aubipy(OH) ₂	AubipyC	Aupy(OAc) ₂
E1	k _q , M ⁻¹ s ⁻¹	1,26×10 ¹⁷	3,25×10 ¹⁶	3,11×10 ¹⁶
	K _a , M ⁻¹	1,26×10 ⁷	3,78×10 ⁷	7,04×10 ⁷
	K _b , M ⁻¹	/	3,25×10 ⁶	3,11×10 ⁶
	f _a	0,27	0,17	0,17
	f _b	/	0,77	0,47
E2P	k _q , M ⁻¹ s ⁻¹	1,18×10 ¹⁶	7,09 × 10 ¹⁵	1,75×10 ¹⁷
	K _a , M ⁻¹	1,18×10 ⁶	7,09 × 10 ⁵	1,75×10 ⁷
	f _a	0,20	0,81	0,48

a-dostupni; b-nedostupni Trp ostaci.

U uslovima dirigovane E1 konformacije enzima modifikovani *Stern-Volmer*-ov grafik pokazuje linearnu zavisnost za Aubipy(OH)₂ kompleks, dok za komplekse AubipyC i Aupy(OAc)₂ dolazi do odstupanja od linearnosti. U slučaju E2P konformacije enzima, do odstupanja od linearnosti dolazi kod Aubipy(OH)₂ i AubipyC kompleksa dok za Aupy(OAc)₂ kompleks *Stern-Volmer*-ov grafik ima linearni oblik.

Kao što je ranije bilo napomenuto, odstupanje od linearnosti u *Stern-Volmer*-ovom grafiku ukazuje na postojanje najmanje dve vrste Trp, dostupnih i nedostupnih kompleksima zlata(III). Međutim odstupanje od linearnosti u modifikovanim *Stern-Volmer*-ovim graficima ukazuje na činjenicu da pri određenoj koncentraciji kompleksa zlata(III) (koncentracija koja odgovara preseku dveju prava na Slici 27) dolazi do konformacionih promena u enzimu usled čega ili ranije nedostupni Trp sada bivaju dostupni kompleksima zlata(III), pa ovi statički gase njihovu fluorescenciju; ili pak dolazi do intra rezonantnog transfera energije (intra-FRET gašenje) (Poglavlje 1.5.3.) [105,151,154].

Kada je modifikovani *Stern-Volmer*-ov grafik pokazivao linearnu zavisnost konstanta K_a (*Stern-Volmer*-ova konstanta gašenja fluorescencije dostupnih Trp) je dobijena iz nagiba te prave, dok je frakcija Trp čija je fluorescencija ugašena dobijena iz preseka sa y-osom. Međutim u slučajevima odstupanja od linearnosti modifikovani *Stern-Volmer*-ov grafik (Slika 27) je aproksimiran dvema pravama koje se seku u tački koja odgovara koncentraciji kompleksa koja dovodi do konformacione promene u enzimu [151] i na svaku od ovih pravih je onda primenjena jednačina (14) kako bi se izračunali dati parametri.

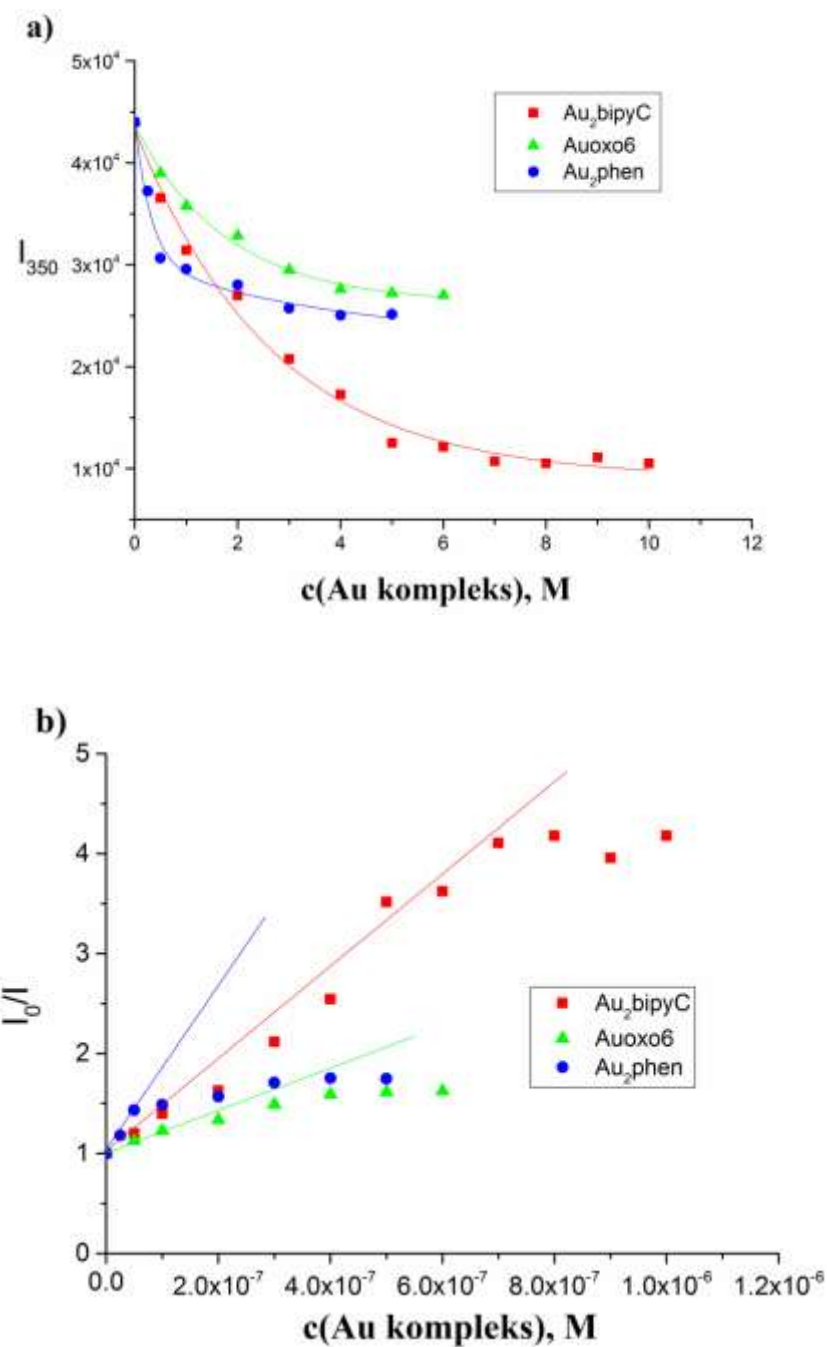
Za kompleks AubipyC tačke preseka su pri koncentracijskom odnosu protein:kompleks 1:2, za obe konformacije enzima ukazujući da nakon vezivanja dva AubipyC kompleksa dolazi do takvih konformacionih promena u enzimu kojim se gasi fluorescencija ranije nedostupnih Trp. Kod Aupy(OAc)₂ kompleksa ova tačka preseka se nalazi pri odnosu protein:kompleks 1:1 za E1 konformaciju, dok kod E2P konformacije nije primećeno odstupanje od linearnosti. Slična situacija je i kod kompleksa Aubipy(OH)₂ gde se tačka preseka nalazi pri odnosu koncentracija protein:kompleks 2:1, za E2P konformaciju i gde nemamo odstupanja od linearnosti za E1 konformaciju.

Izračunate k_q konstante za ispitivane mononuklearne komplekse u oba slučaja (E1 i E2P konformacije enzima) su $10^6 - 10^7$ reda veličine veće od maksimalne moguće vrednosti za gašenje izazvano difuzijom u vodenim rastvorima ($k_q \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Na osnovu dobijene k_q vrednosti se može zaključiti da gašenje fluorescencije Trp Na⁺/K⁺-ATPaze ispitivanim mononuklearnim kompleksima zlata(III) nije nastalo dinamičkim gašenjem već da postoji specifična interakcija između Na⁺/K⁺-ATPaze i ispitivanih kompleksa.

4.1.6.2. Uticaj binuklearnih kompleksa zlata(III) na fluorescenciju Na⁺/K⁺-ATPaze

Uticaj binuklearnih kompleksa zlata(III) na fluorescenciju Na⁺/K⁺-ATPaze je praćen u uslovima koji omogućavaju da enzim zauzme stanje koje je analogno E2P konformaciji enzima i koje je korišćeno kao model konformacije u kojem je supstrat vezan.

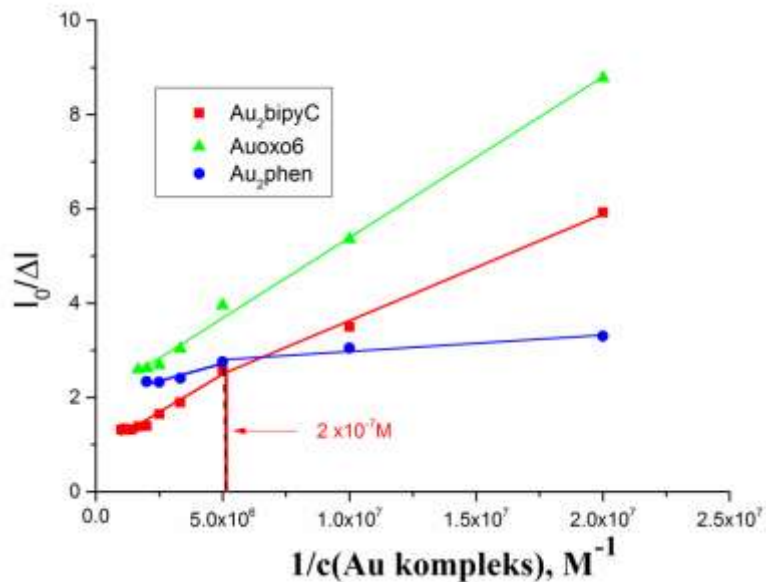
Na Slici 28a je prikazan grafik zavisnosti promene intenziteta fluorescencije na 350 nm u funkciji dodate koncentracije binuklearnih kompleksa zlata(III). Sa ove slike se može videti da ispitivani binuklearni kompleksi zlata(III) gase unutrašnju fluorescenciju Na⁺/K⁺-ATPaze u zavisnosti od svoje koncentracije. Promena fluorescencije na talasnoj dužini maksimuma emisije (350 nm) može se opisati bifaznom eksponencijalnom jednačinom, ukazujući kao i u slučaju mononuklearnih kompleksa, na postojanje više od jednog vezivnog mesta za ove komplekse.



Slika 28. a) Zavisnost intenziteta fluorescencije 1×10^{-7} M Na^+/K^+ -ATPaze na 350 nm (I_{350}), u E2P konformaciji, od koncentracije binuklearnih kompleksa zlata(III). b) *Stern-Volmer*-ov grafik gašenja Na^+/K^+ -ATPaze u E2P konformaciji, u zavisnosti od koncentracije binuklearnih kompleksa zlata(III).

Stern Volmer-ov grafik za binuklearne komplekse prikazan je na Slici 28b. Na osnovu njegovog oblika, tzv. *downward* odstupanja od linearnosti, je zaključeno da binuklearni kompleksi gase fluorescenciju Na^+/K^+ -ATPaze na sličan način kao i mononuklearni. Koristeći modifikovanu *Stern-Volmer*-ovu jednačinu datu jednačinom (14) dobijene su zavisnosti prikazane na Slici 29. Vrednosti za K_{sv} , k_q i f , izračunate su na način opisan za mononuklearne komplekse i prikazane su u Tabeli 6.

Modifikovani *Stern-Volmer*-ov grafik pokazuje linearnu zavisnost samo u slučaju Auoxo6 kompleksa, dok se za komplekse Au_2bipyC i Au_2phen primećuje odstupanje od linearnosti pri koncentraciji kompleksa 2×10^{-7} M, odnosno pri molarnom odnosu protein : kompleks, 1 : 2. Ovo odstupanje od linearnosti je pripisano, kao i u slučaju mononuklearnih kompleksa, konformacionim promenama u enzimu nastalim vezivanjem kompleksa zlata(III). Vrednosti dobijene za konstante k_q su 10^6 do 10^7 reda veličine veće od maksimalne moguće vrednosti za gašenje izazvano difuzijom u vodenim rastvorima, ukazujući na statičko gašenje unutrašnje fluorescencije Na^+/K^+ -ATPaze ispitivanim kompleksima.



Slika 29. Modifikovani *Stern-Volmer*-ov grafik gašenja fluorescencije Trp 1×10^{-7} M Na^+/K^+ -ATPaze u E2P konformaciji, u prisustvu binuklearnih kompleksa zlata(III).

Tabela 6. Parametri gašenja fluorescencije Trp Na⁺/K⁺-ATPaze u E2P konformaciji, binuklearnim kompleksima zlata(III).

	Au ₂ bipyC	Au ₂ oxo6	Au ₂ phen
k _q , M ⁻¹ s ⁻¹	6,06 × 10 ¹⁶	5,75 × 10 ¹⁶	7,56 × 10 ¹⁷
K _a , M ⁻¹	6,06 × 10 ⁶	5,75 × 10 ⁶	7,56 × 10 ⁷
K _b , M ⁻¹	3,13 × 10 ⁶	/	1,35 × 10 ⁷
f _a	0,73	0,51	0,38
f _b	0,27	/	0,12

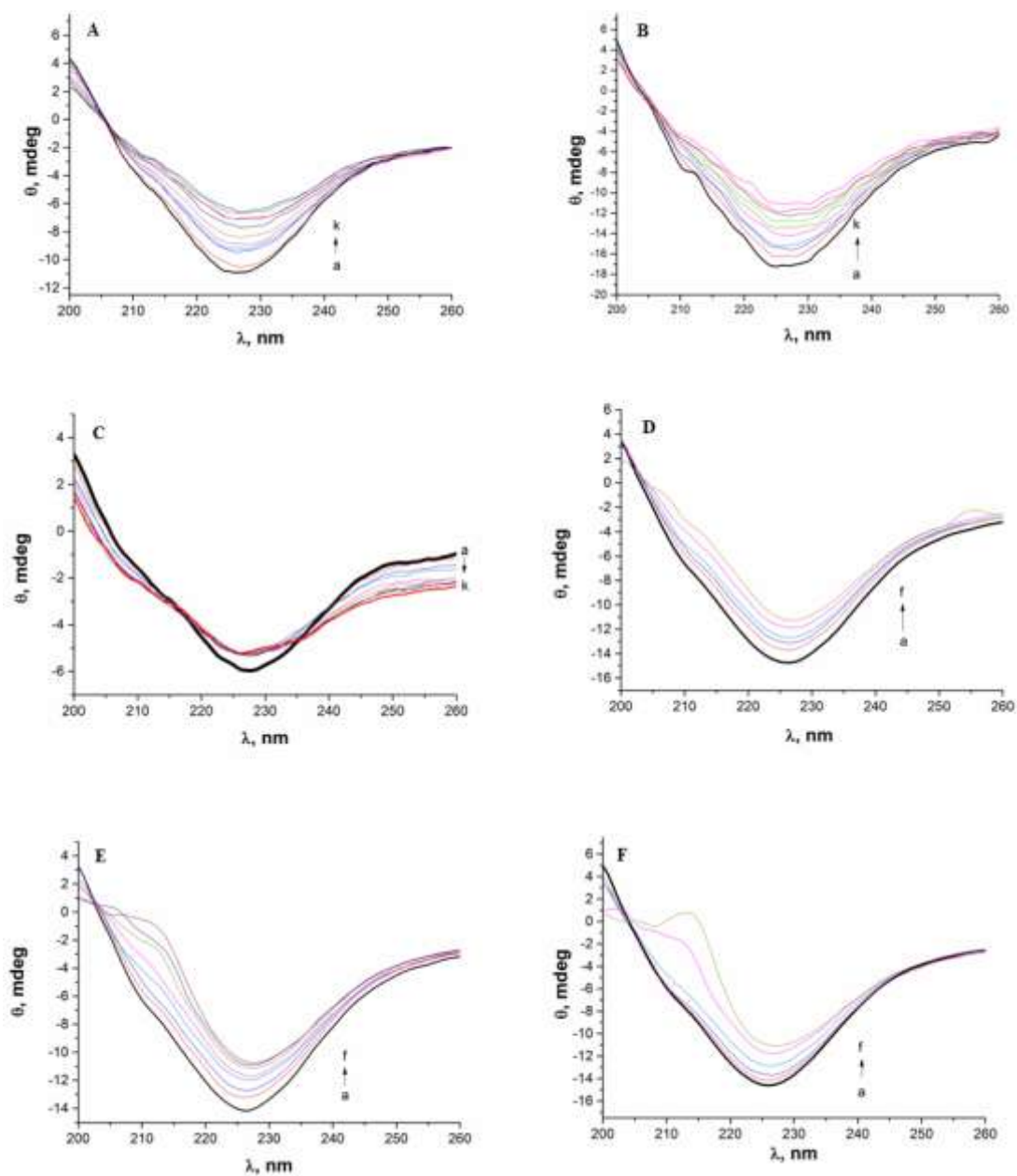
a-dostupni; b-nedostupni Trp ostaci.

4.1.7. Uticaj kompleksa zlata(III) na sekundarnu strukturu Na⁺/K⁺-ATPaze

Odstupanje od linearnosti u modifikovanom *Stern-Volmer*-ovom grafiku (Poglavlje 4.1.6.) ukazuje da dolazi do konformacionih promena u enzimu. Nastale konformacione promene u Na⁺/K⁺-ATPazi potvrđene su i metodom cirkularnog dihroizma (CD).

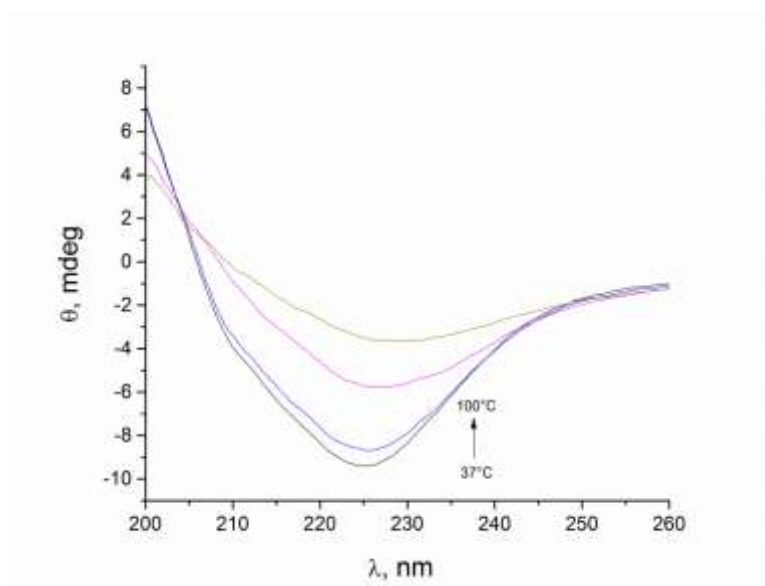
CD spektri u dalekoj UV oblasti, Na⁺/K⁺-ATPaze u rastvoru koji sadrži 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, su snimani u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija (1 × 10⁻⁶ – 1 × 10⁻⁵ M) ispitivanih kompleksa, a dobijeni spektri su prikazani na Slici 30. CD spektri komercijalne Na⁺/K⁺-ATPaze dobijeni pri primenjenim eksperimentalnim uslovima, u odsustvu ispitivanih kompleksa (linija a u spektrima na Slici 30) sadrže negativni maksimum na 225 nm kao i pozitivni maksimum u regionu ispod 200 nm. Ovakav oblik spektara ukazuje na proteine koji sadrže veliki procenat β ravni [155] u svojoj sekundarnoj strukturi. Prema literaturnim podacima sekundarna struktura Na⁺/K⁺-ATPaze u njenom E1 stanju predstavlja smešu heliksa, ravni, uvijene i nasumične strukture u sledećim odnosima: 25 % α-heliksa, 31 % β-ravni, 35 % nasumičnog klupka (*random coil*, eng.) i 9 % nabrane uvijene strukture [156]. CD spektri u zavisnosti od porasta koncentracije kompleksa zlata(III) (linije b-k) pokazuju da svi ispitivani kompleksi (A-F) izazivaju jasno koncentracijski zavisnu promenu u sekundarnoj strukturi enzima, koja se ogleda u smanjenju sadržaja α-heliksa i β-ravni

(pozitivnije vrednosti molarnog elipticiteta, θ na 225 nm) i povećanja udela nasumične strukture (negativnije vrednosti θ na 200 nm).



Slika 30. CD spektri 2×10^{-6} M Na^+/K^+ -ATPaze u zavisnosti od koncentracije kompleksa zlata(III), a - bez kompleksa; (b \rightarrow k): 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10×10^{-6} M. A: AubipyC; B: Aubipy(OH)₂; C: Aupy(OAc)₂; D: Au₂bipyC; E: Auoxo6; F: Au₂phen.

Promena CD signala Na^+/K^+ -ATPaze u njenoj E1 formi u zavisnosti od temperature prikazana je na Slici 31. Sličnost koja postoji između spektara na Slikama 30 i 31 ukazuje da ispitivani kompleksi zlata(III) dovode do denaturacije enzima u određenom procentu.



Slika 31. Termalna denaturacija Na^+/K^+ -ATPaze, CD spektri na 37, 50, 80 i 100 C°. Koncentracija enzima 2×10^{-6} M u 100 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4.

4.1.8. Evaluacija parametara interakcije kompleksa zlata(III) i enzima

Korišćenjem rezultata dobijenih fluorescentnim merenjima određeni su parametri interakcije ispitivanih kompleksa zlata(III) sa Na^+/K^+ -ATPazom, kao što su stehiometrija formiranog kompleksa enzim-ligand, konstante stabilnosti i uslovi pri kojima dolazi do saturacije primenjene koncentracije enzima odabranim kompleksima.

4.1.8.1. Scatchard-ova analiza

Kako bi dobili parametre vezivanja ispitivanih kompleksa za enzim, primenjen je Scatchard-ov (Skačard) metod kao jedan od najčešćih grafičkih metoda korišćenih u analizi ligand-protein interakcije. Koncentracija slobodnog kompleksa u rastvoru je određena iz razlike ukupne dodate koncentracije kompleksa i koncentracije vezanog kompleksa, koja je dobijena iz grafika zavisnosti $\Delta I_{350} = f(c(\text{Au kompleks}))$.

Za veliki akceptorski molekul sa N vezivnih mesta identičnih konstanti vezivanja, *Scatchard*-ov grafik je dat jednačinom (15a):

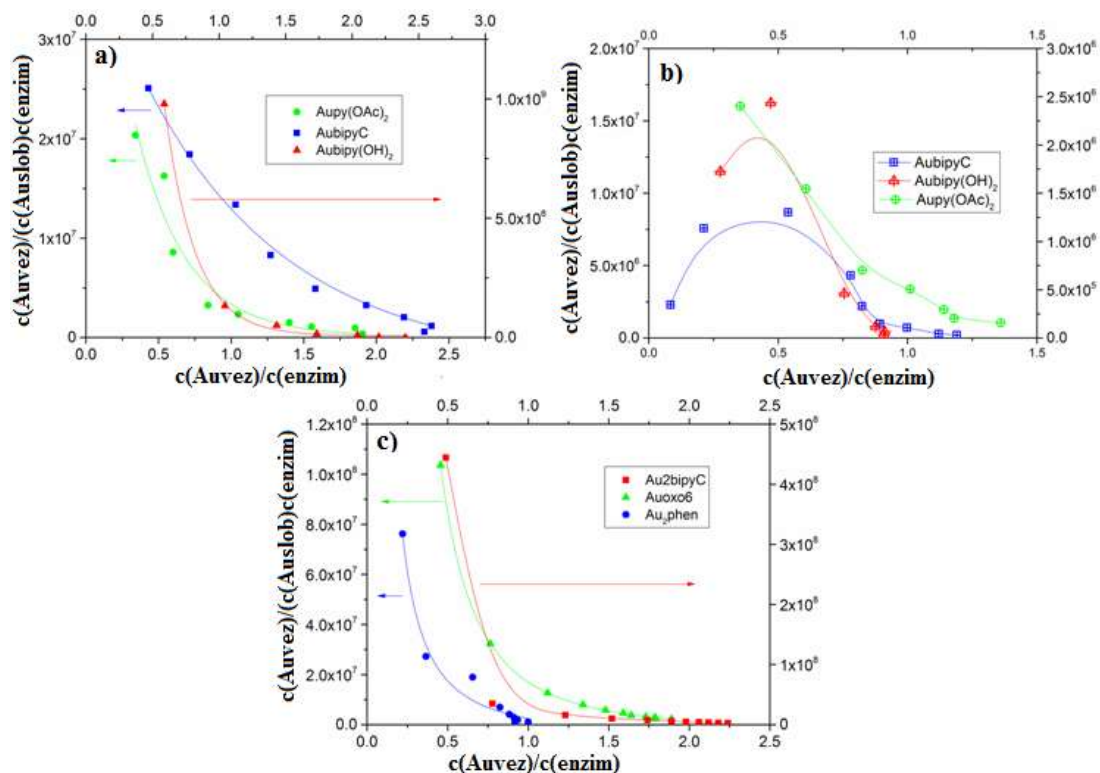
$$\frac{c(\text{Au}_{\text{vez}})}{c(\text{enzim})} = \frac{N_{\text{ukup}} K_a c(\text{Au}_{\text{slob}})}{1 + K_a c(\text{Au}_{\text{slob}})} \quad (15a)$$

ili izrazom (15b) koja predstavlja njegovu linearnu transformaciju:

$$\frac{c(\text{Au}_{\text{vez}})}{c(\text{Au}_{\text{slob}})c(\text{enzim})} = K_a N_{\text{ukup}} - K_a \frac{c(\text{Au}_{\text{vez}})}{c(\text{enzim})} \quad (15b)$$

gde je N_{ukup} ukupan broj vezivnih mesta na proteinu; K_a - konstanta asocijacije , $c(\text{Au}_{\text{slob}})$ - koncentracija slobodnog kompleksa, $c(\text{Au}_{\text{vez}})$ - koncentracija vezanog kompleksa i $c(\text{enzim})$ -koncentracija enzima.

Scatchard-ova analiza za sve ispitane komplekse je urađena primenom jednačine 15b, i grafički prikazana na Slici 32.



Slika 32. *Scatchard*-ova analiza interakcije Na⁺/K⁺-ATPaze sa ispitivanim kompleksima zlata(III). a) mononuklearni kompleksi i enzim u E1 konformaciji; b) mononuklearni kompleksi i enzim u E2P konformaciji; c) binuklearni kompleksi i enzim u E2P konformaciji.

Na graficima prikazanim na Slici 32, koji su dobijeni primenom *Scatchard*-ove jednačine (15b) za ispitivane komplekse, može se uočiti da u svim slučajevima dolazi do odstupanja od linearnosti. Linearni oblik *Scatchard*-ovog grafika je karakterističan za sistem koji ima jedan identičan i nezavistan set vezivnih mesta, dok odstupanje od linearnosti ukazuje na postojanje kooperativnosti između vezivnih mesta. *Upward* oblik (savijanje ka y-osi) *Scatchard*-ovog grafika, dobijen je za sledeće sisteme: mononuklearni kompleksi i enzim u E1 konformaciji, Aupy(OAc)₂ i enzim u E2P konformaciji, binuklearni kompleksi i enzim u E2P konformaciji. Ovaj oblik *Scatchard*-ovog grafika ukazuje na postojanje negativne kooperativnosti u vezivanju tj. vezivna mesta su identična, ali postojanje interakcije između njih vodi do vezivanja liganda na drugom mestu sa manjom konstantom asocijacije. *Downward* oblik zavisnosti dobijen

je za komplekse AubipyC i Aubipy(OH)₂ i enzim u E2P konformaciji ukazujući na pozitivnu kooperativnost u vezivanju (vezivanje liganda za jedno od mesta vezivanja povećava afinitet liganda za vezivanje na drugom mestu).

Dobijanje parametara vezivanja, N_{ukup} i K_a , iz nelinearnih *Scatchard*-ovih grafika nije moguće pa su primenjeni drugi grafički modeli kako bi došli do informacije o ovim parametrima.

4.1.8.2. Analiza saturacionih krivih

Kao što je prikazano u prethodnom poglavlju, dobijeni *Scatchard*-ovi grafici (Slika 32) odstupaju od linearnosti, ukazujući da je vezivanje ovih kompleksa za enzim kooperativni proces. Često u velikim i složenim sistemima, kao što su proteini i enzimi dolazi do vezivanja liganda za dva različita tipa vezivnih mesta. *Scatchard*-ov grafik za ovakve sisteme može imati, kao i u slučaju postojanja kooperativnosti, *upward* ili *downward* oblik, vodeći do nesuglasica sa Hill-ovim modelom koji predstavlja model postojanja kooperativnosti između jednog seta vezivnih mesta. Zbog preliminarnih rezultata koji su pokazali da ispitivani kompleksi mogu da reaguju sa Cys, His i Trp opravdano je posumnjati na postojanje više od jednog tipa vezivnih mesta na Na⁺/K⁺-ATPazi za ispitivane komplekse.

U cilju dobijanja parametara vezivanja ispitivanih kompleksa zlata(III) za enzim, konstruisani su saturacioni grafici, koji predstavljaju zavisnost koncentracije vezanog kompleksa po molu enzima od koncentracije slobodnog kompleksa zlata(III) u enzimskoj smeši. Za analizu ovako dobijenih saturacionih krivih primenjena su dva grafička modela: *Hill*-ov model (kao model koji opisuje postojanje kooperativnosti između istih vezivnih mesta na enzimu) [148] dat jednačinom (16) i model „dva vezivna mesta“ (model koji opisuje dva različita vezivna mesta) [157] opisan jednačinom (17):

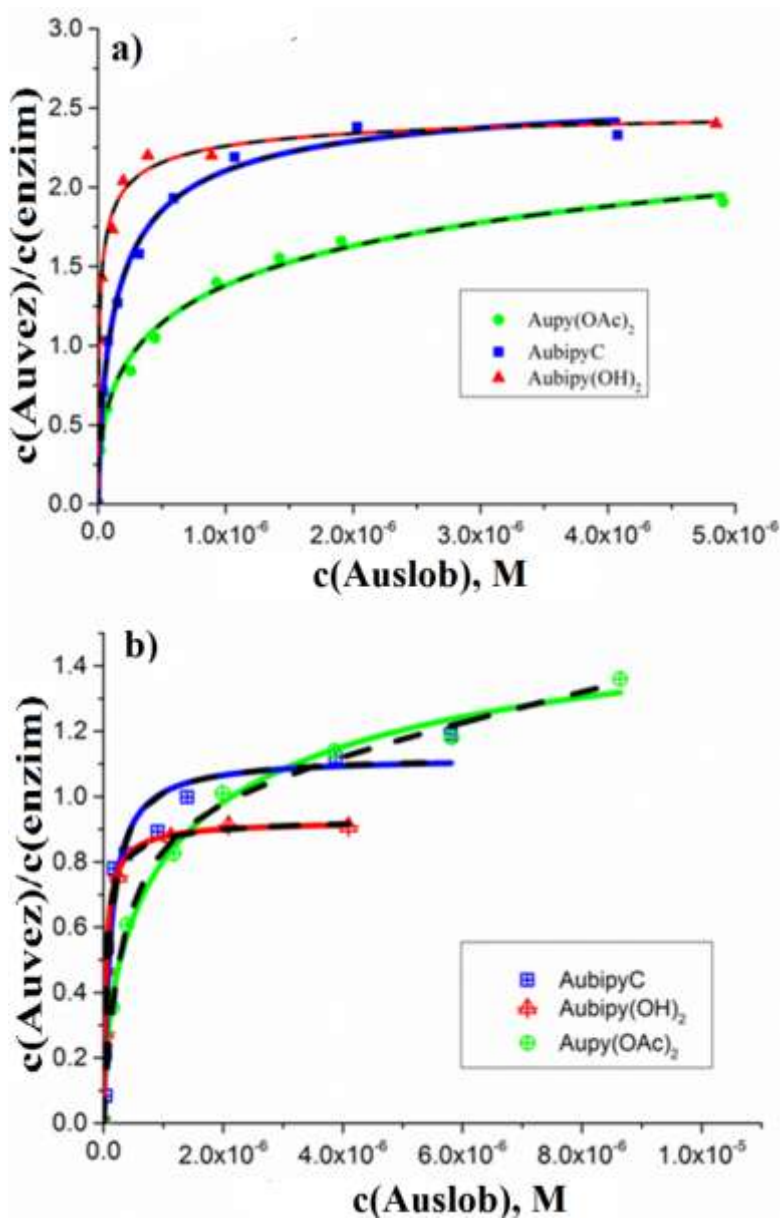
$$\frac{c(\text{Au vez})}{c(\text{enzim})} = \frac{N_{\text{ukup}} K_a c(\text{Au slob})^n}{1 + K_a c(\text{Au slob})^n} \quad (16)$$

$$\frac{c(\text{Au vez})}{c(\text{enzim})} = \frac{N_1 K_{a1} c(\text{Au slob})}{1 + K_{a1} c(\text{Au slob})} + \frac{N_2 K_{a2} c(\text{Au slob})}{1 + K_{a2} c(\text{Au slob})} \quad (17)$$

gde je n , *Hill*-ov koeficijent kooperativnosti ($n = 1$ označava nepostojanje kooperativnosti, $n > 1$ pozitivnu kooperativnost, $n < 1$ negativnu kooperativnost), K_a - konstanta asocijacije, N - broj vezivnih mesta na enzimu. Da bi se dobila kompletna slika o mehanizmu vezivanja, parametri dobijeni ovim grafičkim metodama su dalje upoređeni.

4.1.8.2.1. Analiza saturacionih krivih mononuklearnih kompleksa

Jednačinama koje opisuju različite modele vezivanja liganda za protein (jednačine (16) i (17)) fitovane su eksperimentalno dobijene saturacione krive za interakciju mononuklearnih kompleksa i enzima u E1 i E2P konformaciji (Slika 33). Dobijeni podaci: broj vezanih molova zlata po molu enzima (N), *Hill*-ov koeficijent (n) i konstanta asocijacije kompleksa enzim - ligand (K_a), prikazani su u Tabelama 7 i 8.



Slika 33. Saturacione krive vezivanja mononuklearnih kompleksa zlata(III) za Na⁺/K⁺-ATPazu u a) E1 konformaciji i b) E2P konformaciji. Tačke predstavljaju eksperimentalne podatke, a linije odgovaraju fitovanju eksperimentalnih podataka jednačinom (16) (puna linija) i jednačinom (17) (isprekidana linija).

Tabela 7. Parametri interakcije mononuklearnih kompleksa zlata(III) sa Na⁺/K⁺-ATPazom u konformaciji E1.

		Kompleks		
		Aubipy(OH) ₂	AubipyC	Aupy(OAc) ₂
Hill-ov model	N _{ukup}	2,55±0,11	2,64±0,13	3,31±0,98
	n	0,41±0,05	0,73±0,07	0,49±0,05
	K _d ×10 ⁷ M ⁻¹	0,17±0,04	1,57±0,03	14,9 ± 7,2
Model dva vezivna mesta	N ₁	1,31±0,32	0,83±0,51	0,59±0,26
	K _{d1} ×10 ⁸ M ⁻¹	0,26±0,02	2,27±0,18	14,9±1,50
	N ₂	1,11±0,10	1,71±0,37	1,41±0,23
	K _{d2} ×10 ⁷ M ⁻¹	1,17±0,67	3,09±0,5	7,46±0,25

Tabela 8. Parametri interakcije mononuklearnih kompleksa zlata(III) sa Na⁺/K⁺-ATPazom u konformaciji E2P.

	Aubipy(OH) ₂	AubipyC	Aupy(OAc) ₂
N _{ukup}	0,93±0,06	1,12±0,09	1,76±0,25
n	0,90±0,27	1,02±0,28	0,59±0,10
K _d ×10 ⁷ M	0,024±0,001	1,13±0,10	13,5±0,1

Analizom dobijenih vrednosti za konstantu disocijacije, K_d ($K_d=1/K_a$), za mononuklearne komplekse zlata, primenom ova dva modela fitovanja eksperimentalnih tačaka (Tabele 7 i 8) zaključujemo da svi ispitivani kompleksi sa enzimom grade stabilne adukte sa vrednostima konstanti disocijacije u opsegu 10^{-9} – 10^{-6} M. Konstanta disocijacije (K_d) opada sa porastom polarnosti kompleksa (Poglavlje 4.1.2.) pri

vezivanju za obe konformacije enzima, ukazujući na činjenicu da polarniji kompleksi grade stabilnije adukte sa Na^+/K^+ -ATPazom.

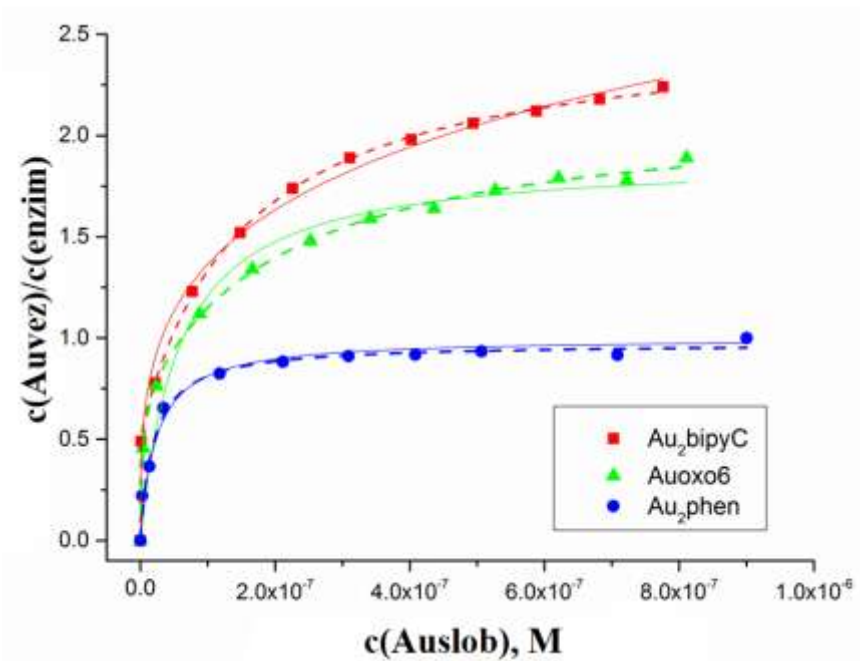
Broj vezanih molova ispitivanih mononuklearnih kompleksa zlata(III) po molu enzima zavisi od konformacije u kojoj se enzim nalazi. Primenom *Hill*-ovog modela na E1 konformaciju nađeno je da se u svim slučajevima vezuju tri mola kompleksa po molu enzima, dok je u slučaju E2P konformacije dobijeno da se po molu enzima vezuje jedan do dva mola ovih kompleksa zlata(III). Takođe, *Hill*-ova analiza u slučaju konformacije E1 ukazuje na negativnu kooperativnost, $n < 1$, dok je u slučaju E2P konformacije dobijena pozitivna kooperativnost, $n > 1$ za komplekse AubipyC i Aubipy(OH)₂. Pozitivne kooperativnosti dobijene za AubipyC i Aubipy(OH)₂ komplekse u E2P konformaciji su u saglasnosti sa prethodno urađenom *Scatchard*-ovom analizom čiji grafik ima *downward* oblik (Poglavlje 4.1.8.1.) kao i sa studijama inhibicije u kojima je nađeno da se ovi kompleksi vezuju pozitivnom kooperativnošću [70], ukazujući da je E2P konformacija ona u kojoj dolazi do inhibicije. U slučaju kompleksa Aupy(OAc)₂ je dobijena negativna kooperativnost primenom *Hill*-ovog modela, koja je potvrđena i *Scatchard*-ovom analizom (*upward* izgled grafika) što nije u saglasnosti sa inhibicionim studijama [70]. Međutim, *upward* izgled *Scatchard*-ovog grafika sugerise i na postojanje više vezivnih mesta na enzimu za ovaj kompleks umesto negativne kooperativnosti, pa je u ovom slučaju ovaj model prikladniji model za određivanje vezivnih mesta.

Analiza saturacionog grafika modelom „dva vezivna mesta“ ukazuje na mogućnost postojanja dva različita vezivna mesta za ispitivane mononuklearne komplekse. Stehiometrija vezivanja primenom ovog modela je 1 : 1 za sva vezivna mesta, osim u slučaju AubipyC kompleksa gde je 2 : 1 u korist kompleksa zlata za vezivno mesto nižeg afiniteta. Model „dva vezivna mesta“ za slučaj kada se enzim nalazi u E2P konformaciji nije dao pouzdane rezultate.

4.1.8.2.2. Analiza saturacionih krivih binuklearnih kompleksa

Analiza saturacionih krivih vezivanja binuklearnih kompleksa za Na^+/K^+ -ATPazu urađena je samo za njenu E2P konformaciju (Slika 34) primenom gore pomenuta dva

modela vezivanja liganda, a dobijene vrednosti parametara vezivanja su prikazane u Tabeli 9.



Slika 34. Saturacione krive vezivanja binuklearnih kompleksa zlata(III) za Na⁺/K⁺-ATPazu u E2P konformaciji. Tačke predstavljaju eksperimentalne podatke, a puna i isprekidana linija su fitovane vrednosti dobijene *Hill*-ovim modelom i modelom „dva vezivna mesta“, redom.

Primenom *Hill*-ovog modela (Tabela 9) nisu dobijeni pouzdani rezultati za Au₂bipyC kompleks pa on neće biti razmatran. Ostala dva kompleksa po ovom modelu grade stabilne adukte sa enzimom, dok *Hill*-ov koeficijent ukazuje na kooperativno vezivanje. Broj molova zlata koji se veže po molu enzima je ~ 2. Ovi rezultati jesu u saglasnosti sa inhibicionim studijama. Primenom modela „dva vezivna mesta“ na ove komplekse dobijamo da Au₂bipyC i Auoxo6 grade adukte sa enzimom približno slične stabilnosti kao i da je stehiometrija vezivanja ista, 2 : 1. Međutim, ovaj model nije dao pouzdane rezultate za Au₂phen, pa nije uziman u razmatranje.

Tabela 9. Parametri vezivanja binuklearnih kompleksa zlata(III) za Na⁺/K⁺-ATPazu u njenoj E2P konformaciji.

		Kompleks		
		Au ₂ bipyC	Auoxo6	Au ₂ phen
<i>Hill-ov model</i>	N _{ukup}	/	1,89±0,20	1,03±0,05
	n	/	1,00±0,27	1,00±0,18
	K _d × 10 ⁸ M	/	5,63±0,01	2,32±0,01
<i>Model dva vezivna mesta</i>	N ₁	0,53±0,03	1,44±0,40	/
	K _{d1} × 10 ⁸ M	0,013±0,001	21,40±3,54	/
	N ₂	2,01±0,02	0,72±0,06	/
	K _{d2} × 10 ⁸ M	15,1±0,8	0,30±0,08	/

/ - nisu dobijeni pouzdani rezultati.

4.1.9. Teorijsko predviđanje potencijalnih mesta vezivanja kompleksa zlata(III) za enzim

Molekulsko modelovanje interakcija Na⁺/K⁺-ATPaze sa kompleksima zlata(III) je primenjeno za predviđanje mesta vezivanja ispitivanih kompleksa za enzim. Iz Proteinske banke podataka (www.pdb.org) preuzete su kristalne strukture Na⁺/K⁺-ATPaza u E₁ konformaciji (PDB kod 4HQJ) i u E₂P konformaciji (PDB kod 2ZXE).

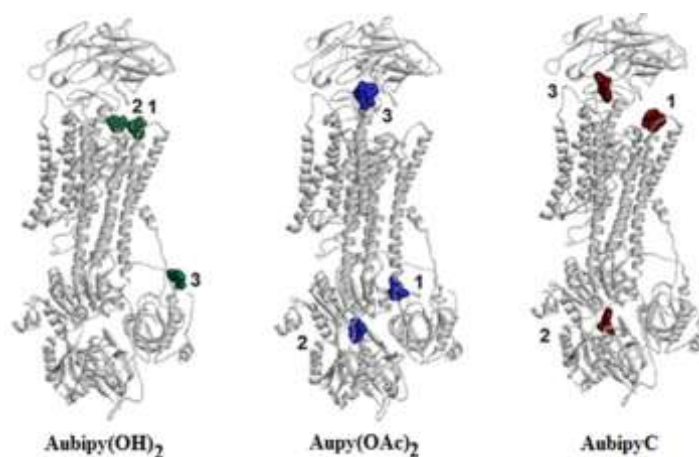
4.1.9.1. Potencijalna mesta vezivanja mononuklearnih kompleksa zlata(III) za enzim

Molekulskim modelovanjem, na osnovu vrednosti energije vezivanja ispitivanih mononuklearnih kompleksa zlata(III) za enzim, predviđeno je nekoliko mesta vezivanja nezavisno od konformacije Na⁺/K⁺-ATPaze (Slika 35 i 36). Energetski najpovoljnija mesta vezivanja kompleksa označena su brojevima od **1** do **3**, prema opadajućem

afinitetu ka vezivanju, procenjenom na osnovu vrednosti njihovih energija vezivanja prikazanih u Tabelama 10 i 11.

4.1.9.1.1. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja mononuklearnih kompleksa u E1 konformaciji enzima

Analizom rezultata dobijenih za enzim u konformaciji E1, može se uočiti da postoje najmanje tri vezivna mesta za kompleks Aubipy(OH)₂ sa relativno velikom energijom vezivanja (Tabela 10) i da su ova mesta prostorno udaljena od vezivnog mesta supstrata, ATP (Slika 42). U Tabeli 10 i na Slici 35 (pozicija vezivnih mesta u strukturi Na⁺/K⁺-ATPaze), ova mesta su označena brojevima **1**, **2** i **3** na osnovu opadajuće vrednosti energije vezivanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno urađenim studijama inhibicije, koje su pokazale da ovaj kompleks inhibira aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze nekompetitivnim mehanizmom [70]. Vezivna mesta **1** i **2** se nalaze na površini transmembranskog domena, u ekstracelularnom delu Na/K izmenjivačkog kanala (Slika 3, Poglavlje 1.2.1.). Ovakvim vezivanjem blokira se izmena jona što direktno utiče na aktivnost enzima. Ova vezivna mesta za Aubipy(OH)₂ kompleks su slična vezivnim mestima kardijačnih glikozida, koji su specifični inhibitori Na⁺/K⁺-ATPaze [158] ali se razlikuju od vezivnih mesta nađenih za cisplatin [71]. Vezivno mesto **3** se nalazi u prostoru između dve petlje.



Slika 35. Teorijski predviđena vezivna mesta ispitivanih mononuklearnih kompleksa zlata(III) na Na⁺/K⁺-ATPazi u E1 konformaciji.

Tabela 10. Procenjene energije vezivanja za energetski najpovoljnija vezivna mesta mononuklearnih kompleksa zlata(III) u E1 konformaciji Na⁺/K⁺-ATPaze.

	Energija vezivanja (kcal/mol)		
	VM 1	VM 2	VM 3
Aubipy(OH) ₂	-4,80	-4,20	-4,15
AubipyC	-5,76	-5,66	-5,42
Aubipy(OAc) ₂	-4,60	-3,99	-3,98

*VM-vezivno mesto

Energetski najpovoljnije vezivno mesto kompleksa Aupy(OAc)₂ (vezivno mesto **1**) je smešteno između A i P domena (Slika 35) u susedstvu vezivnog mesta K⁺ jona [159]. Vezivno mesto **2** sa nešto nižom energijom vezivanja se nalazi između N i P domena, u ATP vezivnom mestu (Slika 35) ukazujući na kompetitivnu inhibiciju Na⁺/K⁺-ATPaze. Vezivno mesto **3** za ovaj kompleks se nalazi između transmembranskog domena i β-podjedinice i verovatno vezivanje kompleksa na ovom mestu ne izaziva konformacione promene u enzimu koje mogu da utiču na vezivanje ATP za aktivno mesto. Koristeći informaciju da Aupy(OAc)₂ nekompetitivno inhibira aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze [70] može se zaključiti da je vezivno mesto **1** najverovatnije mesto vezivanja pod datim eksperimentalnim uslovima. S druge strane, vezivna mesta **2** i **3** su jako slična vezivnim mestima cisplatina koji inhibira aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze kompetitivnim mehanizmom [71].

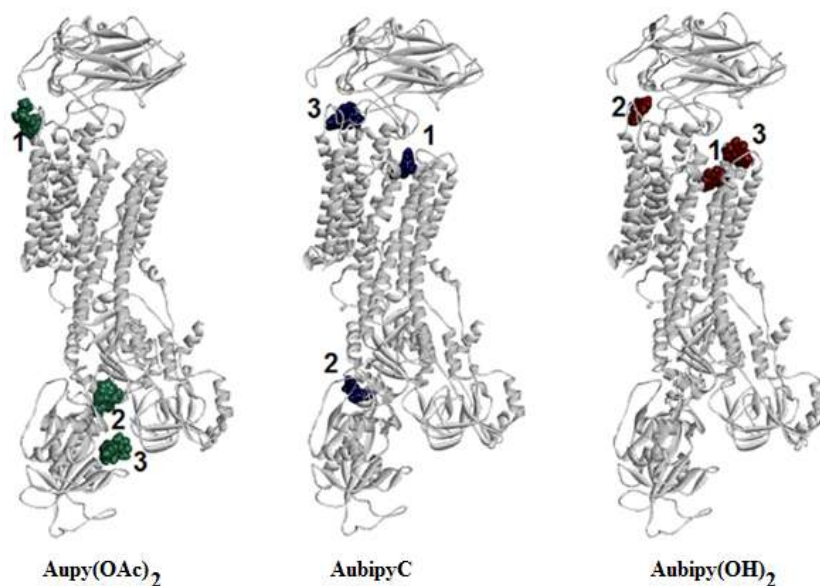
Vezivno mesto **1** za kompleks AubipyC nalazi se sa ekstracelularne strane Na/K kanala, dok je vezivno mesto **2** u isto vreme i vezivno mesto supstrata. Energije vezivanja za ove dve pozicije na enzimu su jako slične, a preferirano mesto vezivanja je određeno kinetičkim faktorom tj. manjim sternim smetnjama i manjom kompeticijom između liganada. U vezivnom mestu **2** postoji jaka kompeticija između ispitivanog kompleksa i ATP, što se ne dešava u vezivnom mestu **1**. Vezivno mesto **3** ovog kompleksa je locirano između β i γ-podjedinice. Kinetička ispitivanja i za ovaj kompleks ukazuju na nekompetitivnu inhibiciju, ukazujući na činjenicu da je vezivanje ovog kompleksa za poziciju **1** odgovorno za inhibiciju enzima.

4.1.9.1.2. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja mononuklearnih kompleksa u E2P konformaciji enzima

Analiza rezultata dobijenih molekulskim modelovanjem za enzim u E2P konformaciji (Slika 36) pokazala je takođe, kao i u slučaju E1 konformacije, postojanje najmanje tri energetski povoljna potencijalna mesta vezivanja ovih kompleksa.

Vezivna mesta Aubipy(OH)₂ kompleksa za enzim su udaljena od ATP vezivnog mesta (N domen), što ujedno potvrđuje nekompetitivnu inhibiciju enzima. Dva Aubipy(OH)₂ kompleksa se vezuju u transmembranskom domenu u jonskom kanalu, koji je odgovoran za transport Na⁺ i K⁺ jona kroz ćelijsku membranu. Drugo vezivno mesto pojačini se nalazi u vanćelijskom prostoru, između transmembranskog domena i β-podjedinice.

Vezivna mesta Aupy(OAc)₂ kompleksa se ne nalaze u transmembranskom domenu (Slika 36). U najstabilnijoj orijentaciji, kompleks metala se nalazi u vanćelijskom delu enzima, između β- i γ-subjedinice. Kod orijentacija sa nešto nižom energijom vezivanja (-3.75 i -3.73 kcal/mol) (Tabela 11), kompleksi metala se nalaze u unutarćelijskom delu enzima, između N, P i A domena, u blizini ATP vezivnog mesta. Ova dva vezivna mesta ukazuju da se u slučaju Aupy(OAc)₂ kompleksa radi o kompetitivnoj inhibiciji Na⁺/K⁺-ATPaze, što nije u saglasnosti sa kinetičkim merenjima. Na osnovu eksperimentalnih rezultata možemo zaključiti da je vezivanje Aupy(OAc)₂ kompleksa u poziciji **1** najverovatnije odgovorno za inhibiciju enzima.



Slika 36. Teorijski predviđena vezivna mesta ispitivanih mononuklearnih kompleksa zlata(III) za Na^+/K^+ -ATPazu u E2P konformaciji.

Tabela 11. Procenjene energije vezivanja za energetski najpovoljnija vezivna mesta mononuklearnih kompleksa zlata(III) u E2P konformaciji Na^+/K^+ -ATPaze.

	Energija vezivanja (kcal/mol)		
	VM 1	VM 2	VM 3
Aubipy(OH) ₂	-4,01	-3,73	-3,66
AubipyC	-6,17	-5,50	-5,45
Aubipy(OAc) ₂	-3,98	-3,75	-3,73

*VM-vezivno mesto

Energetski najpovoljnije vezivno mesto **1** za AubipyC kompleks se nalazi u jonskom kanalu koje je bogato negativno naelektrisanim amino kiselinskim ostacima. Vezivno mesto **2** se nalazi u blizini ATP vezivnog mesta dok se vezivno mesto **3** nalazi u vanćelijskom delu enzima, između trans-membranskog domena i β -podjedinice. Kako su vezivna mesta **1** i **2** jako bliska po energiji, prednost u vezivanju ima mesto koje ima bolje kinetičke predispozicije (manje sterno zaklonjeno, tj potrebna su manja pomeranja

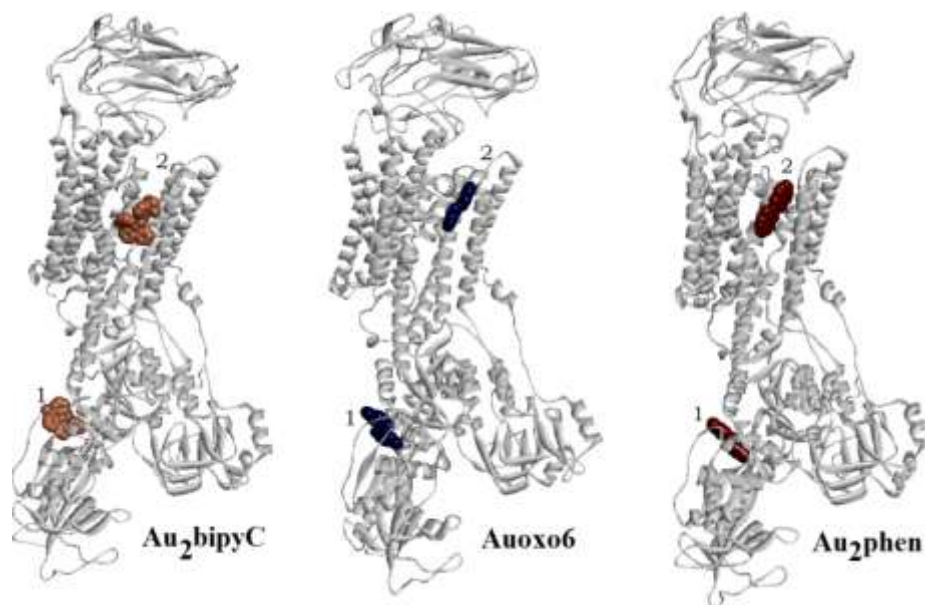
unutar enzima) i za koje ne postoji kompeticija sa drugim ligandima. Kako za prvo i treće vezivno mesto ne postoji kompeticija između AubipyC kompleksa i ATP, a koja se javlja za drugo vezivno mesto, pretpostavljamo da će se kompleks pre vezivati za ova dva mesta. U prilog tome idu i ekperimentalni podaci koji su pokazali da vezivanje ovih kompleksa u fiziološkim uslovima dovodi do nekompetitivne inhibicije enzima [70].

4.1.9.2. Potencijalna mesta vezivanja binuklearnih kompleksa zlata(III) za enzim

Molekulska modelovanje urađeno je i za interakcije Na^+/K^+ -ATPaze sa binuklearnim kompleksima i izračunate su pozicije dva energetska najpovoljnija vezivna mesta za obe konformacije E1 i E2P enzima. Rezultati su prikazani u Tabelama 12 i 13, a pozicije predviđenih vezivnih mesta su pokazane na Slikama 37 i 38.

4.1.9.2.1. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja binuklearnih kompleksa u E2P konformaciji enzima

Dobijeni rezultati pokazuju da ispitivani binuklearni kompleksi imaju ista vezivna mesta na E2P konformaciji enzima (Slika 37). Prvo vezivno mesto, **1**, koje je i ujedno i energetski najpovoljnije nalazi se u intracelularnom delu enzima između N i P domena, dok se drugo vezivno mesto, **2**, nalazi u transmembranskom delu α -podjedinice, između α -M2 i α -M6 heliksa, poznatom kao jonski kanal. U realnim uslovima, u ćeliji, pokretljivost α -M2 i α -M4 heliksa omogućava da se simultanim približavanjem generiše kanal između α -M2, α -M6 i α -M9 heliksa. U ovom kanalu se mogu naći regulatorni proteini ili lipidi u odsustvu ovih proteina. Međutim, imajući u vidu način vezivanja lipida i konformacionu pokretljivost α -M5 i α -M6 heliksa, koji su aktivni tokom katalitičkog ciklusa, pretpostavljeno je da je vezivno mesto **2** potencijalno inhibitorno mesto. Na osnovu podataka prikazanih u Tabeli 12 može se zaključiti da energije vezivanja ispitivanih kompleksa rastu sa *van der Waalsov*-om površinom ispitivanih kompleksa (Poglavlje 4.1.3.).



Slika 37. Teorijski predviđena vezivna mesta ispitivanih binuklearnih kompleksa zlata(III) za Na^+/K^+ -ATPazu u E2P konformaciji.

Tabela 12. Procenjene energije vezivanja za energetski najpovoljnija vezivna mesta binuklearnih kompleksa zlata(III) u E2P konformaciji Na^+/K^+ -ATPaze.

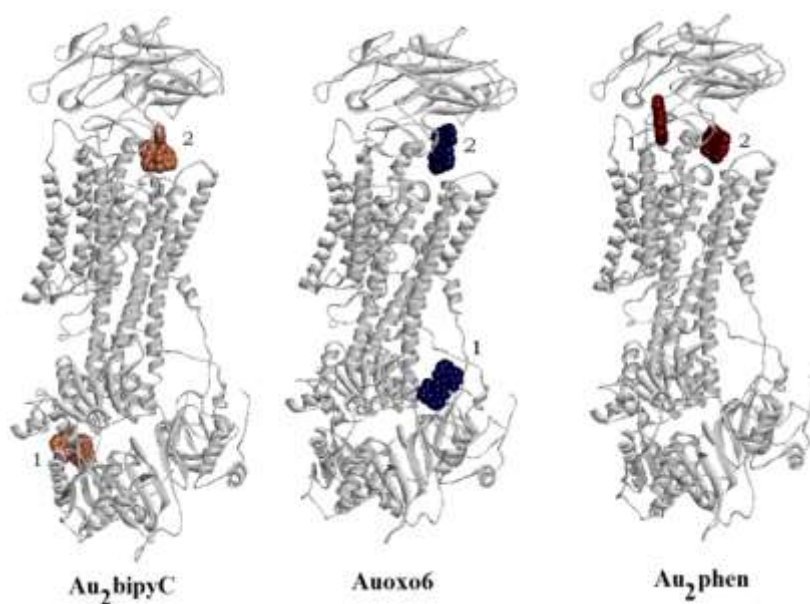
	Energija vezivanja (kcal/mol)	
	VM 1	VM 2
Auoxo6	-7,18	-7,10
Au ₂ bipyC	-8,80	-7,21
Au ₂ phen	-7,56	-7,55

*VM-vezivno mesto

4.1.9.2.2. Teorijsko predviđanje mesta vezivanja binuklearnih kompleksa u E1 konformaciji enzima

Vezivna mesta ispitivanih kompleksa u E1 konformaciji (Slika 38) zavise isključivo od njihove strukture. Energetski najpovoljnije mesto za Au₂bipyC i Auoxo6 komplekse je pozicionirano u citosolnom delu enzima. Nasuprot njima, energetski najpovoljnije vezivno

mesto za Au₂phen kompleks se nalazi u ekstracelularnom delu enzima, između β podjedinice i γ transmembranskog heliksa. Dok se Au₂bipyC vezuje između N i P domena, Auoxo6 se vezuje između A i P domena Na⁺/K⁺-ATPaze. Drugo vezivno mesto za sva tri kompleksa se nalazi sa ekstracelularne strane rasepa u enzimu, zahvaljujući kome joni ulaze i napuštaju ćeliju. Generalno, mesta vezivanja izabranih binuklearnih kompleksa su ista kao i za njihove mononuklearne analoge. Na osnovu energije vezivanja za obe konformacije datih u Tabelama 13 i 14 može se zaključiti da Au₂bipyC kompleks ima najveći afinitet vezivanja ka E2P konformaciji enzima, dok su energije vezivanja za druga dva kompleksa slične za sva predviđena vezivna mesta.



Slika 38. Teorijski predviđena vezivna mesta ispitivanih binuklearnih kompleksa na Na⁺/K⁺-ATPazi u E1 konformaciji enzima.

Tabela 13. Procenjene energije vezivanja za energetski najpovoljnija vezivna mesta binuklearnih kompleksa zlata(III) u E1 konformaciji Na⁺/K⁺-ATPaze.

	Energija vezivanja (kcal/mol)	
	VM 1	VM 2
Auoxo6	-7,17	-7,16
Au ₂ bipyC	-7,80	-7,73
Au ₂ phen	-7,61	-7,28

*VM-vezivno mesto

Procenjene energije vezivanja ispitivanih mononuklearnih kompleksa (Tabele 10 i 11) su niže od energije vezivanja procenjenih za binuklearne komplekse, ukazujući da je afinitet ispitivanih kompleksa zlata(III) ka Na⁺/K⁺-ATPazi u skladu sa *van der Waals*-ovom površinom ispitivanih kompleksa (Poglavlje 4.1.3.). Povećanjem površine prstena, raste broj aminokiselinskih ostataka koji mogu da interaguju sa ispitivanim kompleksima.

Kombinacijom rezultata dobijenih molekulskim modelovanjem i kinetičkim merenjima, može se zaključiti da se najpovoljnije vezivno mesto za Au₂bipyC i Auoxo6 kompleks nalazi u jonskom kanalu kao i u slučaju kardijačnih glikozida, koji predstavljaju specifične inhibitore Na⁺/K⁺-ATPaze [48]. Pošto kinetički rezultati ukazuju na akompetitivni mehanizam, jasno je da ovi binuklearni kompleksi zlata(III) mogu da se vezuju samo nakon vezivanja supstrata. Oslanjajući se na ovu činjenicu, najverovatniji zaključak je da je inhibitorna aktivnost ovih kompleksa povezana sa E2P konformacijom. Mehanizam inhibicije Na⁺/K⁺-ATPaze kompleksom Au₂phen je mešoviti i uključuje kompetitivnu i nekompetitivnu inhibiciju. Uzimajući u obzir ovu činjenicu i rezultate dobijene molekulskim modelovanjem, može se zaključiti da ovaj kompleks može inhibirati enzimsku aktivnost vezivanjem za predviđena mesta u obema konformacijama.

4.1.10. Distribucija aminokiselinskih ostataka enzima u vezivnim mestima kompleksa

Analiza prirode aminokiselinskih ostataka u blizini energetski najpovoljnijih vezivnih mesta za ispitivane komplekse je urađena primenom naredbe za određivanje interakcija liganada u vezivnom mestu, koja je implementirana u program *Discovery Studio Visualizer* [160].

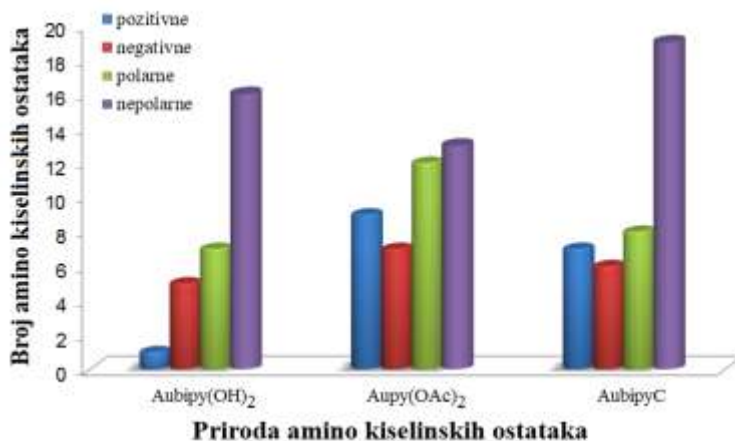
Analiza vezivnih mesta mononuklearnih kompleksa (Slika 39A) pokazala je da pozitivno naelektrisan Aubipy(OH)₂ kompleks ima izuzetno veliku težnju ka interakcijama sa nepolarnim amino kiselinama.

AubipyC kompleks, koji je takođe pozitivno naelektrisan, pokazuje težnju ka neutralnim i nepolarnim amino kiselinskim ostacima, ali i nešto veću težnju ka pozitivno naelektrisanim aminokiselinama, u odnosu na Aubipy(OH)₂ kompleks. Veći broj pozitivno naelektrisanih aminokiselina posledica je povećanja površine π -sistema AubipyC kompleksa (u poređenju sa Aubipy(OH)₂ kompleksom), usled supstitucije -OH liganada arilnim ligandom. Ovo povećanje površine praćeno je povećanjem mogućnosti kompleksa da u svom okruženju smesti veći broj aminokiselinskih ostataka, a pored toga, povećava se i površina sa parcijalno negativnim naelektrisanjem, što za posledicu ima povećanje broja pozitivnih aminokiselina u okruženju. Upravo to je i razlog da AubipyC kompleks ima veći afinitet prema enzimu od Aubipy(OH)₂ kompleksa. Zamena -OH liganada iz Aubipy(OH)₂ kompleksa acetatnim ligandom vodi smanjenju naelektrisanja kompleksa, kompleks postaje neutralan, sa nešto većom površinom od Aubipy(OH)₂ i AubipyC kompleksa, kao i manjom polarnošću. U skladu sa tim, Aupy(OAc)₂ kompleks gradi veći broj interakcija sa aminokiselinama u vezivnim mestima (u poređenju sa Aubipy(OH)₂ i AubipyC kompleksima), i manifestuje nešto veću težnju ka interakcijama sa naelektrisanim aminokiselinama, u odnosu na prethodna dva kompleksa. Naravno, i ovaj kompleks pokazuje veću težnju ka neutralnim aminokiselinama, ali kako je kompleks neutralan, to ga čini pogodnim za interakcije i sa neutralnim i sa naelektrisanim vrstama.

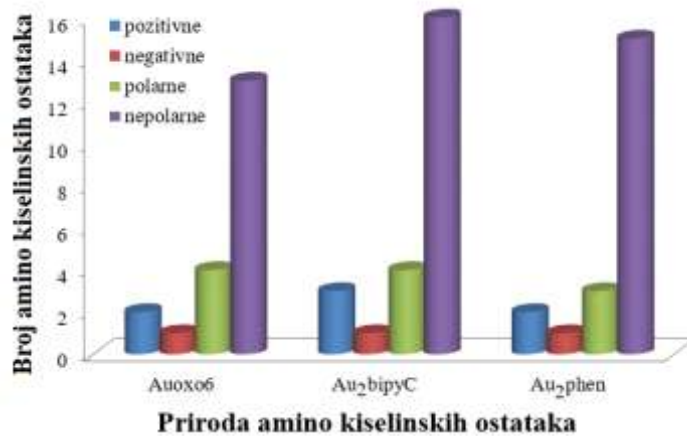
Analiza prirode aminokiselinskih ostataka u vezivnim mestima urađena je i za ispitivane binuklearne komplekse (Slika 39B). Kao i u slučaju mononuklearnih kompleksa, i binuklearni kompleksi imaju najizraženiju težnju ka interakcijama sa nepolarnim

aminokiselinama. Afinitet ka ovim aminokiselinskim ostacima može biti objašnjen posedovanjem velike površine u strukturi kompleksa koji su hidrofobne prirode (ligandi). Na osnovu dobijene analize može se zaključiti da se ispitivani binuklearni kompleksi zlata(III) vezuju u hidrofobnim delovima enzima.

a)



b)



Slika 39. Raspodela aminokiselina koje se javljaju u vezivnim mestima a) mononuklearnih kompleksa; b) binuklearnih kompleksa zlata(III) u funkciji njihove prirode.

4.1.11. Toksični efekti kompleksa zlata(III) testirani na sinaptozimima iz mozga pacova

Toksični efekti kompleksa zlata(III) su ispitani određivanjem specifične aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH), antioksidativnih enzima (katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) i parametra lipidne peroksidacije malondialdehida (MDA) u neprečišćenim sinaptozimima (presinaptički neuroni) pacova soja *Wistar albino*. Način na koji su neprečišćeni sinaptozomi pripremljeni i tretirani kompleksima opisan je u Poglavlju 3.6. Izolovani sinaptozomi tretirani su različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u toku 1,5 h na 37 °C.

4.1.11.1. Citotoksični efekti kompleksa zlata(III)

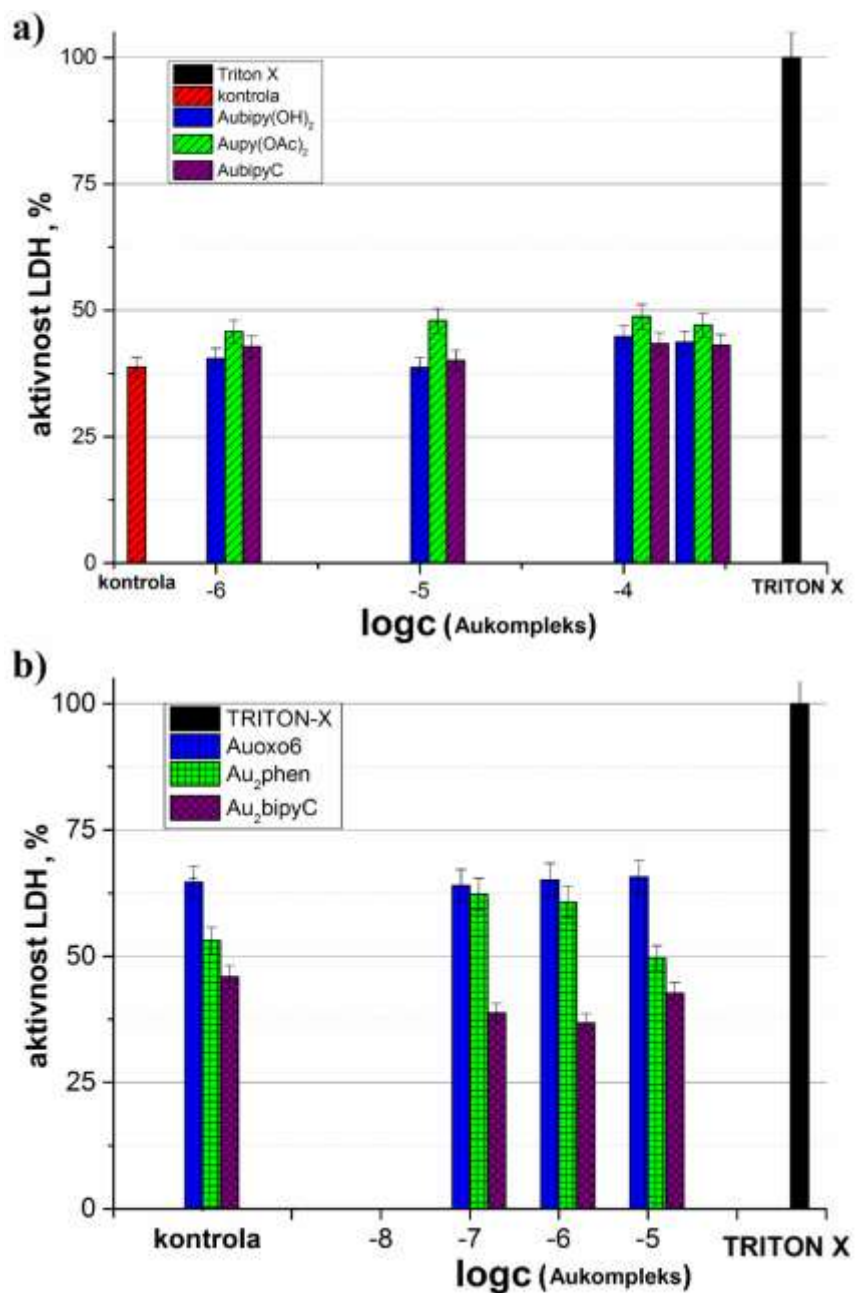
Merenjem aktivnosti LDH prema proceduri opisanoj u Poglavlju 3.8.5. ispitivani su citotoksični efekti kompleksa zlata na sinaptozimima izolovanim iz mozga pacova. Aktivnost je merena odmah nakon završenog tretmana.

Laktat dehidrogenaza je citozolni enzim koji se oslobađa u slučajevima kada dolazi do oštećenja plazma membrane pa predstavlja biomarker citotoksičnosti i citolize [160]. Katalizuje reakciju prevođenja piruvata u laktat, koristeći koenzim NADH kao donor vodonika. Reakcija je reverzibilna i na fiziološkom pH je favorizovana redukcija piruvata u laktata.

Na Slici 40 su prikazani dobijeni rezultati izraženi kao aktivnost LDH u funkciji različitih koncentracija ispitivanih kompleksa zlata. Aktivnost LDH je izražena kao % od aktivnosti dobijene u prisustvu 0,1% Tritona X koja predstavlja 100% aktivnost enzima.

Izmerene aktivnosti LDH u prisustvu kompleksa $AuPy(OAc)_2$ (Slika 40A) i Au_2phen (Slika 40B) se razlikuje najviše za 15% od kontrolne vrednosti dobijene u netretiranim sinaptozimima, dok za ostale komplekse nije postojala značajna razlika u aktivnosti LDH u odnosu na kontrolu. Poređenjem sa aktivnošću LDH dobijene u prisustvu 0,1% tritona X, kada dolazi do totalnog oslobađanja LDH iz citoplazme usled oštećenja membrane, aktivnost ovog enzima u netretiranim i tretiranim uzorcima sinaptozoma kompleksima zlata je oko 2 puta manja (Slika 40A i 40B). Ovako dobijene vrednosti

ukazuju da ispitivani kompleksi zlata(III) ne dovode do oštećenja plazma membrana tokom 1,5 h tretmana sinaptozoma, odnosno ne pokazuju citotoksično dejstvo.

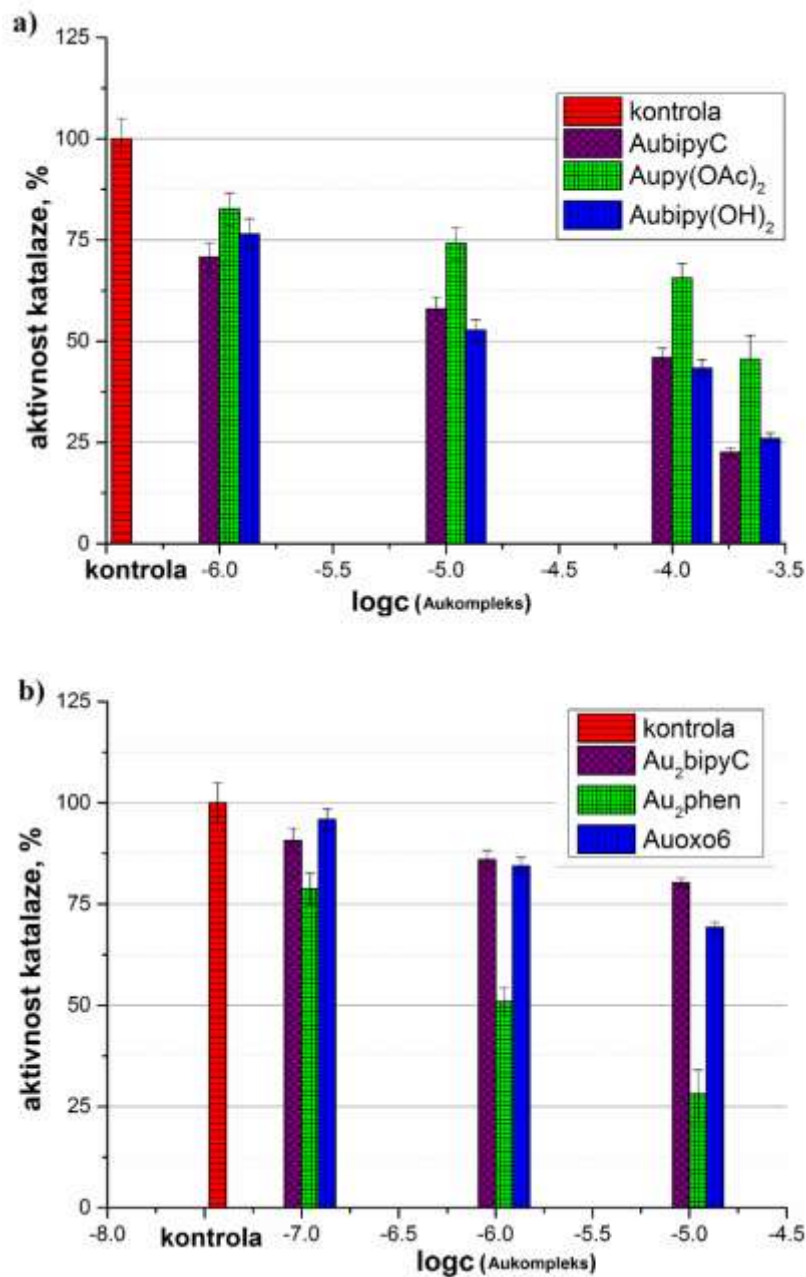


Slika 40. Uticaj kompleksa zlata na aktivnost LDH u sinaptozomima izolovanim iz mozga pacova. a) Uticaj mononuklearnih kompleksa zlata(III) koncentracije: 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} i 2×10^{-4} M; b) Uticaj binuklearnih kompleksa zlata(III) koncentracije: 1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} M.

4.1.11.2. Prooksidativna svojstva kompleksa zlata(III)

Prooksidativna svojstva kompleksa zlata procenjena su merenjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, CAT i GPx u neprečišćenim sinaptosomima izolovanim iz mozga pazova, nakon 1,5 h tretmana različitim koncentracijama ovih kompleksa. Metode za određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima su opisane u Poglavljima 3.8.3 i 3.8.4.

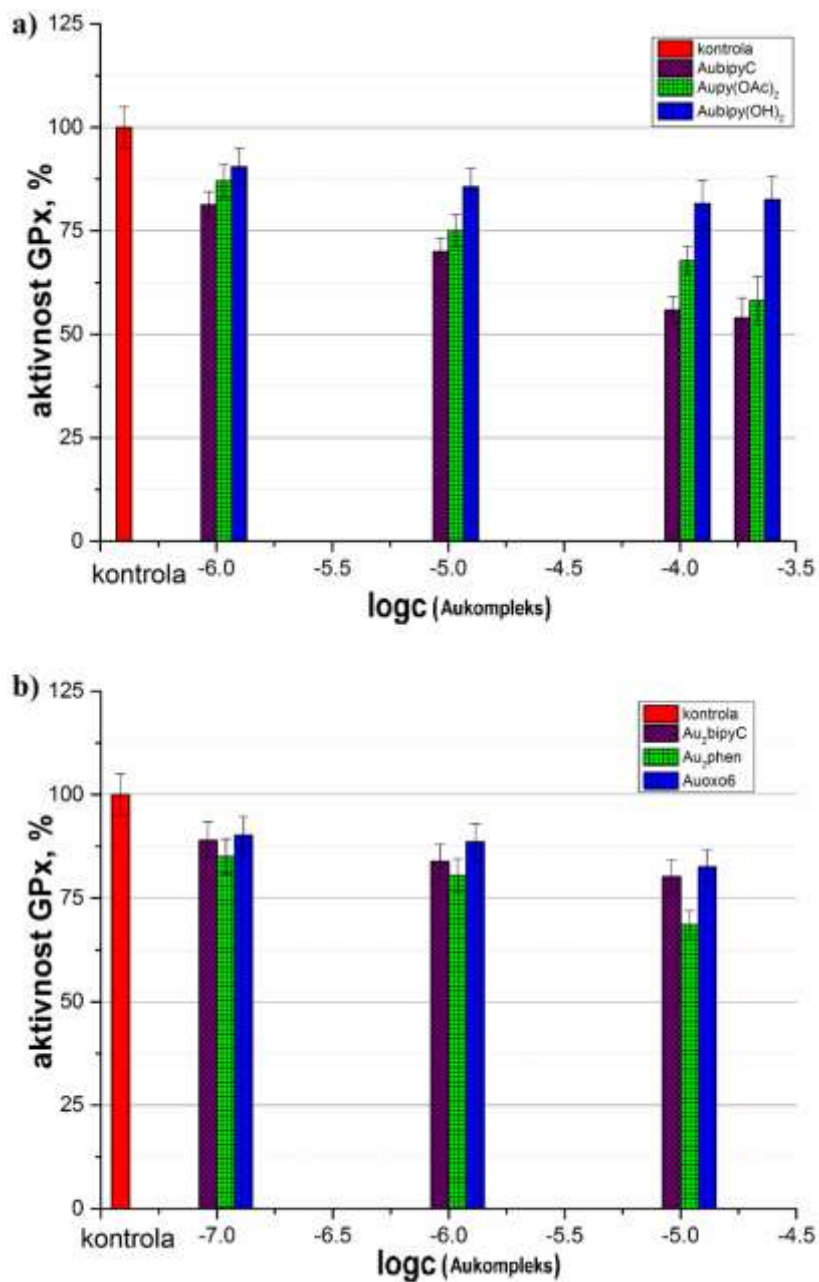
Na Slikama 41 i 42 su prikazane dobijene aktivnosti CAT i GPx, enzima koji kao supstrat koriste vodonik-peroksid, u zavisnosti od koncentracije ispitivanih kompleksa zlata, kao i kontrolna vrednost za netretirane sinaptosome.



Slika 41. Uticaj kompleksa zlata(III) na aktivnost katalaze u sinaptozomima izolovanim iz mozga pacova. a) Uticaj mononuklearnih kompleksa zlata(III) koncentracije: 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} i 2×10^{-4} M; b) Uticaj binuklearnih kompleksa zlata(III) koncentracije 1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} M.

Dobijeni rezultati su pokazali da ispitivani mononuklearni i binuklearni kompleksi zlata smanjuju aktivnost katalaze na koncentracijski zavistan način. Inhibitorna sposobnost ispitivanih kompleksa zlata može biti objašnjena interakcijom Au(III) jona sa

aminokiselinama His, Asp (asparaginska kiselina) ili Phe (fenilalanina) koje ulaze u sastav aktivnog mesta enzima [162] a prema kojima Au joni pokazuju veliki afinitet. Mononuklearni kompleksi $\text{Au}(\text{bipy})\text{C}$ i $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2$ su se pokazali kao bolji inhibitori ovog enzima u odnosu na svoje strukturne dimere $\text{Au}_2(\text{bipy})\text{C}$ i $\text{Au}_2(\text{oxo})_6$. IC_{50} vrednost ovih mononuklearnih kompleksa je oko 1×10^{-5} M dok ova koncentracija binuklearnih kompleksa inhibira oko 25% aktivnosti CAT. Bolja inhibitorska sposobnost se verovatno može objasniti prisustvom lako odlazeće $-\text{OH}$ grupe u mononuklearnim kompleksima. Poređenjem inhibitornih sposobnosti binuklearnih kompleksa vidi se da je uloga liganda takođe važna pa se može slobodno zaključiti da su fenantrolinski kompleksi bolji inhibitori CAT od bipyridinskih.



Slika 42. Uticaj kompleksa zlata(III) na aktivnost GPx u sinaptozomima izolovanim iz mozga pacova. a) Uticaj mononuklearnih kompleksa koncentracije: 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} i 2×10^{-4} M; b) Uticaj binuklearnih kompleksa koncentracija: 1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} M.

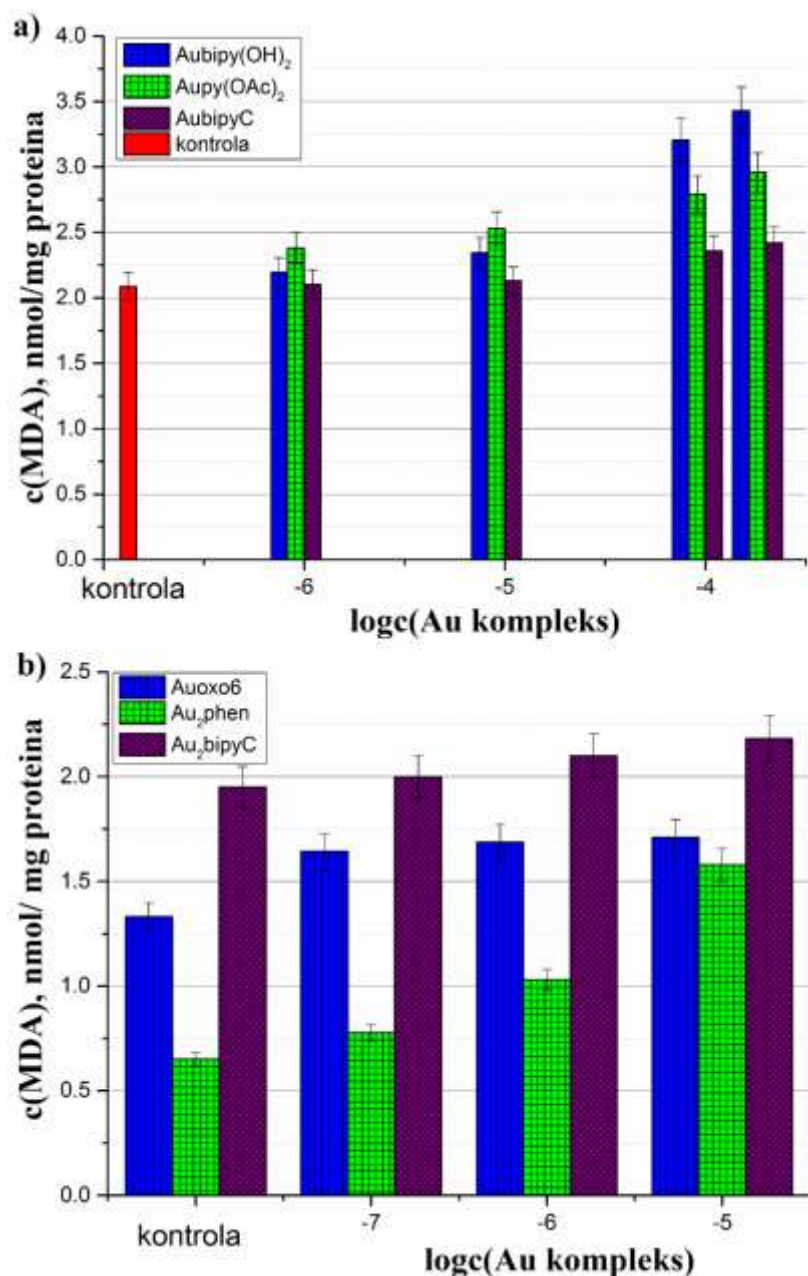
Slika 42 pokazuje da u uzorcima tretiranim kompleksima zlata takođe dolazi i do koncentracijski zavisnog smanjenja aktivnosti GPx u odnosu na kontrolnu vrednost. Inhibicija aktivnosti GPx se može objasniti velikim afinitetom kompleksa zlata ka Cys

(cistein) i selenocisteinu koji se nalaze u aktivnom mestu ovog enzima dok je inhibitorna sposobnost mononuklearnih i binuklearnih kompleksa slična.

Inhibicijom CAT i GPx kompleksima zlata(III) dolazi do promena u redoks stanju ćelije što dovodi do povećane produkcije vodonik peroksida i drugih lipidnih peroksida. Značajno povećanje u intracelularnoj koncentraciji H_2O_2 izazvano inhibicijom ovih enzima dovodi do ćelijske smrti apoptozom. U ćelijama tumora aktivnost GPx i katalaze je veća u odnosu na zdravu ćeliju, kao odgovor tumorskih ćelija na izazvani oksidativni stres zbog ubrzane ćelijske proliferacije, tako da inhibicija ovih enzima može imati povoljan efekat. Međutim u zdravim ćelijama inhibicija ovih enzima ima samo štetan efekat i može dovesti do iniciranja lipidne peroksidacije što je potvrđeno eksperimentom u poglavlju 4.1.11.3.

4.1.11.3. Uticaj kompleksa zlata(III) na lipidnu peroksidaciju

Uticaj mononuklearnih i binuklearnih kompleksa zlata(III) na lipidnu peroksidaciju je praćen merenjem sadržaja MDA, proizvoda lipidne peroksidacije i markera lipidnog oštećenja membrane u sinaptozomima nakon 1,5 h tretmana različitim koncentracijama ovih kompleksa. Metoda za određivanje sadržaja MDA je prikazana u Poglavlju 3.8.6. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 43.



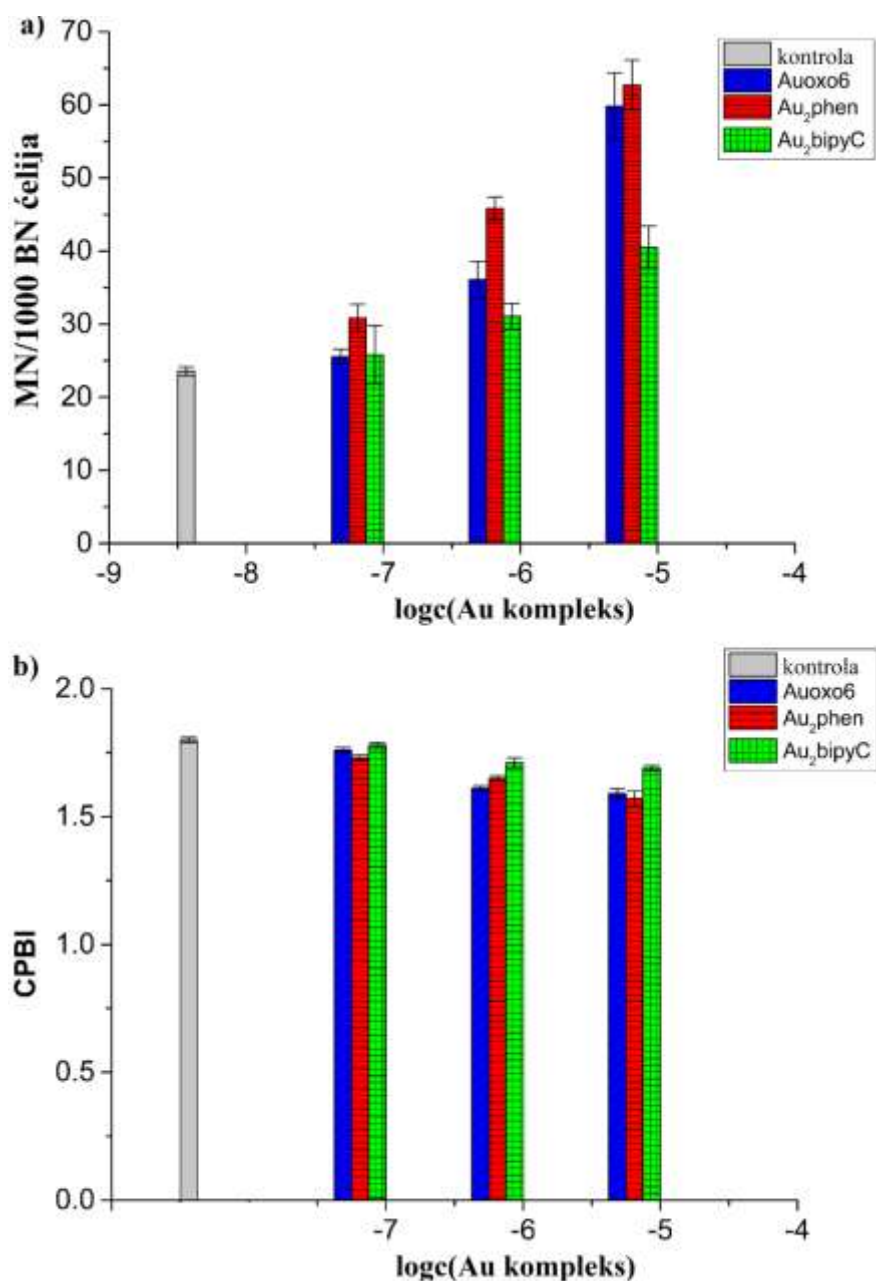
Slika 43. Sadržaj parametra lipidne peroksidacije, MDA, u sinaptozomima tretiranim različitim koncentracijama kompleksa zlata(III). a) Mononuklearnim kompleksima koncentracije 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} i 2×10^{-4} M; b) Binuklearnim kompleksima koncentracije: 1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} M.

Prikazani rezultati (Slika 43) pokazuju da ispitivani mononuklearni i binuklearni kompleksi zlata(III) dovode do značajnog povećanja sadržaja malondialdehida (> 25 %) pri višim koncentracijama kompleksa u odnosu na netretirane sinaptosome (kontrola).

Inhibicijom katalaze i GPx ovim kompleksima došlo je do povećane produkcije H₂O₂ i drugih lipidnih peroksida. Nastali H₂O₂ u prisustvu metalnog jona inicira proces lipidne peroksidacije čiji je krajnji proizvod malondialdehid čija je povećana koncentracija primećena za sve komplekse.

4.1.12. Genotoksični efekti binuklearnih kompleksa zlata(III) testirani na humanim limfocitima

Genotoksični efekti binuklearnih kompleksa zlata(III) su određeni analizom učestalosti mikronukleusa (MN/1000 binukleusnih ćelija), kao indikatora genomskih ozleda i indeksa (potencijala) ćelijske proliferacije, CBPI, kao indikatora rasta ćelija u kulturama limfocita periferne krvi, tretiranim različitim koncentracijama rastvora binuklearnih kompleksa zlata (1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} M) u fosfatnom puferu, pH 7,4. Rezultati su prikazani na Slici 44.



Slika 44. Učestalost mikronukleusa (a) i citokinezis-blok proliferativni indeks (b) u kulturama limfocita tretiranim binuklearnim kompleksima zlata(III). Koncentracije kompleksa: 1×10^{-7} , 1×10^{-6} i 1×10^{-5} M. MN-mikronukleus, BN-binukleusna ćelija.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kompleksi Au₂phen ($p < 0,05$) i Auoxo6 ($p < 0,01$) dovode do povećanja učestalosti mikronukleusa pri svim ispitivanim koncentracijama, dok kompleks Au₂bipyC značajno povećava učestalost mikronukleusa samo pri najvećoj primenjenoj koncentraciji (Slika 44a). Au₂phen kompleks ima

snažnije genotoksične efekte ($p < 0,05$) u odnosu na Auoxo6 i Au₂bipyC čak i pri najmanjoj ispitanoj koncentraciji. Najniže primenjene koncentracije kompleksa Auoxo6 i Au₂bipyC imaju slične genotoksične efekte i ne menjaju značajno učestalost mikronukleusa u odnosu na kontrolu (Slika 44a).

Značajno smanjenje citokinezis-blok proliferativnog indeksa (CBPI) je opaženo u svim ćelijskim kulturama tretiranim kompleksima Au₂phen i Auoxo6 ($p < 0,001$), dok kompleks Au₂bipyC dovodi do smanjenja CBPI jedino pri višim koncentracijama ($p < 0,05$). Utvrđeno je da sa porastom učestalosti mikronukleusa, opada proliferativni potencijal limfocita u svim tretiranim uzorcima. Linearna regresiona analiza je pokazala statistički značajnu negativnu korelaciju između ispitivanih parametara ($r = -0,96$, $p < 0,005$). Na osnovu dobijenih rezultata moguće je zaključiti da u simuliranim biološkim uslovima, svi ispitivani binuklearni kompleksi izazivaju genotoksične efekte na koncentracijski zavistan način. Najverovatnije, razlike u sposobnosti indukovanja genotoksičnih efekata mogu biti objašnjene njihovom različitom stabilnošću pri fiziološkim uslovima (Poglavlje 4.1.1.). Bipiridini, fenantrolini kao i njihovi derivati izazivaju oštećenje molekula DNK [163,164] koje može dovesti do ćelijske smrti. U Poglavlju 4.1.1. je pokazano da jedino kompleks Au₂bipyC ostaje stabilan u dužem vremenskom periodu. Ostala dva kompleksa, Auoxo6 i Au₂phen, podležu strukturnim promenama i otpuštanju liganada. Može se zaključiti da otpuštanje bipiridinskih i fenantrolinskih liganada zbog manje stabilnosti kompleksa pri fiziološkim uslovima može imati značajan uticaj na genotoksičnost ispitivanih kompleksa.

4.2. Interakcija poliooksovolframata sa acetilholinesterazom

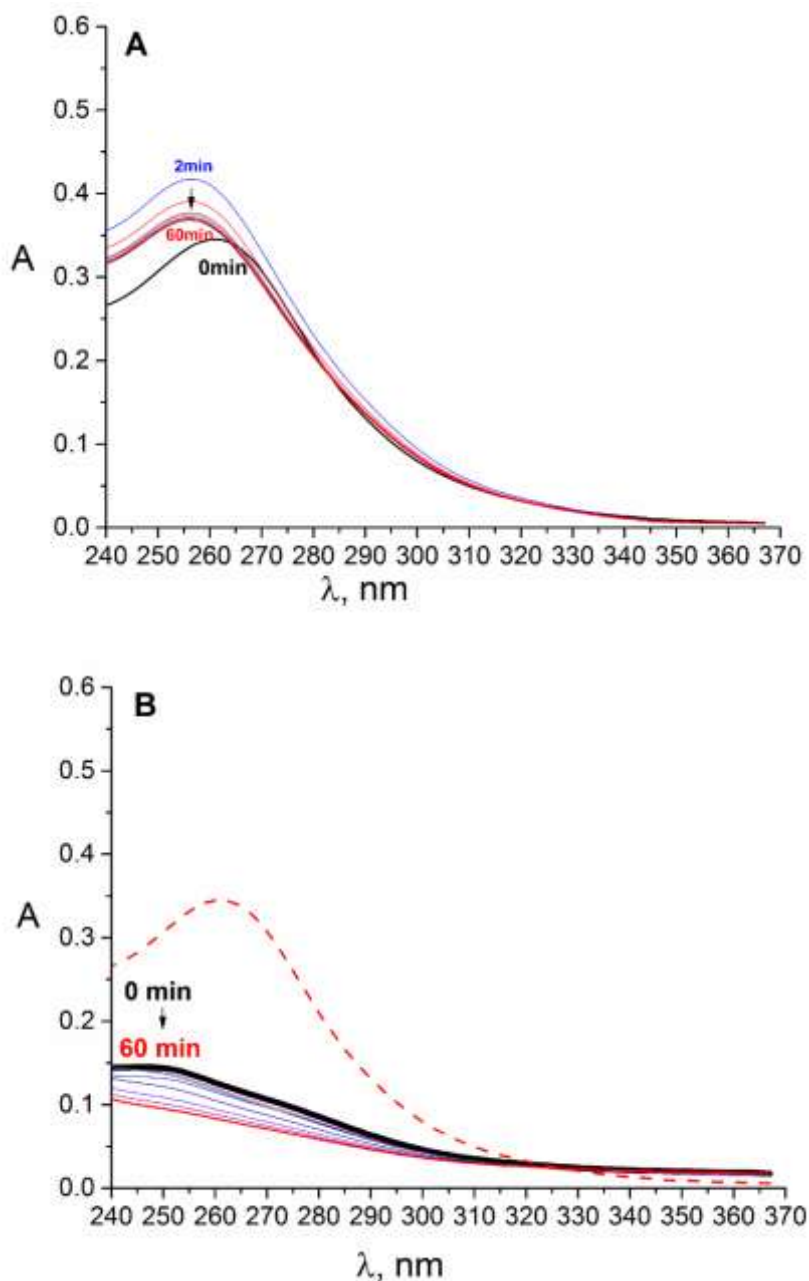
U ovom poglavlju ispitan je uticaj 12-volframsilicijumove (WSiA) i 12-volframfosforne kiseline (WPA) na enzim acetilholinesterazu (AChE), kombinacijom različitih eksperimentalnih tehnika koje su korelirane sa teorijskim proračunima.

4.2.1. Stabilnost poliooksovolframata na pH 3,5 i 8

Stabilnost ispitivanih POM-ova je praćena spektrofotometrijski, na sobnoj temperaturi, u toku 1 h u dejonizovanoj vodi nakon rastvaranja odgovarajućeg POM-a, pH ~ 3,5, kao i u 50 mM fosfatnom puferu (FP) pH 8, na kome AChE ima maksimalnu aktivnost

(Poglavlje 3.8.2.). Dobijeni apsorpcioni spektri ispitivanih jedinjenja prikazani su na Slikama 45 i 46.

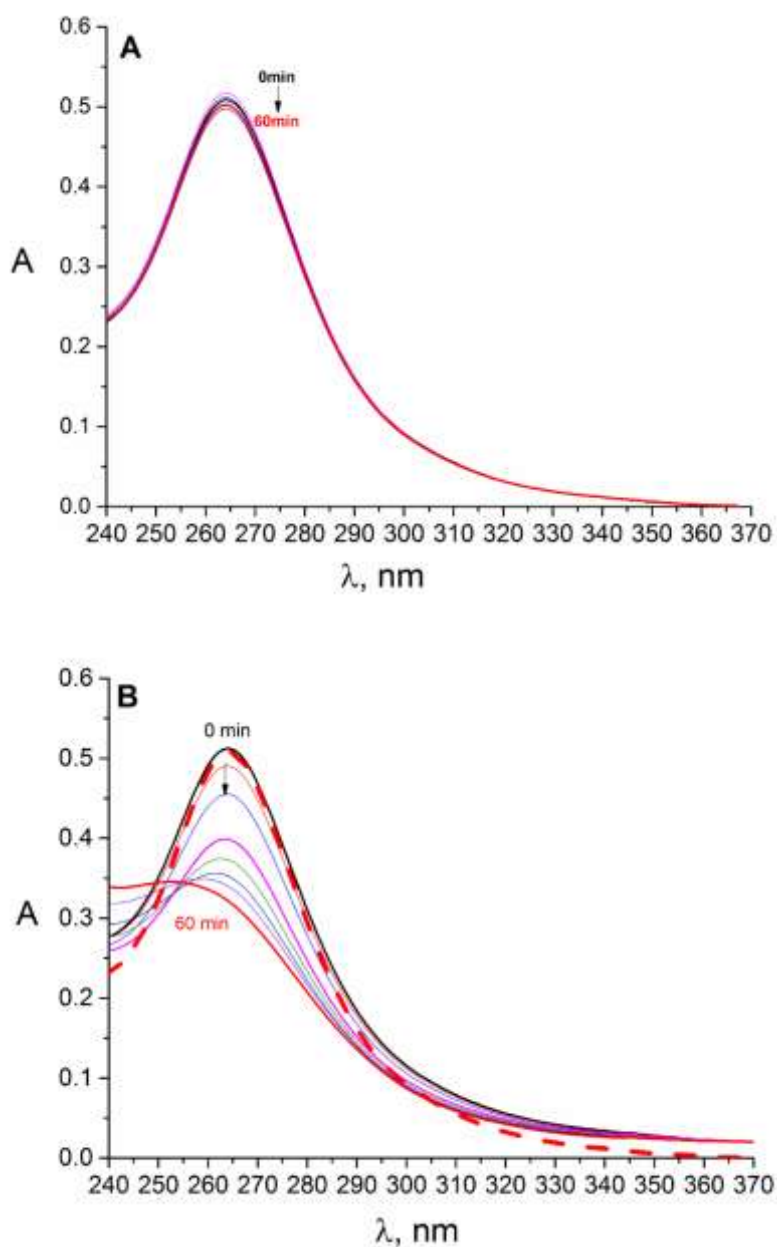
Kada se POM-ovi nalaze u vodi (Slike 45A i 46A), dolazi do manjih transformacija u odnosu na trenutak rastavaranja ($t = 0$) zato što POM nakon određenog vremena zauzima svoju konačnu formu u kojoj ostaje u toku dužeg vremenskog perioda. U slučaju kada se ispitivani POM-ovi nalaze u 50 mM FP pH 8, dolazi do značajne promene apsorpcionog spektra, ukazujući na hemijske transformacije ispitivanih jedinjenja pri datim eksperimentalnim uslovima.



Slika 45. Apsorpcioni spektar 1×10^{-5} M WPA u: A) dejonizovanoj vodi, finalno pH 3,5 i B) u 50 mM fosfatnom puferu, pH 8. Isprekidanim crticama pod B je prikazan spektar WPA u vodi u $t = 0$ radi poređenja.

Većina heteropolikiselina koja poseduje W u svojoj strukturi je stabilna u kiseloj sredini. Prema literaturnim podacima dobijenim na osnovu ^{189}W NMR merenja, u vodenoj sredini u opsegu pH vrednosti od 2,5 – 7,5, WPA ($\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$) se uglavnom nalazi u monolakunarnoj formi *Keggin*-ove strukture $[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}]^{7-}$, dok u opsegu pH

vrednosti od 7,5 – 8 dolazi do njegovog daljeg razlaganja do trilakunarne forme, $[\text{PW}_9\text{O}_{34}]^{11-}$. Na pH vrednostima višim od 8 dolazi do potpunog razlaganja na fosfatni, HPO_4^{2-} , i wolframadni jon WO_4^{2-} [74,165].



Slika 46. Apsorpcioni spektar 1×10^{-5} M WSiA u: A) dejonizovanoj vodi, finalno pH 3,5 i B) u 50 mM fosfatnom puferu pH 8. Isprekidanim crticama pod B je prikazan spektar WSiA u vodi u $t = 0$ radi poređenja.

WSiA ($H_4[SiW_{12}O_{40}]$) je daleko stabilnija u vodi od WPA, na šta ukazuju i manje izražene promene u apsorpcionom spektru, Slika 46A. Ovaj POM je stabilan u opsegu $pH < 8$ i nalazi se u obliku *Keggin*-ove strukture, $[SiW_{12}O_{40}]^{4-}$, [166] što je u saglasnosti sa prikazanim UV/Vis spektrima. Pri $pH < 8,9$, WSiA se uglavnom nalazi u monolakunarnoj formi *Keggin*-ove strukture, $[PW_{11}O_{39}]^{7-}$.

Na osnovu navedenih literaturnih podataka, kao i na osnovu spektrofotometrijskih ispitivanja u ovoj tezi, može se zaključiti da se u 50 mM fosfatnom puferu ispitivani POM-ovi, WPA i WSiA, nalaze u lakunarnim oblicima *Keggin*-ove strukture, i to u trilakunarnom i monolakunarnom, redom.

4.2.2. Particioni koeficijent poliooksovolframata

Particioni koeficijent ispitivanih POM-ova, izražen kao logaritam, $\log P$ je određen na temperaturi od 25 °C u konvencionalnom dvofaznom sistemu n-oktanol/dejonizovana voda, korišćenjem standardne *shake-flask* metode (metodom mućkanja u bočici). Dobijene srednje $\log P$ vrednosti za tri merenja su prikazane u Tabeli 14.

Tabela 14. Vrednosti partitionog koeficijenta ispitivanih POMova.

POM	$\log P$
WPA	-0,29
WSiA	-0,47

Na osnovu dobijenih vrednosti za $\log P$ može se zaključiti da se ispitivana jedinjenja u nekom procentu mogu rastvoriti u n-oktanolu, kao model sistemu za ćelijske membrane, implicirajući da ova jedinjenja mogu proći neometano kroz ćelijsku membranu. Takođe, ispitivani POM-ovi zadovoljavaju kriterijum $\log P < 4$, [167] za lekove namenjene u lečenju bolesti centralnog nervnog sistema. Međutim, prolaz kroz membranu je verovatno otežan usled velikog negativnog naelektrisanja koje se nalazi na POM-ovima.

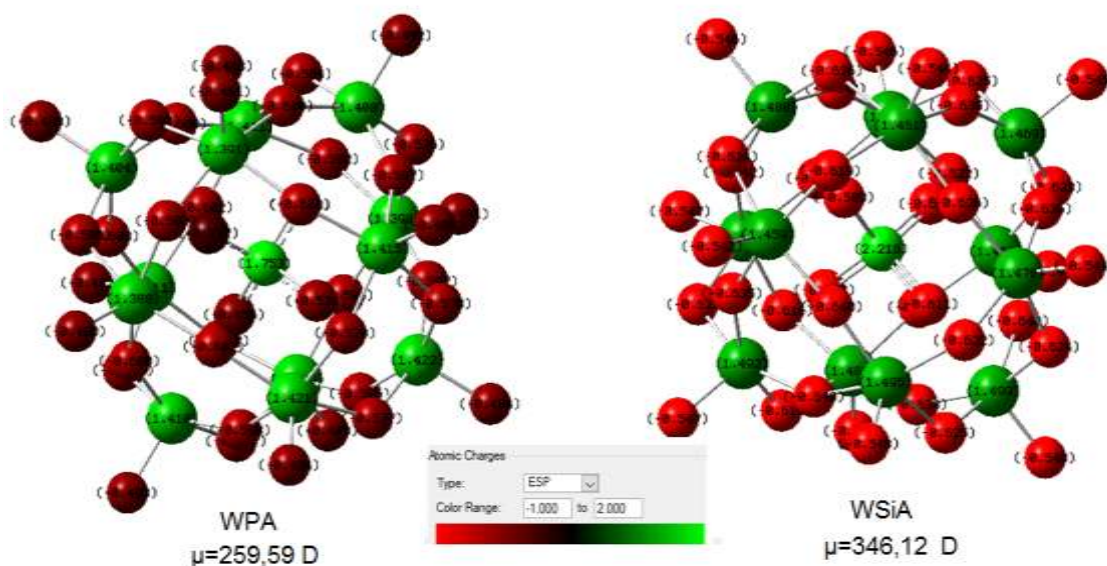
4.2.3. Teorijski proračuni dipolnog momenta, raspodele naelektrisanja, površine i zapremine poliooksovolframata

Teorijski proračuni za procenu dipolnog momenta, raspodele naelektrisanja, ukupne površine i zapremine ispitivanih POM-ova su urađeni sa ciljem njihove dalje karakterizacije. Proračuni su rađeni na optimizovanim strukturama POM-ova, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 15.

Tabela 15. Izračunate vrednosti dipolnog momenta, zapremine i površine POM-ova.

POM	Dipolni moment, D	Zapremina, Å ³	Površina, Å ²	Dužina M-O veze, Å
WSiA	346,12	627,2	500,4	1,55
WPA	259,90	611,4	525,6	1,64

Iako ispitivani POM-ovi pripadaju istoj klasi heteropolikiselina koje odlikuje ista struktura *Keggin*-ovog tipa, izračunate vrednosti dipolnih momenata (Tabela 15), nisu slične (Slika 47).



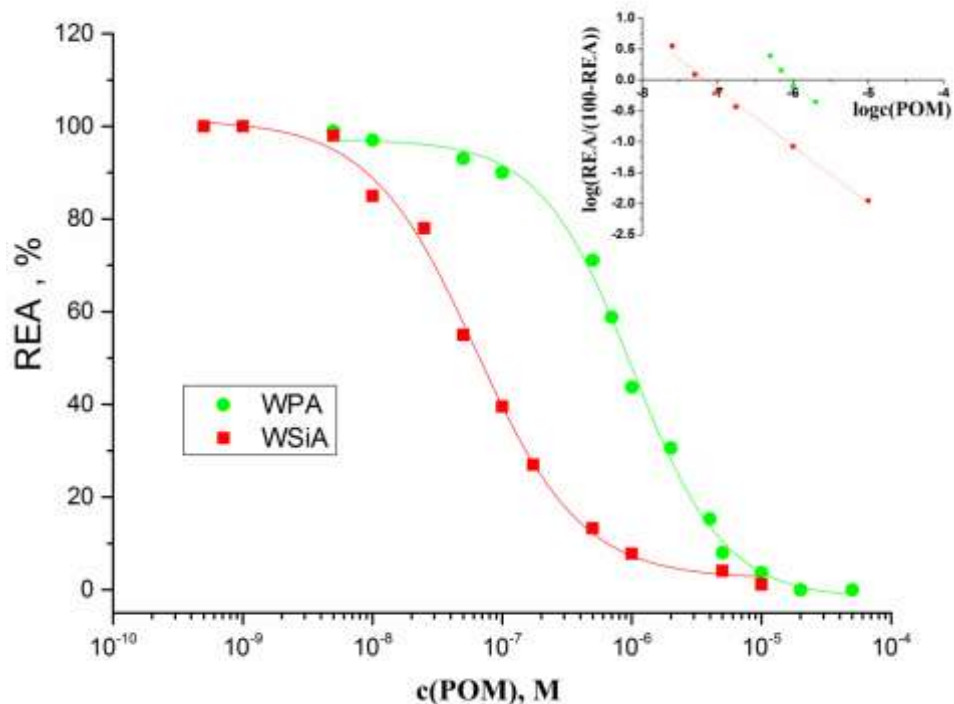
Slika 47. Distribucija elektrostatickog površinskog potencijala (ESP, *electrostatic surface potential*, eng.) i dipolni momenti za WPA i WSiA. Zelena boja označava pozitivno naelektrisane atome, crvena boja negativno naelektrisane atome.

Na osnovu strukture ispitivanih jedinjenja (Poglavlje 1.3.1.) može se videti da se jedina strukturalna razlika između ispitivanih POM-ova nalazi unutar M-O veze, pa se znatno veće vrednosti dipolnog momenta dobijene za WSiA mogu pripisati većoj polarnosti Si-O veze od P-O (elektronegativnost O atoma je 3,5; P je 2,1; Si je 1,8). Kako su *Keggin*-ove strukture jako rigidne, na osnovu dobijenih vrednosti dipolnih momenta može se zaključiti da su ispitivana jedinjenja polarna i da će u interakciji sa proteinima imati veliku težnju ka pozitivno naelektrisanim i polarnim aminokiselinskim ostacima. Dobijene vrednosti dipolnih momenata su takođe u dobroj saglasnosti sa eksperimentalno izračunatim logP vrednostima koji ukazuje da je WSiA sa nižom logP vrednošću ujedno i polarnije jedinjenje od ispitivanog WPA.

Jačina vezivanja nekog liganda za enzim određena je i brojem aminokiselinskih grupa enzima sa kojima ligand ostvaruje kontakt. Ovaj broj je obično proporcionalan površini (odnosno zapremini) liganda, u ovom slučaju ispitivanog POM-a. Kako WSiA i WPA imaju slične zapremine i *van der Waals*-ove površine (Tabela 15), ne treba očekivati da će uticaj ovog faktora biti presudan za jačinu vezivanja. Veće vrednosti zapremine kao i *van der Waals*-ove površine izračunate za WSiA (Tabela 15) mogu se pripisati većoj dužini Si-O veze (1,64 Å) od P-O veze (1,55 Å), što se opet objašnjava većim *van der Waals*-ovim poluprečnikom Si atoma, u poređenju sa poluprečnikom P atoma.

4.2.4. Inhibicija acetilholinesteraze

Uticaj polioksometalata, WSiA i WPA, na aktivnost AChE ispitan je u oblasti koncentracija POM-a od 5×10^{-9} do 1×10^{-4} M. Relativna enzimaska aktivnost (REA), koja predstavlja procenat preostale aktivnosti AChE u odnosu na aktivnost enzima bez dodatog POM-a (kontrolna vrednost), predstavljena je u funkciji koncentracije dodatog POM-a (Slika 48) a dobijena zavisnost je fitovana sigmoidalnom funkcijom prema jednačini (9). Dobijene vrednosti predstavljene su u Tabeli 16. Za dobijanje parametara inhibicije upotrebljena je i *Hill*-ova jednačina (10) a dobijeni rezultati su prikazani na umetnutom grafiku Slike 48 i u Tabeli 16.



Slika 48. Inhibicija aktivnosti AChE poliooksovolframatima. Umetnut grafik: *Hill*-ova analiza inhibicione krive.

Tabela 16. Parametri inhibicije aktivnosti AChE (vrednosti IC_{50} i *Hill*-ov koeficijent, n) POM-ovima dobijeni fitovanjem sigmoidnom zavisnošću i *Hill*-ovom analizom.

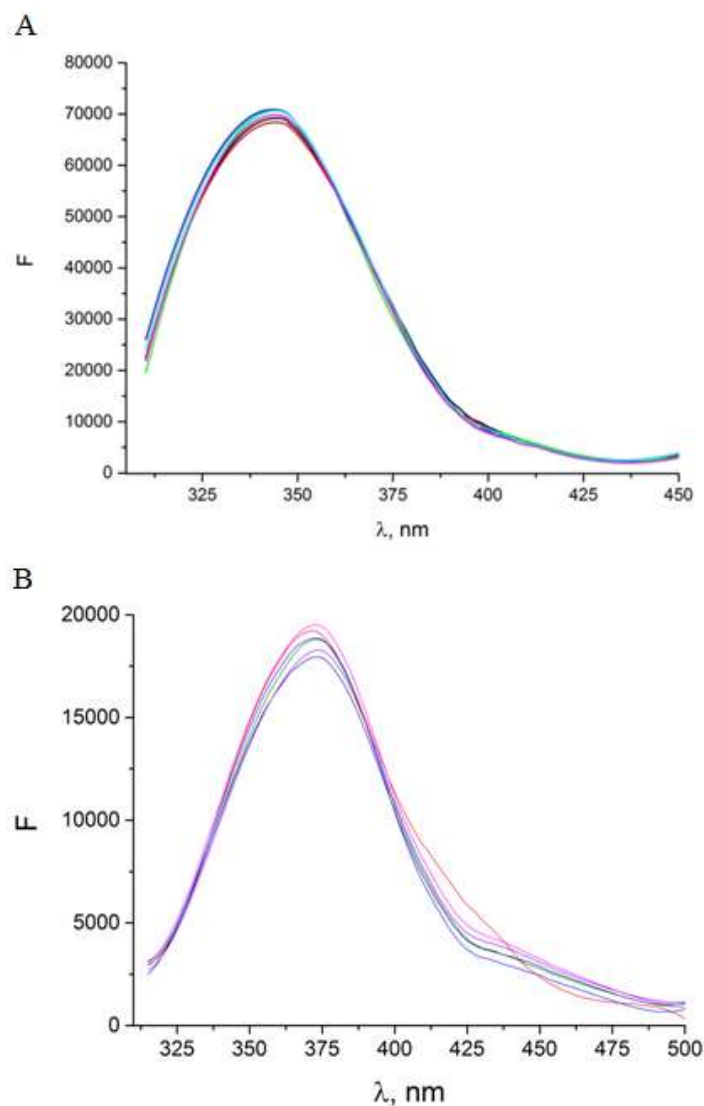
POM	Sigmoidalni fit, IC_{50} , M	<i>Hill</i> -ova analiza	
		IC_{50} , M	n
WSiA	$(6,21 \pm 0,02) \times 10^{-8}$	$(7,23 \pm 0,02) \times 10^{-8}$	$0,93 \pm 0,09$
WPA	$(1,01 \pm 0,01) \times 10^{-6}$	$(1,23 \pm 0,01) \times 10^{-6}$	$1,23 \pm 0,17$

Iz Tabele 16 se može videti da su rezultati dobijeni fitovanjem eksperimentalno dobijenih tačaka sigmoidalnom funkcijom u saglasnosti sa rezultatima dobijenim *Hill*-ovom analizom što ukazuje da se i prvi model može koristiti za određivanje parametara inhibicije (n , IC_{50}). IC_{50} vrednosti za WSiA su u submikromolarnom opsegu dok WPA pokazuje inhibiciju aktivnosti AChE u mikromolarnom opsegu. Dobijene vrednosti *Hill*-ovog koeficijenta ~ 1 ukazuju na nepostojanje kooperativnosti između vezivnih

mesta ovih POM-ova na AChE. Literaturni podaci pokazuju da je interakcija između POM-ova i proteina elektrostatičke prirode [168,169], kao i da ova jedinjenja inhibiraju aktivnost AChE nekompetitivnim mehanizmom [89]. Prema tome, može se pretpostaviti da POM-ovi ispitani u ovom radu inhibiraju aktivnost AChE elektrostatičkim interakcijama, što je molekulskim modelovanjem (Poglavlje 4.2.8.) potvrđeno.

4.2.5. Uticaj poliooksovolframata na fluorescenciju acetilholinesteraze

Uticaj POMova na Trp fluorescenciju AChE praćen je snimanjem fluorescentnih spektara enzima u rastvoru 50 mM fosfatnog pufera u odsustvu i prisustvu ispitivanih POM-ova. Primenjena talasna dužina ekscitacije od 295 nm omogućila je selektivno pobuđivanje Trp u enzimu. Dobijeni emisijski spektri su prikazani na Slici 49.



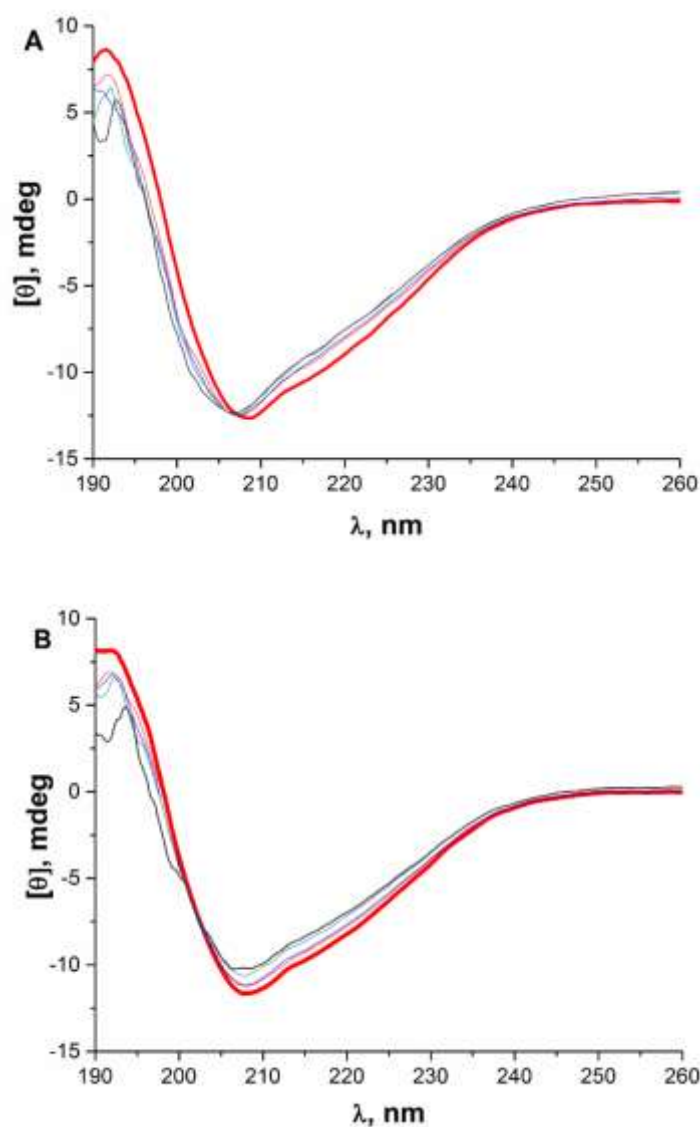
Slika 49. Fluorescentni spektar 1×10^{-7} M AChE u 50 mM fosfatnom puferu, pH 8, u prisustvu različitih koncentracija POM-ova: 1×10^{-7} – 1×10^{-6} M. A) WPA; B) WSiA.

Sa Slike 49 se vidi da ispitivani POM-ovi ne utiču značajno na Trp fluorescenciju AChE. Na osnovu inhibicionih studija videli smo da ispitivani POM-ovi predstavljaju jake inhibitore aktivnosti AChE. Takođe, aktivno mesto AChE je bogato Trp ostacima pa bi iz tog razloga vezivanje ispitivanih POM-ova na ovom mestu uticalo na fluorescenciju enzima. Na osnovu ovih činjenica može se zaključiti da rezultati dobijeni fluorescentnim merenjima ukazuju da se vezivno mesto ispitivanih POM ne nalazi u blizini Trp ostataka kao i da sigurno nije u aktivnom mestu enzima. Ovako dobijeni

rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima prema kojima je mehanizam inhibicije AChE nekompetitivan.

4.2.6. Uticaj poliooksovolframata na sekundarnu strukturu acetilholinesteraze

CD spektri 1×10^{-7} M AChE u 10 mM fosfatnom puferu, pH 8, snimani su u odsustvu i prisustvu poliooksovolframata različitih koncentracija ($1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ M) kako bi se pratile promene u sekundarnoj strukturi enzima izazvane dodatkom ovih jedinjenja. Dobijeni CD spektri su prikazani na Slici 50.

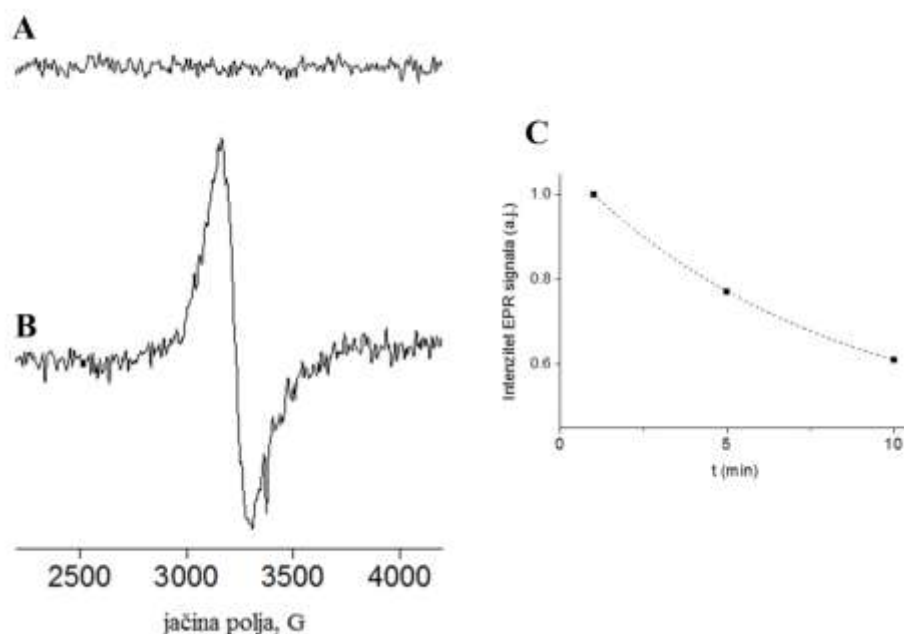


Slika 50. CD spektri 1×10^{-7} M AChE u odsustvu (crveni spektar) i prisustvu različitih koncentracija POM-ova: $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ M. A) WSiA; B) WPA.

CD spektar AChE sadrži izraženi minimum na 208 nm (crveni spektar na Slici 50), koji je karakterističan za sekundarne strukture proteina bogate α -heliksima [155]. Dodatak ispitivanih POM-ova ne menja značajno sekundarnu strukturu ispitivanog enzima pa se može zaključiti da inhibitornu sposobnost ovih jedinjenja nije moguće objasniti promenama u sekundarnoj strukturi.

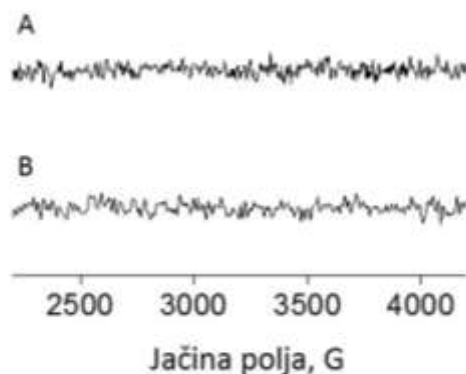
4.2.7. EPR spektroskopsko proučavanje interakcije polioksovolframata sa acetilholinesterazom

U cilju ispitivanja oksidacionog stanja metala (u ovom slučaju W) u toku interakcije POM-ova sa AChE, snimljeni su EPR spektri na 100 K. WSiA nema EPR spektar jer je jon W dijamagnetik kad se nalazu u oksidacionom stanju +6. U prisustvu AChE takođe ne dolazi do pojave EPR signala što znači da je W i dalje u istom oksidacionom stanju, Slika 51A. Međutim, prilikom inkubacije WSiA i AChE sa supstratom (ASChI) detektovan je signal na $g = 2,087$ i širinom linije od 130 G, Slika 51B. Ovaj signal se može pripisati jonu W^{5+} ($S = \frac{1}{2}$) [170], što znači da u toku reakcije WSiA sa AChE u prisustvu supstrata dolazi do redukcije W iz oksidacionog stanja + 6 u + 5. Intenzitet signala na $g = 2,087$ opada u toku vremena (Slika 51C), što znači da dolazi do reoksidacije W^{5+} u W^{6+} .



Slika 51. EPR spektri snimljeni na 100 K: A) 1×10^{-4} M WSiA u prisustvu 2UI/ml AChE nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, B) 1×10^{-4} M WSiA u prisustvu 2UI/ml AChE i 2×10^{-3} M supstrata ASChI nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi. Parametri snimanja spektara su opisani u Poglavlju 3.2.6. Promena intenziteta EPR signala na $g = 2,087$, koji potiče od W^{5+} , u funkciji vremena. Tačke su fitovane eksponencijalnom funkcijom prvog reda.

Za razliku od WSiA, prilikom interakcije WPA sa AChE, čak ni u prisustvu supstrata, ne dolazi do pojave EPR signala (Slika 52) W^{5+} jona ukazujući da u ovom slučaju ne dolazi do redukcije W^{6+} u W^{5+} . Ovakvo različito ponašanje ispitivanih POM-ova u prisustvu AChE ukazuje na različiti mehanizam interakcije ovih POM-ova sa ovim enzimom.

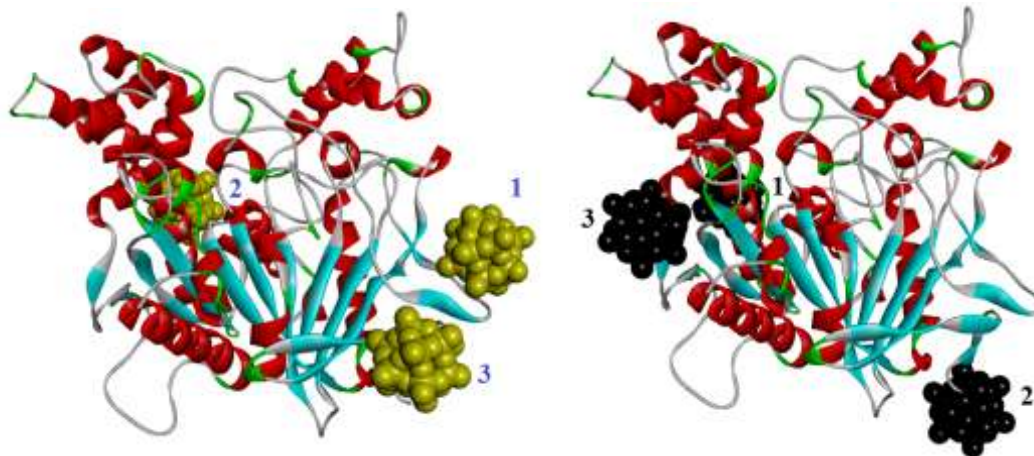


Slika 52. EPR spektri snimljeni na 100 K: A) 1×10^{-4} M WPA u prisustvu 2UI/ml AChE nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, B) 1×10^{-4} M WPA u prisustvu 2UI/ml AChE i 2×10^{-3} M supstrata (ASChI) nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi. Parametri snimanja spektara su opisani u Poglavlju 3.2.6.

4.2.8. Teorijsko predviđanje potencijalnih mesta vezivanja poliooksovolframata na acetilholinesterazi

Molekulsko modelovanje interakcija POM-a sa AChE je urađeno koristeći kristalnu strukturu AChE preuzetu iz proteinske baze proteina, PDB koda 1C2B koja je „očišćena“ od molekula vode i drugih liganada i optimizovane strukture ispitivanih POM-ova. Molekulsko modelovanje je prvo urađeno na celom proteinu (Slika 53), a nakon toga samo na aktivnom mestu (Slika 54).

Na osnovu molekulskog modelovanja urađenom na celom enzimu može se zaključiti da ni jedan od dva ispitivana POM-a ne pokazuje težnju da se vezuje za aktivno mesto, već dolazi do vezivanja samo na površini enzima (Slika 53).



Slika 53. Mesta vezivanja WPA (žuto obojene lopte) i WSiA (crno obojene lopte) za acetilcholinesterazu, sa strukturom preuzetom iz PDB kod 1C2B.

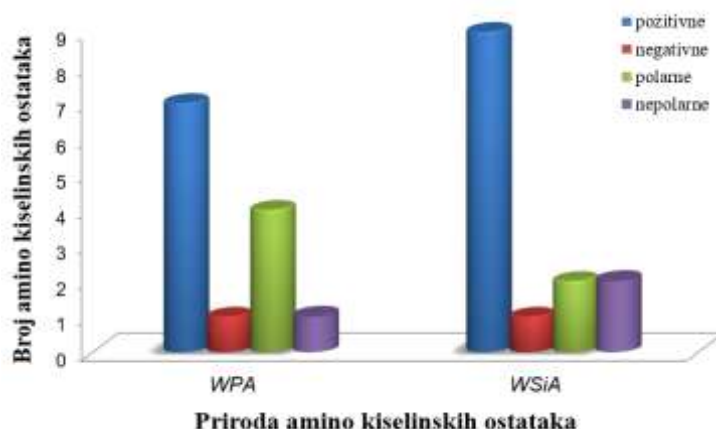
Od tri predložena vezivna mesta za WPA, dva se nalaze u oblasti sa β -ravnima (energije vezivanja su $-4,12$ i $-3,86$ kcal/mol) a jedno u oblasti bogatoj α -heliksima (energija vezivanja je $-4,09$ kcal/mol). WSiA ima veći afinitet ka oblastima sa α -heliksima, u kojoj se nalaze dva njegova vezivna mesta (energije vezivanja su $-4,27$ i $-2,97$ kcal/mol), dok se jedno mesto nalazi u oblasti sa β -ravnima (energija vezivanja je $-3,81$ kcal/mol). Izračunate energije vezivanja datih POM-ova za AChE su prikazane u Tabeli 16.

Tabela 16. Energije vezivanja (izražene u kcal/mol) POM jedinjenja za acetilcholinesterazu, dobijene molekulskim modelovanjem na celom proteinu i na aktivnom mestu.

	Energija vezivanja (kcal/mol)	
	Ceo protein	Aktivno mesto
WPA	$-4,12$	
	$-4,09$	$-2,59$
	$-3,86$	
WSiA	$-4,27$	
	$-3,81$	$-1,86$
	$-2,97$	

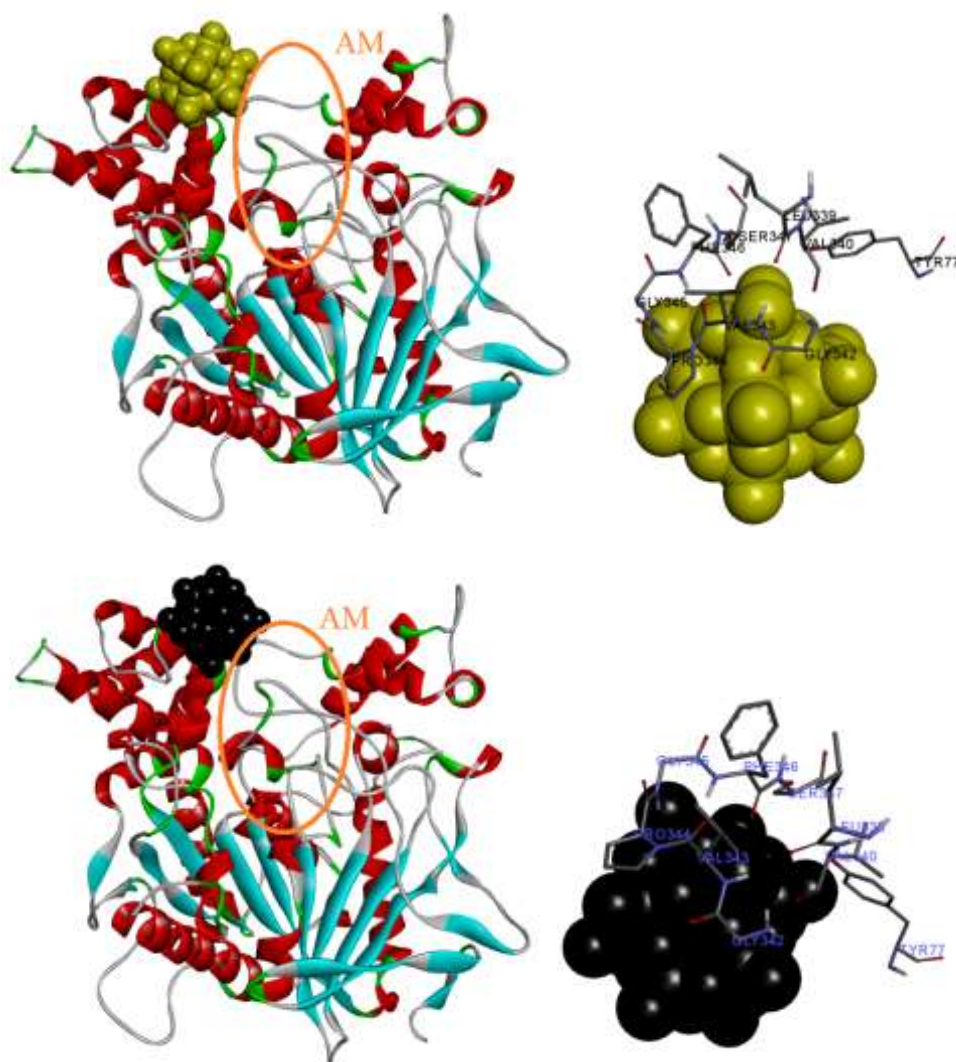
Analiza prirode aminokiselinskih ostataka u ovim vezivnim mestima je prikazana na Slici 54 sa koje se može videti da WPA interaguje sa 13 a WSiA sa 14 aminokiselinskih

ostataka. Takođe, ovom analizom nađeno je da oba POM-a imaju težnju ka građenju elektrostatičkih interakcija sa pozitivno naelektrisanim aminokiselinama (Arg i Lys). Nešto veći broj aminokiselinskih ostataka sa kojim WSiA ostvaruje kontakte može se pripisati neznatno većoj površini (odnosno zapremini) ovog jedinjenja u odnosu na WPA (Poglavlje 4.2.3.) dok se težnja ka vezivanju u području koje je bogato pozitivnim aminokiselinskim ostacima pripisuje negativnom naelektrisanju ovih kompleksa.



Slika 54. Analiza prirode aminokiselinskih ostataka u vezivnim mestima WPA i WSiA za acetilcholinesterazu, sa strukturom preuzetom iz PDB kod 1C2B.

Molekulsko modelovanje interakcije ispitivanih POM-ova sa AChE je urađeno i samo na aktivnom mestu što je postignuto smanjenjem veličine prostora na enzimu u kome se može naći ligand i odabirom aktivnog mesta kao željenog prostora. Rezultati dobijeni ovakvim modelovanjem su prikazani na Slici 55.



Slika 55. Mesto vezivanja WPA (žuto obojene lopte) i WSiA (crno obojene lopte) u okolini aktivnog mesta AChE sa strukturom preuzetom iz PDB kod 1C2B (levo). Distribucija aminokiselina u vezivnom mestu (desno).

Sa Slike 69 se može videti da i u ovom slučaju ne postoji vezivanje u blizini anjonskog vezivnog centra (Trp86, Tyr133, Glu202, Gly448 i Ile451) već da se oba POM-a vezuju za spoljašnju stranu petlje (od Tyr341 do Ser355), koja se nalazi iznad aktivnog mesta, i da interaguju sa istim aminokiselinskim ostacima: Tyr77, Leu 339, Val340, Gly342, Val343, Pro344, Gly345, Phe346 i Ser347.

Poređenjem sa vezivnim mestima nađenim ispitivanjem cele površine proteina, zaključuje se da vezivanjem u blizini aktivnog mesta, kompleksi interaguju uglavnom

sa nepolarnim amino kiselinama. Od devet aminokiselina, čak sedam su nepolarne, a preostale dve su polarne. Interakcije koje grade kompleksi sa nepolarnim aminokiselinama su slabije od elektrostatičkih interakcija, pa je to razlog zašto su energije vezivanja WPA (-2,59 kcal/mol) i WSiA kompleksa (-1.86 kcal/mol) u ovom slučaju manje nego za vezivanje na površinu enzima (Tabela 16).

Na osnovu rezultata dobijenih molekulskim modelovanjem može se izvesti zaključak da se WPA i WSA ne vezuju u aktivno mesto AChE, kada se enzim nalazi u konformaciji koja je nađena u kristalnoj strukturi sa PDB kodom 1C2B nego na njegovoj površini, u oblastima bogatim pozitivno naelektrisanim aminokiselinama. Ove studije su u saglasnosti sa fluorescentnim studijama koje ukazuju da se ispitivani kompleksi ne vezuju u blizini Trp na acetilholinesterazi. Takođe ovo je u saglasnosti i sa literaturnim podacima koji ukazuju na nekompetitivno vezivanje jedinjenja ovog tipa za AChE [89] kao i činjenicom da je interakcija POM-ova sa proteinima elektrostatičke prirode [168,169]. Aktivno mesto AChE predstavlja uski kanal u kome dominiraju negativno naelektrisane kiseline. S druge strane, POM-ovi su molekuli velikih molekulskih masa sa negativnim naelektrisanjem na površini što bi moglo da predstavlja razlog njihovog vezivanja na površini enzima.

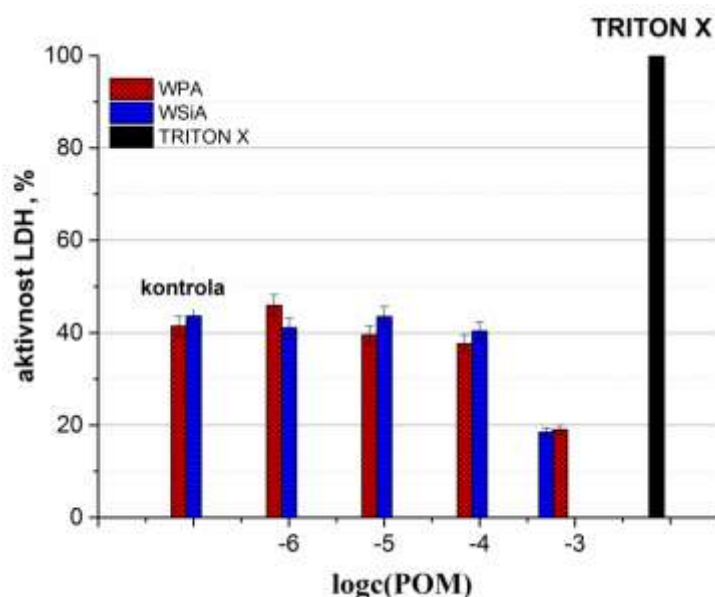
4.2.9. Toksični efekti poliooksovolframata testirani na sinaptozomima iz mozga pacova

Toksični efekti poliooksovolframata su ispitani određivanjem aktivnosti LDH, antioksidativnih enzima CAT i GPx kao i određivanjem sadržaja MDA u neprečišćenim sinaptozomima pacova soja *Wistar albino*. Način na koji su neprečišćeni sinaptozomi pripremljeni opisan je u Poglavlju 3.6. Izolovani sinaptozomi tretirani su različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u toku 1,5 h na temperaturi 37 °C.

4.2.9.1. Citotoksični efekti poliooksovolframata

Citotoksični efekti poliooksovolframata su ispitani merenjem aktivnosti LDH u sinaptozomima mozga pacova prema proceduri opisanoj u Poglavlju 3.8.5. Aktivnost

enzima je merena odmah nakon završenog tretmana. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 56.

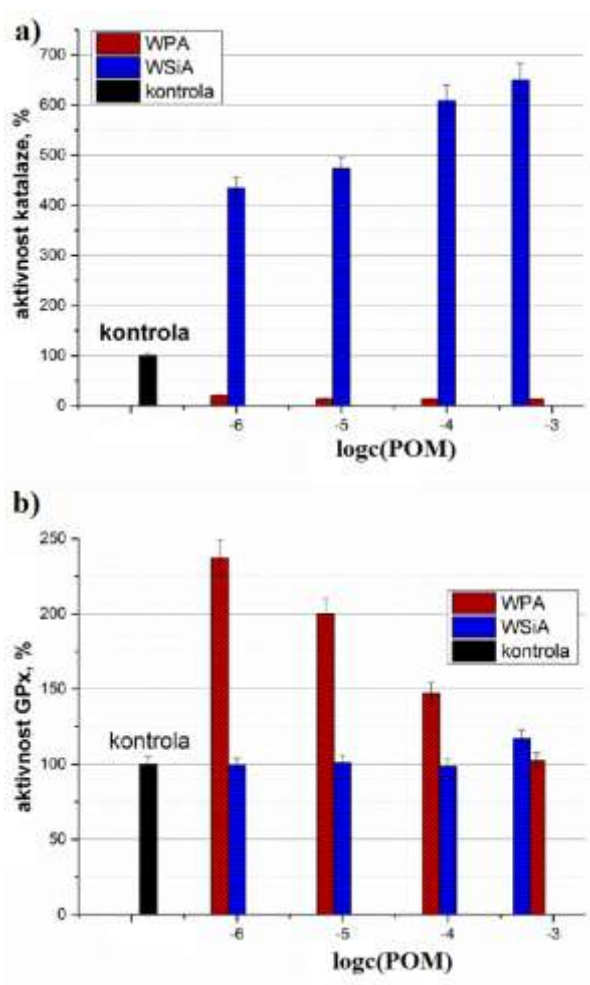


Slika 56. Uticaj različitih koncentracija POM-ova na aktivnost LDH u sinaptozomima izolovanim iz mozga pacova. Koncentracije WSiA i WPA: 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} M. Dodatno 5×10^{-4} M samo za WSiA i 1×10^{-3} M samo za WPA.

Sa Slike 56 se može videti da primenom različitih koncentracija ispitivanih POM-ova ne dolazi do značajnog povećanja aktivnosti enzima laktatdehidrogenaze (oko ~ 5 % više od kontrole) pri najnižim primenjenim koncentracijama (1×10^{-6} M), dok pri višim koncentracijama POM-ova dolazi do inhibicije aktivnosti ovog enzima na koncentracijski zavistan način. Poređenjem dobijenih vrednosti sa aktivnošću ovog enzima koja je dobijena pri tretmanu sinaptozoma 0,1 % tritonom X i koja predstavlja maksimalnu vrednost aktivnosti LDH, može se zaključiti da je u prisustvu ispitivanih POM-ova aktivnost LDH 2,5 puta manja. Ovi rezultati ukazuju da ispitivani POM-ovi ne dovode do oštećenja plazma membrane tokom 1,5 h tretmana sinaptozoma, odnosno ne pokazuju citotoksično dejstvo.

4.2.9.2. Prooksidativna svojstva poliooksovolframata

Prooksidativna svojstva poliooksovolframata procenjena su merenjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, CAT i GPx u neprečišćenim sinaptozomima izolovanim iz mozga pazova. Metode za određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima su opisane u Poglavljima 3.8.3. i 3.8.4. Na Slici 57 su prikazane dobijene aktivnosti CAT i GPx, izražene kao procenat od aktivnosti ovih enzima u netretiranim sinaptozomima u zavisnosti od koncentracije polioksometalata.



Slika 57. Uticaj različitih koncentracija POM-ova na aktivnost CAT (a) i aktivnost GPx (b) u sinaptozomima izolovanim iz mozga pacova. Koncentracije WSiA i WPA: 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} M. Dodatno 5×10^{-4} M samo za WSiA i 1×10^{-3} M samo za WPA.

Sa Slike 57a se može videti da u prisustvu WSiA dolazi do značajnog povećanja aktivnosti CAT čak i pri najnižim primenjenim koncentracijama, 1×10^{-6} M (4 puta u odnosu na kontrolu, koja predstavlja netretirane sinaptosome). S druge strane, aktivnost GPx ostaje nepromenjena u prisustvu ovog POM-a.

Pri tretmanu sinaptosoma drugim POM-om, WPA, aktivnost GPx (Slika 57a) se smanjila 90 % već pri najmanjoj primenjenoj koncentraciji, 1×10^{-6} M, dok se aktivnost GPx (Slika 57b) značajno povećala (2,5 puta od kontrolne vrednosti) pri tretmanu najnižom primenjenom koncentracijom WPA. Međutim povećanje aktivnosti GPx je obrnuto proporcionalno povećanju koncentracije WPA, ukazujući na mogućnost inhibicije GPx ovim POM-om pri višim koncentracijama.

CAT je enzim koji se aktivira u slučajevima stvaranja visokih koncentracija H_2O_2 dok se GPx aktivira već pri malom povećanju H_2O_2 . Iz literaturnih podataka je poznato da POM-ovi imaju ulogu u transferu elektrona (*electron shuttling*, eng.) sa jedne reaktivne vrste (obično metala u nultom ili nižem oksidacionom stanju) na drugu reakcionu vrstu, najčešće O_2 , [171] pri čemu se reverzibilno redukuju (POM_{red}) bez promene svoje strukture.

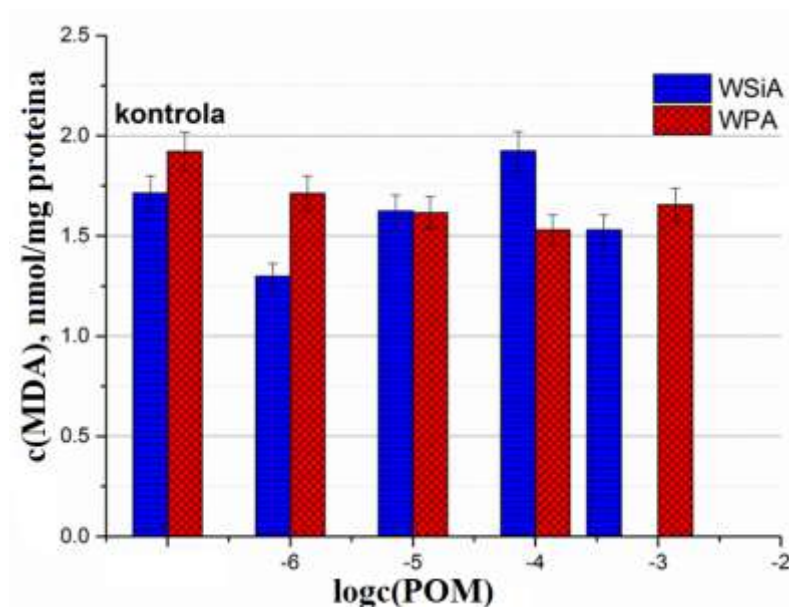
Upravo ova redukovana forma, POM_{red} , je odgovorna za stvaranje superoksid anjona O_2^- u sinaptosomima, mehanizmom transfera elektrona sa metalnog jona na molekul O_2 . Povećano stvaranje O_2^- izazvano prisustvom POM-a može dovesti do inhibicije CAT ili GPx usled čega dolazi do nagomilavanja vodonik peroksida. Nagomilani vodonik peroksid može biti redukovano POM do vode [171] mada je brzina ovog procesa nekoliko redova veličine manja od brzine reakcije prevođenja O_2 u O_2^- . Treba naglasiti i da je brzina razlaganja H_2O_2 redukovanim oblikom POM-a veća za WPA nego za WSiA [171]. Prema tome povećana aktivnost CAT u sinaptosomima pri tretmanu sa WSiA je verovatno rezultat povećanog stvaranja O_2^- koji se aktivnošću superoksid-dizmutaze prevodi u H_2O_2 .

U slučaju WPA, zapažena je smanjenja aktivnost CAT što može biti objašnjeno na više načina. Naime, smanjena aktivnost CAT može biti posledica inhibicije ovog enzima formiranim O_2^- , zatim posledica smanjene proizvodnje H_2O_2 , do koje može doći usled redukcije do H_2O i O_2 ali može i biti i posledica inhibicije enzima izazvane samim POM-om. Povećana aktivnost GPx pri niskim koncentracijama WPA se može povezati

sa stvaranjem H₂O₂ mehanizmom dok njeno smanjenje pri višim koncentracijama sposobnošću ovog POM-a da inhibira GPx.

4.2.9.3. Uticaj polioksovolframata na lipidnu peroksidaciju

Uticaj POM-ova na lipidnu peroksidaciju je određivan merenjem sadržaja MDA u sinaptosomima nakon tretmana različitim koncentracijama (1×10^{-6} – 1×10^{-3} M) POM-ova. Metoda za određivanje sadržaja malondialdehida je prikazana u Poglavlju 3.8.6. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 58.



Slika 58. Sadržaj parametra lipidne peroksidacije, MDA u sinaptosomima tretiranim različitim koncentracijama POM-ova. Koncentracije POM: 1×10^{-6} M; 1×10^{-5} M; 1×10^{-4} M; 5×10^{-4} M samo za WSiA i 1×10^{-3} M samo za WPA.

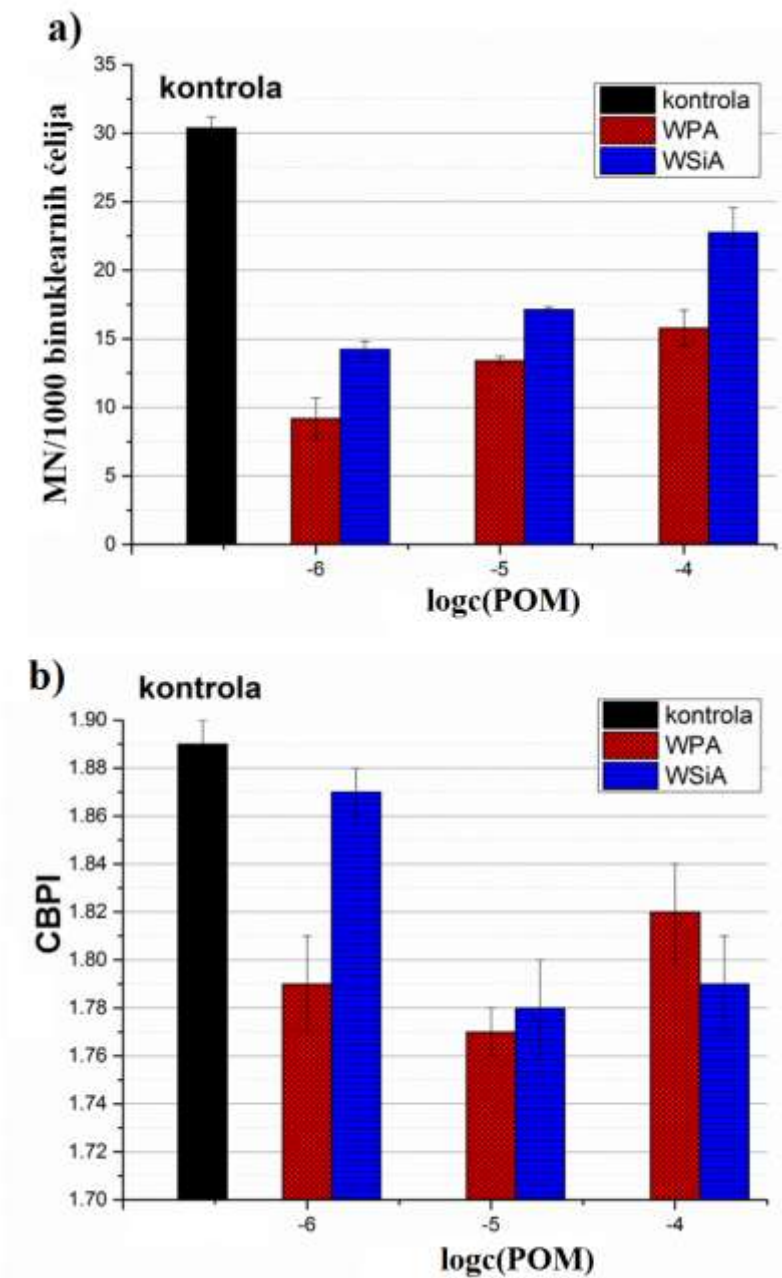
Sa Slike 58 se može videti da oba ispitivana POM-a samo neznatno utiču na smanjenje nivoa MDA u odnosu na kontrolne vrednosti netretiranih sinaptosoma. Kod WPA je zapaženo koncentracijski zavisno smanjenje, dok kod WSiA dolazi do povećanja nivoa MDA sa povećanjem koncentracije ovog POM-a, ali i dalje pri najvišoj primenjenoj koncentraciji WSiA nivo MDA u sinaptosomima je ispod vrednosti dobijene za netretirane sinaptosome.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da WPA smanjujući nivo MDA, markera štetne lipidne peroksidacije ispod nivoa dobijenog za kontrolne vrednosti može imati antioksidativne efekte. Kako je usled prisustva ovog POM-a smanjena aktivnost CAT može se reći da ovaj POM ili ne dovodi do formiranja povećane koncentracije H_2O_2 ili pak dovodi do njegovog razlaganja u manje toksične vrste. Dobijena povećana aktivnost GPx pak ide u prilog formiranju malih koncentracija H_2O_2 jer je ona glavni zaštitnik pri niskim koncentracijama H_2O_2 , a takođe i uklanja formirane lipidne perokside dovodeći do smanjenja nivoa MDA.

Rezultati za WSiA su dosta jasniji, usled povećane koncentracije H_2O_2 dolazi do aktiviranja CAT i GPx kao druge linije odbrane od oksidativnog stresa i samim tim sprečavanja lipidne peroksidacije koja se meri nivoom MDA. Do povećanog stvaranja H_2O_2 dolazi usled povećane aktivnosti enzima superoksid dizmutaze (SOD) koji je odgovoran za transformaciju superoksid anjona O_2^- u manje toksični H_2O_2 . Prema tome, najverovatnije se može zaključiti da WSiA dovodi do povećane produkcije H_2O_2 u tretiranim sinaptozomima zdravih pacova ali aktivacijom GPx i CAT ne dolazi do lipidne peroksidacije.

4.2.10. Genotoksični efekti poliooksovolframata testirani na kulturama humanih limfocita

Analizom ćelijskih kultura tretiranih POM-ovima WPA i WSiA utvrđeno je značajno smanjenje učestalosti mikronukleusa (MN) u odnosu na kontrolu pri svim ispitivanim koncentracijama ($p < 0.01$) pri čemu je najveće sniženje od 70 % i 53 % utvrđeno pri najnižoj koncentraciji ovih POM-ova, redom. (Slika 59A).



Slika 59. a) Učestalost mikronukleusa u kulturama limfocita tretiranim POM-ovima. b) Citokinezis-blok proliferativni indeks (CPBI) u kulturama limfocita tretiranim POM-ovima. Finalne koncentracije POM-ova su: 1×10^{-6} , 1×10^{-5} i 1×10^{-4} M.

Pored smanjenja u broju mikronukleusa za ispitivane POM-ove je zabeleženo i statistički značajno smanjenje u proliferativnom potencijalu ćelija ($p < 0.05$) u tretiranim kulturama limfocita. Rezultati su pokazali da je pri svim ispitivanim

koncentracijama WPA proliferativni potencijal ćelija statistički značajno niži u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) za sve ispitivane koncentracije ovog POM-a. Pri tretmanu dok pri tretmanu kulture limfocita najnižom koncentracijom WSiA dobijeni proliferativni potencijal ćelija je sličan kontrolnoj vrednosti, dok pri višim koncentracijama dolazi do statistički značajnog sniženja u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani POM-ovi pokazuju antiproliferativno dejstvo. Utvrđeno smanjenje učestalosti mikronukleusa nije pokazatelj smanjenja genomskih ozleda već smanjenog broja ćelija koje ulaze u mitozu, što ukazuje na njihov citostatski potencijal.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitana interakcija odabranih novosintetisanih antikancerogenih mononuklearnih i binuklearnih kompleksa zlata(III) sa Na^+/K^+ -ATPazom i interakcija odabranih polioksovolframata sa AChE.

Na osnovu prikazanih rezultata dobijenih ispitivanjem interakcije kompleksa zlata(III) sa Na^+/K^+ -ATPazom moguće je zaključiti sledeće:

- Ispitivani kompleksi su stabilni pri fiziološkim uslovima dok pozitivno naelektrisanje ovih kompleksa kao i optimalna vrednost particionog koeficijenta ukazuju da će ovi kompleksi lako prolaziti kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane.
- Binuklearni kompleksi su umereno jaki inhibitori aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze sa IC_{50} vrednostima u mikromolarnom opsegu koncentracija i sa *Hill*-ovim koeficijentom, $n \sim 2$ koji ukazuje na postojanje najmanje dva vezivna mesta ovih kompleksa za enzim i postojanje pozitivne kooperativnost u vezivanju.
- Kompleksi Au_2bipyC i Auoxo6 se vezuju za enzim tek nakon vezivanja supstrata na mesto koje je udaljeno od aktivnog mesta enzima (akompetitivna inhibicija) dok kompleks Au_2phen može kompetirati sa supstratom za vezivno mesto ali se može i vezati na mesto koje nije aktivno mesto enzima (kompetitivna-nekompetitivna inhibicija).
- Ispitivani kompleksi gase Trp fluorescenciju enzima različitom efikasnošću ali jedan deo fluorescencije ostaje neugašen ukazujući da ne dolazi do totalne denaturacije enzima. Na osnovu dobijenih vrednosti za bimolekularne konstante gašenja, k_q koje su $10^6 - 10^7$ reda veličine veće od maksimalne moguće vrednosti za gašenje izazvano difuzijom u vodenim rastvorima, zaključuje se da gašenje fluorescencije kompleksima zlata(III) nastaje usled vezivanja ovih kompleksa za enzim. Na osnovu odstupanja od linearnosti u modifikovanom *Stern-Volmer*-ovom grafiku zaključuje se da ispitivani kompleksi izazivaju takve konformacione promene u Na^+/K^+ -ATPazi koje dovode do gašenja fluorescencije Trp koji se nalaze u hidrofobnom delu enzima.

- Efikasnost gašenja fluorescencije mononuklearnih kompleksa ne zavisi od konformacije enzima ukazujući da su mesta vezivanja ovih kompleksa ista u obe konformacijama.
- Vezivanje kompleksa u velikoj meri utiče na sekundarnu strukturu enzima koja se ogleda u smanjenju α -heliksa i β -ravni i povećanju nasumične structure.
- Stehiometrija vezivanja mononuklearnih kompleksa je 1:3, dok je stehiometrija vezivanja binuklearnih kompleksa 1:2. Takođe, zaključeno je da postoji velika verovatnoća vezivanja za dva različita vezivna mesta i to za mesta velikog (sa konstantama disocijacije 10^{-8} M) i mesta malog afiniteta vezivanja (sa konstantama disocijacije 10^{-6} M).
- Mononuklearni kompleksi Aubipy(OH)_2 i AubipyC inhibiraju aktivnost vezivanjem za enzim u ekstracelularnom delu Na/K izmenjivačkog kanala čime se blokira izmena ovih jona delujući na taj način kao i specifični inhibitori Na^+/K^+ -ATPaze - kardijačni glikozidi. Kompleks Aupy(OAc)_2 inhibira aktivnost enzima vezivanjem između A i P domena u citosolnom delu enzima u susedstvu vezivnog mesta K^+ jona.
- Binuklearni kompleksi inhibiraju Na^+/K^+ -ATPazu vezivanjem u transmembranskom delu α -podjedinice, između α -M2 i α -M6 heliksa tzv. jonskom kanalu dok se inhibicija enzima Au_2phen kompleksom može objasniti i vezivanjem u ekstracelularnom delu enzima, između β -podjedinice i γ -transmembranskog heliksa.
- Ispitivani kompleksi zlata(III) ne utiču na integritet plazma membrana sinaptozoma u toku 1,5 h tretmana odnosno ne pokazuju citotoksično dejstvo. Međutim, inhibiraju aktivnost CAT i GPx čime dovode do povećane produkcije H_2O_2 i lipidnih peroksida odnosno do izazivanja oksidativnog stresa koji ima za posledicu iniciranje procesa lipidne peroksidacije i povećanja nivoa MDA za sve komplekse.
- U simuliranim biološkim uslovima, svi ispitivani binuklearni kompleksi izazivaju genotoksične efekte na koncentracijski zavistan način.

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem interakcije polioksovolframata, WSiA i WPA sa AChE moguće je izvesti sledeće zaključke:

- WSiA i WPA u fosfatnom puferu pH 8 prelaze u svoje lakunarne *Keggin*-ove structure.
- Inhibiraju aktivnost AChE i to WSiA u submikromolarnom opsegu koncentracija dok WPA u mikromolarnom.
- Ne utiču na Trp fluorescenciju AChE, ukazujući da se ne vezuju za aktivno mesto ovog enzima.
- Inhibitorna moć ovih jedinjenja se ne može povezati sa promenama u sekundarnoj strukturi AChE.
- Tokom interakcije sa AChE u prisustvu supstrata AChI oksidaciono stanje W u WSiA se menja iz +6 u +5 ali u toku vremena dolazi do reoksidacije, dok W u WPA ostaje u istom oksidacionom stanju, ukazujući na drugačiji mehanizam inhibicije AChE ovim POM-ovima.
- Ispitivani POM-ovi se vezuju na površini enzima elektrostatičkim interakcijama sa pozitivno naelektrisanim kiselinama.
- Na osnovu ispitivanja toksičnih efekata odabranih POM-ova može se zaključiti da nijedan od ispitivanih POM-ova ne narušava integritet membrane i da ne dovode do oštećenja membrane lipidnom peroksidacijom, zahvaljujući aktivaciji enzimskog antioksidativnog sistema, tako i sposobnosti ovih jedinjenja da učestvuju u reverzibilnom transferu elektrona bez promena u sopstvenoj strukturi.
- Usled smanjenja broja mikronukleusa i indeksa ćelijske proliferacije zaključeno je da ispitivani POM-ovi imaju antiproliferativne osobine.

Dobijeni rezultati imaju značaja u biofizičkoj kao i medicinskoj hemiji jer ukazuju da polioksometalati inhibicijom AChE predstavljaju novu klasu jedinjenja koja svojim pogodnim toksikološkim profilom može imati značaja u terapiji Alchajmerove bolesti. S druge strane pokazano je da kompleksi zlata(III) svoju antitumorsku aktivnost mogu da ostvaruju i inhibicijom Na^+/K^+ -ATPaze delujući na sličan način kao i kardijačni glikozidi, specifični inhibitori ovog enzima, čija se inhibicija Na^+/K^+ -ATPaze povezuje sa njihovim antitumorskim delovanjem. Proučavanje mehanizma delovanja ovih kompleksa kao i njihovih toksičnih osobina doprinosi uspešnom dizajnu novih

antikancerogenih kompleksa zlata(III) koji će pored veće selektivnosti imati i manju toksičnost što je jako važno za kliničku primenu ovih kompleksa.

6. LITERATURA

1. Momić TG, Čolović MB, Lazarević-Pašti TD, Vasić VM (2016) Metal based compounds, modulators of Na/K-ATPase with anticancer activity. In: Regulation of Membrane Na/K-ATPase, Advances in Biochemistry in Health and Disease, vol 15. Switzerland, Springer International Publishing, pp 389-425.
2. Dasari S, Tchounwou PB (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 0:364-378.
3. Florea AM, Büsselberg D (2011) Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* 3:1351-1371.
4. Nobili S, Mini E, Landini I, Gabbiani C, Casini A, Messori L (2010) Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Med. Res. Rev.* 30:550-580.
5. Maiore L, Cinellu MA, Nobili S, Landini I, Mini E, Gabbiani C, Messori L (2012) Gold(III) complexes with 2-substituted pyridines as experimental anticancer agents: Solution behavior, reactions with model proteins, antiproliferative properties. *J. Inorg. Biochem.* 108:123-127.
6. Vasilets LA, Schwarz W (1993) Structure-function relationships of cation binding in Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1154:201-222.
7. Mijatovic T, Ingrassia L, Facchini V, Kiss R (2008) Na⁺/K⁺-ATPase α subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 12:1403-1417.
8. Lefranc F, Kiss R (2008) The sodium pump α 1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia* 10:198-206.

9. Hasenknopf B (2005) Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. *Front. Biosci.* 10:275-287.
10. Nomiya K, Torii H, Hasegawa T, Nemoto Y, Nomura K, Hashino K, Uchida M, Kato Y, Shimizu K, Oda M (2001) Insulin mimetic effect of a tungstate cluster. Effect of oral administration of homopolyoxotungstates and vanadium-substituted polyoxotungstates on blood glucose level of STZ mice. *J. Inorg. Biochem.* 86:657-667.
11. Wang X, Liu J, Li J, Yang Y, Liu J, Li B, Pope MT (2003) Synthesis and antitumor activity of cyclopentadienyltitanium substituted polyoxotungstate $[\text{CoW}_{11}\text{O}_{39}(\text{CpTi})]_7$ (Cp = 5-C₅H₅). *J. Inorg. Biochem.* 94:279-284.
12. Inoue M, Segawa K, Matsunaga S, Matsumoto N, Oda M, Yamase T (2005) Antibacterial activity of highly negative charged polyoxotungstates, $\text{K}_{27}[\text{KAs}_4\text{W}_{40}\text{O}_{140}]$ and $\text{K}_{18}[\text{KSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]$, and Keggin-structural polyoxotungstates against *Helicobacter pylori*. *J. Inorg. Biochem.* 99:1023-1031.
13. Turner TL, Nguyen VH, McLauchlan CC, Dymon Z, Dorsey BM, Hooker JD, Jones MA (2012) Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro. *J. Inorg. Biochem.* 108:96-104.
14. Prudent R, Moucadel V, Laudet B, Barette C, Lafanechere L, Hasenknopf B (2008) Identification of polyoxometalates as nanomolar noncompetitive inhibitors of protein kinase CK2. *Chem. Biol.* 15:683-692.
15. Seko A, Yamase T, Yamashita K (2009) Polyoxometalates as effective inhibitors for sialyl- and sulfo- transferases. *J. Inorg. Biochem.* 103:1061-1066.
16. Muller CE, Iqbal J, Baqi Y, Zimmermann H, Rollich A, Stephan H (2006) Polyoxometalates - a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:5943-5947.

17. Melani A, Corti F, Stephan H, Muller CE, Donati C, Bruni P, Vannucchi MG, Pedata F (2012) Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Exp. Neurol.* 233:193-204.
18. Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41:31-91.
19. Lane RM, Potkin SG, Enz A (2006) Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9:101-124.
20. Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM (2013) Acetylcholinesterase Inhibitors: *Curr. Neuropharmacol.* 11:315-335.
21. Winblad B (2006) Donepezil for severe Alzheimer's disease. *Lancet* 368:361-362.
22. Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH (1969) Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* 222:385-386.
23. Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF, Crooke ST (1979) Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat. Rev.* 6:17-39.
24. Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265-7279.
25. Eljack ND, Ma HY, Drucker J, Shen C, Hambley TW, New EJ, Friedrich T, Clarke RJ (2014) Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics* 6 (11):2126-2133.
26. Ravi R, Somani SM, Rybak LP (1995) Mechanism of Cisplatin Ototoxicity: Antioxidant System. *Pharmacol. Toxicol.* 76:386-394.

27. Lebwohl D, Canetta R (1998) Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer* 34:1522-1534.
28. Olszewski U, Hamilton G (2010) A better platinum-based anticancer drug yet to come? *Anticancer Agents. Med. Chem.* 10:293-301.
29. Simon TM, Kunishima DH, Vibert GJ, Lorber A (1981) Screening trial with the coordinated gold compound auranofin using mouse lymphocyte leukemia P388. *Cancer Res.* 41:94-97.
30. Messori L, Marcon G (2004) Gold complexes as antitumor agents. *Met. Ions Biol. Syst.* 42:385-424.
31. Zou T, Lum CT, Chui SS, Che CM (2013) Gold(III) complexes containing N-heterocyclic carbene ligands: thiol "switch-on" fluorescent probes and anti-cancer agents. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 52:2930-2933.
32. Frik M, Fernandez-Gallardo J, Gonzalo O, Mangas-Sanjuan V, Gonzalez-Alvarez M, Serrano del Valle A, Hu C, Gonzalez-Alvarez I, Bermejo M, Marzo I, Contel M (2015) Cyclometalated Iminophosphorane Gold(III) and Platinum(II) Complexes. A Highly Permeable Cationic Platinum(II) Compound with Promising Anticancer Properties. *J. Med.Chem.* 58:5825-5841.
33. Dinda J, Nandy A, Rana BK, Bertolasi V, Saha KD, Bielawski CW (2014) Cytotoxicity of silver(I), gold(I) and gold(III) complexes of a pyridine wingtip substituted annelated N-heterocyclic carbene. *RSC Adv.* 4:60776-60784.
34. Coronello M, Mini E, Caciagli B, Cinellu MA, Bindoli A, Gabbiani C, Messori L (2005) Mechanisms of cytotoxicity of selected organogold(III) compounds. *J. Med. Chem.* 48:6761-6765.

35. Marcon G, Carotti S, Coronello M, Messori L, Mini E, Orioli P, Mazzei T, Cinellu MA, Minghetti G (2002) Gold(III) Complexes with Bipyridyl Ligands: Solution Chemistry, Cytotoxicity, and DNA Binding Properties. *J. Med. Chem.* 45:1672-1677.
36. Cinellu MA, Minghetti G, Pinna MV, Stoccoro S, Zucca A, Manassero M (1999) Replacement of the chloride ligand in $[\text{Au}(\text{C},\text{N},\text{N})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ cyclometallated complexes by C, N, O and S donor anionic ligands. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 16:2823-2831.
37. Casini A, Hartinger C, Gabbiani C, Mini E, Dyson PJ, Keppler BK, L. M (2008) Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J. Inorg. Biochem.* 102:564-575.
38. Casini A, Kelter G, Gabbiani C, Cinellu MA, Minghetti G, Fregona D, Fiebig HH, Messori L (2009) Chemistry, antiproliferative properties, tumor selectivity, and molecular mechanisms of novel gold(III) compounds for cancer treatment: a systematic study. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14:1139-1149.
39. Bindoli A, Rigobello MP, Scutari G, Gabbiani C, Casini A, Messori L (2009) Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* 253:1692-1707.
40. Millet R, Urig S, Jacob J, Amtmann E, Moulinoux J-P, Gromer S, Becker K, Davioud-Charvet E (2005) Synthesis of 5-Nitro-2-furancarbohydrazides and Their cis-Diamminedichloroplatinum Complexes as Bitopic and Irreversible Human Thioredoxin Reductase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 48:7024-7039.
41. Pratesi A, Gabbiani C, Ginanneschi M, Messori L (2010) Reactions of medicinally relevant gold compounds with the C-terminal motif of thioredoxin reductase elucidated by MS analysis. *Chem. Commun.* 46:7001-7003.

42. Zaharevitz DW, Holbeck SL, Bowerman C, Svetlik PA (2002) COMPARE: a web accessible tool for investigating mechanisms of cell growth inhibition. *J. Mol. Graphics Modell.* 20:297-303.
43. Cinellu MA, Maiore L, Manassero M, Casini A, Arca M, Fiebig HH, Kelter G, Michelucci E, Pieraccini G, Gabbiani C, Messori L (2010) $[\text{Au}_2(\text{phen}(2\text{Me}))_2(\mu\text{-O})_2](\text{PF}_6)_2$, a Novel Dinuclear Gold(III) Complex Showing Excellent Antiproliferative Properties. *ACS Med. Chem. Lett.* 1:336-339.
44. Gabbiani C, Casini A, Kelter G, Cocco F, Cinellu MA, Fiebig HH, Messori L (2011) Mechanistic studies on two dinuclear organogold(III) compounds showing appreciable antiproliferative properties and a high redox stability. *Metallomics* 3:1318-1323.
45. Che C-M, Sun RW-Y (2011) Therapeutic applications of gold complexes: lipophilic gold(III) cations and gold(I) complexes for anti-cancer treatment. *Chem. Commun.* 47:9554-9560.
46. Durlacher CT, Chow K, Chen XW, He ZX, Zhang X, Yang T, Zhou SF (2015) Targeting Na^+/K^+ -translocating adenosine triphosphatase in cancer treatment. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42:427-443.
47. Arcangeli A, Becchetti A (2010) New Trends in Cancer Therapy: Targeting Ion Channels and Transporters. *Pharmaceuticals* 3:1202-1224.
48. Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ (2003) Structure and mechanism of Na,K -ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65:817-849.
49. Toyoshima C, Kanai R, Cornelius F (2011) First Crystal Structures of Na^+,K^+ -ATPase: New Light on the Oldest Ion Pump. *Structure* 19:1732-1738.

50. Blanco G, Mercer RW (1998) Isozymes of the Na/K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 275:F633-F650.
51. Yin W, Cheng W, Shen W, Shu L, Zhao J, Zhang J, Hua ZC (2007) Impairment of Na⁺,K⁺-ATPase in CD95(APO-1)-induced human T-cell leukemia cell apoptosis mediated by glutathione depletion and generation of hydrogen peroxide. *Leukemia* 21:1669-1678.
52. Wang HY, O'Doherty GA (2012) Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 22:587-605.
53. Bondžić AM, Janjić GV, Dramićanin MD, Messori L, Massai L, Parac Vogt TN, Vasić VM (2017) Na/K-ATPase as a target for anticancer metal based drugs: insights into molecular interactions with selected gold(III) complexes. *Metallomics* 9:292-300.
54. Post RL, Kume S (1973) Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 248:6993-7000.
55. Post RL, Hegyvary C, Kume S (1972) Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247:6530-6540.
56. Glynn IM (1993) Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. *Am. J. Physiol.* 462:1-30.
57. Castillo JP, Rui H, Basilio D, Das A, Roux B, Latorre R, Bezanilla F, Holmgren M (2015) Mechanism of potassium ion uptake by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nat. Commun.* 6:7622.

58. Nyblom M, Poulsen H, Gourdon P, Reinhard L, Andersson M, Lindahl E, Fedosova N, Nissen P (2013) Crystal structure of Na⁺,K⁺-ATPase in the Na(+)-bound state. *Science* 342:123-127.
59. Dempski RE, Hartung K, Friedrich T, Bamberg E (2006) Fluorometric Measurements of Intermolecular Distances between the α - and β -Subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 281:36338-36346.
60. Holmgren M, Wagg J, Bezanilla F, Rakowski RF, De Weer P, Gadsby DC (2000) Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature* 403:898-901.
61. Ogawa H, Toyoshima C (2002) Homology modeling of the cation binding sites of Na⁺K⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:15977-15982.
62. Poulsen H, Khandelia H, Morth JP, Bublitz M, Mouritsen OG, Egebjerg J, Nissen P (2010) Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature* 467:99-102.
63. Li C, Capendeguy O, Geering K, Horisberger J-D (2005) A third Na(+)-binding site in the sodium pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:12706-12711.
64. Weidemann H (2005) Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development – a hypothesis. *Front Biosci.* 10:2165-2176.
65. Apostolou P, Toloudi M, Chatziioannou M, Ioannou E, Knocke DR, Nester J, Komiotis D, Papatotiriou I (2013) Anvirzel™ in combination with cisplatin in breast, colon, lung, prostate, melanoma and pancreatic cancer cell lines. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 14:18.
66. Krinulović K, Bugarčić Ž, Vrvic M, Krstić D, Vasić V (2006) Prevention and recovery of (μ 3-diethylentriamino)-chloro-palladium(II)-chloride induced inhibition of

Na/K-ATPase by SH containing ligands-L-cysteine and glutathione. *Toxicol. In Vitro* 20:1292-1299.

67. Krinulović KS, Vasić VM (2006) Interaction of some Pd(II) complexes with Na⁺/K⁺-ATPase: Inhibition, kinetics, prevention and recovery. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 21:459-465.

68. Neault JF, Benkirane A, Malonga H, Tajmir-Riahi HA (2001) Interaction of cisplatin drug with Na,K-ATPase: drug binding mode and protein secondary structure. *J. Inorg. Biochem.* 86:603-609.

69. Petrović V, Čolović M, Krstić D, Vujačić A, Petrović S, Joksić G, Bugarčić Ž, Vasić V (2013) In vitro effects of some gold complexes on Na⁺/K⁺ ATPase activity and cell proliferation. *J. Inorg. Biochem.* 124:35-41.

70. Petrović V, Petrović S, Joksić G, Savić J, Čolović M, Cinellu MA, Massai L, Messori L, Vasić V (2014) Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase and cytotoxicity of a few selected gold(III) complexes. *J. Inorg. Biochem.* 140:228-235.

71. Huliciak M, Reinhard L, Laursen M, Fedosova N, Nissen P, Kubala M (2014) Crystals of Na⁺/K⁺-ATPase with bound cisplatin. *Biochem. Pharmacol.* 92:494-498.

72. Chermann JC, Raynaud M, Jasmin C, Mathe G (1970) Powerful new inhibitor of murine leukaemia and sarcoma viruses. *Nature* 227:173-174.

73. Inouye Y, Tokutake Y, Kunihara J, Yoshida T, Yamase T, Nakata A, Nakamura S (1992) Suppressive Effect of Polyoxometalates on the Cytopathogenicity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in Vitro and Their Inhibitory Activity against HIV-1 Reverse Transcriptase. *Chem. Pharm. Bull.* 40:805-807.

74. Pope M (1983) Heteropoly and Isopoly Oxometalates. *Inorganic Chemistry Concepts*, vol 8. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg.

75. Rhule JT, Hill CL, Judd DA, Schinazi RF (1998) Polyoxometalates in medicine. *Chem. Rev.* 98:327-358.
76. Clark CJ, Hall D (1976) Dodecamolybdophosphoric acid circa 30-hydrate. *Acta Crystallogr., Sect. B* 32:1545-1547.
77. Stephan H, Kubeil M, Emmerling F, Müller CE (2013) Polyoxometalates as Versatile Enzyme Inhibitors. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013:1585-1594.
78. Yuan T, Weljie AM, Vogel HJ (1998) Tryptophan fluorescence quenching by methionine and seleno methionine residues of calmodulin: orientation of peptide and protein binding. *Biochemistry* 37:3187-3195.
79. Kinne M, Barteau MA (2000) STM and TS investigations of silver polyoxometalate monolayers: Model compounds and potential multifunctional oxidation catalysts. *Surf. Sci.* 447:105-111.
80. Cibert C, Jasmin C (1982) Determination of the intracellular localization of a polyoxotungstate (HPA-23) by raman laser and X fluorescence spectroscopies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:1424-1433.
81. Berry JP, Galle P (1990) Subcellular localization of HPA-23 in different rat organs: Electron microprobe study. *Exp. Mol. Pathol.* 53:255-264.
82. Cholewa M, Legge GJF, Weigold H, Holan G, Birch CJ (1994) The use of a scanning proton microprobe to observe anti-HIV drugs within cells. *Life Sci.* 54:1607-1612.
83. Ni L, Greenspan P, Gutman R, Kelloes C, Farmer MA, Boudinot FD (1996) Cellular localization of antiviral polyoxometalates in J774 macrophages. *Antiviral Res.* 32:141-148.

84. Inoue M, Suzuki T, Fujita Y, Oda M, Matsumoto N, Yamase T (2006) Enhancement of antibacterial activity of beta-lactam antibiotics by $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$, $[SiMo_{12}O_{40}]^{4-}$, and $[PTi_2W_{10}O_{40}]^{7-}$ against methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Inorg. Biochem*, 100:1225-1233.
85. Yamase T (2005) Anti-tumor, -viral, and -bacterial activities of polyoxometalates for realizing an inorganic drug. *J. Mater. Chem.* 15:4773-4782.
86. Köhler D, Eckle T, Faigle M, Grenz A, Mittelbronn M, Laucher S, Hart ML, Robson SC, Müller CE, Eltzschig HK (2007) CD39/Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 Provides Myocardial Protection During Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 116:1784-1794.
87. Robson SC, Enjyoji K, Goepfert C, Imai M, Kaczmarek E, Lin Y, Sévigny J, Warny M (2001) Modulation of extracellular nucleotide-mediated signaling by CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1. *Drug Dev. Res.* 53:193-207.
88. Dong Z, Tan R, Cao J, Yang Y, Kong C, Du J, Zhu S, Zhang Y, Lu J, Huang B, Liu S (2011) Discovery of polyoxometalate-based HDAC inhibitors with profound anticancer activity in vitro and in vivo. *Eur. J. Med. Chem.* 46:2477-2484.
89. Iqbal J, Barsukova-Stuckart M, Ibrahim M, Ali SU, Khan AA, Kortz U (2013) Polyoxometalates as potent inhibitors for acetyl and butyrylcholinesterases and as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.* 22: 1224-1228
90. Inouye Y, Kanamori T, Yoshida T, Koike T, Shionoya M, Fujioka H, Kimura E (1996) Differential contribution of metal complexation and dimerization to the chemotherapeutic potential of bicyclic-Zn(II) complex against human immunodeficiency virus. *Biol. Pharm. Bull.* 19:456-458.

91. Alvarez A, Alarcon R, Opazo C, Campos EO, Munoz FJ, Calderon FH, Dajas F, Gentry MK, Doctor BP, De Mello FG, Inestrosa NC (1998) Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J. Neurosci.* 18:3213-3223.
92. Ballenger JF (2006) Progress in the history of Alzheimer's disease: the importance of context. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9:5-13.
93. Becker DE (2012) Basic and Clinical Pharmacology of Autonomic Drugs. *Anesthesia Progress* 59:159-169.
94. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253:872-879.
95. Bajda M, Wieckowska A, Hebda M, Guzior N, Sotriffer CA, Malawska B (2013) Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* 14:5608-5632.
96. Johnson G, Moore SW (2006) The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.* 12:217-225.
97. Szegletes T, Mallender WD, Thomas PJ, Rosenberry TL (1999) Substrate Binding to the Peripheral Site of Acetylcholinesterase Initiates Enzymatic Catalysis. Substrate Inhibition Arises as a Secondary Effect. *Biochemistry* 38:122-133.
98. Čolović MB, Krstić DZ, Vasić VM, Bondžić AM, Ušćumlić GS, Petrović SD (2013) Organofosfatni insekticidi: toksični efekti i bioanalitički testovi za evaluaciju toksičnosti tokom procesa degradacije. *Hem. Ind.* 67:217-230.

99. Boublik Y, Saint-Aguet P, Lougarre A, Arnaud M, Villatte F, Estrada-Mondaca S, Fournier D (2002) Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng., Des. Sel.* 15:43-50.
100. Čolović MB, Krstić DZ, Ušćumlić GS, Vasić VM (2011) Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100:16-22.
101. Pohanka M (2011) Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech Repub.* 155:219-229.
102. Lakowicz JR (1995) Fluorescence spectroscopy of biomolecules. In: Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine. VCH Publishers, New York.
103. Eftink MR (2006) Fluorescence Techniques for Studying Protein Structure. In: Methods of Biochemical Analysis. John Wiley & Sons, Inc., pp 127-205.
104. Förster T (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 2:55-75.
105. Demchenko AP, Gallay J, Vincent M, Apell HJ (1998) Fluorescence heterogeneity of tryptophans in Na,K-ATPase: evidences for temperature-dependent energy transfer. *Biophys. Chem.* 72:265-283.
106. Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91:31S-38S.
107. Wakamatsu TH, Dogru M, Tsubota K (2008) Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq. Bras. Oftalmol.* 71:72-79.
108. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I (2011) Fiziologija slobodnih radikala. *Vet. Glasnik* 65:95-107.

109. Đukić M (2008) Oksidativni stres - Kliničko dijagnostički značaj. Mono i Manjana, Beograd.
110. Greenberg ME, Li XM, Gugiu BG, Gu X, Qin J, Salomon RG, Hazen SL (2008) The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J. Biol. Chem.* 283:2385-2396.
111. West JD, Marnett LJ (2006) Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem. Res. Toxicol.* 19:173-194.
112. Frankel EN (1984) Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 61:1908-1917.
113. Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82:291-295.
114. Halliwell B (1997) Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. *Adv. Pharmacol.* 38:3-20.
115. Michelson MA (1987) Medical aspects of superoxide dismutase. *Life Chem. Rep.* 6:1-142.
116. Chapple IL, Matthews JB (2007) The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000* 43:160-232.
117. Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-95.
118. Doanes AM, Hegland DD, Sethi R, Kovesdi I, Bruder JT, Finkel T (1999) VEGF Stimulates MAPK through a Pathway That Is Unique for Receptor Tyrosine Kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:545-548.

119. Tucker JD, Preston RJ (1996) Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 365:147-159.
120. Fenech M (1993) The cytokinesis blocks micronucleus technique: a detailed description on the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutat. Res.* 285:35-44.
121. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S (1999) Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14:605-612.
122. Surrales J, Xamena N, Creus A, Marco R (1995) The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat. Res.* 342:43-59.
123. Markwel AK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87:206-210.
124. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
125. Demchenko AP, Apell HJ, Sturmer W, Feddersen B (1993) Fluorescence spectroscopic studies on equilibrium dipole-relaxational dynamics of Na,K-ATPase. *Biophys. Chem.* 48:135-147.
126. Klein CD, Tabeteh GF, Laguna AV, Holzgrabe U, Mohr K (2001) Lipophilicity and membrane interactions of cationic-amphiphilic compounds: syntheses and structure-property relationships. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14:167-175.

127. Vasić V, Jovanović D, Krstić D, Nikezić G, Horvat A, Vujisić L, Nedeljković N (1999) Prevention and recovery of CuSO₄ induced inhibition of Na,K-ATPase and Mg-ATPase in rat brain synaptosomes by EDTA. *Toxicol. Lett.* 110:95-104.
128. Bondžić AM, Čolović MB, Janjić GV, Zarić B, Petrović S, Krstić DZ, Marzo T, Messori L, Vasić VM (2017) The influence of oxo-bridged binuclear gold(III) complexes on Na/K-ATPase activity: a joint experimental and theoretical approach. *J. Biol. Inorg. Chem.* 22:819-832.
129. Law on health care, (2005) Parliament of the Republic of Serbia. 107, 112-161.
130. Seals JR, McDonald JM, Bruns D, Jarett L (1978) A sensitive and precise isotopic assay of ATPase activity. *Anal. Biochem.* 90:785-795.
131. Phillips TD, Wallacehayes A, Ho IK, Durisala D (1978) Effects of Rubratoxin B on the Kinetics of Cationic and Substrate Activation of (Na⁺/K⁺)-ATPase and p-Nitrophenyl Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 253:3487-3493.
132. Ellman GL, Courtney KD, Andreas V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-90.
133. Beutler E (1984) Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods. third edn. Grune and Startton, New York.
134. Wendel A (1980) Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, New York
135. Chilson O, Costello L, Kaplan N (1965) Studies on the Mechanism of Hybridization of Lactic Dehydrogenases in Vitro. *Biochemistry* 4:271-281.
136. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JMC (1989) The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)-iron (III) complex. *Biochem. J.* 258:617-620.

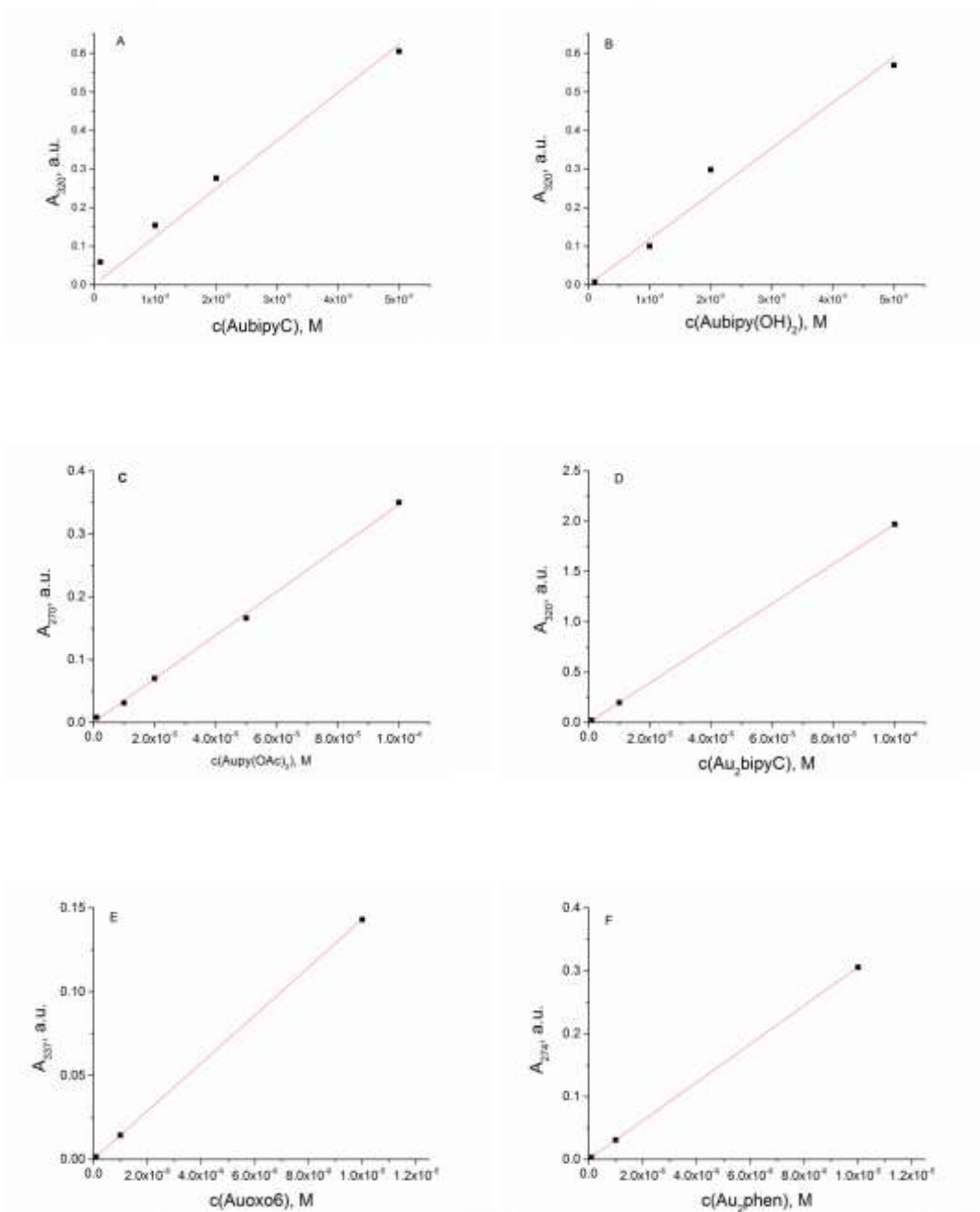
137. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB (2009) Gaussian 09. Gaussian Inc., Wallingford,CT, Pittsburgh, PA.
138. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*31:455-461.
139. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 16: 2785-2791.
140. Chiara G, Casini A, Messori L (2007) Gold (III) compounds as anticancer drugs. *Gold Bull.* 40:73-81.
141. Lechner S, Müller-Ladner U, Neumann E, Spöttl T, Schlottmann K, Rüschoff J, Schölmerich J, Kullmann F (2003) Thioredoxin Reductase 1 Expression in Colon Cancer: Discrepancy between In Vitro and In Vivo Findings. *Lab. Invest.* 83:1321-1331.
142. Castro VM, Söderström M, Carlberg I, Widersten M, Platz A, Mannervik B (1990) Differences among human tumor cell lines in the expression of glutathione transferases and other glutathione-linked enzymes. *Carcinogenesis* 11:1569-1576.
143. Rakashanda S, Rana F, Rafiq S, Masood A, Amin S (2012) Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 7:90-101.
144. Messori L, Scaletti F, Massai L, Cinellu MA, Gabbiani C, Vergara A, Merlino A (2013) The mode of action of anticancer gold-based drugs: a structural perspective. *Chem. Commun.* 49:10100-10102.
145. Trapp S, Horobin RW (2005) A predictive model for the selective accumulation of chemicals in tumor cells. *Eur. Biophys. J.* 34:959-966.

146. Ross MF, Kelso GF, Blaikie FH, James AM, Cochemé HM, Filipovska A, Da Ros T, Hurd TR, Smith RAJ, Murphy MP (2005) Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry* 70:222-230.
147. Foster JP, Weinhold F (1980) Natural Hybrid Orbitals. *J. Am. Chem. Soc.* 102:7211-7218.
148. Saroff HA, Minton AP (1972) The Hill plot and the energy of interaction in hemoglobin. *Science* 175:1253-1255.
149. Ahmed Z, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K (2009) Cisplatin sensitivity of oral squamous carcinoma cells is regulated by Na^+/K^+ -ATPase activity rather than copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63:643-650.
150. Vasic D, Savic J, Bugarcic Z, Krstic D, Tomic N, Colovic M, Petkovic M, Vasic V (2009) Interaction of the $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ complex with L-cysteine. *Zeitschrift fur Naturforschung C, J. Biosci.* 64:103-108.
151. Lakowicz JR (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. third edn. Springer US.
152. Epps DE, Raub TJ, Caiolfa V, Chiari A, Zamai M (1999) Determination of the Affinity of Drugs toward Serum Albumin by Measurement of the Quenching of the Intrinsic Tryptophan Fluorescence of the Protein. *J. Pharm. Pharmacol.* 51:41-48.
153. Xing D, Dorr R, Cunningham RP, Scholes CP (1995) Endonuclease III interactions with DNA substrates, 2: the DNA repair enzyme endonuclease III binds differently to intact DNA and to apyrimidinic/apurinic DNA substrates as shown by tryptophan fluorescence quenching. *Biochemistry* 34:2537-2544.

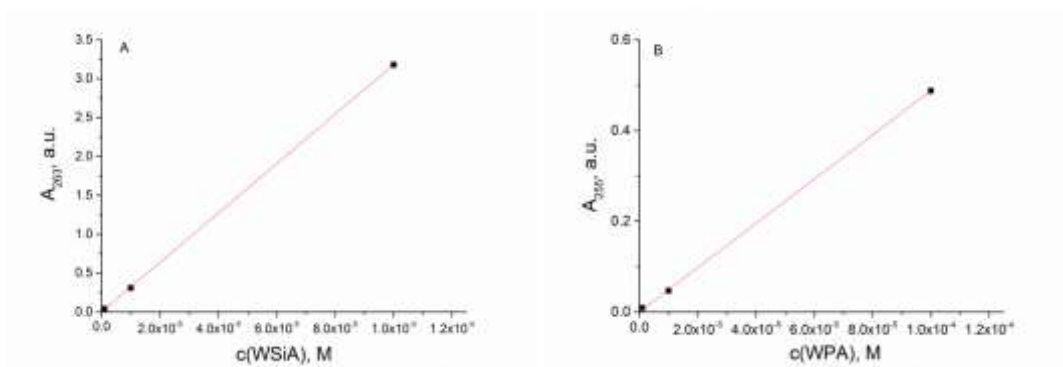
154. Wasylewski M, Malecki J, Wasylewski Z (1995) Fluorescence study of Escherichia coli cyclic AMP receptor protein. *J. Protein. Chem.* 14:299-308.
155. Wallace BA, Janes Robert W (2010) Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) spectroscopy: an enhanced method for examining protein conformations and protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.* 38:861-873.
156. Gresalfi TJ, Wallace BA (1984) Secondary structural composition of the Na/K-ATPase E1 and E2 conformers. *J. Biol. Chem.* 259:2622-2628.
157. Brautigam CA (2015) Fitting two- and three-site binding models to isothermal titration calorimetric data. *Methods* 76:124-136.
158. Laursen M, Gregersen JL, Yatime L, Nissen P, Fedosova NU (2015) Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺,K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:1755-1760.
159. Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Andersen JP, Vilsen B, Palmgren MG, Nissen P (2011) A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:60-70.
160. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.
161. Avezov K, Reznick AZ, Aizenbud D (2014) LDH enzyme activity in human saliva: the effect of exposure to cigarette smoke and its different components. *Arch. Oral Biol.* 59:142-148.
162. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Am. J. Mol. Biol.* 296:295-309.

163. Shimizu S, Watanabe N, Kataoka T, Shoji T, Abe N, Morishita S, Ichimura H (2000) Pyridine and Pyridine Derivatives. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
164. Coyle B, Kinsella P, McCann M, Devereux M, O'Connor R, Clynes M, Kavanagh K (2004) Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. *Toxicol. In Vitro* 18:63-70.
165. McGarvey GB, Moffat JB (1991) A study of solution species generated during the formation of 12-heteropoly oxometalate catalysts. *J. Mol. Catal.* 69:137-155.
166. Bajuk-Bogdanović D, Holclajtner-Antunović I, Todorović M, Mioč UB, Zakrezewska J (2008) A study of 12-tungstosilicic and 12-molybdophosphoric acids in solution. *J. Serb. Chem. Soc.* 73:197-209.
167. Chico LK, Van Eldik LJ, Watterson DM (2009) Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8:892-909.
168. Zhang G, Keita B, Brochon J-C, de Oliveira P, Nadjo L, Craescu CT, Miron S (2007) Molecular Interaction and Energy Transfer between Human Serum Albumin and Polyoxometalates. *J. Phys. Chem. B* 111:1809-1814.
169. Zhang G, Keita B, Craescu CT, Miron S, de Oliveira P, Nadjo L (2007) Polyoxometalate Binding to Human Serum Albumin: A Thermodynamic and Spectroscopic Approach. *J. Phys. Chem. B* 111:11253-11259.
170. Hagen WR (2008) Biomolecular EPR Spectroscopy. CRC Press.
171. Geletii YV, Hill CL, Atalla RH, Weinstock IA (2006) Reduction of O₂ to Superoxide Anion (O₂^{•-}) in Water by Heteropolytungstate Cluster-Anions. *J. Am. Chem. Soc.* 128:17033-17042.

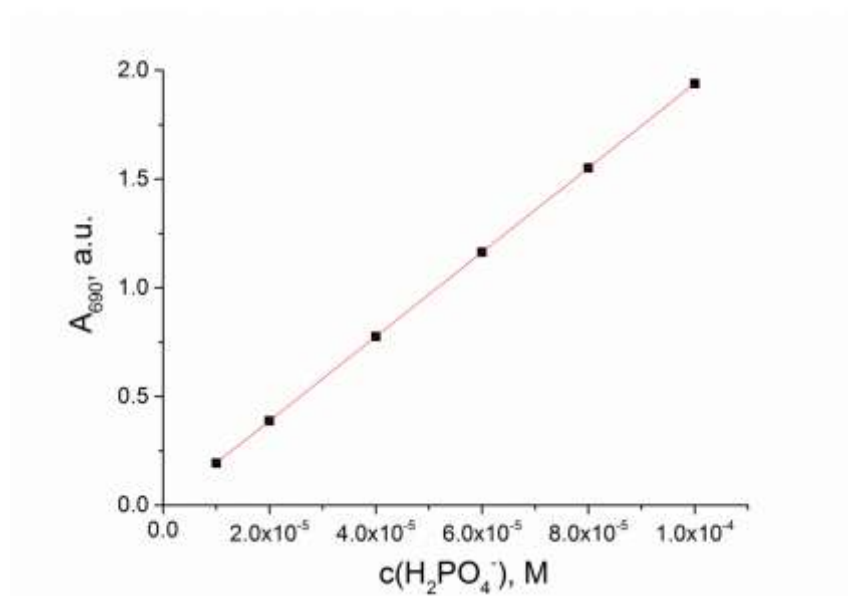
7. PRILOG



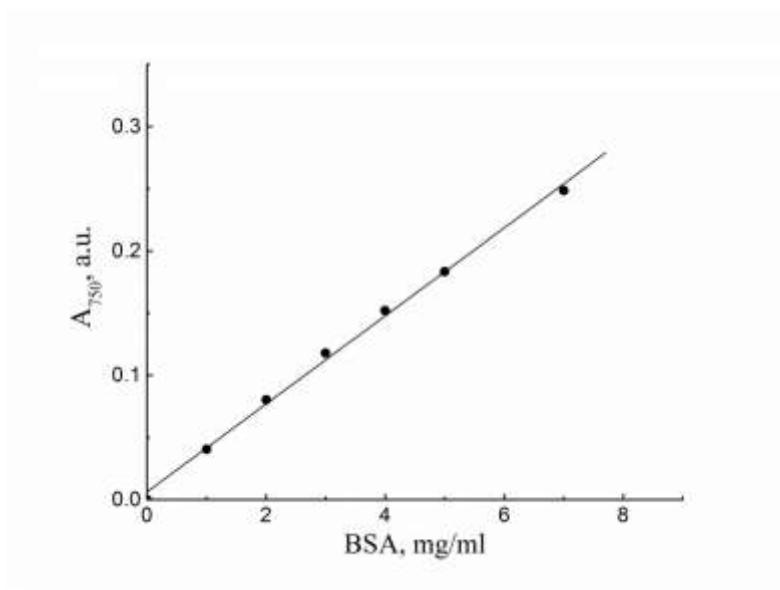
Slika P1. Standardne prave za određivanje koncentracija kompleksa zlata(III) u vodenoj fazi. A) AubipyC; B) Aubipy(OH)₂ C) Aupy(OAc)₂; D) Au₂bipyC; E) Auoxo6; F) Au₂phen.



Slika P2. Standardne prave za određivanje koncentracija kompleksa WSiA i WPA u vodenoj fazi. A) WSiA; B) WPA.



Slika P3. Standardne prave za određivanje koncentracije fosfata H_2PO_4^- .



Slika P4. Standardna prava za određivanje koncentracije proteina



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ И
ЗАШТИТЕ ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ
-УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ-
Број: 323-07-04610/2016-05
Датум: 23.05.2016. године
Београд

Министарство пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије-Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09), члана 192. Закона о општем управном поступку ("Службени гласник СРЈ" бр. 33/97 и 31/2001 и "Службени гласник РС" бр. 30/2010) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије бр. 119-01-13/29/2015-09, од 01.12.2015., решавајући о захтеву Института за нуклеарне науке "Винча" за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Института за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом:

"*In vitro* ефекат ново синтетисаних потенцијалних антиканцерогених и анти-Алцхајмер једињења на активност синаптозомалних ензима у мозгу пацова соја *Wistar albino*".

Образложење

Институт за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, Београд обратио се овом министарству дана 20.05.2016. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама под називом "*In vitro* ефекат ново синтетисаних потенцијалних антиканцерогених и анти-Алцхајмер једињења на активност синаптозомалних ензима у мозгу пацова соја *Wistar albino*".

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио документацију прописану Законом о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишту правог лица, попуњен захтев за издавање решења о одобрењу

спровођења огледа на животињама, стручно мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

Приликом решавања по захтеву, на основу увида у приложену документацију, утврђено је да су се стекли услови за доношење решења као у диспозитиву, сходно одредбама члана 192. Закона о општем управном поступку.

Поука о правном средству: Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор подношењем тужбе Управном суду Србије у року од 30 дана од дана пријема решења.

в.д. ДИРЕКТОР

Миодраг Петровић


Доставити:

1. Институт за нуклеарне науке "Винча", ул. Михајла Петровића-Аласа 12-14, 11000 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1а/4, 11000 Београд
3. Евиденција,
4. Архива



ИНСТИТУТ ЗА НУКЛЕАРНЕ НАУКЕ "ВИНЧА"

Адреса:
П.факс 522, 11001 Београд

Телефон центра: (011) 3408-101
Телефон директора: (011) 6454-945
Телефакс: (011) 3408-787
E-mail: office@vinca.rs

Ваш знак:

Наш знак:

Винча, 24.04.2016

ZAPISNIK

Dana 24. 4. 2016. godine u Institutu „Vinča“ održan je sastanak Etičkog komiteta Instituta „Vinča“ u sastavu:

1. dr Gordana Joksić, molekularni biolog, naučni savetnik (predsedavajući), INN „Vinča“
2. Filipović dr Jelena, lekar student doktorskih studija, istraživač saradnik, INN Vinča
3. Dr Tijana Bijić, viši naučni saradnik INN Vinča
4. Dr Milena Jovašević, naučni savetnik INN Vinča
5. Prof dr Dragana Vujić, lekar specijalista-pedijatar, hematolog, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
6. Prof dr Jasmina Jović Stošić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta odbrane

Predsedavajući Etičkog komiteta dr Gordana Joksić je članovima odbora prezentovala Molbu mast. hem. Aleksandre Bondžić sprovođenje istraživanja na uzorcima krvi zdravih dobrovoljaca, u okviru naučno-istraživačkog Projekta: „Истраживања интеракција ензима са токсичним и фармаколошки активним молекулима“ (broj Projekta: 172023; organizacija - koordinator Projekta: Institut „Vinča“; rukovodilac projekta: dr Vesna Vasić, naučni savetnik). Aleksandra Bondžić je angažovana na Projektu „Истраживања интеракција ензима са токсичним и фармаколошки активним молекулима“, broj Projekta 172023.

Razmatranjem dostavljenih dokumenata, članovi Etičkog komiteta su jednoglasno doneli

ODLUKU

Daje se saglasnost mast. hem. Aleksandri Bondžić

za sprovođenje istraživanja u okviru naučno-istraživačkog projekta: „Истраживања интеракција ензима са токсичним и фармаколошки активним молекулима“, broj projekta: 172023; organizacija - koordinator Projekta: Institut „Vinča“; rukovodilac Projekta: dr Vesna Vasić. Uzorci krvi uzorkovani uz pismenu saglasnost zdravih dobrovoljaca u Polikliničkoj službi JP „Nuklearni objekti Srbije“ će biti korišćeni za izolovanje limfocita i eritrocita u cilju izrade doktorske disertacije, koja obuhvata ispitivanje uticaja kompleksa zlata i polioksometalata na ćelije humane krvi *in vitro*.

Rad Etičkog Komiteta Instituta „Vinča“ usklađen je sa svim etičkim kodeksima, regulisan Pravilnikom o radu Etičkog Komiteta Instituta „Vinča“ i načelima dobre kliničke prakse.

Beograd, 24.04.2016

Predsednik Etičkog komiteta Instituta „Vinča“
Dr Gordana Joksić, naučni savetnik

BIOGRAFIJA

Aleksandra Bondžić je rođena 27. 08. 1980. u Vranju, Srbija gde je završila osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 28. 07. 2006. godine sa prosečnom ocenom 8,17 i odbranjenim diplomskim radom sa ocenom 10,00. Master rad je odbranila 28. 09. 2011. sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10,00 na master radu. Doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu upisala je 01. 03. 2013. Položila je sve ispite predložene planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00.

U INN „Vinča“ u Laboratoriji za fizičku hemiju zaposlila se nakon diplomiranja 01.12. 2006. god. kao istraživač pripravnik i radila do 01.12.2008. god. pod vođstvom naučnog savetnika dr Nade Miljević-Kraus. Nakon ovog perioda prekida radni odnos u INN „Vinča“ iz privatnih razloga. 01.04.2011. god. se ponovo zaposlila u INN „Vinča“ u Laboratoriji za fizičku hemiju, kao učesnik projekta pod nazivom „Istraživanja interakcija enzima sa toksičnim i farmakološki aktivnim molekulima“ pod vođstvom naučnog savetnika dr Vesne Vasić. 01.02.2012. god. izabrana je u zvanje istraživač saradnik, a reizabrana u isto zvanje 02.04.2015.

Istraživački rad kandidata je usmeren na ispitivanje interakcija jedinjenja na bazi metala (kompleksi metala, poliokso-metalati, nanočestice) sa ATPazama, holinesterazama i antioksidantnim enzimima primenom različitih fizičko-hemijskih metoda. Autor je ili koautor 12 radova publikovanih u međunarodnim časopisima i više saopštenja na međunarodnim skupovima.

Naučni radovi i saopštenja iz oblasti disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. **Bondžić A.M.**, Janjić G., Dramićanin M.D., Messori L., Massai L., Parac-Vogt T., Vasić V. (2017) Na/K-ATPase as a target for anticancer metal based drugs: insights into the molecular interactions with selected gold(III) complexes. *Metallomics*, 9(3) 292-300 (IF= 3,975).
2. **Bondžić A.M.**, Čolović M.B., Janjić G.V., Zarić B., Petrović S., Krstić D.Z., Marzo T., Messori L., Vasić V.M. (2017) The influence of oxo-bridged binuclear gold(III) complexes on Na/K-ATPase activity: a joint experimental and theoretical approach. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, doi:10.1007/s00775-017-1460-5 (IF= 2,894).

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u celini (M33):

1. **Bondžić A.**, Janjić G., Marković M., Messori L., Vasić V. Application of nanospectroscopy techniques in investigation of interactions of Na⁺/K⁺-ATPase with some potential antitumor Au complexes, Optical Nanospectroscopy III and Topical Meeting on Nonlinear Plasmonics, March 21st - 25th, 2016, Rome, Italy.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu (M32):

1. **Bondžić A.**, Janjić G., Marković M., Zeković I., Leskovac A., Cricenti A., Luce M., Vasić V. Na,K-ATPase as a target for gold(III) antitumor drugs: application of nanospectroscopy methods for evaluation of reaction mechanism Optical Nanospectroscopy IV, March 28th - 31st, 2017., Lisbon, Portugal

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Бонцић

Број индекса 2012/0317

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Интеракција бипиридинских комплекса злата(III) и полиоксоволфрамата са Na^+/K^+ -АТПазом и ацетилхолинестеразом

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

Потпис аутора

У Београду, 23.8.2017.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Бонцић

Број индекса 2012/0317

Студијски програм _____

Наслов рада Интеракција бипиридинских комплекса злата(III) и
полиоксволфрамата са Na^+/K^+ -АТПазом и ацетилхолинестеразом

Ментор др Ана Поповић-Бијелић и др Весна Васић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 23. 8.2017.

Изјава о коришћењу

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

Интеракција бипиридинских комплекса злата(III) и полиоксоволфрамата са Na^+/K^+ -АТПазом и ацетилхолинестеразом

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 23.8.2017.

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

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

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

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

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

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