



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Jovana B. Veselinović

**FARMAKOHEMIJSKI ASPEKTI DELOVANJA
ODABRANIH 4-FENIL HIDROSIKUMARINA –
INTEGRISANA *IN VITRO* I KOMPJUTERSKA STUDIJA**

Doktorska disertacija

Niš, 2014.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Jovana B. Veselinović

**PHARMACOCHEMICAL ASPECTS OF SELECTED
4-PHENYL HYDROXYCOUMARINS' ACTIVITIES –
INTEGRATED *IN VITRO* AND COMPUTATIONAL STUDY**

Doctoral Dissertation

Niš, 2014.

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Srđan Pešić, predsednik komisije

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet u Nišu

Prof. dr Goran Nikolić, mentor i član

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet u Nišu

Prof. dr Gordana Kocić, član

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet u Nišu

Prof. dr Dušica Stojanović, član

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet u Nišu

Prof. dr Tatjana Mihajilov-Krstev, član

Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet u Nišu

Datum odbrane: _____

Za izradu ove doktorske disertacije iskrenu zahvalnost dugujem:

Prof. dr Goranu Nikoliću, mentoru ovog rada, za veliko znanje koje mi uvek nesebično prenosi, uloženi trud, korisne sugestije i podršku u izboru teme, za ukazano poverenje tokom svih godina zajedničkog rada, kao i za druženje tokom detaljnog iščitavanja disertacije

Prof. dr Gordani Kocić, rukovodiocu projekta 31060, za visoke pedagoške kvalitete, dragocenu pomoć još od mojih studentskih dana, za otvorenost i želju da savetuje, toplinu i ljubav koju širi oko sebe, kao i za maksimalnu podršku koju mi je pružila u mom naučnom i stručnom usavršavanju

Prof. dr Dušici Stojanović za pomoć i iskrenu podršku u radu, nesebičnost u prenosu iskustava i naučnih ideja uz poverenje koje mi je pružila ne samo kao nastavnik već i kao prijatelj od prvog dana volonterskog rada na predmetu Bromatologija

Prof. dr Srđanu Pešićuza preneseno znanje koje mi je pomoglo da razumem složene mehanizme delovanja farmakološki aktivnih molekula. Svojim stručnim savetima i ljudskim kvalitetima doprineo je da saradnja sa njim bude privilegija

Prof. dr Tatjani Mihajilov-Krstev za spremnost da izađe u susret svaki put kada mi je bilo potrebno, za uloženo vreme i energiju tokom izrade doktorata, počevši od laboratorijskog dela, preko sređivanja i tumačenja rezultata do učešća u oceni ove disertacije

Prof. dr Milanu Jokanoviću na svim savetima, bezrezervnoj podršci i motivaciji da istrajem u naučno-istraživačkom radu

Kolegama sa Katedre za biohemiju, pre svega prof. dr Dušici Pavlović koja me je uvela u svet slobodnih radikala, prof. dr Stevi Najmanukao i svim profesorima i asistentima sa Katedre za hemiju isa Katedre za farmaciju, Medicinskog fakulteta u Nišu, sa kojima sam uspešno sarađivala od početka doktorskih studija kada je možda i bilo najteže

Posebnu i možda i najveću zahvalnost dugujem Aleksandru, mojim roditeljima, sestri i prijateljima na bezgraničnoj ljubavi, stpljenju, podršci, pažnji i snazi koju mi nesebično pružaju u svakom trenutku

Autor

Autor Jovana Veselinović

Doktorska disertacija

Naslov Farmakohemijski aspekti delovanja odabranih 4-fenil
hidroksikumarina – integrisana *in vitro* i kompjuterska studija
Mentor Prof. dr Goran M. Nikolić
Broj stranica 119
Broj slika 41
Broj šema 9
Broj tabela 19
Broj bibliografskih podataka 165
Naučna oblast Farmacija
Uža naučna oblast Toksikologija; Farmaceutska hemija
UDK broj 615+54:547.587.51(043.3)
Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u
okviru istraživanja vezanih za projekat Ministarstva prosvete
i nauke Republike Srbije, evidencioni broj 31060.

Naučni doprinos

Veselinović JB, Veselinović AM, Vitnik ŽJ, Vitnik VD,
Nikolić GM. Antioxidant properties of selected 4-phenyl
hydroxycoumarins: Integrated *in vitro* and computational
studies. Chem-Biol Interact 2014; 214: 49-56.

Veselinović J, Veselinović A, Toropov A, Toropova A,
Damjanović I, Nikolić G. Monte Carlo Method Based
QSAR Modeling of Coumarin Derivates as Potent HIV-1
Integrase Inhibitors and Molecular Docking Studies of
Selected 4-phenyl Hydroxycoumarins. Acta Fac Med Naiss
2014; 31: 95-103.

Veselinović JB, Veselinović AM, Nikolić GM, Pešić SZ,
Stojanović DB, Matejić JS, Mihajilov-Krstev TM.
Antibacterial potential of selected 4-phenyl
hydroxycoumarins: integrated *in vitro* and molecular docking
studies. Med Chem Res Article in Press DOI:
10.1007/s00044-014-1245-0.

Author Jovana Veselinović

Doctoral dissertation

Title Pharmacochemical aspects of selected 4-phenyl hydroxycoumarins' activities – integrated in vitro and computational study

Menthor Prof. dr Goran M. Nikolić

Page number 119

Figure number 41

Scheme number 9

Table number 19

Reference number 165

Scientific field Pharmacy

Scientific area Toxicology; Pharmaceutical chemistry

UC 615+54:547.587.51(043.3)

The experimental part of this dissertation was carried out in the framework of the research related to the project of the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, number 31060.

Scientific contribution

Veselinović JB, Veselinović AM, Vitnik ŽJ, Vitnik VD, Nikolić GM. Antioxidant properties of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated in vitro and computational studies. Chem-Biol Interact 2014; 214: 49-56.

Veselinović J, Veselinović A, Toropov A, Toropova A, Damnjanović I, Nikolić G. Monte Carlo Method Based QSAR Modeling of Coumarin Derivates as Potent HIV-1 Integrase Inhibitors and Molecular Docking Studies of Selected 4-phenyl Hydroxycoumarins. Acta Fac Med Naiss 2014; 31: 95-103.

Veselinović JB, Veselinović AM, Nikolić GM, Pešić SZ, Stojanović DB, Matejić JS, Mihajilov-Krstev TM. Antibacterial potential of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: integrated *in vitro* and molecular docking studies. Med Chem Res Article in Press DOI: 10.1007/s00044-014-1245-0.

Rezime

Uvod. Kumarini su široko rasprostranjeni u biljnom svetu i predstavljaju klasu bioaktivnih molekula sa različitim funkcionalnim grupama vezanim za osnovnu kumarinsku strukturu koja se može definisati kao lakton gde je benzenov prsten spojen sa α -pironom. Za molekule koji sadrže hidroksilne grupe vezane sa osnovnu kumarinsku strukturu potvrđeno je da pokazuju antioksidativno delovanje jer imaju sposobnost da reaguju sa slobodnim radikalima. Kumarini se smatraju i potencijalnim antibakterijskim agensima koji inhibiraju ATP-aznu aktivnost bakterijske DNK giraze. Rezultati velikog broja istraživanja su ukazali da spektar biološke aktivnosti kumarina obuhvata antikancersko, antiinflamatorno, antibakterijsko, antikoagulativno i imunomodulatorno delovanje.

Jedan od značajnih ciljeva medicinske hemije je pronalaženje novih molekula sa antioksidativnim delovanjem koji su sposobni da reaguju sa slobodnim radikalima i neutrališu njihove štetne efekte. Sa druge strane, morbiditet i mortalitet zbog infektivnih bolesti i dalje predstavljaju veliki zdravstveni problem. Fenomen rezistencije na postojeće antibiotike jedan je od najvećih problema današnje medicine tako da racionalna primena antibiotika u kliničkoj praksi i razvoj novih antibakterijskih agenasa sa širokim spektrom delovanja predstavljaju savremene naučne izazove.

Izolovanje prirodnih jedinjenja, njihova upotreba kao vodeće strukture za hemijsku modifikaciju i poboljšanje farmakohemijske aktivnosti, identifikacija farmakofore i uspostavljanje kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti (*Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR) paralelnom primenom *in vitro* i kompjuterskih studija predmet su savremenih istraživanja.

Neoflavoni predstavljaju grupu prirodnih jedinjenja sa osnovnom strukturom 4-fenilkumarina. 4-fenil hidroksikumarini imaju fenil grupu u položaju 4 i hidroksilne grupe vezane za osnovnu kumarinsku strukturu, a odabrani kumarini koji su korišćeni za ispitivanja u ovoj doktorskoj disertaciji su: 7-hidroksi-4-fenilkumarin (7C), 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin (5,7C) i 7,8-dihidroksi-4-fenilkumarin (7,8C).

Ciljevi istraživanja su bili da se ispita antioksidativna aktivnost odabranih 4-fenil hidroksikumarina, da se uspostavi odnos između strukture i antioksidativne aktivnosti primenom DFT deskriptora i da se odredi mehanizam antioksidativnog delovanja na osnovu fizičko-hemijskih parametara dobijenih DFT proračunima, da se ispita antibakterijska aktivnost i uspostavi korelacija između potencijalne antibakterijske aktivnosti i afiniteta

vezivanja ispitivanih molekula za aktivno mesto bakterijskih enzima primenom kompjuterske doking metode, da se uspostave QSAR modeli za odabrane farmakohemijske aktivnosti ispitivanih kumarina i da se procene fizičko-hemijske i molekulske karakteristike i predvidi biološka raspoloživost ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina.

Metode. Za ispitivanje antioksidativne i antibakterijske aktivnosti odabranih 4-fenil hidroksikumarina korišćene su *in vitro* metode. DPPH[•], ABTS^{•+}, feri tiocijanat metoda, FRAP i CUPRAC su primenjeni za ispitivanje antioksidativne aktivnosti. Pored ispitivanih jedinjenja, radi komparacije, ispitana je i antioksidativna aktivnost komercijalnih sintetskih antioksidanasa koji su korišćeni kao kontrolna grupa (butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), troloks i α -tokoferol). Značajnost razlike između antioksidativne aktivnosti ispitivanih kumarina i standardnih antioksidanasa je određena korišćenem Dunett-ovog testa ($p < 0,05$ se smatralo kao značajna i $p < 0,01$ kao veoma značajna razlika). Mikrodiluciona metoda je primenjena za određivanje antibakterijske aktivnosti. Savremene kompjuterske (*in silico*) metode (DFT, molekulski doking, QSAR) su primenjene za uspostavljenje korelacije između strukture i delovanja ispitivanih jedinjenja, kao i za određivanje mehanizama kojima se ova korelacija ostvaruje. Da bi se dobio uvid u mogući mehanizam antibakterijske i anti-HIV aktivnosti odabrani 4-fenil hidroksikumarini su podvrgnuti doking simulacijama. *S. aureus* tirozil tRNA sintetaza, *E. coli* topoizomeraza II DNK Giraza β i HIV-1 integraza su izabrane kao ciljni enzimi za proučavanje inhibitorne aktivnosti.

Rezultati. 7,8C je pokazao statistički značajno veću antioksidativnu aktivnost ($p < 0,01$) u poređenju sa standardnim antioksidansima i u DPPH[•] i u ABTS^{•+} metodi, dok 7C i 5,7C nisu pokazali tu aktivnost. Svi ispitivani molekuli su pokazali efekat inhibicije lipidne peroksidacije. Nakon 60 h trajanja reakcije procenat inhibicije lipidne peroksidacije (sa intervalom poverenja 95%) je iznosio: 56,61 (52,67-60,55) % za 7C, 82,48 (75,24-89,72) % za 5,7C i 90,939 (88,542-93,324) % za 7,8C. Od svih ispitivanih kumarinskih molekula samo 7C nije pokazao redukcionu sposobnost određivanu FRAP i CUPRAC metodom. Vrednosti nagiba prave (sa intervalom poverenja 95% i korelacionim koeficijentom r^2) koje su direktno proporcionalne redukujućoj moći su iznosile 0,0068 (0,00578-0,00777), 0,929 za 5,7C i 0,0269 (0,0235-0,0303), 0,985 za 7,8C kod FRAP metode i 0,0314 (0,0275-0,0354), 0,994 za 5,7C i 0,059 (0,0548-0,06316), 0,99924 za 7,8C kod CUPRAC metode. Izračunate vrednosti za DFT deskriptore (HOMO, LUMO, energetska razlika, IP, ΔE_{iso} i dipolni moment) za ispitivane kumarine u vakuumu, n-oktanolu, etanolu i vodi ukazuju da od svih ispitivanih 4-

fenil hidroksikumarina najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje 7,8C, što je u skladu sa dobijenim eksperimentalnim podacima. Analiza kompjuterski dobijenih parametara ukazuje da je HAT termodinamički dominantan mehanizam u gasnoj fazi, a u drugim ispitivanim sistemima najverovatniji je SPLET mehanizam. Dobijeni rezultati pokazuju da je kod 7,8C termodinamički favorizovan položaj 8 hidroksilne grupe u reakcijama koje uključuju BDE, PDE i ETE parametre i položaj 7 u reakcijama koje uključuju PA parametar. Za 5,7C u gasnoj fazi favorizovan je položaj 5 hidroksilne grupe za sve mehanizme. U drugim ispitivanim sistemima za reakcione mehanizme koji uključuju BDE, PDE i ETE parametre termodinamički je favorizovan položaj 5, a za mehanizme koji uključuju parametar PA položaj 7. Utvrđeno je da ispitivani kumarini pokazuju bolji inhibitorni efekat na Gram (+) bakterije (opseg MIC vrednosti je iznosio 0,01-2,50 mg/mL) u odnosu na Gram (-) (opseg MIC vrednosti je iznosio 0,16-10,0 mg/mL). 5,7 C i 7,8C su imali najslabiji efekat, dok 7C i pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 10mg/mL, nije delovao inhibitorno protiv *P. aeruginosa* i *P. mirabilis*. Svi ispitivani kumarini su najjače inhibirali rast sojeva *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* i *M. luteus*. Najslabiju aktivnost od svih ispitivanih kumarina je imao 7C. 5,7C je pokazao bolji inhibitorni efekat na većinu testiranih sojeva u odnosu na 7,8C. Za tumačenje ovih rezultata iskorišćeni su podaci koji su dobijeni studijama molekulskog dokinga ispitivanih jedinjenja za aktivna mesta karakterističnih enzima. MolDock score vrednosti vezivanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina za aktivno mesto tirozil tRNK sintetaze pokazuju da najveći afinitet vezivanja ima 5,7C, dok 7,8C pokazuje najveći afinitet vezivanja za aktivno mesto topoizomeraze II DNK Giraze β . Hbond vrednosti za tirozil tRNK sintetazu pokazuju da je najjača interakcija sa 7,8C, dok je kod topoizomeraze II DNK Giraze β najjača interakcija veza za 5,7C. Po svim Score vrednostima 7C pokazuje najslabije interakcije sa enzimima. Najbolji QSAR modeli za inhibiciju HIV-1 integraze od strane kumarinskih molekula imali su sledeće statističke parametre za 3' Processing aktivnost: $R^2=0.9980$ i $Q^2=0.9977$ za trening set i $R^2=0.9788$ za test set i za Integration aktivnost: $R^2=0.9999$ i $Q^2=0.9998$ za trening set i $R^2=0.9213$ za test set. QSAR modeli su primenjeni na ispitivane 4-fenil hidroksikumarine za izračunavanje njihove aktivnosti i procenu inhibicije HIV-1 integraze. Sve dobijene score vrednosti vezivanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina za aktivno mesto HIV-1 integraze pokazuju da najveći afinitet vezivanja ima 7,8C. Izračunate fizičko-hemijske i molekulske karakteristike su pokazale da se ispitivani 4-fenil hidroksikumarini povinuju pravilima Lipinskog.

Zaključak. 7,8C pokazuje mnogo izraženiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na 7C i 5,7C što ukazuje da *orto* položaj hidroksilnih grupa kod 4-fenil hidroksikumarina značajno doprinosi njihovoj antioksidativnoj aktivnosti. HOMO i LUMO energija i njihova energetska razlika za 4-fenil hidroksikumarine ispitivane u ovom radu takođe ukazuju da 7,8C ima nabolju antioksidativnu aktivnost. Između 5,7C i 7C, bolju antioksidativnu aktivnost ima 5,7C. ΔE_{iso} vrednosti ukazuju da 7,8C ima najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Raspored ukupne spinske gustine ukazuje da je od svih ispitivanih položaja hidroksilne grupe na osnovnoj strukturi 4-fenilkumarina za slobodno-radikalske reakcije najmanje favorizovan položaj 7. DFT deskriptori kao i eksperimentalni podaci potvrđuju 7,8C kao jedinjenje sa najboljom antioksidativnom aktivnošću u odnosu na ostale ispitivane kumarine. HAT je termodinamički dominantan mehanizam u gasnoj fazi, a u drugim ispitivanim sistemima najverovatniji je SPLET mehanizam antioksidativnog delovanja ispitivanih kumarina. Odnos antibakterijske aktivnosti ispitivanih jedinjenja može se prikazati sledećim nizom: 7C < 7,8C < 5,7 C. Molekulski doking primenjen je za procenu antibakterijske aktivnosti na osnovu afiniteta vezivanja ispitivanih kumarina za aktivna mesta tirozil tRNK sintetaze (*S. aureus*) i topoizomerase II DNK Giraze β (*E. coli*). Na osnovu *score* vrednosti dobijenih primenom molekulskog dokinga utvrđen je afinitet vezivanja ispitivanih molekula i dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima za njihovu antibakterijsku aktivnost. QSAR metoda je uspešno primenjena za dobijanje matematičkog modela za izračunavanje anti-HIV aktivnosti kumarinskih molekula na osnovu inhibicije HIV-1 integraze. 4-fenil hidroksikumarini ispitivani u ovom radu se povinuju pravilima Lipinskog što ukazuje na njihov zadovoljavajući farmakokinetički profil.

Ključne reči: 4-fenil hidroksikumarini, antioksidativna aktivnost, antibakterijska aktivnost, DFT, SAR, QSAR, Molekulski doking, pravila Lipinskog.

Summary

Introduction. Coumarins are widely present in the plant's kingdom and represent a class of bioactive molecules with different functional groups attached to the basic coumarin structure which can be defined as a lactone where benzene ring is connected to α -piron. It was confirmed that molecules with hydroxyl groups attached to the basic coumarin structure exhibit antioxidant activity since they have the ability to react with free radicals. Coumarins are also considered as potential antibacterial agents which inhibit the ATPase activity of bacterial DNA gyrase. Results from a large number of studies have shown that the spectrum of biological activity of coumarins includes anticancer, anti-inflammatory, antibacterial, anticoagulant and immunomodulatory activity.

One of the major goals of medicinal chemistry is to find new molecules with the antioxidant activities, which are capable of reacting with free radicals and neutralize their harmful effects. On the other hand, the morbidity and mortality caused by infectious diseases are still a major health issue. The phenomenon of bacterial resistance to existing antibiotics is one of the biggest problems of today's medicine so that rational use of antibiotics in clinical practice and the development of new antibacterial agents with a broad spectrum of activity present contemporary scientific challenges.

The isolation of natural compounds and their application as a leading structure for the chemical modification and further pharmacochemical activity improvement, pharmacophore identification and the establishment of quantitative structure activity relationship (QSAR) parallel with *in vitro* and computer studies are the subject of modern research.

Neoflavones present a group of natural compounds with the basic structure of 4-phenylcoumarin. 4-phenyl hydroxycoumarins have a phenyl group at position 4 and hydroxyl groups attached to the basic coumarin structure and coumarins selected for the study in this doctoral dissertation are: 7-Hydroxy-4-phenyl coumarin (7C), 5,7-dihydroxy-4-phenyl coumarin (5,7C), 7,8-dihydroxy-4-phenyl coumarin (7,8C).

Aims of this research were to determine the antioxidant activity of selected 4-phenyl hydroxycoumarins, to establish a relationship between the structure and antioxidant activity with the application of DFT descriptors and to determine the mechanism of antioxidant action on the basis of physico-chemical parameters obtained with DFT calculations, to investigate the antibacterial activity and to establish a correlation between the potential antibacterial activity and the binding affinity of the studied molecules to the active site of bacterial

enzymes with the application of computational molecular docking methods, to establish a QSAR models for the studied coumarins' selected pharmacological activity and to assess the physico-chemical and molecular properties in order to predict the bioavailability of the studied 4-phenyl hydroxycoumarins.

Methods. For the determination of antioxidant and antibacterial activity of selected 4-phenyl hydroxycoumarins *in vitro* methods have been used. DPPH[•], ABTS^{•+}, ferric thiocyanate method, FRAP and CUPRAC were applied for the determination of antioxidant activity. In addition to the studied compounds, for comparison, the antioxidant activities of commercial synthetic antioxidants (butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), trolox, and α -tocopherol) were determined and used further as a control group. The significant differences between the antioxidant activity of studied coumarins and standard antioxidants was determined with the application of Dunett's test ($p < 0.05$ was considered as significant and $p < 0.01$ as a very significant difference). Microdilution method was applied for the determination of antibacterial activity. Modern computer (*in silico*) methods (DFT, molecular docking, QSAR) are applied for establishing the correlation between the structure and the activity of the studied compounds and to determine the mechanisms by which this correlation is realized. In order to gain insight into the possible mechanisms of antibacterial and anti-HIV activities studied 4-phenyl hydroxycoumarins were subjected to docking simulations. *S. aureus* tyrosyl-tRNA synthetase, *E. coli* topoisomerase II DNA gyrase β and HIV-1 integrase have been chosen as target enzymes for the study of inhibitory activity.

Results. 7,8C showed significantly higher antioxidant activity ($p < 0.01$) in comparison to standard antioxidants determined with DPPH[•] and ABTS^{•+} method, while 7C and 5,7C didn't show that activity. All tested molecules showed inhibitory effect on lipid peroxidation. After 60 h reaction time the percentage of the inhibition of lipid peroxidation (with 95% confidence interval) was: 56.61 (52.67 to 60.55)% for 7C, 82.48 (75.24 to 89.72)% for 5,7C and 90.939 (88.542 to 93.324)% for 7,8C. Of all the studied coumarin molecules only 7C did not show reducing power determined by FRAP and CUPRAC methods. The slope values (with a confidence interval of 95% and a correlation coefficient r^2), which are directly proportional to reducing power were 0.0068 (0.00578-0.00777), 0.929 for 5,7C and 0.0269 (0.0235-0.0303), 0.985 for 7,8C determined with FRAP method and 0.0314 (0.0275-0.0354), 0.994 for 5,7C and 0.059 (0.0548-0.06316), 0.99924 for 7,8C determined with CUPRAC method. The calculated values for the DFT descriptors (HOMO, LUMO, the energy difference, IP, ΔE_{iso} and dipole moment) for the studied coumarins in vacuum, n-octanol, ethanol and water show

that of all studied 4-phenyl hydroxycoumarins 7,8C has the highest antioxidant activity, which is in agreement with obtained experimental data. The analysis of the parameters obtained with computational calculations indicate that the HAT is thermodynamically dominant mechanism in the gas phase, while in other studied systems, the most likely mechanism is SPLET. The obtained results for 7,8C show that the thermodynamically favored position of the hydroxyl group in the reactions involving BDE, PDE and ETE parameters is 8 and in the reactions which include the PA parameter is position 7. For 5,7C in the gas-phase favored position of the hydroxyl group in all mechanisms is position 5. In other studied systems, in the reaction mechanisms involving thermodynamic parameters BDE, PDE and ETE position 5 is favored, while in the mechanism that include parameter PA the position 7 is favored. It was determined that studied coumarins show better inhibitory effect against Gram (+) bacteria (MIC values range was from 0.01 to 2.50 mg/mL) in comparison to the Gram (-) (MIC values range was 0.16-10.0 mg/mL). 5,7C and 7,8C show the weakest inhibitory effect against *P. aeruginosa* and *P. mirabilis*, while 7C even at the highest tested concentration of 10 mg/mL didn't show inhibitory effect. All studied coumarins had the strongest inhibitory effect on the growth of strains of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *M. luteus*. The lowest activity among studied coumarin had 7C. 5,7C showed better inhibitory effect on the majority of the tested strains in comparison to 7,8C. For the interpretation of these results, data obtained by molecular docking studies of the studied compounds for the active site of characteristic enzymes were used. MolDock score values for the binding of the studied 4-phenyl hydroxycoumarins to the active site of tyrosyl tRNA synthetase demonstrated that 5,7C has the highest binding affinity, while 7,8C showed the highest binding affinity to the active site of topoisomerase II DNA gyrase β . Hbond values for the tyrosyl tRNA synthetase showed that 7,8C has the strongest interaction, whereas for the topoisomerase II DNA gyrase β 5,7C has strongest interaction. According to all Score values 7C shows the weakest interactions with the enzymes. Best QSAR models for the inhibition of HIV-1 integrase by a coumarin molecules have the following statistical parameters - for the 3' Processing activity: $R^2 = 0.9980$ and $Q^2 = 0.9977$ for the training set, and $R^2 = 0.9788$ for the test set and for the Integration activity: $R^2 = 0.9999$, and $Q^2 = 0.9998$ for training set and $R^2 = 0.9213$ for the test set. QSAR models are applied to the studied 4-phenyl hydroxycoumarins for calculation and evaluation of their inhibition activities on HIV-1 integrase. All the obtained score values for the studied coumarins binding to the active site of HIV-1 integrase have shown that 7,8C has the highest binding affinity. Calculated

physico-chemical and molecular characteristics showed that the investigated 4-phenyl hydroxycoumarins obey Lipinski rules.

Conclusion. 7,8C showed a much more pronounced antioxidant activity in comparison to 7C and 5,7C which indicates that the *ortho* position of the hydroxyl groups in 4-phenyl hydroxycoumarins significantly contributes to their antioxidant activities. HOMO and LUMO energies and their energy difference of 4-phenyl hydroxycoumarins examined in this study also indicate that 7,8C has the highest antioxidant activity. Between 5,7C and 7C better antioxidant activity has 5,7C. ΔE_{iso} values indicate that 7,8C has the greatest ability to capture free radicals. Total spin density indicates that for all examined hydroxyl groups least favored position in the basic structure of the 4-phenylcoumarins for free-radical reactions is position 7. DFT descriptors as well as obtained experimental data confirm that 7,8C has the highest antioxidative activity in comparison to other studied coumarins. HAT is thermodynamically dominant mechanism in the gas phase, while in other studied systems, the most likely antioxidative mechanism of action of studied coumarins is SPLET. The antibacterial activity of the compounds can be summarized in the following sequence: 7C<7,8C<5,7C. The molecular docking was applied for the evaluation of antibacterial activity on the basis of binding affinity of the studied coumarins in the active sites of tyrosyl tRNA synthetase (*S. aureus*) and topoisomerase II DNA gyrase β (*E.coli*). Based on the score values obtained with molecular docking, the binding affinity of the investigated molecules was determined and these results are in agreement with the results of their antibacterial activity. QSAR method was successfully applied for building of a mathematical model for calculating the anti-HIV activity of coumarin molecules on the basis of inhibition of HIV-1 integrase. All studied 4-phenyl hydroxycoumarins obey the Lipinski rules indicating their satisfactory pharmacokinetic profile.

Keywords: 4-phenyl hydroxycoumarins, antioxidant activity, antibacterial activity, DFT, SAR, QSAR, molecular docking, Lipinski rules.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	5
2.1. Kumarini.....	5
2.1.1. Biosinteza kumarina.....	6
2.1.2. Biološka i farmakološka aktivnost kumarina.....	8
2.1.3. Kumarini i pravila Lipinskog.....	11
2.1.4. 4-fenilkumarini (neoflavoni).....	13
2.2. Slobodni radikali u biološkim sistemima i oksidativni stres.....	14
2.2.1. Antioksidativni potencijal ćelije i antioksidansi.....	22
2.2.1.1. Kumarini kao antioksidansi.....	24
2.2.2. Metode primenjene za ispitivanje antioksidativne aktivnosti.....	26
2.2.2.1. <i>In vitro</i> metode.....	26
2.2.2.1.1. DPPH [•] metoda.....	27
2.2.2.1.2. ABTS ^{••} metoda.....	28
2.2.2.1.3. Feri tiocijanat metoda.....	28
2.2.2.1.4. FRAP metoda (Fe ³⁺ <i>Reducing Power Assay</i>).....	29
2.2.2.1.5. CUPRAC metoda (<i>Cupric ions reducing power assay</i>).....	29
2.2.2.2. DFT (<i>Density Functional Theory</i>) metoda.....	30
2.2.2.2.1. DFT deskriptori.....	32
2.2.2.2.2. Mehanizmi antioksidativnog delovanja.....	33
2.3. Osnovni principi antibakterijskog delovanja.....	36

2.3.1. Rezistencija na antibakterijske lekove.....	38
2.3.2. Kumarini kao antibakterijski agensi.....	40
2.3.3. Metode primenjene za ispitivanje antibakterijske aktivnosti.....	42
2.3.3.1. Mikrodiluciona metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti <i>in vitro</i> .	42
2.3.3.2. Kompjuterska doking metoda.....	43
2.4. QSAR studije farmakoloških aktivnosti.....	45
3. Ciljevi istraživanja.....	47
4. Materijal i metode.....	48
4.1. Materijal.....	48
4.1.1. Supstance i reagensi.....	48
4.1.2. Bakterijski sojevi.....	48
4.2. Metode.....	50
4.2.1. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti.....	51
4.2.1.1. DPPH [•] metoda.....	51
4.2.1.2. ABTS ⁺⁺ metoda.....	52
4.2.1.3. Feri tiocijanat metoda.....	52
4.2.1.4. FRAP metoda (Fe ³⁺ <i>Reducing Power Assay</i>).....	53
4.2.1.5. CUPRAC metoda (<i>Cupric ions reducing power assay</i>).....	53
4.2.2. Mikrodiluciona metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti.....	54
4.2.3. DFT (<i>Density Functional Theory</i>) metoda.....	54
4.2.4. Molekulski doking.....	55
4.2.5. QSAR metoda.....	56
5. Rezultati.....	59

5.1. Ispitivanje antoksidativne aktivnosti.....	59
5.1.1. DPPH [•] metoda.....	59
5.1.2. ABTS ^{•+} metoda.....	59
5.1.3. Feri tiocijanat metoda.....	60
5.1.4. FRAP metoda.....	61
5.1.5. CUPRAC metoda.....	62
5.2. Mikrodiluciona metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti.....	63
5.3. DFT (<i>Density Functional Theory</i>) metoda.....	65
5.4. Molekulski doking za antibakterijsko delovanje.....	71
5.5. QSAR metoda.....	80
5.6. Molekulski doking za anti HIV delovanje.....	85
5.7. Pravila Lipinskog kod ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina.....	89
6. Diskusija.....	90
6.1. Antioksidativna aktivnost ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina.....	90
6.2. Antibakterijska aktivnost ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina.....	94
6.3. QSAR studija i molekulski doking anti-HIV aktivnosti.....	98
6.4. Pravila Lipinskog.....	99
7. Zaključak.....	101
8. Literatura.....	104
Biografija autora.....	119

Lista skraćenica

Skraćenica	Značenje
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenozin trifosfat
BDE	entalpije raskidanja veze O–H (<i>Bond Dissociation Enthalpy</i>)
BHA	butilovani hidroksianizol
BHT	butilovani hidroksitoluen
CAT	katalaza
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CL	interval poverenja
CPCM	<i>Conductor-like Polarizable Continuum Model</i>
CUPRAC	<i>Cupric ions reducing power assay</i>
DFT	teorija funkcionala gustine (<i>Density Functional Theory</i>)
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH [•]	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
EC ₅₀	efikasna koncentracija (<i>Efficient Concentration</i>)
ETE	entalpija transfera elektrona (<i>Electron Transfer Enthalpy</i>)
ET-PT	postepeni elektrontransfer-protontransfer (<i>Stepwise Electron Transfer - Proton Transfer</i>)
FMO	<i>Frontier Molecular Orbital</i>
FRAP	<i>Fe³⁺ Reducing Power Assay</i>
HAT	direktan transfer atoma vodonika (<i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
HIV	virus humane imunodeficijencije
HOMO	najviša popunjena molekulska orbitala (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
IP/EI	Jonizacioni potencijal/Jonizaciona energija (<i>Ionization Potential/Ionization Energy</i>)
k	nagib prave
LCAO-MO	molekulske orbitale nastale linearnim kombinovanjem atomskih orbitala
LUMO	najniža nepopunjena molekulska orbitala (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
MDA	malondialdehid
MEP	mapa elektrostatičkog potencijala
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MO	molekulska orbitala
MVD	The Molegro Virtual Docker
NAD	nikotin amid dinukleotid
N _{epoch}	broj ponavljanja
NMR	nuklearna magnetna rezonanca

P	particioni koeficijent
p.a.	za analizu (pro analysi)
PA	afinitet prema protonu (<i>Proton Affinity</i>)
PABA	para-amino-benzoeva kiselina
PBP	proteini za vezivanje penicilina (<i>Penicillin-Binding Proteins</i>)
PDE	entalpija disocijacije protona (<i>Proton Dissociation Enthalpy</i>)
QSAR/QSPR	kvantitativni odnos između strukture i aktivnosti kao i strukture i fizičko-hemijskih karakteristika molekula (<i>Quantitative Structure-Activity and Quantitative Structure-Property Relationship</i>)
r^2	korelacioni koeficijent
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kiseonične vrtse (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SAR	odnos između strukture i aktivnosti (<i>Structure Activity Relationship</i>)
SD	standardna devijacija
SE	standardna greška
SMILES	<i>Simplified Molecular Input-Line Entry System</i>
SOD	superoksid dismutaza
SPLET	sekvencijalni gubitak protona praćen transferom elektrona (<i>Sequential Protonloss Electron Transfer</i>)
T	prag (<i>Threshold</i>)
TTC	trifenil tetrazolium hlorid
USG	ukupna spinska gustina
UV/VIS	ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija
TPSA	topološka polarna površina
ΔE_{iso}	energija stabilizacije
ϵ	polarizabilnost

1. Uvod

Ako sledimo prirodu kao vođu, nikad nećemo zalutati

Ciceron

Kumarini su široko rasprostranjeni u biljnom svetu i predstavljaju značajnu klasu bioaktivnih molekula. Jednostavni kumarini, furanokumarini i piranokumarini, kao i druga fenilpropanska jedinjenja, vode poreklo iz cimetne kiseline nastale iz fenilalanina u šikiminskom putu biosinteze. Hidroksilacija aromatičnog jezgra u *orto* položaju u odnosu na bočni niz je ključni korak u formiranju laktona cimetne kiseline-kumarina. Kumarini mogu nastati i kao produkti metabolizma fenilalanina preko cimetne kiseline i *p*-kumarinske kiseline [Bourgaud et al., 2006]. Biološka aktivnost kumarina, kao sekundarnih metabolita biljaka, se povezuje sa njihovom sposobnošću da deluju kao fitoaleksini. Fitoaleksini imaju zaštitnu ulogu za biljku jer sprečavaju infekciju tkiva bakterijama, gljivama ili virusima i predstavljaju adaptaciju biljne vrste na različite ekološke faktore. Razlike u biološkoj aktivnosti kumarina uslovljene su razlikama u njihovoj hemijskoj strukturi koje nastaju supstitucijom osnovnog kumarinskog jezgra na šest dostupnih položaja. Spektar biološke aktivnosti kumarina obuhvata antikancersko, antiinflamatorno, antibakterijsko, antikoagulativno i imunomodulatorno delovanje [Wu et al., 2009].

Kumarini predstavljaju klasu bioaktivnih molekula sa različitim funkcionalnim grupama vezanim za osnovnu kumarinsku strukturu koja se može definisati kao lakton gde je benzenov prsten spojen sa α -pironom. Sama osnovna struktura je geometrijski kruta i bogata elektronima zbog prisustva većeg broja konjugovanih dvostrukih veza. Jedinstvene osobine kumarinskih molekula se ogledaju u njihovoj sposobnosti građenja nekovalentnih interakcija kao što su hidrofobne, Van der Waals-ove, π - π i elektostatičke interakcije. Molekuli koji sadrže hidroksilne grupe vezane sa osnovnu kumarinsku strukturu pokazuju antioksidativno delovanje jer imaju sposobnost da reaguju sa slobodnim radikalima.

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni sa jednim ili više nesparenih elektrona zbog čega su veoma reaktivni. Radikali koji u najvećoj meri dovode do oštećenja ćelija spadaju u reaktivne kiseonične vrste (ROS) koje se stvaraju endogenim putem u vidu međuprodukata

vitalnih metaboličkih reakcija na nivou respiratornog lanca mitohondrija, ili u toku odvijanja detoksikacionih procesa. Egzogeni proizvodnja ROS nastaje u prisustvu virusnih, bakterijskih ili gljivičnih oboljenja, radijacije i različitih toksina. Narušena ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i sistema zaštite usmerava ćeliju u stanje oksidativnog stresa što dovodi do modifikacije DNK, proteina i lipida. Dokazano je da radikali učestvuju u patogenezi mnogih bolesti, kao što su dijabetes, kardiovaskularna oboljenja, kancerogeneza, neurološka oboljenja, bolesti bubrega, jetre, srca itd. [Martinet et al., 2002].

Današnji stil života i navike doprinose pojačanoj izloženosti čovekovog organizma slobodnim radikalima i jedan od značajnih ciljeva savremene medicinske hemije je pronalaženje novih molekula sa antioksidativnim delovanjem koji su sposobni da reaguju sa slobodnim radikalima i neutrališu njihove štetne efekte.

Kumarini se smatraju i potencijalnim antibakterijskim agensima koji inhibiraju ATP-aznu aktivnost bakterijske DNK giraze konkurišući sa ATP-om za vezivanje za B podjedinicu enzima [Damu et al., 2012; Zhang et al., 2012]. Osnovno kumarinsko jezgro, benzopiron, je strukturno slično benzopiridonu, koji predstavlja osnovu antiinfektivnih lekova iz grupe hinolona [Wang et al., 2012]. Novobiocin, klorobiocin i kumermicin A1 su aminokumarinski antibiotici koji su izolovani iz različitih *Streptomyces* vrsta [Wu et al., 2009]. Bakterijske infekcije su česta i veoma značajna infektivna oboljenja koja su posebno rasprostranjena u nehigijenskim sredinama i među stanovništvom gde je zdravstvena kultura niska. Od 1940. godine razvoj lekova efikasnih protiv bakterijskih infekcija doveo je do revolucionarnih promena u farmakoterapiji, ali morbiditet i mortalitet zbog infektivnih bolesti i dalje predstavljaju veliki zdravstveni problem. Fenomen rezistencije na postojeće antibiotike nameće ozbiljna ograničenja u pogledu raspoloživih opcija za medicinsku terapiju mnogih bakterijskih infekcija. Bez novih i efikasnih antibiotika, a uz nagli porast broja rezistentnih sojeva, društvo bi se moglo vratiti u uslove pre antibiotske ere. Rezistencija bakterija na antibiotike jedan je od najvećih problema današnje medicine tako da racionalna primena antibiotika u kliničkoj praksi i razvoj novih antibakterijskih agenasa sa širokim spektrom delovanja predstavljaju savremene naučne izazove.

Izolovanje prirodnih jedinjenja i njihova upotreba kao vodeće strukture za hemijsku modifikaciju i poboljšanje farmakohemijske aktivnosti ima dugu istoriju u farmaceutskoj industriji [Efferth & Koch, 2011]. Savremena istraživanja i dizajn lekova su dosta fokusirani na identifikaciju farmakofora, kao skupa strukturnih karakteristika molekula odgovornih za

njegovu farmakološku aktivnost, i uspostavljanju odnosa između strukture i aktivnosti (*Structure Activity Relationship*, SAR) paralelnom primenom *in vitro* i kompjuterskih studija.

Uspostavljanje kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti kao i strukture i fizičko-hemijskih karakteristika molekula (*Quantitative Structure-Activity and Quantitative Structure-Property Relationship*, QSAR/QSPR) je od velikog značaja za savremenu hemiju i biohemiju. Suštinu QSAR/QSPR predstavlja transformacija ispitivanih molekula sa određenim karakteristikama u matematički kvantifikovani i kompjuterizovani obrazac koristeći eksperimentalne podatke i hemijsku intuiciju. Uspostavljena veza između strukture i aktivnosti/osobina omogućava kompjuterski skrining za bilo koji set molekula, uključujući i ona koja još nisu sintetisana, u cilju izbora strukture sa željenim karakteristikama. Prednost ovih kompjuterskih studija je mogućnost izbora jedinjenja sa najboljim karakteristikama za sintezu i laboratorijske testove. Na taj način QSAR/QSPR pristup štedi resurse i ubrzava proces razvoja novih molekula koji će se koristiti kao lekovi, aditivi ili u druge svrhe [Karelson & Lobanov, 1996].

Aktuelna istraživanja ukazuju na veliki broj kumarinskih molekula kao jedinjenja koja pokazuju izraženu farmakološku aktivnost, niske toksične i sporedne efekte, visoku biološku raspoloživost i širok spektar delovanja. U principu, utvrđeno je da se kumarini povinuju pravilima Lipinskog koja predstavljaju bitne karakteristike mnogih lekova koji su danas u upotrebi [Galkin et al., 2009]. Navedene jedinstvene osobine kumarina pružaju široke mogućnosti za intenzivna proučavanja, potencijalnu primenu i razvoj ove grupe jedinjenja.

U odnosu na druga kumarinska jedinjenja 4-fenil hidroksikumarini (neoflavoni) su relativno malo ispitivani. Takođe, ne postoji dovoljno literaturnih podataka o njihovim farmakohemijskim karakteristikama, uključujući antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost. 4-fenil hidroksikumarini predstavljaju klasu jedinjenja koja imaju fenil grupu u položaju 4 i hidroksilne grupe vezane za osnovnu kumarinsku strukturu. Odabrani kumarini koji su korišćeni za ispitivanja u ovoj doktorskoj disertaciji su: 7-hidroksi-4-fenilkumarin (7C), 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin (5,7C) i 7,8-dihidroksi-4-fenilkumarin (7,8C).

Rezultatima ove doktorske studije je utvrđena antioksidativna i antibakterijska aktivnost ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina, uspostavljena je korelacija između njihove strukture i aktivnosti, utvrđeni su mehanizmi kojima se ostvaruje antioksidativna aktivnost i prikazan je način vezivanja ovih kumarina unutar aktivnog mesta bakterijskih enzima (tirozil tRNK

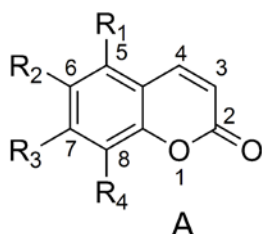
sintetaza iz *S. aureus* i topoizomeraza II DNK Giraza β iz *E. coli*). Na ovaj način dobijeni su podaci koji su značajni za detaljno sagledavanje farmakohemijske aktivnosti odabranih 4-fenil hidroksikumarina kao i njihove potencijalne primene u medicinske svrhe.

2. Pregled literature

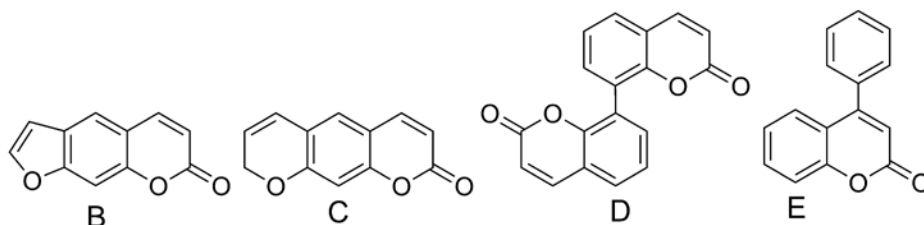
2.1. Kumarini

Kumarini, aglikoni kumarinskih heterozida, predstavljaju klasu bioaktivnih molekula sa različitim funkcionalnim grupama vezanim za osnovnu kumarinsku strukturu koja se može definisati kao lakton gde je benzenov prten spojen sa α -pironom [O'Kennedy & Thornes, 1997]. Osnovna stuktura je geometrijski kruta i bogata elektronima zbog sistema konjugovanih π veza te ima sposobnost transfera naelektrisanja. Jedinstvene osobine kumarinskih molekula se ogledaju u njihovoj sposobnosti građenja nekovalentnih interakcija kao što su hidrofobne, Van der Waals-ove, π - π i elektostatičke interakcije.

Kumarini se mogu podeliti na jednostavne kumarine (benzo- α -piron), furanokumarine (linearni i angularni tip), piranokumarine, dikumarine i fenilkumarine (slika 2.1.). Uvođenje prenil grupe u položaj 6 osnovne strukture kumarina dovodi do ciklizacije i formiranja linearnih furanokumarina ili piranokumarina. Vezivanjem prenil grupe za položaj 8 nastaju angularni furanokumarini [Estévez-Braun & González 1997; Murray 1991; Murray et al., 1982].



Kumarin: R1, R2, R3, R4: H
 Skopoletin: R2: OMe, R3: OH,
 Umbeliferon: R3: OH
 Herniarin: R3: OMe
 Skoparon: R2, R3: OMe
 Eskuletin: R2, R3: OH
 Fraksetin: R2: OMe, R3, R4: OH
 Izofraksidin: R2, R4: OMe, R3: OH
 Izoskopoletin: R2: OH, R3: OMe
 Dafnetin: R3, R4: OH
 Hidrangetin: R3: OH, R4: OMe



Slika 2.1. Hemijska struktura kumarina: A) jednostavni kumarini, B) furanokumarini, C) piranokumarini, D) dikumarini i E) fenilkumarini.

Kumarin je jedinjenje koje je prvi put izolovano 1820. godine iz semena (*Tonquino beans*) južnoameričkog drveta *Dipterix odorata*, *Fabaceae*. Kumarini su široko rasprostranjeni u biljnom svetu, izolovano je preko 1000 različitih molekula kumarinske strukture. Jednostavni kumarini su najprisutniji u biljkama familija *Asteraceae* i *Fabaceae*, a heterociklični kumarini (furanokumarini i piranokumarini) u okviru familija *Rutaceae* i *Apiaceae*. [Akeson et al., 1963; Ehlers et al., 1995; Kovačević, 2004].

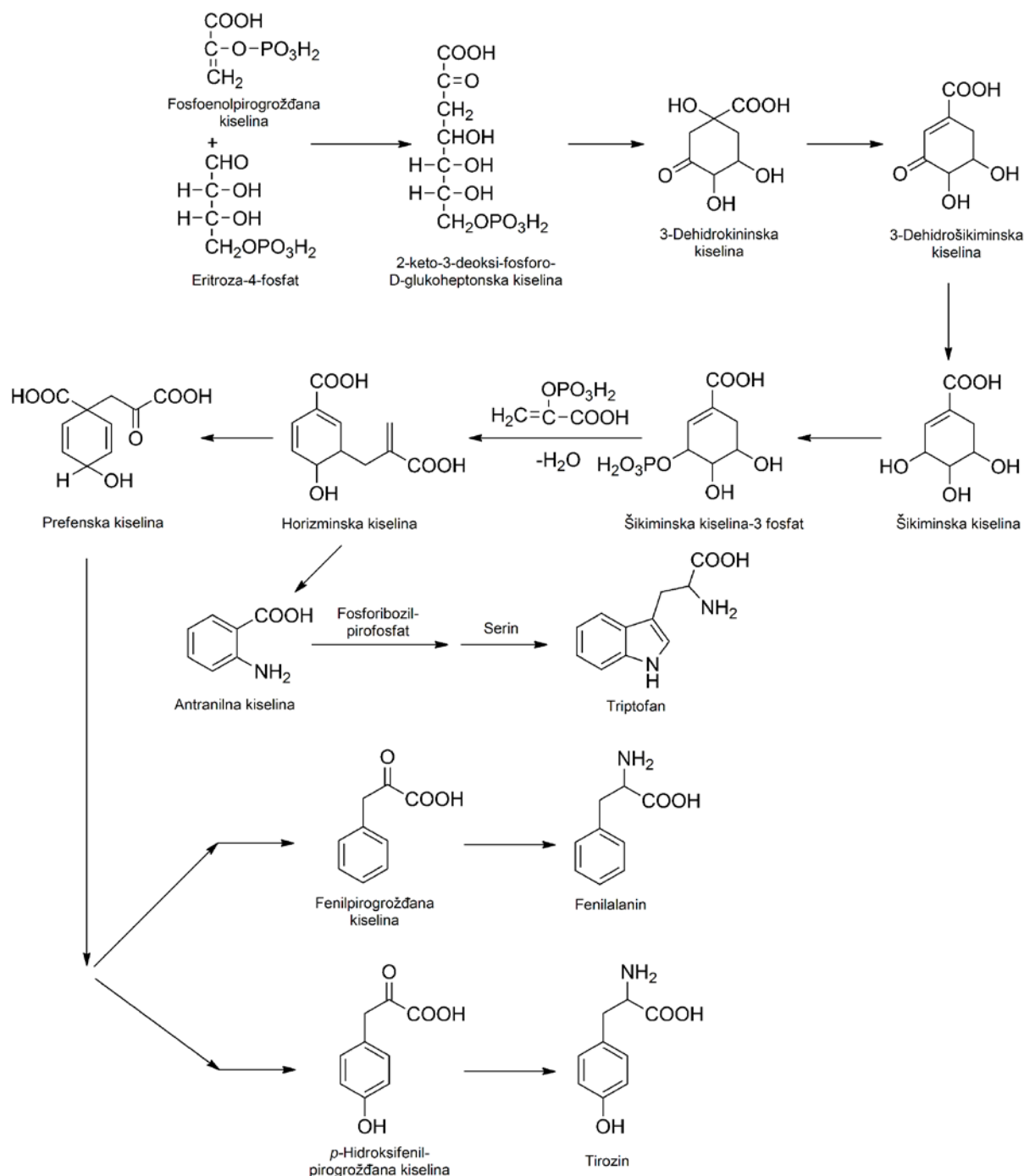
Kumarinske droge, ekstrakti i izolovana jedinjenja koriste se kao sredstva za aromatizaciju u kozmetičkoj, prehrambenoj, duvanskoj i industriji alkoholnih pića. Poznate kumarinske droge su:

1. Melilloti herba (herba kokoca),
2. Ammi visnagae fructus (plod visnage),
3. Hippocastani cortex (kora divljeg kestena),
4. Angelicae herba et radix (herba i koren angelike) i
5. Pilosellae herba cum radicibus (herba i koren zečije lobode).

Ekstrakt kokoca deluje antiedematozno, intenzivira vensku cirkulaciju i smanjuje permeabilnost kapilara i koristi se kod poremećaja venske i limfne cirkulacije. Plod visnage sadrži visnadin (piranokumarin) koji blokira kalcijumove kanale i deluje kao koronarni vazodilatator. Kora divljeg kestena sadrži kumarine (eskulin, eskuletin i metileskuletin) triterpenske saponozide i flavanoide i koristi se u terapiji oštećenja periferne cirkulacije donjih ekstremiteta i rektalnog regiona. Angelika se tradicionalno koristi u terapiji poremećaja varenja hrane, lučenja fermenta u digestivnom traktu i kod grčeva. Zečja loboda sadrži heterozide umbeliferona, a koristi se za poboljšanje rada organa digestivnog trakta i kao diuretik [Kovačević, 2004].

2.1.1. Biosinteza kumarina

Jednostavni kumarini, furanokumarini i piranokumarini, kao i druga fenilpropanska jedinjenja, vode poreklo iz cimetne kiseline nastale iz fenilalanina u šikiminskom putu biosinteze (šema 2.1.). Fenilkumarini nastaju metabolizmom izoflavona [Bourgaud et al., 2006].



Šema 2.1. Biosinteza aromatičnih jedinjenja preko šikiminske kiseline-fenilpropanski put (preuzeto iz Kovačević, 2004).

Hidroksilacija aromatičnog jezgra u *orto* položaju u odnosu na bočni niz je ključni korak u formiranju laktone cimetne kiseline-kumarina. Istraživanja su pokazala da umbeliferon potiče iz *cis-p*-kumarinske kiseline, dok kumarin nastaje iz *cis*-cimetne kiseline. Različiti enzimi su odgovorni za *orto* i *para* hidroksilaciju cimetne kiseline. Hidroksilacija cimetne kiseline u

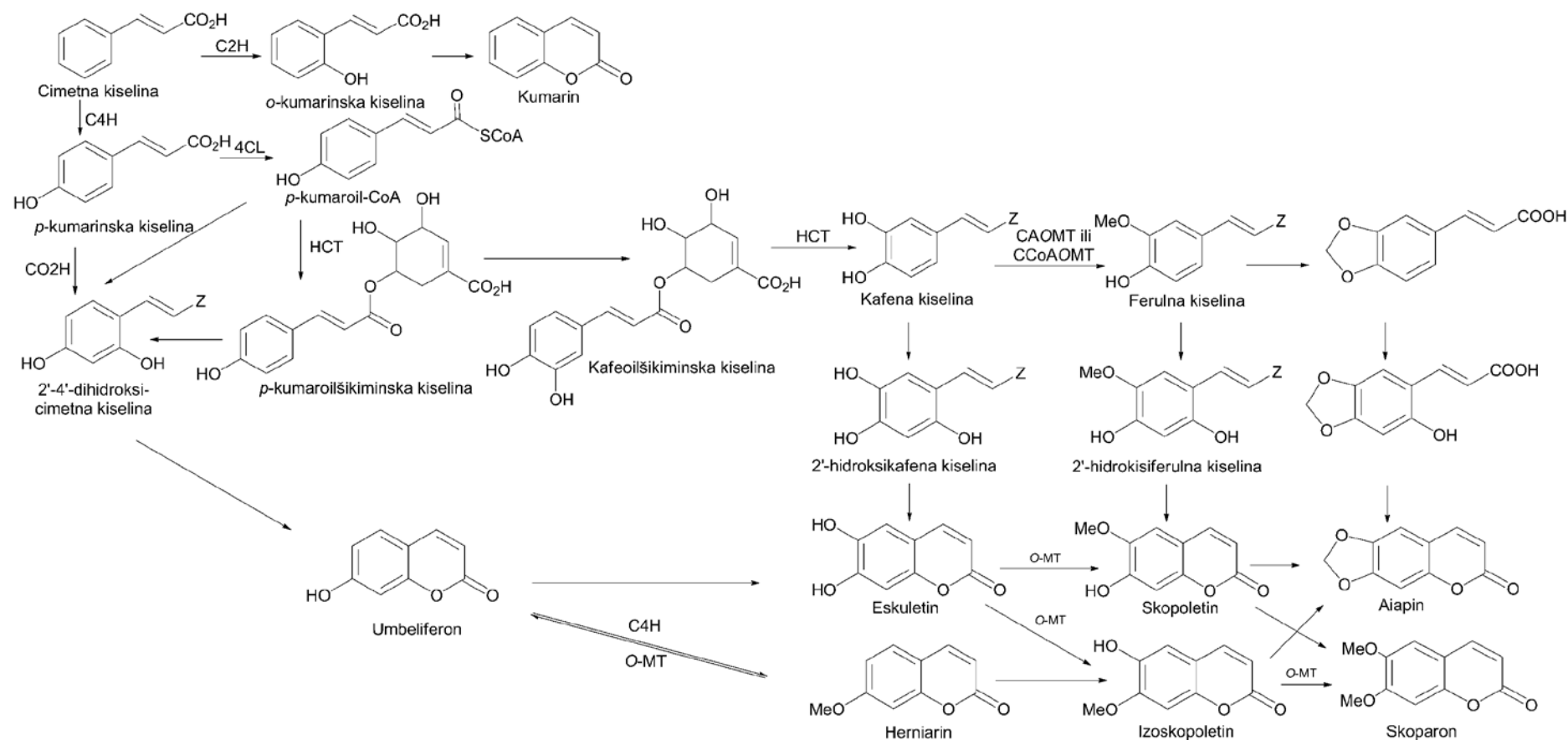
položaju 4 katalizovana je cimetna kiselina 4-hidroksilazom, citohrom P450 monooksigenazom iz CYP73A porodice [Teutsch et al., 1993].

Fenilpropanski put biosinteze kumarina (šema 2.2.) pokazuje da skopoletin nastaje pre iz ferulinske kiseline nego preko umbeliferon-eskuletin-skopoletin puta dok je umbeliferon polazno jedinjenje za sintezu furanokumarina [Fritig et al., 1970; Kai et al., 2008; Matern et al., 1999].

2.1.2. Biološka i farmakološka aktivnost kumarina

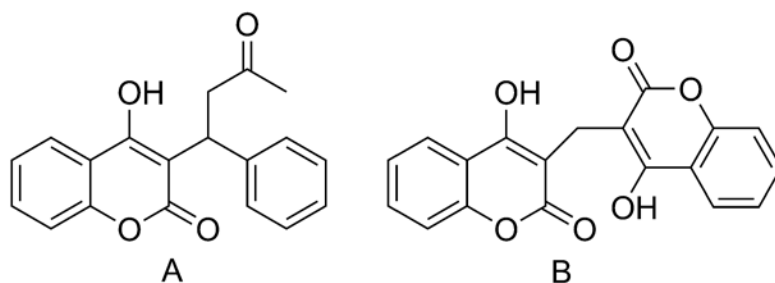
Biološka aktivnost kumarina, kao sekundarnih metabolita biljaka, se povezuje sa njihovom sposobnošću da deluju kao fitoaleksini. Fitoaleksini imaju zaštitnu ulogu za biljku jer sprečavaju infekciju tkiva bakterijama, gljivama ili virusima i predstavljaju adaptaciju biljne vrste na različite ekološke faktore. Poznato je da kumarini štite biljku od ultraljubičastog zračenja. Skopoletin je karakterističan fitoaleksin [Kùc, 1982], njegova sinteza u biljkama se aktivira nakon infekcije [Sharan et al., 1998]. Skopoletin takođe pokazuje sposobnost hvatanja radikala (reaktivnih kiseoničnih vrsta) i može biti uključen u sistem zaštite biljne ćelije od oksidativnog stresa [Chong et al., 2002].

Mogućnost supstitucije osnovne kumarinske strukture i uvođenje različitih funkcionalnih grupa utiče na farmakološku aktivnost kumarina i razlog je njihovog širokog spektra delovanja. Potvrđeno je da kumarini pokazuju antikancersku aktivnost [Riveiro et al., 2010], antimikrobno [Wu et al., 2009], antikoagulativno [Gomez-Outes et al., 2012], antineurodegenerativno [Anand et al., 2012] i antioksidativno delovanje [Kostova et al., 2011].



Šema 2.2. Fenilpropanski put biosinteze kumarina: Z=CO₂H ili CO-SCoA, C2H-cimetna kiselina 2-hidroksilaza, C4H-cimetna kiselina 4-hidroksilaza, 4CL-4-kumarat: CoA ligaza, CO2H-4-kumarinska kiselina 2-hidroksilaza, HCT-hidroksicinamoil-transferaza, CAOMT-kafena kiselina O-metiltransferaza, CCoAOMT-kafeoil CoA O-metiltransferaza, O-MT-O-metiltransferaza (preuzeto iz Bourgaud et al., 2006).

Oralni antikoagulansi iz grupe 4-hidroksikumarina, kao što je varfarin, predstavljaju najčešće propisivane lekove za terapiju i prevenciju venske tromboze. Varfarin je u upotrebi preko 50 godina i predstavlja sintetički derivat dikumarola, mikotoksinskog antikoagulansa otkrivenog u pokvarenoj stočnoj hrani koja sadrži kokotac. 4-hidroksikumarini pokazuju sposobnost da inhibiraju vitamin K epoksid reduktaze [Oldenburg et al., 2007] i izazivaju stanje slično nedostatku vitamina K. Dikumarol i njegov analog, varfarin, su antagonisti vitamina K i inhibiraju sintezu protrombina kao i faktora VII, IX i X u jetri. Ispitivanje odnosa strukture i aktivnosti pokazuje da su za antiokoagulatívno delovanje ovih kumarina odgovorni osnovna kumarinska struktura sa hidroksilnom grupom u položaju 4 i bočni supstituent u položaju 3 [Ikawa et al., 1944] (slika 2.2.).



Slika 2.2. Hemijska struktura A) varfarina i B) dikumarola.

Studije pokazuju da je varfarin obećavajući lek za terapiju kancera. McCulloch i saradnici sugerišu da varfarin *in vitro* može inhibirati metastaze tumora pri koncentraciji manjoj od 1mM [McCulloch & George 1989].

4-hidroksikumarin je bez antikoagulatívne aktivnosti, usled nedostatka supstituenta u položaju 3, selektivno dezorganizuje aktin citoskeleta u ćelijskim linijama melanoma i na taj način utiče na ćelijku deobu [Velasco-Velazquez et al., 2003]. Ova otkrića ukazuju da 4-hidroksikumarin može biti koristan kod metastaza i u terapiji melanoma.

Antitumorska aktivnost kumarina i 7-hidoksikumarina (umbeliferona) na humanim tumorskim ćelijskim linijama prvi put je primećena od strane Weber-a i sardnika [Weber et al., 1998]. Eskuletin pokazuje antiproliferativni efekat u leukemijskim ćelijama indukcijom apoptoze [Chu et al., 2001].

U laboratorijskim uslovima otkrivena je mutagena aktivnost linearnih furanokumarina koja se ostvaruje njihovim povezivanjem sa pirimidinskim bazama u lancu DNK što se može potencijalno iskoristiti u terapiji kancera [Cook & Samman, 1996].

Herniarin, eskuletin, skopolin i skopoletin pokazali su antiinflamatornu aktivnost inhibirajući otpuštanje eikosanoida iz jonoformiranih makrofaga miša [Laposata et al., 2007].

Kumarinska jedinjenja predstavljaju značajne anti-HIV agense jer su sposobni da inhibiraju virusnu adsorpciju, reverznu transkripciju, proteazu i integraciju u HIV replikacionom ciklusu [Vlietinck et al., 1998; Yu et al., 2003]. U cilju pronalaženja novih jedinjenja sa anti-HIV delovanjem HIV-1 integraza predstavlja važan enzim u molekulskom modelovanju i dizajnu lekova [Al-Mawsawi & Neamati, 2011].

Međutim, pored pozitivnih efekata treba spomenuti i toksične efekte određenih kumarina kao što su akutna hepatotoksičnost i kancerogenost aflatoksina [Murray et al., 2005].

2.1.3. Kumarini i pravila Lipinskog

Aktuelna istraživanja ukazuju na veliki broj kumarinskih molekula kao potencijalne lekove koji pokazuju izraženu farmakološku aktivnost, slabe toksične i sporedne efekte, dobru biološku raspoloživost i širok spektar delovanja. U principu, utvrđeno je da se kumarini povinuju pravilima Lipinskog koja predstavljaju bitne karakteristike mnogih lekova koji su danas u upotrebi [Galkin et al., 2009].

Na osnovu analize mnogih lekova, Lipinski i saradnici su utemeljili efikasnu metodologiju „pravilo pet“ („rule of five“) za procenu rastvorljivosti i permeabilnosti potencijalnog leka na osnovu proračuna 4 deskriptora: molekulska masa, oktanol/voda particioni koeficijent (P), broj donora i broj akceptora vodoničnih veza. Metodologija „pravilo pet“ koristi broj 5 za procenu biološke raspoloživosti molekula: slaba biološka raspoloživost je karakteristika molekula koji imaju molekulsku masu veću od 500, vrednost logP preko 5 i koji sadrže više od 5 donora ili 10 (2×5) akceptora vodoničnih veza. Molekul za koji se smatra da poseduje osobine slične registrovanom leku ne sme pokazati više od jednog odstupanja od pravila Lipinskog [Lipinski, 2004; Lipinski et al., 2001].

Deskriptori Lipinskog, zapravo omogućavaju procenu farmakokinetičkog profila ispitivanih molekula predviđanjem njihove apsorpcije i distribucije (raspodele) odnosno biološke raspoloživosti. Apsorpcija i distribucija su 2 od 4 osnovna parametra koje proučava farmakokinetika i predstavljaju deo LADMER sistema koji obuhvata složene procese oslobađanja (*Liberation*) aktivne supstance iz farmaceutskog oblika, njene apsorpcije (*Absorption*) u sistmsku cirkulaciju, raspodele (*Distribution*) i metabolizma u organizmu (*Metabolism*), procese izlučivanja (*Elimination*) leka iz organizma i postizanja

farmakodinamičkog odgovora (*Response*). Mnogi problemi u razvoju lekova rezultat su baš farmakokinetičkih nedostataka kao što su loša apsorpcija, efekat prvog prolaza, visok stepen vezivanja za proteine i dr. Ovi procesi utiču na biološku raspoloživost i zavise od fizičko-hemijskih osobina samih molekula kao što su veličina i oblik, rastvorljivost, particioni koeficijent i stepen jonizacije. Uloga lipofilnosti u apsorpciji molekula je kritična. Brzina apsorpcije nije funkcija celokupne koncentracije lekovite supstance na mestu apsorpcije, već samo koncentracije njenog oblika koji se apsorbuje, a to je lipofilni, nejonizovani oblik.

Particioni koeficijent (P) opisuje raspodelu molekula između lipidne i vodene faze, odnosno afinitet molekula za lipidnu ili vodenu fazu. P i vrednost logP predstavljaju parametre lipofilnosti molekula od kojih zavisi prolaz molekula kroz membrane. *In vitro* dvofazni sistemi za raspodelu supstance između dve faze, organske i vodene faze, simuliraju reakciju potencijalnog leka i membrane. Organska faza, koju čine organski rastvarači (npr. oktanol) predstavlja hidrofobni deo membrane, dok vodena faza predstavlja unutrašnjost kompartmenta punjenih vodenim sadržajem. Polarne supstance pokazuju veći afinitet za vodenu fazu, dok nepolarne supstance pokazuju veći afinitet za organsku fazu. Particioni koeficijent (koeficijent raspodele) je odnos koncentracija nejonizovanog oblika jedinjenja rastvorenog u dve faze koje se ne mešaju i koje su u ravnoteži. Vrednost logP se koristi za poređenje lipofilnosti različitih jedinjenja (jednačina 2.1.).

$$\log P = \log [\text{nejonizovani oblik leka}]_{\text{oktanol}} - \log [\text{nejonizovani oblik leka}]_{\text{voda}} \quad (2.1.)$$

Pored eksperimentalnih metoda, postoje i kompjuterski proračuni za dobijanje vrednosti logP:

1. fragmentna metoda omogućava izračunavanje logP na osnovu hemijske strukture ispitivanog molekula. LogP se izračunava kao suma lipofilnih karakteristika individualnih fragmenata molekula (π vrednosti). π vrednosti su dobijene na osnovu korelacije lipofilnog doprinosa pojedinačnih fragmenata na logP velikog broja molekula,
2. CLOGP-kompjuterski program za izračunavanje logP na osnovu vrednosti doprinosa lipofilnosti velikog broja fragmenata koje se nalaze u bazi podataka i
3. izračunavanje logP se takođe može vršiti na osnovu suma doprinosa svakog tipa atoma na logP ($\log P = \sum a_i n_i$).

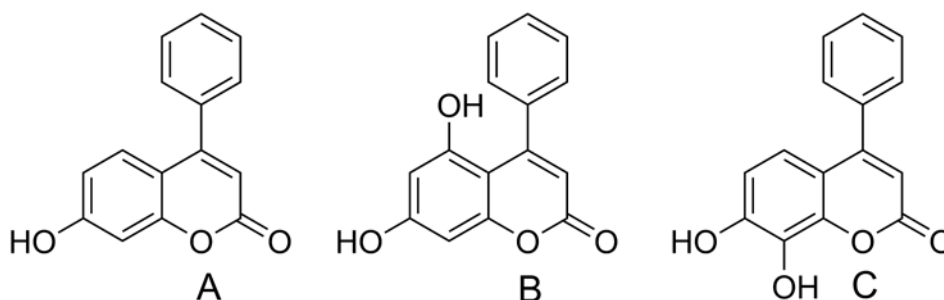
Topološka polarna površina (*Topological Polar Surface Area*, TPSA) je parametar koji opisuje biološku raspoloživost potencijalnog leka nakon oralne primene, apsorpciju i sposobnost prolaska molekula kroz membrane (permeabilnost kroz tkivne barijere). TPSA predstavlja zbir površina u molekulu koje sadrže atome kiseonika i azota, kao i atome vodonika vezanih za njih i koristi se za procenu sposobnosti molekula da gradi vodonične veze. Molekuli čije su vrednosti za $TPSA < 140 \text{ \AA}^2$ imaju dobru intestinalnu apsorpciju, dok molekuli sa $TPSA < 60 \text{ \AA}^2$ pokazuju sposobnost prolaska kroz hemato-encefalnu barijeru [Ertl et al., 2000; Prasanna & Doerksen, 2009].

Na osnovu deskripcije Lipinskog struktura osnovnog molekula se može modifikovati uvođenjem funkcionalnih grupa u cilju postizanja željenih farmakokinetičkih karakteristika.

2.1.4. 4-fenilkumarini (neoflavoni)

Neoflavoni su priznati sredinom 60-ih kao nova grupa prirodnih jedinjenja sa osnovnom strukturom 4-fenilkumarina. Neoflavoni su izolovani iz 58 biljaka porodica *Clusiaceae*, *Fabaceae*, *Rubiaceae*, *Asteraceae*, *Thelypteridaceae*, *Passifloraceae* i *Rutaceae*. Dalbergin (6-hidroksi-7-metoksi-4-fenilkumarin) je najviše rasprostranjen neoflavon u biljkama. Prvi neoflavon, kalofilolid, je izolovan 1951. godine iz ekstrakta semenki *Calophyllum inophyllum* [Garazd et al., 2003]. Iz iste biljne vrste izolovan je i apetatolid za koji je potvrđena antitumorska aktivnost [Games, 1972; Itoigawa et al., 2001]. U literaturi postoje podaci da neoflavoni pokazuju različite biološke aktivnosti (antimikrobna aktivnost protiv *Candida albicans* [Mata et al., 1988], *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* i *M. luteus* [Quadri-Spinelli et al., 2000], citotoksična aktivnost [Quadri-Spinelli et al., 2000], antitumorska aktivnost [Itoigawa et al., 2001], inofilum A, B, C, D, E, G-1, G-2, P su inhibitori HIV-1 reverzne transkriptaze [Patil et al., 1993]), ali su ova jedinjenja ipak relativno malo proučavana u odnosu na druga prirodna fenolna jedinjenja.

Kumarini koji su korišćeni za ispitivanja u ovoj doktorskoj disertaciji su: 7-hidroksi-4-fenilkumarin (7C), 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin (5,7C) i 7,8-dihidroksi-4-fenilkumarin (7,8C) (slika 2.3.).



Slika 2.3. Hemijska struktura odabranih 4-fenil hidroksikumarina: A) 7-hidroksi-4-fenilkumarin (7C), B) 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin (5,7C) i C) 7,8-dihidroksi-4-fenilkumarin (7,8C).

Seratin (5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin) je prirodno jedinjenje prisutno u biljci *Passiflora serratodigitata* [Ulubelen et al., 1982].

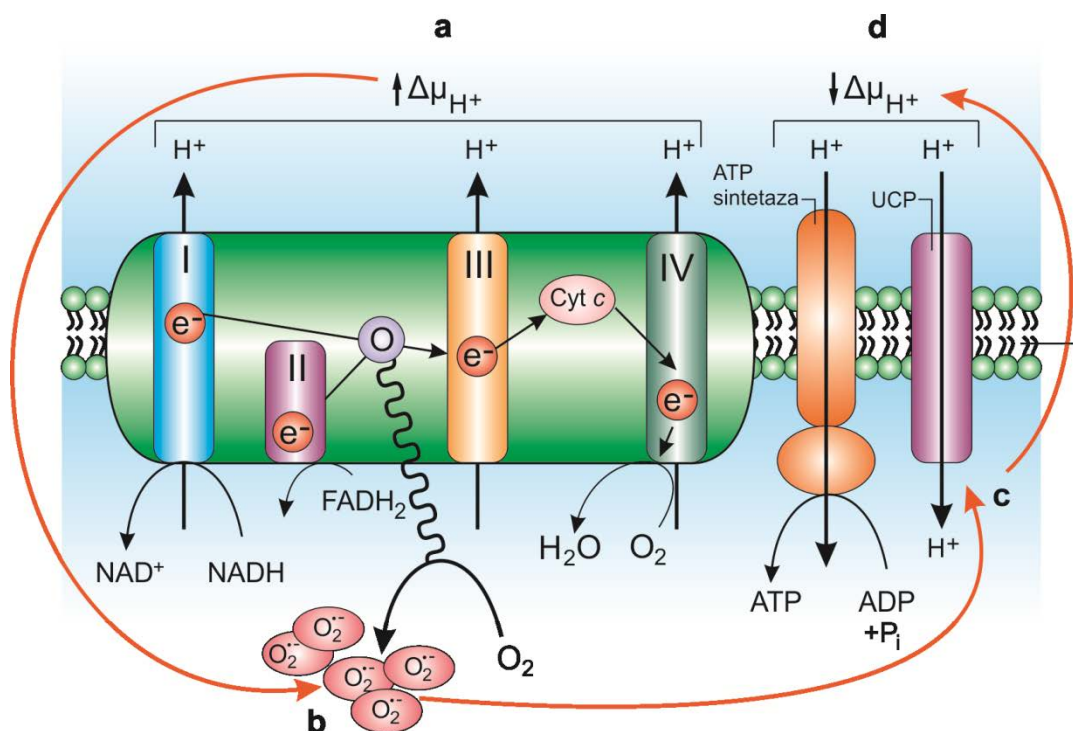
2.2. Slobodni radikali u biološkim sistemima i oksidativni stres

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni sa jednim ili više nesparenih elektrona. Slobodni radikali mogu biti neutralni, pozitivno (katjon radikal) i negativno naelektrisani (anjon radikal). Uzrok njihove neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti su nespareni elektroni. Nespareni elektron može biti lokalizovan na atomima različitih elemenata, pa se po tome slobodni radikali mogu podeliti na slobodne radikale kiseonika, hlora, azota itd. Slobodni radikali spadaju u najreaktivnije hemijske vrste. Zbog svoje visoke hemijske reaktivnosti oni lako stupaju u reakcije, međusobno ili sa drugim molekulima. U jako reaktivne hemijske vrste, pored slobodnih radikala, ubrajaju se i neradikalni oblici (oksidacioni agensi) koji se lako konvertuju u radikale.

Slobodni radikali u ćelijama (endogeni put produkcije slobodnih radikala) se formiraju brojnim biohemijskim reakcijama [Djordjević, 2004]:

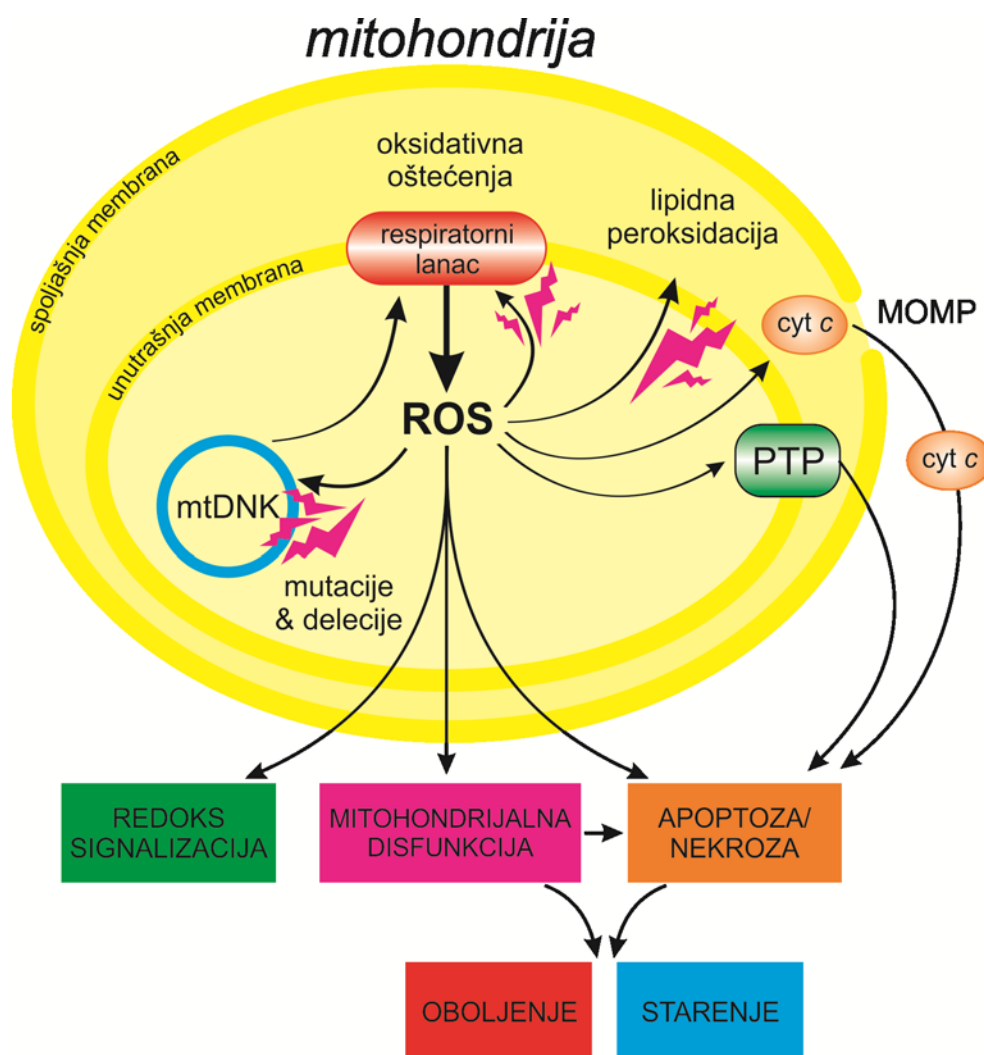
1. u toku oksidativne fosforilacije u mitohondrijama,
2. u procesu fagocitoze,
3. u reakcijama biotransformacije endogenih i egzogenih supstrata u endoplazmatskom retikulumu,
4. u enzimskim reakcijama koje katalizuju oksidaze,
5. u procesu sinteze eikosanoida,
6. u reakcijama oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom.

U mitohondrijama u prisustvu molekuskog kiseonika odvija se proces oksidativne fosforilacije ili tkivnog disanja uz katalitičku aktivnost citohrom-oksida. U toku ovog procesa se preko 90% kiseonika redukuje u vodu sukcesivnim primanjem 4 elektrona (slika 2.4.) [Acworth, 2003].



Slika 2.4. Proces disanja u mitohondrijama. Ovaj proces se odvija na unutrašnjim membranama mitohondrija uz katalitičku ulogu kompleksa citohrom-oksida, pri čemu svaki molekul kiseonika veže četiri elektrona: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ (preuzeto iz Krauss et al., 2005).

Sa druge strane, mitohondrijalni transportni sistem elektrona je jedan od najznačajnijih procesa u kome se formira superoskid anjon radikal (slika 2.5.) [Cadenas & Davies, 2000].



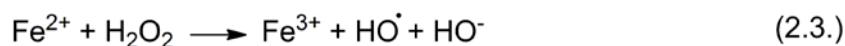
Slika 2.5. Mitohondrijalna produkcija ROS-a. Mitohondrijalna produkcija ROS-a smanjuje sposobnost mitohondrija da sintetiše ATP i da obavlja različite metaboličke funkcije. Oksidativna oštećenja mitohondrija mogu dovesti do povećanja mitohondrijalnog oslobađanja proteina (kao što je citohrom cyt c) iz međumembranskog prostora u citosol preko mitohondrijalne spoljašnje membrane (MOMP), što dalje aktivira ćelijsku apoptozu. Mitohondrijalna produkcija ROS-a povećava propustljivost mitohondrijalnih tranzicionih pora (PTP). Kao posledica svega navedenog, mitohondrijalna oksidativna oštećenja mogu dovesti do oksidativnog oštećenja mitohondrijalnih proteina, membrana i DNK i doprinose širokom spektru patoloških promena (preuzeto iz Murphy, 2009).

U procesu fagocitoze polimorfonuklearni leukociti, makrofagi i eozinofilni leukociti proizvode reaktivne vrste (superoksid anjon radikal, vodonik peroksid, hidroksil radikal, singletni kiseonik itd.) u cilju eliminacije mikroorganizama i oštećenih biomolekula.

Superoksid anjon radikal i vodonik peroksid direktno mogu nastati u toku katalitičke aktivnosti oksidaza. Enzim ksantin-oksidadza je najznačajniji za produkciju navedenih reaktivnih vrsta [Ohara et al., 1993]. Ovaj enzim u ćelijama postoji kao ksantin dehidrogenazna forma, koja kao akceptor elektrona koristi NAD, i ksantin oksidazna forma koja kao akceptor elektrona koristi O₂ i produkuje slobodne radikale [Parks et al., 1986].

U toku sinteze eikosanoida polinezasićene masne kiseline, prvenstveno arahidonska, se prevode, u prisustvu prostaglandin sintetaze, u ciklični endoperoksid hidroperoksid i ciklični endoperoksid alkohol. U toku ove sinteze stvaraju se reaktivne kiseonične vrste, uljučujući i hidroksil radikal.

Metali sa promenljivom valencom (npr. gvožđe, bakar) ispoljavaju direktan prooksidativni efekat [Halliwell & Gutteridge, 1984]. U prisustvu jona gvožđa odvija se Fentonova reakcija uz produkciju hidroksil radikala. Jednačina 2.2. prikazuje redukciju Fe³⁺ u prisustvu superoksid anjon radikala (O₂^{•-}). Jednačina 2.3. predstavlja Fentonovu reakciju u kojoj dolazi do produkcije hidroksil radikala (HO[•]) i hidroksid anjona (HO⁻) iz vodonik peroksida (H₂O₂). Jednačina 2.4. je Haber-Weiss-ova reakcija katalizovana jonima gvožđa.



Egzogena produkcija slobodnih radikala nastaje usled virusnih, bakterijskih ili gljivičnih oboljenja, radijacije i prisustva različitih toksina. Ksenobiotici pripadaju grupi egzogenih faktora koji različito deluju na organizam. Ksenobiotici su jedinjenja/fizički uslovi koji su strani organizmu i kojima je organizam svakodnevno izložen (metali, pesticidi, rastvarači, neki lekovi, UV i jonizujuće zračenje, arozagađivači, etanol, pušenje itd.). Prooksidativno delovanje ksenobiotika je odgovorno za njihov toksični efekat.

Neosporno je da reaktivne vrste, pre svega reaktivne kiseonične vrtse (ROS, *Reactive Oxygen Species*), ispoljavaju niz fizioloških uloga, ali je takođe dokazano da pri povećanoj produkciji mogu ispoljiti toksične efekte. Najznačajnije reaktivne kiseonične vrste predstavljene su u tabeli 2.1.

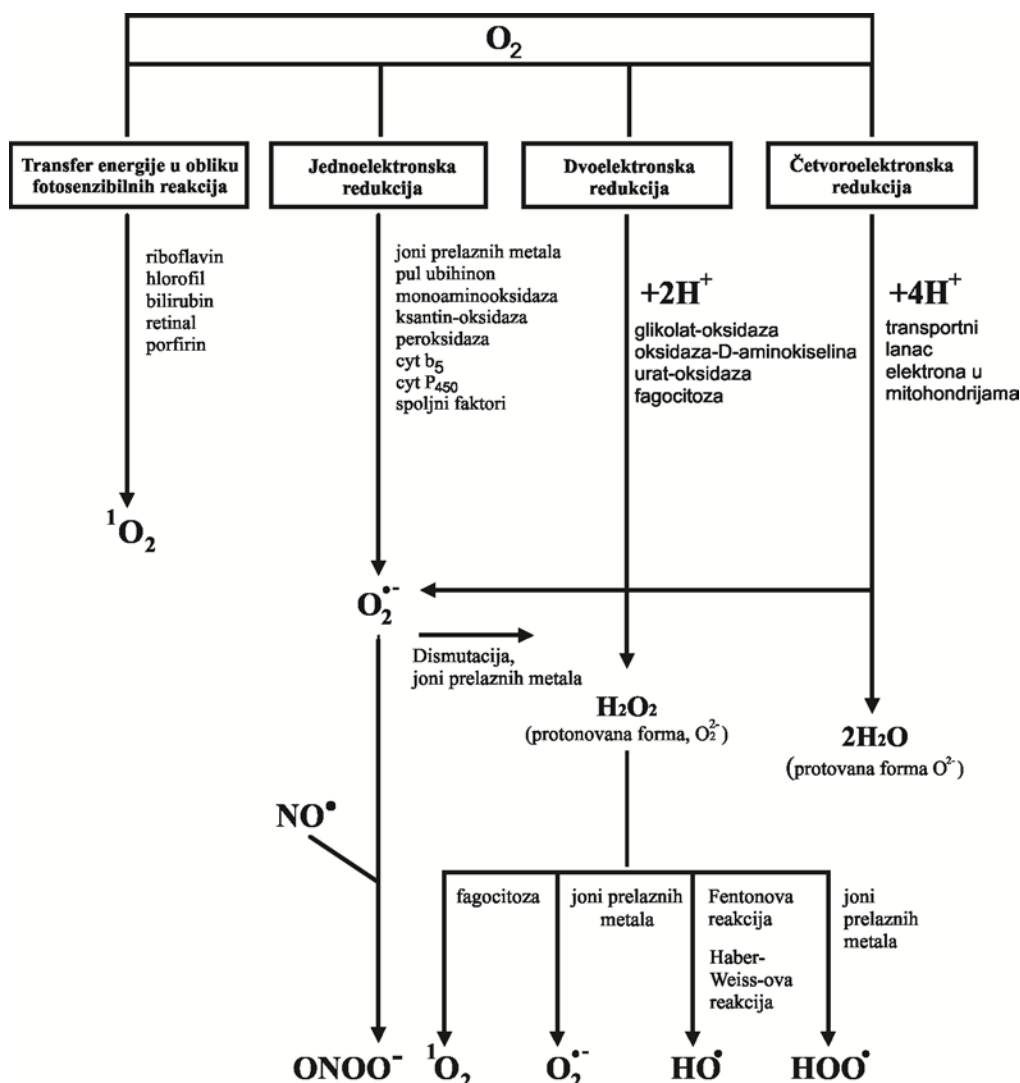
Tabela 2.1. Najznačajnije reaktivne kiseonične slobodnoradikalske i neradikalske vrste.

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Superoxid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil radikal, $HO^{\cdot}$	Hipobromasta kiselina, $HOBr$
Hidroperoksil radikal, $HO_2^{\cdot}$	Hipohlorasta kiselina, $HOCl$
Peroksil radikali, $RO_2^{\cdot}$	Ozon, O_3
Alkoksil radikali, $RO^{\cdot}$	Singletni kiseonik, 1O_2
Karbonatni radikal, $CO_3^{\cdot-}$	Organski peroksidi, $ROOH$
Ugljenoksidni radikal, $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$

Iako smatran osnovnim molekulom i simbolom života na planeti, kiseonik je istovremeno i element poremećaja, bolesti i smrti. Kiseonik se pod normalnim uslovima javlja kao dvoatomni molekul formule O_2 sa molekulskom elektronskom konfiguracijom:

$$1\sigma^2 2\sigma^2 3\sigma^2 \pi_{xy}^4 \pi_{xy}^{*2}.$$

Molekulski kiseonik u organizmu je slabo reaktivan. Razlozi za to su visoka energija aktivacije, paramagnetičnost, triplet osnovno stanje i paralen spinovi njegovih nesparenih elektrona. Triplet 3O_2 predstavlja najstabilniji oblik kiseonika. Tripletni kiseonik je biradikal sa dva nesparena elektrona koji imaju isti spinski kvantni broj i locirani su u suprotno orijentisanim antivezivnim π^* orbitalama. Iz osnovnog stanja, triplet $^3O_2(^3\Sigma)$, kiseonik može da pređe u reaktivnije stanje, singlet $^1O_2(^1\Delta)$, dovođenjem energije. Energija omogućava da se ukloni spinska restrikcija i na taj način poveća oksidaciona sposobnost molekula kiseonika. Jedinjenja koja poseduju sposobnost da izvrše prenos energije na molekule kiseonika i izazovu njegovu ekscitaciju su riboflavin i njegovi derivati (flavin-mononukleotid i flavin-adenin-dinukleotid), hlorofil, bilirubin, retinal i porfirini [Halliwell & Gutteridge, 1999]. Na šemi 2.3. prikazano je nastajanje ROS iz tripletnog kiseonika.



Šema 2.3. Reakcije stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta: cyt-citohrom (preuzeto iz Groves, 1999).

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) se najčešće stvara u biološkim sistemima. Poznati izvori njegove produkcije su elektron transportni sistem mitohondrija ili endoplazmatskog retikuluma, autooksidacija redoks aktivnih supstrata, enzimski procesi u prisustvu ksantin-oksidade, kao i proces fagocitoze. $O_2^{\bullet-}$ odnosno njegov protonovani oblik, hidroperoksil radikal ($HO_2^{\bullet}$), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika. $HO_2^{\bullet}$ se može dobiti i oksidacijom vodonik peroksida (H_2O_2) u prisustvu hidroksil radikala ($HO^{\bullet}$):



Hidroksil radikal ($HO^{\bullet}$) je najreaktivniji poznati radikal u hemiji. Nastaje sukcesivnom jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika u toku ćelijskog metabolizma, u prisustvu jonizujućeg zračenja, u toku redukcije H_2O_2 metalnim katjonima, u gvoždem

katalizovanoj Haber-Weiss-ovoj reakciji, kao i u toku enzimskih reakcija u kojima se stvaraju superoksid anjon radikal i H_2O_2 . Takođe, može nastati i u reakciji superoksid anjon radikala sa produktima lipidne peroksidacije.

Vodonik peroksid (H_2O_2) je manje reaktivan od hidoksil radikala, ali je potencijalno toksičniji jer može dalje da difunduje. Može nastati direktno dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili dejstvom superoksid dismutaze u vodenom rastvoru:



Produkcija vodonik peroksida odvija se na nivou peroksizoma, mitohondrija, mikrozoma i ćelijske membrane.

Reaktivnost reaktivnih kiseoničnih vrsta se može prikazati sledećim nizom [Karbowski *et al.*, 2010]:

Tripletni kiseonik < superoksid anjon radikal < hidroperoksil radikal < hidoksil radikal

Prikazani niz ukazuje da hidoksil radikal predstavlja najreaktivniji radikal. Visoko reaktivni hidoksil radikal u stanju je da izazove ćelijsku smrt inicijacijom serije hemijskih reakcija sa biološki važnim molekulima što rezultuje promenama na DNK, oštećenjem mitohondrija i peroksidacijom lipida i posledično oštećenjem membrana [Barnham *et al.*, 2004].

Sposobnost ROS da brzo oksiduju i nespecifično napadaju brojne biomolekule (proteine, nukleinske kiseline, lipide) predstavlja jedan od glavnih mehanizama oštećenja u ćelijama. Oksidaciona oštećenja ćelija su posledica oksidativnog stresa. Oksidativni stres se definiše kao narušena ravnoteža između produkcije reaktivnih vrsta na jednoj, i sistema zaštite od oksidacionih oštećenja, na drugoj strani, odnosno podrazumeva složene intracelularne i ekstracelularne procese koji dovode do povećanog metaboličkog i hemijskog generisanja i akumuliranja ROS, što remeti pomenutu ravnotežu [Shinar *et al.*, 1989]. Narušena ravnoteža između produkcije reaktivnih vrsta i sistema zaštite, dalje remeti integritet i funkcionalnost ćelije, kao i organizma u celini, što dovodi do velikog broja patoloških stanja kao što su dijabetes, kardiovaskularna oboljenja, kancerogeneza, neurološka oboljenja, bolesti bubrega, jetre, srca itd. [Martinet *et al.*, 2002]. Reaktivne kiseonične vrste predstavljaju glavne promotere infarkta miokarda, ateroskleroze i ishemične demencije [Brude *et al.*, 1997; Groves, 1999; Kromhout, 1999].

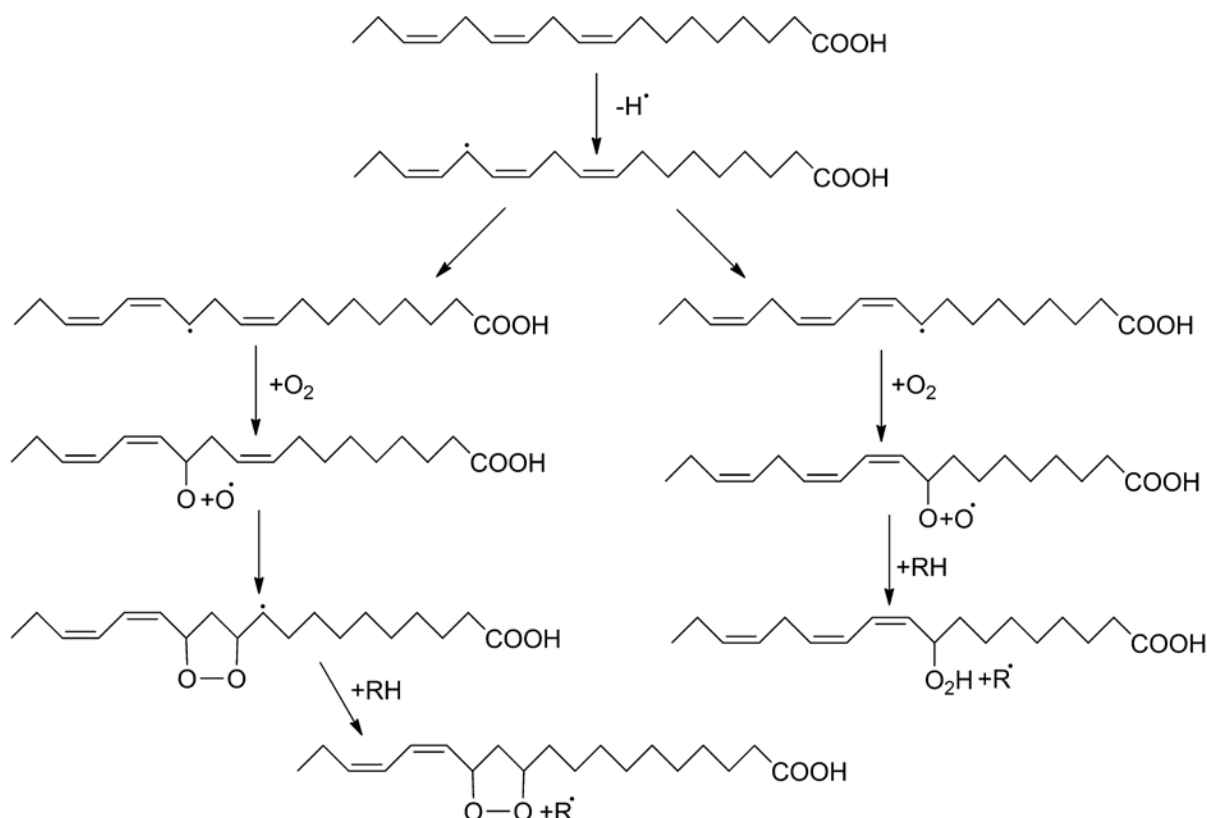
Produkti lipidne peroksidacije u Alzheimer-ovoj bolesti predstavljaju jedinstvene markere oksidativnog oštećenja u nervnom sistemu [Yin et al., 2005].

Lipidna peroksidacija je jedan od najviše proučavanih slobodno-radikalnih procesa koji se odvija mehanizmom lančane reakcije koja uključuje stvaranje novih radikalnih vrsta, vezivanje kiseonika, premeštanje dvostrukih veza u nezasićenim masnim kiselinama pri čemu dolazi do razaranja ćelijskih membrana uz nastajanje velikog broja različitih degradacionih proizvoda [Pryor, 1976]. Narušavanje fizičko-hemijskih osobina lipida dovodi do povećane propustljivosti membrane i oštećenja same ćelije. Arahidonska kiselina, kao višestruko nezasićena masna kiselina, je najvažniji supstrat za proces lipidne peroksidacije.

Neophodni preduslovi za odvijanje procesa lipidne peroksidacije su:

1. prisustvo supstrata koji podleže reakcijama oksidacije,
2. slobodni radikali visokog oksidativnog potencijala (ROS),
3. molekulski kiseonik i/ili
4. prisustvo metala sa promenljivom valencom.

Enzimski peroksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina (autooksidacija) je osnovni mehanizam lipidne peroksidacije koji se odvija u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija se odigrava u prisustvu hidroksil radikala, singlet kiseonika, hidroperoksil radikala i tiola. U ovoj fazi dolazi do oduzimanja $H^{\bullet}$ masnim kiselinama iz metilenske grupe u α položaju od mesta dvostruke veze, pri čemu se formira alkil radikal nezasićene masne kiseline. Intramolekularnim preraspoređivanjem dvogubih veza nastaju konjugovani dieni koji dalje reaguju sa kiseonikom i obrazuju lipidperoksid radikal koji svojom reaktivnošću propagira dalje lančani niz procesa lipidne peroksidacije. Ovaj proces se ubrzava u prisutvu jona gvožđa zbog stvaranja hidroksil radikala u Fentonovoj reakciji, ali i zbog direktne reakcije sa lipidnim hidroperoksidima uz formiranje alkoksil ($RO^{\bullet}$) i peroksil ($RO_2^{\bullet}$) radikala koji mogu da iniciraju lipidnu peroksidaciju (šema 2.4.) [Pré et al., 1991]. Oksidacijom alkoksil radikala nastaje dihidroperoksid čijom razgradnjom se formiraju sekundarni krajnji produkti reakcije: alkani, alkeni i kratkolančani malondialdehid (MDA). Terminacija se postiže reakcijom peroksil radikala i α tokoferola, a moguća je i reakcija alkil radikala sa lipidnim peroksidima.



Šema 2.4. Mehanizam lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina.

Brža reakcija od procesa autoksidacije je reakcija fotooksidacije koja se dešava u prisustvu singlet kiseonika koji u prisutvu fotosenzitivnih materija (porfirini, riboflavin, bilirubin i dr.) i svetlosti reaguje sa dvostrukim vezama polinezasićenih masnih kiselina.

Proces enzimske peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina se odvija u toku sinteze eikosanoida u kome nastaju ciklični endoperoksidi.

2.2.1. Antioksidativni potencijal ćelije i antioksidansi

Iako u organizmu postoji neprekidna produkcija slobodnih radikala, do poremećaja homeostaze ne dolazi sve dok postoji ravnoteža između produkcije reaktivnih vrsta i mehanizama antioksidativne zaštite koji su prisutni u svim ćelijama i učestvuju u sprečavanju stvaranja radikala, neutralizaciji njihovih efekata i reparaciji oksidativno izmenjenih molekula, svodeći oštećenja ćelija na minimum.

Sistem antioksidativne zaštite podrazumeva enzimsku i neenzimku zaštitu [Đorđević et al., 2000]. U enzimske komponente spadaju superoksid-dismutaza, glutacion peroksidaza, katalaza, glutation-s-transferaza i glutacion reduktaza. Neenzimske komponente obuhvataju

liposolubilne (vitamin E, vitamin A, koenzim Q) i hidrosolubilne (vitamin C, glutation, cistein, mokraćna kiselina, albumin, proteini transferin i ceruloplazmin koji imaju bitnu ulogu u transportu metalnih jona i dr.) antioksidanse.

Superoksid dismutaza (SOD) predstavlja osnovnu komponentu enzimskog antioksidativnog sistema zaštite. Citosolarna Cu,ZnSOD katalizuje konverziju-reakciju dismutacije superoksid anjon radikala u H_2O_2 .

Glutation peroksidaza katalizuje redukciju H_2O_2 u vodu i organskih hidroperoksida u alkohole.

Katalaza (CAT) katalizuje razgradnju H_2O_2 do vode i molekulskog kiseonika.

Antioksidansi su „supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata“, po definiciji koju je dao Halliwell [Halliwell, 1990]. Antioksidansi se mogu podeliti na endogene (nastaju u ljudskom organizmu) i egzogene (unose se putem hrane ili lekova). Fenolna jedinjenja (fenolkarbonske i fenilpropanske kiseline, fenolni diterpeni, flavonoidi, kumarini i polifenoli) su jedna od najvažnijih grupa prirodnih egzogenih antioksidanasa, čija je aktivnost uslovljena strukturnim karakteristikama [Rice-Evans *et al.*, 1996]. Biljna fenolna jedinjenja su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti biljaka i do danas ih je identifikovano više hiljada koji kao zajedničku karakteristiku imaju benzenov prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Razlike u strukturi egzogenih antioksidanasa, kao i razlike u vrsti supstrata, uslovljavaju različite mehanizme kojima ova jedinjenja ostvaruju svoju aktivnost u sistemu antioksidativne zaštite.

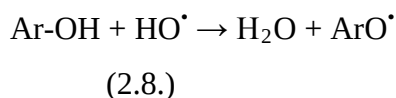
U reakcijama sa hidroksil radikalima antioksidansi pokazuju sposobnost da deluju kao:

- hvatači („skevindžeri“) slobodnih radikala,
- donori elektrona,
- donori H-atoma;

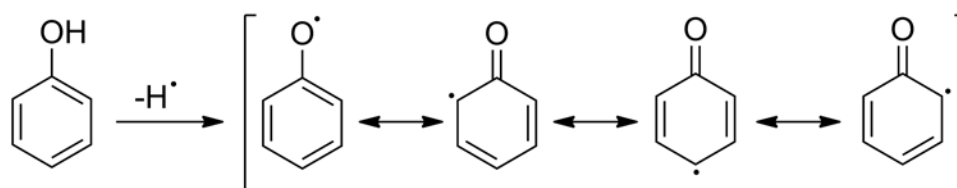
dok u reakcijama sa ugljeničnim slobodnim radikalima pokazuju sposobnost da deluju kao:

- akceptori elektrona,
- akceptori H-atoma.

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja prvenstveno je rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma. U reakciji dolazi do eliminacije slobodnog radikala i građenja manje reaktivnog fenoksil radikala:



Povećana stabilnost formiranog fenoksil radikala pripisuje se prvenstveno delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi (šema 2.5.).



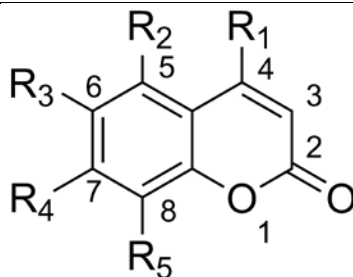
Šema 2.5. Rezonantne strukture fenoksil radikala.

Pored efekta hvatanja radikala, fenolna jedinjenja, prvenstveno flavonoidi i kumarini, deluju i kao preventivni antioksidansi kompleksiranjem (heliranjem) jona prelaznih metala čime sprečavaju ove metalne jone da katalizuju proizvodnju slobodnih radikala u ćeliji [Arora et al.,1998].

2.2.1.1. Kumarini kao antioksidansi

Dosadašnja *in vitro* ispitivanja kumarinskih jedinjenja (kumarin, 4-hidroksikumarin, 7-hidroksikumarin, eskuletin, skopoletin, 4-metileskuletin i 7-hidroksi-4-metilkumarin čije su strukture prikazane u tabeli 2.2.) su pokazala da eskuletin ima najveću sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala, a da nešto slabiju aktivnost ima 4-metileskuletin [Lin et al., 2008].

Tabela 2.2. Struktura kumarina i njegovih derivata sa izraženom antioksidativnom aktivnošću.



Jedinjenje	Naziv	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Kumarin		H	H	H	H	H
4-hidroksikumarin		OH	H	H	H	H
7-hidroksikumarin	umbeliferon	H	H	H	OH	H
6,7-dihidroksikumarin	eskuletin	H	H	OH	OH	H
7-hidroksi-6-metoksikumarin	skopoletin	H	H	OCH ₃	OH	H
4-metileskuletin		CH ₃	H	OH	OH	H
7-hidroksi-4-metilkumarin		CH ₃	H	H	OH	H

Većina radova ukazuje na to da broj i položaj hidroksilnih grupa na osnovnoj kumarinskoj strukturi utiču na antioksidativnu aktivnost kumarina zbog mogućnosti hidroksilnih grupa da učestvuju u slobodno-radikalnim reakcijama u kojima se hidroksikumarini ponašaju kao antioksidansi iz grupe fenola ili hinona.

Ispitivanja dihidroksi derivata 4-metilkumarina su potvrdila da je *orto* položaj hidroksilnih grupa odgovoran za odličnu antioksidativnu aktivnost, jer je *orto* dihidroksi raspored u stanju da formira rezonantno stabilisan radikal i da nagradi intramolekulske vodonične veze [Barzegar et al., 2011].

Simultani uticaj fenil grupe i hidroksilnih grupa na antioksidativnu aktivnost 4-fenil hidroksikumarina je nedovoljno ispitan.

2.2.2. Metode primenjene za ispitivanje antioksidativne aktivnosti

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti odabranih 4-fenil hidroksikumarina korišćene su *in vitro* metode (hemijski *cell-free* testovi) i kompjuterska DFT (*Density Functional Theory*) metoda.

2.2.2.1. *In vitro* metode

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (*Radikal Scavenging Capacity*) odabranih 4-fenil hidroksikumarina određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH[•] i ABTS^{•+} radikale. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije određena je korišćenjem feri tiocijanat metode. Redukciona moć (*Reducing power*) je određena korišćenjem metoda FRAP i CUPRAC koje se zasnivaju na praćenju elektron-transfer reakcija.

Korišćene *in vitro* metode podrazumevaju primenu ultraljubičaste/vidljive (UV/VIS) spektrofotometrije koja je poslužila za dobijanje podataka na osnovu kojih je utvrđena antioksidativna aktivnost. UV/VIS spektrofotometrija je metoda koja se zasniva na merenju apsorpcije elektromagnetnog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm. Spektrofotometrijska određivanja se zasnivaju na Lambert-Beer-ovom zakonu koji opisuje odnos intenziteta upadne i propuštene monohromatske svetlosti u zavisnosti od debljine sloja kroz koji svetlost prolazi i koncentracije apsorbujućih čestica u rastvoru:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon bc} \quad (2.9.)$$

gde je I intezitet propuštene svetlosti, I_0 intezitet upadne svetlosti, ϵ apsorpcioni koeficijent, b dužina optičkog puta (debljina sloja), c-koncentracija rastvora.

Transformacijom i logaritmovanjem jednačine (2.9.) dobija se:

$$A = \epsilon bc \quad (2.10.)$$

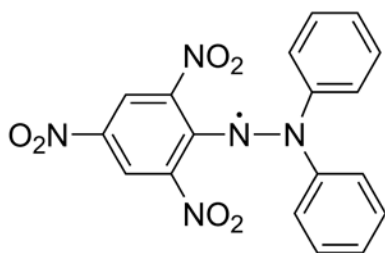
gde je A apsorbancija.

Pored primene za identifikaciju organskih jedinjenja, UV/Vis spektrofotometrija se danas dosta primenjuje u kvantitativnoj analizi. U svim navedenim metodama za ispitivanje antioksidativne aktivnosti, meri se apsorbancija ispitivanog rastvora i prati njena zavisnost od koncentracije. Zavisnost između promene apsorbancije i koncentracije ispitivanog antioksidansa je linearna, $A=f(c)$, i određena je primenom metode kalibracione krive [Sharma, 2000].

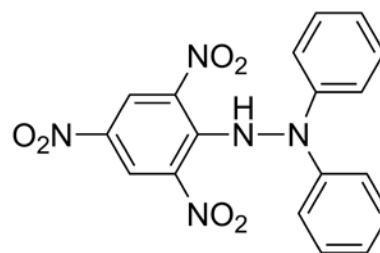
2.2.2.1.1. DPPH[•] metoda

Metoda je prvi put predstavljena 1958. i poznata je kao Blois-ova metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti [Blois, 1958]. Zasniva se na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog DPPH[•] radikala u redukovanu, žuto obojenu formu uz spektrofotometrijsko očitavanje apsorbancije.

DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil), prikazan na slici 2.6., je stabilan radikal tamno ljubičaste boje čiji etanolni rastvor pokazuje maksimum apsorbancije na oko 520 nm. Jedinjenja koja mogu biti donori H-atoma pokazuju sposobnost da redukuju (neutralizuju) DPPH[•] radikal u rastvoru. Nastajanje redukavane, neradikalske forme (1,1-difenil-2-pikril-hidrazin), prikazane na slici 2.7., dovodi do gubitka tamno ljubičaste boje rastvora i pojave blede žute boje koja potiče od prisutne pikril grupe.



Slika 2.6. Hemijska struktura DPPH[•] radikala.



Slika 2.7. Hemijska struktura neradikalske forme DPPH.

Reakcija redukcije DPPH[•] radikala (jednačina 2.11.) se odvija u odgovarajućem stehiometrijskom odnosu.



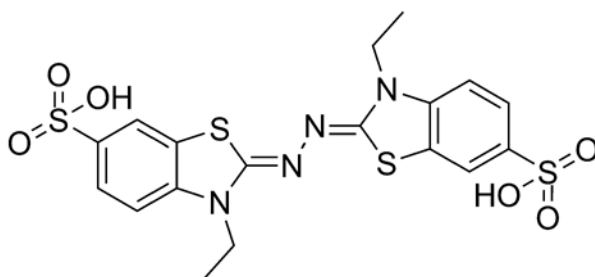
gde je DPPH[•] radikal predstavljen sa $Z^{\bullet}$, a jedinjenje koje može biti donor H-atoma (redukciono sredstvo) sa AH.

Sterni prilaz DPPH[•] radikalu određuje brzinu reakcije, jer mali molekuli lakše prilaze ovom radikalu i imaju relativno veći antioksidativni kapacitet.

Parametar koji je korišćen za interpretaciju rezultata dobijenih DPPH[•] metodom je EC₅₀ (*Efficient Concentration*). EC₅₀ vrednost je definisana kao koncentracija substrata (antioksidansa) koji dovodi do gubitka aktivnosti (smanjenja koncentracije) DPPH[•] radikala za 50%. Ovaj parametar je određen metodom kalibracione krive.

2.2.2.1.2. ABTS^{•+} metoda

ABTS^{•+} metoda je opisana od strane Re i saradnika [Re et al., 1999]. ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), slika 2.8.), koji je blede zelene boje, se oksidacijom pomoću kalijum persulfata (K₂S₂O₈) u vodenom rastvoru prevodi u ABTS^{•+} radikal intenzivno zelene boje čiji rastvor pokazuje stabilnu vrednost apsorpcije na 734 nm.



Slika 2.8. Hemijska struktura ABTS.

U prisustvu jedinjenja koja pokazuju sposobnost da redukuju ABTS^{•+} radikal dolazi do smanjenja intenziteta zelene boje rastvora usled formiranja neutralnog ABTS-a. Promena intenziteta boje rastvora je praćena spektrofotometrijski. Kapacitet hvatanja ABTS^{•+} radikala je određen, kao i kod DPPH[•] metode, na osnovu EC₅₀ vrednosti.

2.2.2.1.3. Feri tiocijanat metoda

Feri tiocijanat metoda je primenjena za praćenje procesa inhibicije lipidne peroksidacije. Zasniva se na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije peroksil radikala (RO₂[•]) koji sponatno nastaju u sistemu linoleinske kiseline u prisustvu kiseonika. Nivo formiranih peroksil radikala određivan je na 12h dodavanjem rastvora fero sulfata (FeSO₄) i amonijum tiocijanata (NH₄SCN) u sistem. U prisutvu radikala fero (Fe²⁺) jon prelazi u feri (Fe³⁺) jon koji dalje reaguje sa tiocijanatnim (SCN⁻) jonom, formirajući kompleks feri tiocijanat koji pokazuje maksim apsorpcije na 500 nm:



Pojava crvene boje nastalog feri tiocijanata ukazuje na prisustvo radikala u ispitivanom sistemu. Merenjem apsorpcije na 500 nm određuje se nivo formiranih peroksil radikala. Dodavanje jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost u sistem linoleinske kiseline dovodi do promene (smanjenja) apsorpcije što je uslovljeno smanjenjem koncentracije

peroksil radikala koji nastaju u procesu lipidne peroksidacije. Kontrolni sistem predstavlja pripremljenu emulzija linoleinske kiseline i pufera bez ispitivanog jedinjenja [Gulcin, 2006].

Inhibicija lipidne peroksidacije u sistemu linoleinske kiseline je određena korišćenjem jednačine:

$$\text{Inhibicija lipidne peroksidacije (\%)} = 100 - [(A_c/A_s) \times 100] \quad (2.13.)$$

gde je A_c apsorbancija kontrolnog sistema, a A_s apsorbancija ispitivanog sistema.

2.2.2.1.4. FRAP metoda (Fe^{3+} Reducing Power Assay)

FRAP metoda se zasniva na praćenju redukcije heksacijanoferat(III) jona (fericijanidni jon, $[Fe(CN)_6]^{3-}$) u heksacijanoferat(II) jon (ferocijanidni jon, $[Fe(CN)_6]^{4-}$) u prisutvu antioksidansa:



Ferocijanidni jon u kiseljoj sredini reaguje sa dodatim Fe^{3+} jonom formirajući kompleks prusko plavo, $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ (pri $pH \geq 7$ dolazi do formiranja nerastvornog gvožđe(III)hidroksida). Apsorbancija formiranog kompleksa, merena na 700 nm, je korišćena kao indikator redukcionne sposobnosti (veća vrednost apsorbcije ukazuje na bolju redukcionu sposobnost) [Gulcin, 2009; Oyaizu, 1986]. Utvrđena je linearna zavisnost apsorbcije od koncentracije. Metodom linearne regresije iz jednačine koja opisuje zavisnost apsorbcije od koncentracije, dobijena je vrednost za nagib prave. Ovaj parametar je korišćen za poređenje redukcionne sposobnosti ispitivanih jedinjenja.

2.2.2.1.5. CUPRAC metoda (*Cupric ions reducing power assay*)

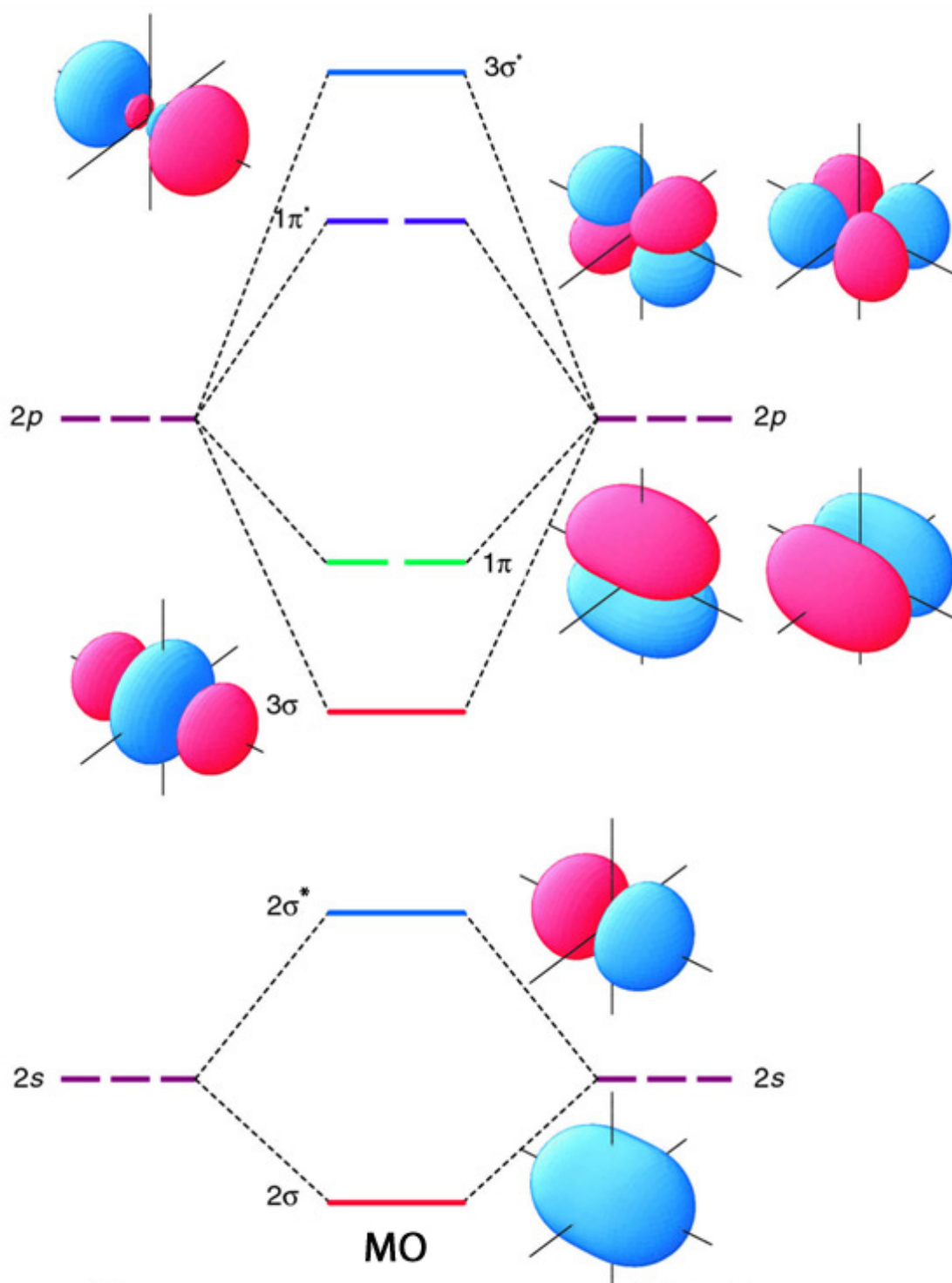
CUPRAC metoda se zasniva na praćenju redukcije bakar(II) jona koji sa neokuproinom (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), pri pH 7 gradi bezbojan bis(neokuproin)bakar(II) helatni kompleks, Cu(II)-Nc. Cu(II)-Nc predstavlja redoks reagens u CUPRAC metodi. U prisustvu redukcionog sredstva nastaje Cu(I)-Nc, kompleksno jedinjenje narandžasto-crvene boje koje pokazuje maksimum apsorbcije na 450 nm [Ak & Gulcin, 2008]. Apsorbancija formiranog kompleksa je korišćena kao indikator redukcionne sposobnosti (veća vrednost apsorbcije ukazuje na bolju redukcionu sposobnost). Za poređenje redukcionne sposobnosti ispitivanih jedinjenja korišćen je, kao i kod FRAP metode, nagib prave.

U poređenju sa drugim metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti na redoks reakciju u CUPRAC metodi ne utiču parametri kao što su prisustvo vazduha, sunčeva svetlost i vlažnost jer je Cu(II)-Nc reagens stabilniji od DPPH-a i ABTS-a. Redoks reakcija u CUPRAC metodi se odvija pri pH 7 (približno fiziološki uslovi) za razliku od kisele sredine koja se mora obezbediti u FRAP metodi (pH 3,6) gde redukciona moć može biti suprimirana zbog reakcije hidroksilne grupe ispitivanog jedinjenja sa H^+ jonom [Apak et al., 2008].

2.2.2.2. DFT (*Density Functional Theory*) metoda

Teorija funkcionala gustine (*Density Functional Theory*-DFT) je kompjuterska kvantno-mehanička metoda koja se primenjuje u fizici, hemiji i farmaciji za ispitivanje elektronske strukture molekula. Danas je DFT jedna od najpopularnijih i najpouzdanijih kompjutersko-hemijskih metoda jer poseduje veoma dobar odnos između vremena i kompjuterskih resursa koje treba upotrebiti i validnosti dobijenih proračuna. Pomoću DFT metode karakteristike molekula, kao višeelektronskih sistema, mogu biti određene korićenjem funkcionala, tj. funkcija drugih funkcija, u ovom slučaju funkcija elektronske gustine koja je funkcija prostornog rasporeda elektrona u ispitivanom sistemu [Koch & Holthausen, 2001].

U hemiji se molekulska orbitala (MO) može definisati kao matematička funkcija koja opisuje talasno ponašanje elektrona u molekulu i ova funkcija se može koristiti za izračunavanje hemijskih i fizičkih karakteristika molekula kao što je npr. verovatnoća nalaženja elektrona u nekom delu molekula. Molekulske orbitale se mogu koristiti da se predstavi deo molekula gde se elektron najverovatnije nalazi i pomoću njih se može definisati elektronska konfiguracija molekula: prostorni raspored energije jednog ili više parova elektrona [Fleming, 2009]. Molekulske orbitale se mogu dobiti linearnim kombinovanjem atomskih orbitala ili hibridnih orbitala svakog atoma u molekulu (LCAO-MO metoda, slika 2.9.), ili kombinacijama molekulskih orbitala grupe atoma [Dewor & Kelemen, 1971].



Slika 2.9. Šema nastajanja molekulskih orbitala.

Primenom DFT metode mogu se dobiti vrednosti parametara pomoću kojih se mogu definisati razlike između strukturnih i elektronskih karakteristika molekula [Mazzanti & Casarini, 2012]. Dobijene vrednosti (DFT deskriptori) mogu da posluže za uspostavljanje odnosa strukture i aktivnosti molekula [Karelson et al., 1996].

2.2.2.2.1. DFT deskriptori

Za uspostavljanje odnosa strukture i antiosidativne aktivnosti posebno su značajni sledeći deskriptori:

HOMO i LUMO. Molekulska orbitala nastaje preklapanjem atomskih orbitala. Dve novonastale molekulske orbitale stvorene interakcijom dveju atomskih orbitala su vezivna, koja ima nižu energiju, i antivezivna orbitala, koja ima višu energiju. Orbitale koje definišu kako molekul interaguje sa drugim česticama u sistemu nazivaju se granične orbitale. Dve najvažnije granične orbitale su najviša popunjena molekulska orbitala (*Highest Occupied Molecular Orbital* - HOMO) i najniža nepopunjena molekulska orbitala (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* - LUMO). Kenichi Fukui je razvio praktični model kojim se opisuje hemijska reaktivnost pomoću graničnih molekulskih orbitala-FMO teorija (*Frontier Molecular Orbital theory*) koja se bazira na proučavanju samo HOMO i LUMO orbitala [Fukui et al., 1952]. FMO teorija nukleofilnost molekula ne posmatra preko ukupne elektronske gustine, već preko lokalizacije elektronske gustine u HOMO orbitali jer je samo ova orbitala sposobna da učestvuje u nukleofilnim reakcijama. Na isti način se može definisati sposobnost molekula da učestvuje u elektrofilnim reakcijama pomoću LUMO orbitale molekula jer LUMO orbitala predstavlja mesto gde se elektroni supstrata mogu vezati. U slučaju kada molekul ima više funkcionalnih grupa ili u molekulu postoji elektronska delokalizacija i HOMO i LUMO orbitale se prostiru preko celog molekula i on može imati više mesta za nukleofilnu i elektrofilnu interakciju sa drugim molekulom [Fleming, 2009].

HOMO-LUMO gap. Energetska razlika između HOMO i LUMO ili HOMO-LUMO šupljina (*HOMO-LUMO gap*) je najmanja energija koju treba dovesti molekulu da bi se izazvala elektronska ekscitacija. Što je ta energetska razlika manja elektron lakše prelazi u pobuđeno stanje i lakše ulazi u reakcije [De Proft & Geerlings, 2001; Zhan et al., 2003].

Spinska gustina. Kada se elektronska gustina primeni na molekulski slobodni radikal dobija se spinska gustina. Spinska gustina daje raspored elektronske gustine nesparenog elektrona u molekulskom radikalu [Kohn et al., 1996].

Elektrostatička potencijalna mapa. Elektrostatička potencijalna mapa ili mapa elektrostatičkog potencijala (MEP) prikazuje kako je naelektrisanje raspoređeno u molekulu. MEP omogućava vizuelizaciju različito naelektrisanih oblasti u molekulu. Informacija o

rasporedu naelektrisanja omogućava da se definiše potencijalno reaktivno mesto molekula. Reaktivno mesto se može definisati kao posebno naelektrisana oblast molekula koja ima afinitet da reaguje sa naelektrisanim česticama. Deo molekula koji ima oblast sa izraženim negativnim potencijalom pokazuje jak afinitet za pozitivno naelektrisane čestice u blizini. Reaktivna mesta imaju poseban značaj prilikom određivanja nukleofilnog ili elektrofilnog ponašanja molekula. MEP je posebno korisna kada se prikazuje preraspodela naelektrisanja u reaktivnim mestima u slučajevima kada molekul dobije ili izgubi različite funkcionalne grupe [Tsai et al., 2010].

Jonizacioni potencijal/Jonizaciona energija (Ionization potential - IP/Ionization energy-EI). Jonizaciona energija je minimalna količina energije koju je potrebno dovesti jednom atomu nekog elementa ili molekulu da bi on otpustio svoj poslednji, najslabije vezani elektron sa poslednjeg energetskog nivoa. IP se kod fenolnih jedinjenja može predstaviti preko jednačine:

$$IP = H_{Ar-OH^{\bullet+}} - H_{Ar-OH} \quad (2.15.)$$

gde je $H_{Ar-OH^{\bullet+}}$ entalpija nastajanja molekulskog katjon radikala ispitivanog antioksidansa, a H_{Ar-OH} entalpija nastajanja molekula antioksidansa.

Energija stabilizacije (ΔE_{iso}). Stabilnost radikala može se odrediti izračunavanjem energije stabilizacije preko jednačine:

$$\Delta E_{iso} = [H_{Ar-OH^{\bullet+}} + H_{Ph-OH}] - [H_{Ar-OH} + H_{Ph-OH^{\bullet+}}] \quad (2.16.)$$

Jednačina 2.16. prikazuje energetske promene prilikom transfera elektrona sa molekula antioksidansa (Ar-OH) na referentni molekul fenola (Ph-OH). Veća apsolutna vrednost za ΔE_{iso} pokazuje da je molekul bolji antioksidans [Zipse, 2006].

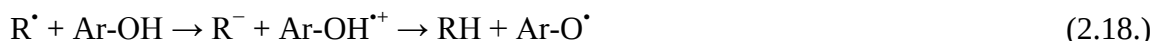
2.2.2.2.2. Mehanizmi antioskidativnog delovanja

Tri različita mehanizma antioskidativnog delovanja predstavljaju način na koji potencijalni antioksidans može reagovati sa slobodnim radikalima [Wright, et al., 2001]:

1. Direktan transfer atoma vodonika (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT)



2. Postepeni elektrontransfer-protontransfer (*Stepwise Electron Transfer - Proton Transfer*, ET-PT)



3. Sekvencijalni gubitak protona praćen transferom elektrona (*Sequential Protonloss Electron Transfer*, SPLET)



U HAT mehanizmu antioksidans, Ar-OH, reaguje sa slobodnim radikalom, $R^{\bullet}$, tako što predaje vodonikov atom nakon homolitičkog raskidanja O–H veze. Reaktivnost Ar-OH može se proceniti izračunavanjem entalpije raskidanja veze O–H (*Bond Dissociation Enthalpy*, BDE), gde niže vrednosti BDE pokazuju veću antioksidativnu aktivnost. BDE se može izračunati preko jednačine:

$$BDE = H_{Ar-O^{\bullet}} + H_{H^{\bullet}} - H_{Ar-OH} \quad (2.22.)$$

gde su $H_{Ar-O^{\bullet}}$, $H_{Ar-O^{\bullet}}$, $H_{H^{\bullet}}$ entalpije nastajanja antioksidansa, njegovog radikala i vodonikovog atoma.

Kod ET-PT mehanizma u prvoj fazi dolazi do transfera elektrona sa antioksidansa na slobodni radikal $R^{\bullet}$. Najvažniji fizičko-hemijski energetski parametar koji određuje antioksidativnu sposobnost molekula u ovom slučaju je jonizacioni potencijal (*Ionization Potential*, IP). Molekuli sa niskim vrednostima IP se smatraju dobrim antioksidansima. IP se može izračunati preko jednačine 2.15. Ograničavajući faktor u drugoj fazi ET-PT mehanizma je entalpija disocijacije protona (*Proton Dissociation Enthalpy*, PDE) koja se može izračunati preko jednačine:

$$PDE = H_{Ar-O^{\bullet}} + H_{H^{+}} - H_{ArOH^{\bullet+}} \quad (2.23.)$$

gde su $H_{Ar-O^{\bullet}}$, $H_{ArOH^{\bullet+}}$, $H_{H^{+}}$ entalpije nastajanja slobodnog radikala antioksidansa, katjon radikala antioksidansa i entalpija nastajanja protona.

SPLET mehanizam ima nekoliko faza i samim tim nekoliko ograničavajućih faktora. Prva faza se može definisati kao disocijacija vodonikovog jona sa odgovarajuće grupe i faktor koji definiše ovu fazu je afinitet prema protonu (*Proton Affinity*, PA) koji se matematički može izračunati preko jednačine:

$$PA = H_{Ar-O^-} + H_{H^+} - H_{Ar-OH} \quad (2.24.)$$

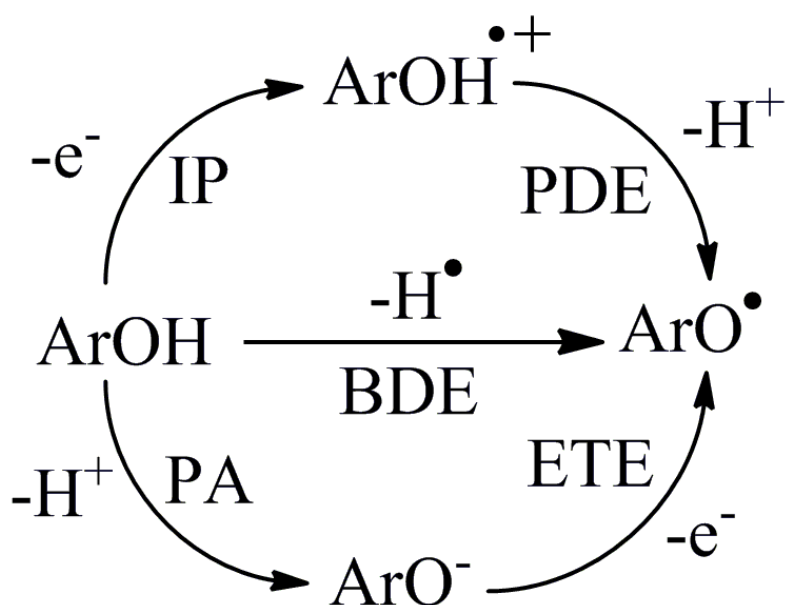
gde su H_{Ar-OH} , H_{Ar-O^-} i H_{H^+} entalpije nastajanja antioksidansa, njegovog anjona i entalpija nastajanja protona.

Drugu fazu SPLET mehanizma karakteriše transfer elektrona sa anjonskog oblika antioksidansa na slobodni radikal. Faktor koji utiče na ovu fazu je entalpija transfera elektrona (*Electron Transfer Enthalpy*, ETE) koja se može izračunati preko jednačine:

$$ETE = H_{Ar-OH^\bullet} - H_{Ar-OH^-} \quad (2.25.)$$

gde su H_{Ar-OH^-} i $H_{Ar-OH^\bullet}$ entalpije nastajanja anjonskog oblika antioksidansa i njegove slobodno radikalske forme.

Svi reakcioni antioksidativni mehanizmi zajedno sa odgovarajućim parametrima su prikazani na šemi 2.6.



Šema 2.6. Osnovni reakcioni mehanizmi antioksidativnog delovanja.

2.3. Osnovni principi antibakterijskog delovanja

Termin hemoterapija prvi je upotrebio Paul Ehrlich da označi primenu sintetskih jedinjenja koja su toksična za patogene mikroorganizme, a bezopasna za domaćina [Kaufmann, 2008]. Takav princip se naziva selektivna toksičnost. Kasnije je definicija ovog termina proširena i na antibiotike-antiinfektivne supstance koje stvaraju izvesni mikroorganizmi. Hemijskim modifikacijama molekula prirodnih antibiotika dobijeni su mnogi polusintetski derivati sa boljim karakteristikama, pre svega u pogledu spektra antibakterijskog delovanja i podnošljivosti. Selektivno toksično delovanje hemoterapijskih lekova na mikroorganizme omogućeno je morfološkim razlikama, kao i razlikama u biohemijskim procesima između mikroorganizma i čoveka.

Bakterije su jednoćelijski organizmi prokariotske građe i ne sadrže jedro. Ćeliju okružuje ćelijski zid koji je različite strukture kod Gram (+) i Gram (-) organizama. Peptidoglikan je sastavni deo bakterijskog zida i ne nalazi se kod eukariota. Predstavlja višeslojnu osnovu od aminošećera vezanih za ostatke *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilmuraminske kiseline. Ćelijski zid Gram (+) organizama je jednostavnije građe i sastoji se od 50% pepidoglikana, 40-45% kiselih polimera i oko 5-10% proteina i polisaharida. Ćelijski zid Gram (-) organizama je složenije građe, a osnovna razlika je prisustvo spoljašnje membrane koja može da spreči prodor antibakterijskog leka u ćeliju. Polisaharidi su glavne determinante antigenosti organizma. Do ćelijskog zida, prema unutrašnjosti ćelija nalazi se plazmatska membrana sastavljena od proteina i dvosloja fosfolipida. Ne sadrži sterole što je verovatno razlog različitog prodora hemijskih supstanci kroz ovu membranu. Zajedno, plazmatska membrana i ćelijski zid čine omotač bakterijske ćelije. Do plazmatske membrane se nalazi citoplazma koja se satoji od ribozoma, proteina i molekula značajnih za metabolizam ćelije. Za razliku od eukariotske, bakterijska ćelija ne sadrži jedro, već se genetski materijal u obliku jednog hromozoma nalazi u citoplazmi. Druga razlika u odnosu na eukariotsku ćeliju je nedostatak mitohondrija, tako da plazmatska membrana služi za stvaranje energije. Pojedine bakterije imaju i dodatne komponente, ali navedeni strukturni elementi i razlike između prokariotske i eukariotske ćelije su značajni za antibakterijsko delovanje [Rang et al., 2005].

Postoje 4 mehanizma delovanja poznatih antibiotika [Varagić & Milošević, 2005]:

1. inhibicija sinteze ćelijskog zida,
2. promena permeabilnosti ćelijske membrane,
3. inhibicija sinteze proteina i
4. inhibicija sinteze nukleinskih kiselina.

Antibiotici mogu blokirati sintezu peptidoglikana i na taj način prouzrokovati smrt ćelije. Penicilini i cefalosporini su selektivni inhibitori sinteze ćelijskog zida. Ovi β -laktamski antibiotici inhibiraju enzime za transpeptidaciju vezivanjem za ćelijske receptore koji predstavljaju posebne proteine za vezivanje penicilina (*Penicillin-Binding Proteins*, PBP). Inhibicijom reakcija transpeptidacije prestaje sinteza peptidoglikana. Bacitracin i vankomicin ometaju rane faze u sintezi peptidoglikana koje se odvijaju u unutrašnjosti ćelije. Cikloserin je strukturni analog D-alanina i inhibira sintezu peptidoglikana blokirajući delovanje alanin-racemaze, enzima koji omogućava inkorporaciju D-alanina u peptidoglikan.

Polimiksini su antibiotici koji selektivno deluju na bakterijske membrane reagujući sa fosfolipidima. Na ovaj način se remeti integritet membrane, makromolekuli i joni izlaze iz ćelije što dovodi do smrti ćelije.

Bakterijski ribozomi se sastoje od 50S subjedinice i 30S subjedinice, za razliku od ribozoma sisara koji se sastoje od 60S subjedinice i 40S subjedinice. Ova razlika je odgovorna za selektivnost antibakterijskog delovanja aminoglikozida, makrolida, linkomicina, tetraciklina i hloramfenikola. Navedeni antibiotici inhibiraju sintezu proteina vezivanjem za subjedinice bakterijskog ribozoma.

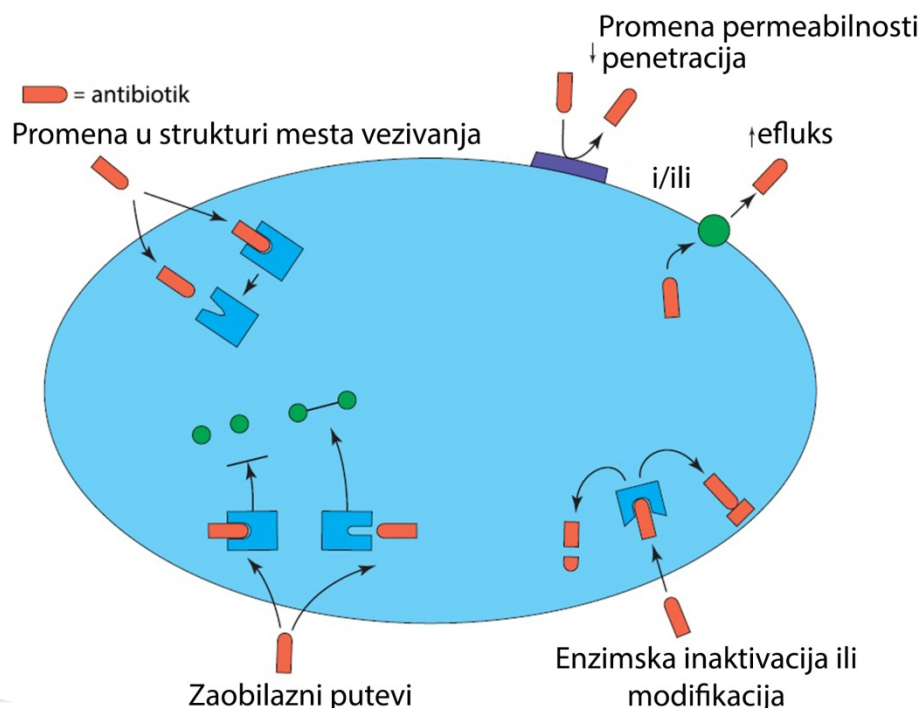
Inhibicijom RNK polimeraze i DNK giraze remete se procesi odgovorni za sintezu nukleinskih kiselina. Hinoloni inhibiraju DNK girazu (topoizomerazu II), enzim koji proizvodi negativni supernamotaj DNK i koji na ovaj način omogućava transkripciju i replikaciju [Drlica & Zhao, 1997]. Ovi lekovi deluju selektivno na bakterijski enzim jer se on strukturno razlikuje od enzima sisara. Zbog toga je posebno značajno proučavanje interakcija potencijalnih antibakterijskih agenasa sa enzimima bakterija pri čemu se kao jedan od karakterističnih enzima za Gram (+) bakterije može uzeti tirozil tRNK sintetaza iz *S. aureus*,

a kao jedan od karakterističnih enzima za Gram (-) bakterije može uzeti topoisomeraza II DNK giraza β iz *E. coli*.

2.3.1. Rezistencija na antibakterijske lekove

Od 1940. godine razvoj lekova efikasnih protiv bakterijskih infekcija doveo je do revolucionarnih promena u farmakoterapiji, ali morbiditet i mortalitet zbog infektivnih bolesti i dalje predstavljaju veliki zdravstveni problem. Razvoj rezistencije bakterija prema antibiotiku proporcionalan je frekvenciji primene tog antibiotika. Postoje 4 osnovna mehanizma nastajanja rezistencije na antibiotike (šema 2.7.) [Hawkey, 1998]:

1. produkcija enzima koji inaktiviraju antibiotik,
2. promena u strukturi mesta vezivanja,
3. promena permeabilnosti i
4. stvaranje novih metaboličkih puteva kojima se zaobilazi reakcija na koju deluju antibiotici.



Šema 2.7. Mehanizmi odgovorni za nastajanje bakterijske rezistencije (preuzeto iz Hawkey, 1998).

Najbolji primer rezistencije koja nastaje enzimskom inaktivacijom antibiotika je rezistencija na β -laktamske antibiotike. Enzim β -laktamaza otvara prsten penicilina i cefalosporina, ali ukrštena rezistencija nije potpuna jer pojedine β -laktamaze pokazuju afinitet za peniciline, dok druge za cefalosporine. Hloramfenikol acetiltransferaza koja se stvara u rezistentnim sojevima inaktivira hloramfenikol, dok se aminoglikozidi inaktiviraju fosforilacijom, adenilacijom ili acetilacijom.

Gubitak ili promena specifičnog proteina na 30S podjedinici bakterijskog ribozoma, koji služi kao receptor, dovodi do rezistencije prema aminoglikozidima, dok se kod rezistencije prema eritromicinu promena dešava na 50S podjedinici. Tačkasta mutacija DNK giraze je odgovorna za smanjeno vezivanje fluorohinolona. Nastajanje rezistencije prema penicilinima i cefalosporinima se dešava i zbog promena u proteinima za koje se vezuju ovi antibiotici (PBP).

Promene u ćelijskom zidu bakterija mogu smanjiti akumulaciju aminoglikozida, β -laktama, hloramfenikola, peptidnih antibiotika i tetraciklina. Ovaj tip rezistencije je rezultat energetski-zavisnog efluksa.

Bakterije pokazuju sposobnost da razviju alternativni metabolički put i na taj način zaobilaze biohemijski proces na koji lek deluje. Rezistencija na sulfonamide posledica je stvaranja forme dihidropteroat sintetaze koja ispoljava manji afinitet za sulfonamide, a neizmenjen afinitet za para-amino-benzoevu kiselinu (PABA).

Jedan od glavnih problema javnog zdravlja širom sveta je bakterijska rezistencija na većinu korišćenih antibiotika [Neu, 1992]. Pojedini sojevi stafilokoka su postali rezistentni na sve raspoložive antibiotike. *Staphylococcus aureus* pored rezistencije na β -laktamske antibiotike usled inaktivacije β -laktamazom i stvaranjem novog proteina (PBP), čime se stvara rezistencija na meticilin, može ispoljiti i rezistenciju na hloramfenikol, sulfonamide, aminoglikozide, hinolone. Infekcije mikroorganizmima nazvanim meticilin-rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus* postale su ozbiljan zdravstveni problem.

Samomedikacija i neracionalna primena antibiotika predstavljaju glavne uzroke nastanka rezistencije. Suština racionalne primene antibiotika se sastoji u poznavanju i pridržavanju osnovnih principa farmakoterapije. Oni se pre svega ogledaju u pravilnom izboru antibiotika i adekvatnom doziranju prema individualnim karakteristikama bolesnika (doziranje usklađeno sa kapacitetom eliminacionih mehanizama bolesnika koji zavise od funkcija jetre i bubrega).

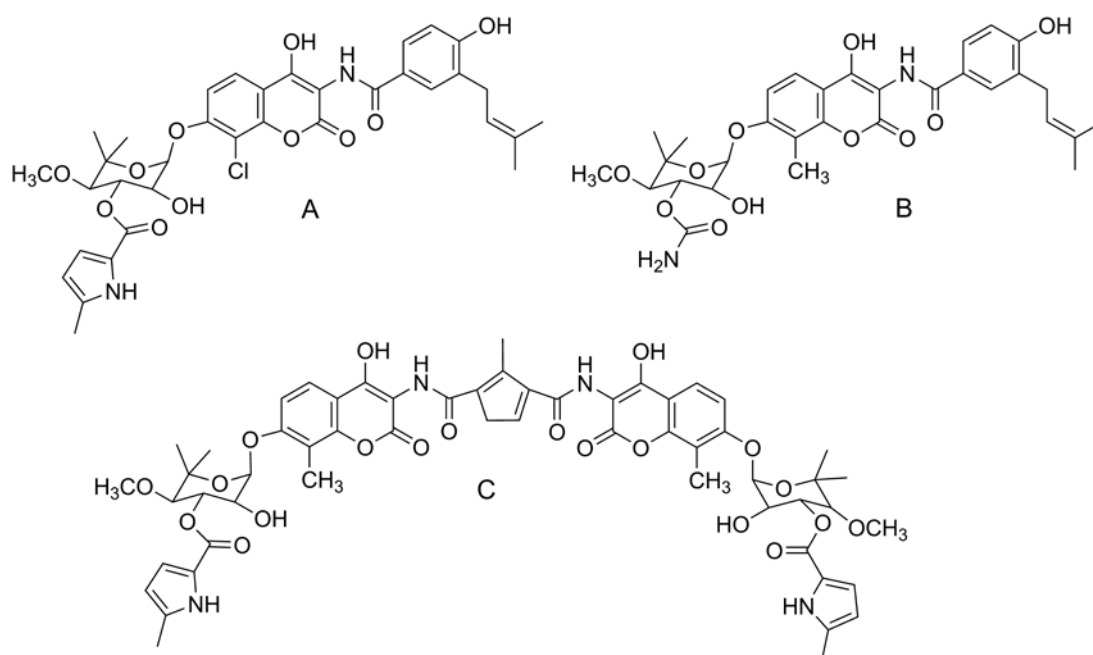
Optimalna primena antibiotika podrazumeva prvenstveno bakteriološku verifikaciju i ispitivanje senzitivnosti izolovane klice na antibakterijske lekove, na osnovu čega se bira efikasan antibiotik najužeg spektra delovanja, sa najmanjom toksičnošću, najpogodnijim načinom primene, najnižom cenom i minimalnom mogućnošću stupanja u interakcije sa drugim lekovima koje bolesnik koristi.

Fenomen rezistencije zahteva brz razvoj novih antibakterijskih agenasa. Dizajn potencijalnih lekova sa novim mehanizmom antibakterijskog delovanja, kao i njihova strukturna modifikacija u cilju poboljšanja aktivnosti predstavljaju glavne naučne izazove u savremenoj medicinskoj hemiji [Fischbach & Walsh, 2009]. Mnoga prirodna jedinjenja, kao i jedinjenja nastala hemijskom modifikacijom njihove strukture, pokazuju antibakterijsku aktivnost [Saleem et al., 2010].

2.3.2. Kumarini kao antibakterijski agensi

Kumarini se smatraju potencijalnim antibakterijskim agensima koji inhibiraju ATP-aznu aktivnost bakterijske DNK giraze konkurišući sa ATP-om za vezivanje za β podjedinicu enzima [Damu et al., 2012; Zhang et al., 2012]. Osnovno kumarinsko jezgro, benzopiron, je strukturno slično benzopiridonu, koji predstavlja osnovu antiinfektivnih lekova iz grupe hinolona [Wang et al., 2012].

Novobiocin, klorobiocin i kumermicin A1 su aminokumarinski antibiotici koji su izolovani iz različitih *Streptomyces* vrsta (slika 2.10.).



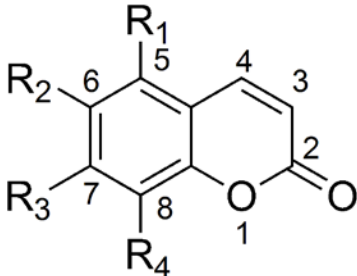
Slika 2.10. Hemijska struktura kumarinskih antibiotika: A) klorobiocin, B) novobiocin i C) kumermicin A1.

Uklanjanje karbamoil grupe ili transfer ove grupe u položaj 2 na šećernoj komponenti novobiocina dovodi do potpunog gubitka aktivnosti [Maxwell, 1993]. Sa druge strane, zamena karbamoil grupe 5-metil-2-pirolilkarbamoil grupom, koja je prisutna u kumermicinu, dovodi do više od desetostrukog povećanja kako antibakterijske aktivnosti tako i *in vitro* inhibicije DNK giraze. U molekulu novobiocina i klorobiocina 3-amino-4,7-dihidroksikumarinski fragment (ADHC) predstavlja osnovnu strukturu okruženu sa jedne strane šećernom komponentom, L-noviozom, i sa druge strane 3-dimetilalil-4-hidroksibenzoil (DMAHB) grupom. ADHC i šećerna komponenta su odgovorni za antibakterijsko delovanje, a supstituenti vezani za ove fragmente imaju značajan uticaj na farmakološku aktivnost molekula u celini. Kristalografsko ispitivanje kompleksa antibiotik-enzim pokazalo je da su ADHC i L-novioza fragmenti zajedno uključeni u vezivanje antibiotika za β -podjedinicu DNK giraze [Lewis et al., 1996]. Studije molekulskog modelovanja i doking kompjuterska metoda su pokazale da su nekovalentne interakcije, pre svega nagrađene vodoonične veze, kojima se kumarini vezuju za aktivno mesto enzima značajne za njihovu antibakterijsku aktivnost [Farag et al., 2010].

In vitro studije odnosa strukture i aktivnosti kumarina su pokazale da lipofilni karakter i planarna struktura molekula predstavljaju neophodne uslove za dobru antibakterijsku aktivnost [Kayser & Kolodziej, 1999]. Antibakterijski potencijal kumarina se može povezati sa olakšanom pasivnom difuzijom koja zavisi od navedenih fizičko-hemijskih karakteristika molekula. Lipofilni karakter jedinjenja je odgovoran za lakšu penetraciju kroz ćelijski zid Gram (+) bakterija.

Broj i položaj hidroksilnih grupa na osnovnoj kumarinskoj strukturi takođe utiče na antibakterijsku aktivnost. U odnosu na osnovni kumarin, prisustvo hidroksilne grupe u položaju 7 kod umbeliferona značajno smanjuje antibakterijsku aktivnost, dok supstitucija ove grupe metoksi grupom (herniarin) ili promena položaja hidroksilne grupe iz položaja 7 u položaj 8 (8-hidroksikumarin) ne dovodi do značajnih razlika u delovanju (tabela 2.3.).

Tabela 2.3. Antibakterijska aktivnost kumarina i njegovih derivata protiv *E. coli* određena primenom mikrodilucione metode [Kayser & Kolodziej, 1999].

						
Jedinjenje	Ime	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MIC (µg/mL)
Kumarin		H	H	H	H	400
7-hidroksikumarin	umbeliferon	H	H	OH	H	1000
7-metoksikumarin	herniarin	H	H	OCH ₃	H	250
8-hidroksikumarin		H	H	H	OH	375
6,7-dihidroksikumarin	eskuletin	H	OH	OH	H	400
5,7-dihidroksikumarin		OH	H	OH	H	250
7,8-dihidroksikumarin	dafnetin	H	H	OH	OH	>1000

Antibakterijska aktivnost (na osnovu dobijenih vrednosti za minimlnu inhibitornu koncentraciju, MIC, protiv *E. coli*) navedih jedinjenja raste u nizu:

7-hidroksikumarin (umbeliferon) < kumarin < 8-hidroksikumarin < 7-metoksikumarin (herniarin).

Antibakterijska aktivnost disupstituisanih derivata kumarina, koji sadrže dve hidroksilne grupe, može se prikazati nizom:

7,8- dihidroksikumarin < 6,7-dihidroksikumarin (eskuletin) < 5,7- dihidroksikumarin.

2.3.3. Metode primenjene za ispitivanje antibakterijske aktivnosti

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti odabranih 4-fenil hidroksikumarina korišćene su *in vitro* mikrodiluciona metoda i kompjuterska doking metoda.

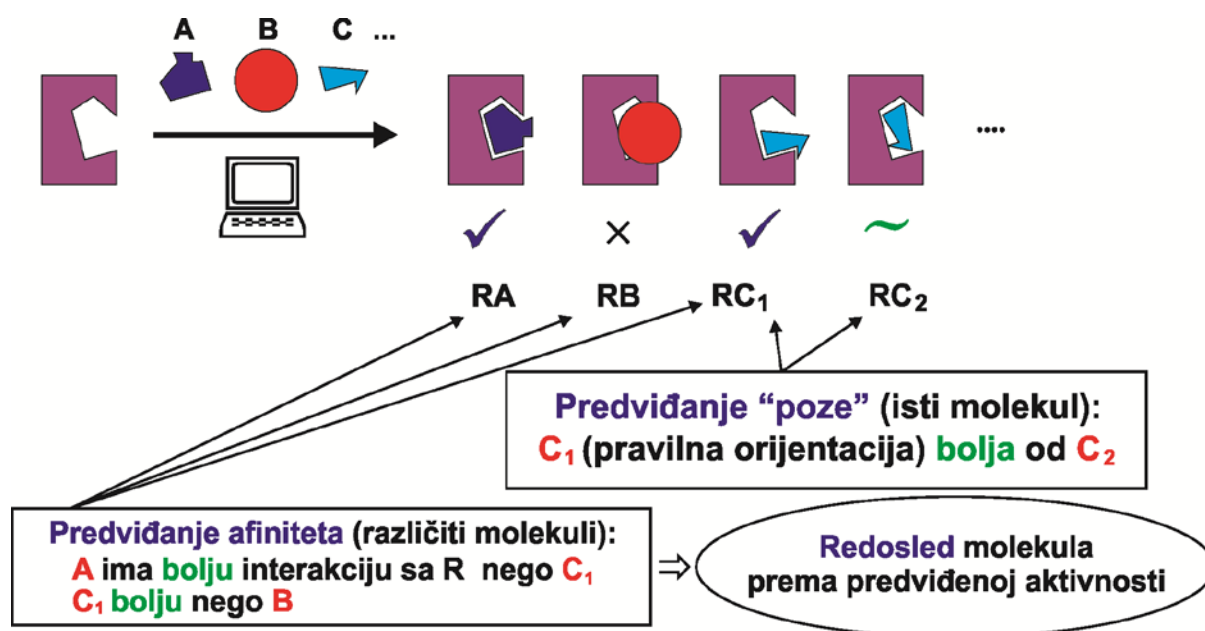
2.3.3.1. Mikrodiluciona metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti *in vitro*

Metoda se zasniva na istovremenom testiranju serije od 12 duplih razblaženja uzorka i referentnog antibiotika protiv suspenzije određenih bakterijskih sojeva turbiditeta 10^6 CFU/mL.

Mikrodiluciona metoda je oko 30 puta osetljivija u odnosu na druge korišćene metode za ispitivanje antibakterijske aktivnosti, daje reproduktivne rezultate u kratkom vremenskom periodu, zahteva malu količinu uzorka, može se koristiti za veliki broj uzoraka i ekonomična je [Eloff, 1998].

2.3.3.2. Kompjuterska doking metoda

Molekulski doking, kao kompjuterska metoda, zauzima posebno mesto u dizajnu i otkriću lekova kao i u studijama koje se bave mehanizmom delovanja farmakološki aktivnih molekula i ima za cilj da predvidi pogodnu geometriju i afinitet vezivanja ispitivanog molekula (liganda) za aktivno mesto ciljnog makromolekula (receptora) primenom „scoring” funkcija, kao i njihove međusobne interakcije koje dovode do najmanje slobodne energije ispitivanog sistema (šema 2.8.) [Guedes et al., 2014; Kroemer, 2007; Leach et al. 2006].



Scoring funkcije: Interakcione energije, solvatacija/desolvatacija, entropija....

Šema 2.8. Prikaz molekulskog dokinga.

Deskriptori koji se koriste za definsanje afiniteta vezivanja liganda za receptor su broj, jačina i dužina vodoničnih veza, građenje jonskih parova, raspoloživa kontaktna površina i fleksibilnost liganda. Fleksibilna stuktura liganda podrazumeva da ispitivani molekuli imaju

translatorske i rotacione stepene slobode koje se odnose na molekul u celini i unutrašnje stepene slobode koji se odnose na slobodnu rotaciju hemijskih veza.

Prva faza u molekulskom dokingu je definisanje strukture receptora, u ovom slučaju enzima, koji se ispituje. Najčešće se struktura receptora određuje korišćenjem eksperimentalnih tehnika kao što su kristalografija pomoću X-zraka ili NMR. Za enzime čija struktura nije dostupna koriste se tehnike za predviđanje njihovih struktura, kao što je na primer homologno modelovanje (*homology modeling*) [Campbell et al., 2003; Cavasotto et al., 2009].

Pojedini programi koji se koriste za molekulski doking ligand posmatraju iz fragmenata koje algoritam povezuje u celinu tokom doking procesa, dok neki drugi programi molekul liganda tretiraju kao celinu. Geometrija receptora je takođe važan parametar za podelu programa u doking analizi. Većina programa definiše receptor kao geometrijski krutu strukturu. Međutim, pouzdaniji rezultati se dobijaju ako se uvede fleksibilnost receptora kao celine ili jednog njegovog dela, ali ovaj pristup zahteva više vremena i kompjuterskih resursa za izračunavanje afiniteta vezivanja [Cozzini et al., 2008].

Odgovarajući programi postavljaju kompjuterski generisanu strukturu ispitivanog molekula unutar dela enzima koji je prethodno definisan (aktivno mesto enzima) u različite pozicije, konformacije ili orijentacije koje se nazivaju poze. Da bi se indentifikovala energetska najpovoljnija poza primenjuje se iterativni kompjuterski proces, predviđanje poza gde se svaka poza procenjuje (*scored*) na osnovu njene komplementarnosti sa aktivnim mestom enzima na koju utiču geometrijski parametri liganda i receptora i njihove elektrostatičke interakcije [Halperin et al., 2002; Kitchen et al., 2004]. Poređenje dobijenih *score* vrednosti za ispitivane molekule služi da se utvrdi jačina veze kojom se ti molekuli vezuju za aktivno mesto enzima. Na ovaj način se u odgovarajućem setu molekula može odrediti molekul sa najvećim afinitetom vezivanja, odnosno najvećom inhibitornom aktivnošću [Jain, 2007; Mohan et al., 2005].

Kompjuterska pretraga odgovarajućeg načina vezivanja (predviđanje poze) molekula se uobičajno vrši definisanim brojem ponavljanja i zadržavanjem onih poza koje imaju najbolje energetske karakteristike. Ovo uključuje pronalaženje pogodne orijentacije i konformacije ispitivanog molekula. Identifikacija i rangiranje pogodnih poza molekula se vrši na osnovu elektrostatičkih i Van der Waals-ovih interakcija („*dock score*”) i na osnovu najmanje energije ligand-receptor veze („*affinity score*”) primenom odgovarajućih kompjuterskih

algoritama. Izračunavanje *affinity score* vrednosti se bazira na analizi fizičko-hemijskih parametara sistema čija se promena slobodne energije nastale usled vezivanja liganda za ciljno mesto može razložiti na sumu individualnih energetske komponenti (jednačina 2.26.)

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{\text{solv}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{motion}} \quad (2.26.)$$

gde je ΔG_{bind} ukupna promena slobodne energije sistema usled vezivanja liganda za receptor, ΔG_{int} promena slobodne energije usled specifične ligand-receptor interakcije, ΔG_{solv} promena slobodne energije usled interakcije liganda i receptora sa rastvaračem, ΔG_{conf} promena slobodne energije usled konformacionih promena liganda i receptora i ΔG_{motion} promena slobodne energije usled kretanja liganda i receptora. Jednačina 2.26. se može u potpunosti primeniti za sisteme gde su navedene energije međusobno nezavisne. Međutim, za veliki broj sistema energetske promene su međusobno zavisne i imaju međusobno pozitivne i negativne doprinose što ima uticaja na afinitet vezivanja. Takođe, u velikom broju biohemijskih procesa nema aditivnosti između energetske doprinosa. I pored navedenih nedostataka, koji se mogu prevazići uvođenjem određenih aproksimacija, od velikog značaja je činjenica da su *affinity score* vrednosti primenljive za procenu afiniteta vezivanja velikog broja liganda za receptor [Kroemer, 2007; Wang et al., 2003; Warren et al., 2006].

2.4. QSAR studije farmakoloških aktivnosti

Uspostavljanje kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti kao i strukture i fizičko-hemijskih karakteristika molekula (*Quantitative structure-activity and Quantitative structure-property relationship*, QSAR/QSPR) je od velikog značaja za savremenu hemiju i biohemiju. QSAR/QSPR se bazira na transformaciji ispitivanih molekula sa određenim karakteristikama u matematički kvantifikovani i kompjuterizovani obrazac koristeći eksperimentalne podatke i interakcije očekivane na osnovu poznavanja hemijskih struktura. Uspostavljena veza između strukture i aktivnosti/osobina omogućava kompjuterski skrining za bilo koji set molekula, uključujući i one koji još nisu sintetisani, u cilju izbora strukture sa najboljim karakteristikama za dalje ispitivanje. Prednost ovih kompjuterskih studija je mogućnost izbora jedinjenja sa najboljim karakteristikama za sintezu i laboratorijske testove. Na taj način QSAR/QSPR pristup štedi resurse i ubrzava proces razvoja novih molekula koji će se koristiti kao lekovi, aditivi ili u druge svrhe [Karelson & Lobanov, 1996].

Iako često nije lako naći zadovoljavajuću korelaciju strukture i aktivnosti/fizičko-hemijskih karakteristika molekula, nedavni eksponencijalni rast broja QSAR/QSPR studija je pokazatelj

brzog razvoja u ovoj oblasti. Uspostavljanje značajne korelacije vrši se primenom odgovarajućih deskriptora dobijenih teorijskim ili empirijskim putem ili na osnovu dostupnih eksperimentalnih strukturnih karakteristika.

Optimalni deskriptori predloženi od strane Randića i saradnika za uspostavljanje korelacije koriste molekulski graf [Randic & Basak, 1999, 2001; Randic & Pompe, 2001]. SMILES (*Simplified Molecular Input-Line Entry System*) notacija je zamena za molekulski graf i predstavlja pojednostavljen prikaz molekulske strukture čime se olakšava unos podataka [Weininger, 1988, 1990; Weininger et al., 1989]. Zbog toga razvoj QSAR/QSPR pristupa koji se bazira na SMILES prikazu molekulske strukture postaje značajan pravac istraživačkog rada u oblasti QSAR/QSPR teorije i njene primene.

Za prevođenje SMILES molekulske strukture u fragmente koji služe za dobijanje optimalnih deskriptora koristi se CORAL kompjuterski program koji se zasniva na Monte Karlo metodi. Za SMILES molekulske strukture prethodno se definišu trening set (podskup molekula na osnovu koga se uspostavlja QSAR model) i test set koji zajedno čine ispitivani set molekula. Test set predstavlja 20% slučajno odabranih molekula i služi za procenu validnosti dobijenog QSAR/QSPR modela na osnovu analize trening seta molekula. Polje pretrage seta molekula određeno je vrednostima za prag (T , *Threshold*) i broj ponavljanja (N_{epoch}). T vrednost definiše retke fragmente u ispitivanom setu molekulu koji se ne uzimaju u obzir za dobijanje QSAR/QSPR modela.

Svaki QSAR/QSPR model karakterišu: definisano ispitivanje-aktivnost/osobina prikazano kao brojana vrednost (*endpoint*), jasno definisani algoritam, definisani domen primenljivosti za odgovarajući set molekula, jasna mera validacionih vrednosti i primena dobijenih kompjuterskih vrednosti za farmakohemijsku karakterizaciju molekula [OECD, 2007].

Dobijeni model se matematički prikazuje jednačinom prave dobijenom linearnom regresijom ($y=f(x_1, x_2, \dots, x_n)$), gde y predstavlja proračunatu vrednost za definisanu aktivnost/osobinu-endpoint, a $x_{1..n}$ su deskriptori koji opisuju karakteristike molekula od značaja za datu aktivnost/osobinu).

Ovako dobijeni modeli se mogu koristiti za kompjutersko ispitivanje složenih farmakoloških aktivnosti potencijalnih lekova, a na osnovu povoljnog doprinosa pojedinih molekulskih fragmenata na ispitivanu aktivnost moguće je predložiti hemijske strukture novih jedinjenja

sa boljim farmakohemijskim karakteristikama što je od značaja za dizajn lekova [Toropova et al., 2014, Veselinović AM et al., 2013a,b; Veselinović JB et al., 2014].

3. Ciljevi istraživanja

I pored dugogodišnjih istraživanja farmakohemijskih aktivnosti kumarinskih molekula, još uvek nije ispitan uticaj broja i položaja hidroksilnih grupa na antioksidativno i antibakterijsko delovanje 4-fenil hidroksikumarina. Ovo istraživanje bi omogućilo da se uspostavi povezanost između strukture i aktivnosti ispitivanih kumarina i da se identifikuju mehanizmi kojima se ova povezanost ostvaruje, tako da su ciljevi istraživanja:

- Ispitati antioksidativnu aktivnost odabranih 4-fenil hidroksikumarina.
- Uspostaviti odnos između strukture i antioksidativne aktivnosti primenom DFT deskriptora.
- Odrediti mehanizam antioksidativnog delovanja na osnovu fizičko-hemijskih parametara dobijenih DFT proračunima.
- Ispitati antibakterijsku aktivnost odabranih 4-fenil hidroksikumarina na različite bakterijske sojeve.
- Uspostaviti korelaciju između potencijalne antibakterijske aktivnosti i afiniteta vezivanja ispitivanih molekula za aktivno mesto bakterijskih enzima (tirozil tRNA sintetaza iz *S. aureus* i topoizomeraza II DNK giraza β iz *E. coli*) primenom kompjuterske doking metode.
- Uspostaviti QSAR modele za odabrane farmakohemijske aktivnosti ispitivanih kumarina primenom Monte Karlo metode.
- Proceniti fizičko-hemijske i molekulske karakteristike ispitivanih kumarina i predvideti njihovu biološku raspoloživost u skladu sa pravilima Lipinskog.

4. Materijal i metode

4.1. Materijal

4.1.1. Supstance i reagensi

7-hidroksi-4-fenilkumarin (7C), 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarin (5,7C), 7,8-dihidroksi-4-fenilkumarin (7,8C), butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), troloks, α -tokoferol, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil radikal (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), linoleinska kiselina, polioksietilen sorbitan monolaurat (Tween-20), amonijum tiocijanat, trihlorsirćetna kiselina, trifeniltetrazolijum hlorid (TTC), Mueller-Hinton bujon, tetraciklin i hloramfenikol nabavljeni su od Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka).

Ostale korišćene supstance, kalijum persulfat, kalijum fericijanid, $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, su bile analitičke čistoće (p.a.) i nabavljene su od Zorka Šabac.

Za održavanje odgovarajuće pH vrednosti u ispitivanim sistemima korišćeni su acetatni pufer (pH 7,0) i fosfatni pufer (pH 6,6; pH 7,0; pH 7,4).

Za pripremanje svih rastvora korišćeni su čist metanol, 70% i 96% etanol i dejonizovana voda.

4.1.2. Bakterijski sojevi

Antibakterijska aktivnost odabranih 4-fenil hidroksikumarina je ispitivana protiv 20 bakterijskih ATCC (*American Type Culture Collection*) test sojeva koji su prikazani u tabeli 4.1.

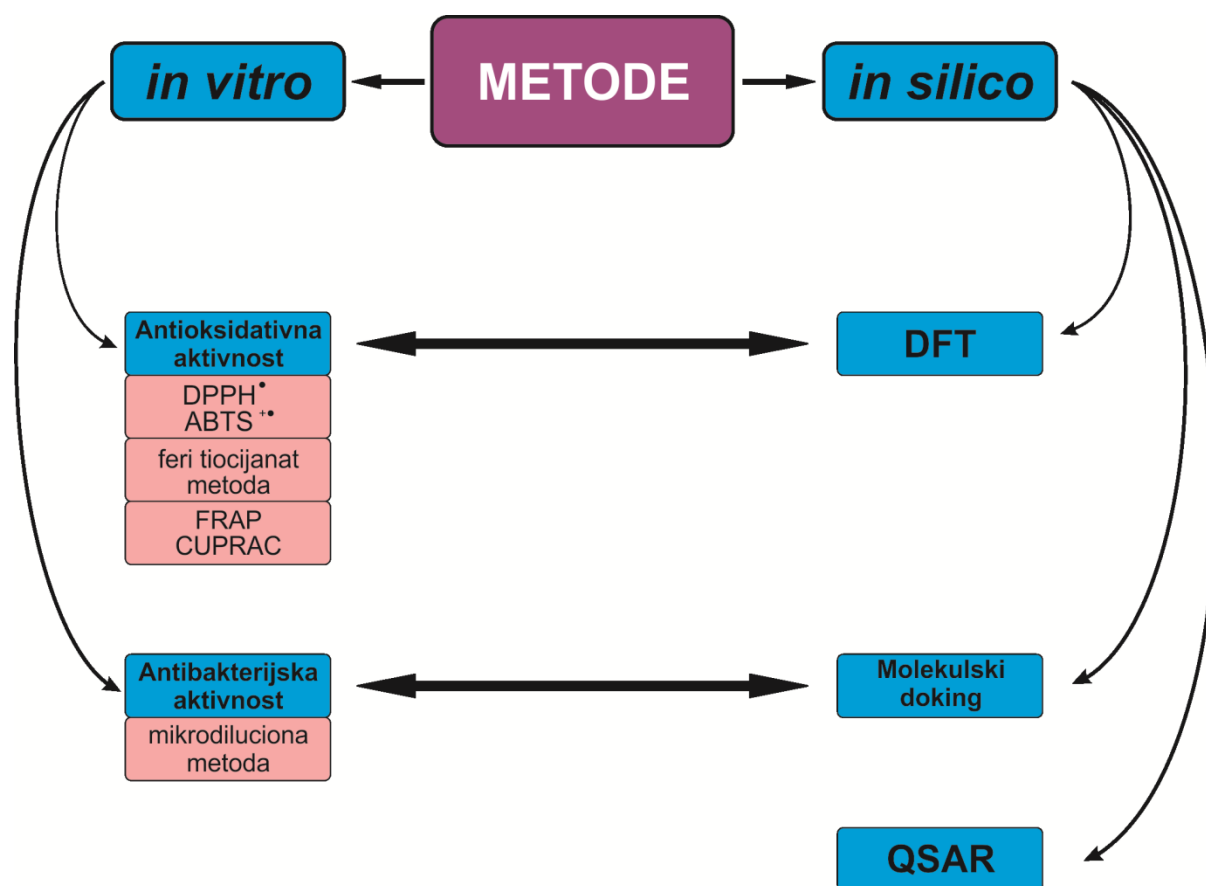
Tabela 4.1. Testirani bakterijski ATCC sojevi.

Gram (-) bakterije	Gram (+) bakterije
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 19404
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 49656	<i>Listeria innocua</i> ATCC 51742
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Enterococcus faecalis</i> 19433
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Enterobacter aerogenes</i> 13048	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240

4.2. Metode

Za ispitivanje antioksidativne i antibakterijske aktivnosti odabranih 4-fenil hidroksikumarina korišćene su *in vitro* metode. Hemijski *cell-free* testovi (DPPH[•], ABTS^{•+}, feri tiocijanat metoda, FRAP i CUPRAC) su primenjeni za ispitivanje antioksidativne aktivnosti. Mikrodiluciona metoda je primenjena za određivanje antibakterijske aktivnosti.

Savremene kompjuterske (*in silico*) metode (DFT, molekulski doking, QSAR) su primenjene za uspostavljenje korelacije između strukture i delovanja ispitivanih jedinjenja, kao i za identifikaciju mehanizama kojima se ova korelacija ostvaruje.



Šema 4.1. Šematski prikaz primenjenih metoda.

4.2.1. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (*Radikal Scavenging Capacity*) odabranih 4-fenil hidroksikumarina određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH[•] i ABTS^{•+} radikale. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije određena je korišćenjem feri tiocijanat metode. Redukciona moć (*Reducing power*) je određena korišćenjem metoda FRAP i CUPRAC. Pored ispitivanih jedinjenja, radi komparacije, ispitana je i antioksidativna aktivnost komercijalnih sintetskih antioksidanasa koji su korišćeni kao kontrolna grupa; butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), troloks i α -tokoferol. Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja sa tri probe.

Sva spektrofotometrijska merenja su urađena na UV/VIS spektrofotometru Evolution 60 (Thermo Scientific, USA).

Eksperimentalno dobijeni podaci su prikazani kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, standardnom greskom i intervalom poverenja (95%). Jednofaktorska analiza varijanse je primenjena za statističku analizu. Značajnost razlike između antioksidativne aktivnosti ispitivanih kumarina i standarda je određena korišćenem Dunett-ovog testa ($p < 0,05$ se smatralo kao značajna i $p < 0,01$ kao veoma značajna razlika).

4.2.1.1. DPPH[•] metoda

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih jedinjenja i standardnih antioksidanasa (kontrolne grupe) određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH[•] radikal. Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog DPPH[•] radikala u redukovanu, žuto obojenu, formu uz spektrofotometrijsko očitavanje apsorbancije [Blois, 1958].

Ispitivanje je vršeno dodavanjem 0,5 mL rastvora DPPH[•] radikala koncentracije 0,4 mM u 1,5 mL pripremljenog etanolnog rastvora 7C, 5,7C, 7,8C i standardnih antioksidanasa različitih koncentracija (50-500 μ M). Kontrolni rastvor je sadržao 0,5 mL etanolnog rastvora DPPH[•] radikala koncentracije 0,4 mM i 1,5 mL apsolutnog etanola koji je korišćen za rastvaranje DPPH[•] radikala, ispitivanih jedinjenja i standardnih antioksidanasa. Rastvori pripremljeni na ovaj način su ostavljeni na hladnom i tamnom mestu 20 minuta, a zatim su apsorbancije dobijenih rastvora merene na 517 nm uz 96% etanol kao referentni rastvor.

Na osnovu kinetičkih karakteristika jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost se mogu podeliti na antioksidanse sa brzom (<5 min), srednjom (5–30 min) i sporom (>30 min) reakcijom sa DPPH[•] radikalom [Sanchez-Moreno et al., 1998]. Kako prethodna preliminarna ispitivanja vršena primenom različitog vremenskog intervala (završna tačka reakcije je predstavljala period od 20, 30 i 60 minuta) nisu pokazala vremenski zavisnu reakciju za ispitivane kumarine, reakciona smeša je ostavljena 20 minuta što je u skladu sa postupkom koji je u literaturi opisan za ispitivanja hidroksikumarina [Morabito et al., 2010]

Parametar koji je korišćen za interpretaciju rezultata dobijenih DPPH[•] metodom je EC₅₀ (*Efficient Concentration*) i određivan je metodom kalibracione krive. EC₅₀ vrednost je definisana kao koncentracija antioksidansa koji dovodi do gubitka aktivnosti (smanjenja koncentracije) DPPH[•] radikala za 50%.

4.2.1.2. ABTS^{•+} metoda

Sposobnost ispitivanih jedinjenja i standardnih antioksidanasa da neutrališu ABTS^{•+} radikal je procenjena primenom ABTS^{•+} metode [Re et al., 1999]. ABTS^{•+} katjon radikal intenzivno zelene boje je formiran oksidacijom vodenog rastvora ABTS blede zelene boje koncentracije 7mM pomoću kalijum persulfata čija je finalna koncentracija iznosila 2,45 mM. Rastvor je ostavljen 12-16 sati na sobnoj temperaturi na tamnom mestu pre upotrebe, a zatim je razblažen fosfatnim puferom (pH 7,4) kako bi se obezbedila stabilna vrednost apsorpcije od 0,7±0,02 na 734 nm. U 2 mL ovako pripremljenog rastvora ABTS^{•+} katjon radikala je dodato 20 µL metanolnog rastvora 7C, 5,7C, 7,8C i standardnih antioksidanasa različitih koncentracija (5-100 µM). Kontrola je sadržala 2 mL rastvora ABTS^{•+} katjon radikala i 20 µL metanola. Reakciona smeša je ostavljena 6 minuta na tamnom mestu na sobnoj temperaturi, a zatim su apsorpcije rastvora merene na 734 nm uz čist metanol kao referentni rastvor. Kapacitet hvatanja ABTS^{•+} radikala je određen, kao i kod DPPH[•] metode, na osnovu EC₅₀ vrednosti.

4.2.1.3. Feri tiocijanat metoda

Feri tiocijanat metoda je primenjena za praćenje procesa inhibicije lipidne peroksidacije [Gulcin, 2006; Gulcin & Dastan, 2007].

Zasniva se na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije peroksida koji sponatno nastaje u sistemu linoleinske kiseline u prisustvu kiseonika. Za pripremanje 5 mL emulzionog sistema linoleinske kiseline bilo je potrebno 15,5 µL linoleinske kiseline i 17,5 µg Tween 20

sjediniti u 0,04 M kalijum-fosfatni pufer (pH 7,0). Identične koncentracije rastvora 7C, 5,7C, 7,8C i standardnih antioksidanasa (20 µg/mL) su pripremljene takođe u kalijum-fosfatnom puferu (0,04 M, pH 7,0) i 2,5 mL ovog rastvora je dodato u 2,5 mL emulzije linoleinske kiseline. Kontrolni rastvor je sadržao 2,5 mL emulzije linoleinske kiseline i 2,5 mL kalijum-fosfatnog pufera (0,04 M, pH 7,0). Rastvori su inkubirani na 37⁰ C. Nivo formiranog peroksida određivan je merenjem apsorbanije na 500 nm nakon reakcije sa FeCl₂ i amonijum tiocijanatom u intervalima na svakih 5 sati tokom inkubacije sve do postizanja maksimalne vrednosti apsorbanije za kontrolni rastvor. Step en inhibicije lipidne peroksidacije u sistemu linoleinske kiseline je određen korišćenjem jednačine:

$$\text{Inhibicija lipidne peroksidacije (\%)} = 100 - [(A_c/A_s) \times 100] \quad (2.13.)$$

gde je A_c apsorbanija kontrolnog sistema, A_s apsorbanija ispitivanog sistema.

4.2.1.4. FRAP metoda (*Fe³⁺ Reducing Power Assay*)

Redukciona moć ispitivanih jedinjenja i standardnih antioksidanasa određena je merenjem njihove sposobnosti da redukuju fericijanidni jon, [Fe(CN)₆]³⁻ u ferocijanidni jon, [Fe(CN)₆]⁴⁻ [Gulcin, 2009; Oyaizu, 1986]. Apso rbancija kompleksa prusko plavo, formiranog nakon dodatka Fe³⁺ jona, korišćena je kao indikator redukcione sposobnosti. Različite koncentracije rastvora 7C, 5,7C, 7,8C i standardnih antioksidanasa (5-100 µM) pripremljene su u dejonizovanoj vodi i 0,75 mL svakog rastvora pomešano je sa 1,25 mL natrijum-fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 1,25 mL 0,1 % rastvora kalijum fericijanida. Smeša je inkubirana 20 minuta na 50⁰ C, a zatim je zakišeljena sa 1,25 mL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline. Nakon dodatka 0,5 mL 0,1 % FeCl₃ apso rbancije rastvora su spektrofotometrijski merene na 700 nm uz referentni rastvor koji je sadržao 0,75 mL dejonizovane vode, 1,25 mL natrijum-fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6), 1,25 mL 0,1 % rastvora kalijum fericijanida, 1,25 mL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline i 0,5 mL 0,1 % FeCl₃. Metodom linearne regresije iz jednačine koja opisuje zavisnost apso rbancije od koncentracije, dobijena je vrednost za nagib prave. Ovaj parametar je korišćen za poređenje redukcione sposobnosti ispitivanih jedinjenja.

4.2.1.5. CUPRAC metoda (*Cupric ions reducing power assay*)

Redukciona moć ispitivanih jedinjenja i standardnih antioksidanasa određena je merenjem njihove sposobnosti da redukuju Cu²⁺ jon iz kompleksa sa neokuproinom do Cu⁺ jona [Apak & Gulcin, 2008]. Pripremljena je reakciona smeša od 0,5 mL rastvora CuCl₂ (0,01 M), 0,5 mL acetatnog pufera (1mM), 0,5 mL etanolnog rastvora neokuproina (7,5×10⁻³ M) i 0,5 mL

vodenog rastvora 7C, 5,7C, 7,8C i standardnih antioksidanasa različitih koncentracija (5-110 μM) i ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancije rastvora su spektrofotometrijski merene na 450 nm u odnosu na referentni rastvor koji je sadržao 0,5 mL rastvora CuCl_2 (0,01 M), 0,5 mL acetatnog pufera (1mM), 0,5 mL etanolnog rastvora neokuproina ($7,5 \times 10^{-3}$ M) i 0,5 mL dejonizovane vode. Za poređenje redukcionih sposobnosti ispitivanih jedinjenja korišćen je, kao i kod FRAP metode, nagib prave.

4.2.2. Mikrodiluciona metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti

Od prekonoćnih bakterijskih kultura je u sterilnom fiziološkom rastvoru napravljena suspenzija turbiditeta 0,5 McFarlanda (koja odgovara 10^7 - 10^8 CFU/mL, zavisno od roda bakterija) (NCCLS, 2003). Od početne koncentracije testiranih komponenti (100 mg/mL 70%-nog etanola) je u sterilnom Mueller-Hinton bujonu napravljena serija duplih razblaženja. Upotrebljeni rastvarač (70% etanol) nije uticao na rast korišćenih sojeva mikroorganizama pri finalnim koncentracijama ispitivanih kumarina [Kayser & Kolodziej, 1999]. U mikrotitar ploče sa 96 udubljenja je uneseno po 90 μL inokulisane podloge i po 10 μL od svakog razblaženja testiranih komponenti. Finalni volumen u svakom udubljenju je bio 100 μL , finalna koncentracija bakterijskih ćelija 10^6 CFU/mL, a testirana serija duplih razblaženja uzorka je bila u opsegu od 10,0-0,005 mg/mL. Mikotitar ploče su zatim inkubirane 24 h na 37°C . Sve analize su izvedene u tri ponavljanja. Korišćene su dve kontrole, kontrola rasta tj. inokulisani hranljivi medijum kao negativna kontrola, i hranljivi medijum sa serijom razblaženja referentnog antibiotika kao pozitivna kontrola. Tetraciklin je korišćen kao pozitivna kontrola za Gram (-) bakterije, dok je hloramfenikol korišćen kao pozitivna kontrola za Gram (+) bakterije.

Mikrobiološki rast je očitavan dodavanjem po 20 μL , 0,5% vodenog rastvora trifenil tetrazolium hlorida (TTC) koji boji porasle kolonije u ružičasto [Sartoratto et al., 2004]. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je definisana kao najniža koncentracija ispitivanog jedinjenja u kojoj nema vidljivog rasta bakterija (nema ružičasto obojenih kolonija na dnu udubljenja mikrotitar ploče nakon dodavanja TTC-a).

4.2.3. DFT (*Density Functional Theory*) metoda

Geometrijska optimizacija odabranih 4-fenil hidroksikumarina je izvršena korišćenjem DFT metode, zbog veoma dobrog odnosa vremena potrebnog za kumpjuterska izračunavanja i opisa elektronske strukture [Geerlings et al., 2003]. Sva izračunavanja su obavljena

korišćenjem Gaussian 09 molecular package softvera [Frisch, et al., 2004]. Polazna geometrija je generisana primenom standardnih geometrijskih parametara i energetski je minimizirana bez ograničenja u potencijalnoj energiji površine korišćenjem B3LYP složenog seta funkcija gustine i standardnog 6-31G(d,p) osnovnog seta funkcija [Becke, 1993]. Radi boljeg definisanja strukture, geometrije su dalje reoptimizovane do stabilnih konformera primenom 6-311++G(d,p) osnovnog seta funkcija [McLean & Chandler, 1980; Krishnan et al., 1980]. Optimizacija geometrije radikala i radikal katjona je urađena primenom UB3LYP/6-311++G(d,p). Za sve molekule konformer sa najnižom energijom je dalje kompjuterski ispitivan. Uticaj rastvarača je definisan na *Conductor-like Polarizable Continuum Model*-u (CPCM) [Barone et al., 1998], gde je energija konformacije molekula u gasnoj fazi dodatno obrađena u odnosu na definisani rastvarač pomoću njegove polarizabilnosti (ϵ). Ispitivan je uticaj sledećih rastvarača: n-oktanola ($\epsilon = 9,863$), etanola ($\epsilon = 24,852$) i vode ($\epsilon = 78,355$). Za uspostavljanje odnosa između strukture i antioksidativne aktivnosti izračunati su odgovarajući deskriptori [Queiroz et al., 2009].

Sve reakcione entalpije definisane u poglavlju 2.2.2.2. su izračunate na 298 K. Korišćene vrednosti za entalpiju su bile:

u gasnoj fazi-entalpija nastajanja vodonikovog atoma: $H_{H\cdot} = -0.49764$ Ha (-1306.6 kJ/mol), i protona: $H_{H^+} = 0.00236$ Ha (6.197 kJ/mol) [Klein et al., 2007],

u etanolu-entalpija solvatacije vodonikovog atoma: $\Delta_{\text{solv}}H_{H\cdot} = -0.00152$ Ha (-4 kJ/mol), i entalpija solvatacije protona: $\Delta_{\text{solv}}H_{H^+} = -0.39802$ Ha (-1045 kJ/mol),

u vodi-entalpija solvatacije vodonikovog atoma: $\Delta_{\text{solv}}H_{H\cdot} = 0.001409$ Ha (3.7 kJ/mol), i entalpija solvatacije protona: $\Delta_{\text{solv}}H_{H^+} = -0.38926$ Ha (-1022 kJ/mol),

u n-oktanolu-entalpija solvatacije vodonikovog atoma: $\Delta_{\text{solv}}H_{H\cdot} = 0.0019$ Ha (5 kJ/mol), i entalpija solvatacije protona: $\Delta_{\text{solv}}H_{H^+} = -0.39992$ Ha (-1050 kJ/mol) [Rimarčik et al., 2010].

4.2.4. Molekulski doking

Za kompjuterske studije molekulskog dokinga korišćen je The Molegro Virtual Docker (MVD v. 2013.6.0.1.) softver [Thomsen & Christensen, 2006]. MVD je primenjen za identifikaciju vodoničnih veza, elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija između liganda (odabrani 4-fenil hidroksikumarini) i aktivnog mesta enzima (amino kiselinski ostaci).

Kompjuterski proračuni za aktivno mesto enzima vršeni su sa mrežnom rezolucijom od 0.3 Å. Kao algoritam pretrage najpovoljnijih poza primenjen je MolDock SE i odabran je broj ciklusa od 100. Parametri doking procedure su bili: veličina populacije-50, maksimalni broj iteracija-1500, energetska prag-100,00 kcal/mol i maksimalni broj koraka-300. U doking proceduri je određeno deset energetski najpovoljnijih poza sa svaki ligand. Procena ligand-receptor interakcija je vršena primenom MVD *scoring* funkcija MolDock Score, Rerank Score, Protein Score, Hbond Score, i Docking Score.

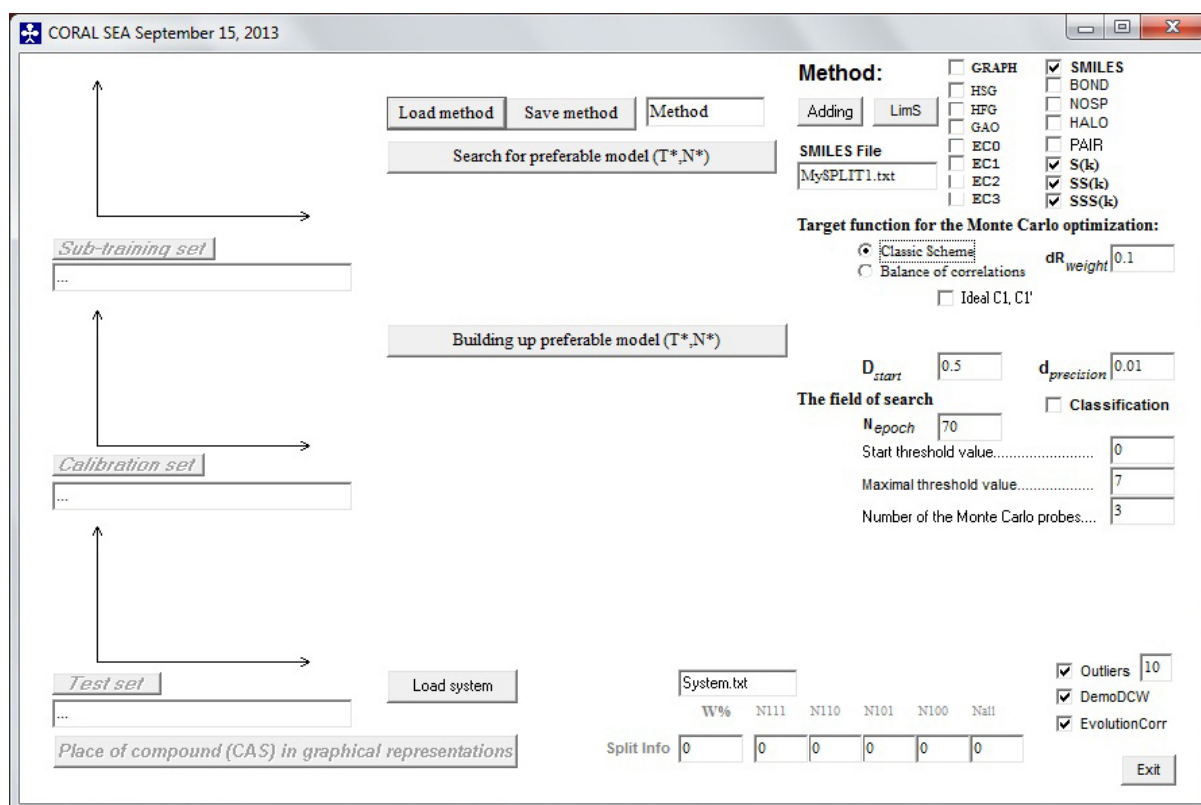
LigPlot+ program je primenjen za dvodimenzionalni prikaz energetski najpovoljnijih ligand-receptor interakcija [Laskowski & Swindells, 2011].

Kristalne strukture ispitivanih enzima su preuzete iz *Brookhaven Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb>). Potencijalni mehanizam antibakterijske aktivnosti je ispitivan na osnovu interakcija odabranih 4-fenil hidroksikumarina sa bakterijskim enzimama-tirozil tRNK sintetaza (pdb kod: 1JIJ) [Qiu et al., 2001] i topoizomeraza II DNK giraza β (pdb kod: 1KZN) [Lafitte et al., 2002]. Za određivanje potencijalnog mehanizma anti-HIV delovanja odabranih 4-fenil hidroksikumarina ispitivana je interakcija sa HIV-1 integrazom (pdb kod: 3NF7) [Rhodes et al., 2011].

Za doking studije korišćene su trodimenzionalne strukture odabranih 4-fenil hidroksikumarina dobijene primenom dva nivoa teorije DFT (za ispitivanja potencijalnog antibakterijskog mehanizma) i MMFF94 [Halgren, 1996] (za ispitivanja inhibicije HIV-1 integracije).

4.2.5. QSAR metoda

Za uspostavljanje QSAR modela korišćena je Monte Karlo metoda koja se može uspešno primeniti za ispitivanje složenih farmakoloških i biohemijskih aktivnosti [Veselinović et al., 2013a,b; Toropova et al., 2014]. Korišćen je CORAL program u kome su zadati odgovarajući parametri za izračunavanje (slika 4.1.) [Toropov et al., 2011, 2012].



Slika 4.1. Prikaz prozora korisničkog interfejsa CORAL programa.

Za QSAR studiju je odabran set od 26 kumarinska molekula sa eksperimentalno određenom inhibicijom HIV-1 integraze [Zhao et al., 1997]. Kao *endpoint* korišćene su pIC_{50} vrednostiza enzimsku aktivnost - 3' *processing* i *integration*. SMILES notacija je napravljena korišćenjem ACD/ChemSketch programa (ACD/ChemSketch v.11.0). U modelovanju je ispitivana jedna slučajna podela osnovnog seta molekula na test i trening set (20% molekula je uzeto kao test set).

Brojčana vrednost optimalnih SMILES deskriptora je izračunata primenom jednačine:

$$DCW(T, N_{epoch}) = \alpha \sum CW(Sk) + \beta \sum CW(SSk) + \gamma \sum CW(SSSk) \quad (4.1.)$$

gde su α , β i γ koeficijenti koji mogu imati vrednost 1 ili 0, a Sk , SSk i $SSSk$ SMILES fragmenti koji sadrže jedan, dva ili tri SMILES simbola [Toropov et al., 2008a,b].

Pretraga za najboljim QSAR modelom je vršena u rasponu T (*Threshold*) od 0 do 7 i N_{epoch} od 0 do 70 po već objavljenoj metodologiji [Veselinović 2013a,b].

QSAR model je predstavljen u skladu sa metodom najmanjih kvadrata preko jednačine:

$$Endpoint = C_0 + C_1 \times DCW(T, N_{epoch}) \quad (4.2.)$$

i primenjen je za izračunavanje aktivnosti odabranih 4-fenil hidroksikumarina za koje nisu poznati eksperimentalni podaci.

5. Rezultati

5.1. Ispitivanje antoksidativne aktivnosti

5.1.1. DPPH[•] metoda

Od ispitivanih kumarinskih jedinjenja sposobnost hvatanja DPPH[•] radikala pokazao je samo 7,8C, dok 7C i 5,7C nisu pokazali tu aktivnost. Tabela 5.1. prikazuje sposobnost hvatanja DPPH[•] radikala za 7,8C i standardne antioksidanse (BHA, BHT, α -tokoferol i troloks) definisanu preko srednje vrednosti EC₅₀(μ M).

Tabela 5.1. Srednja vrednost EC₅₀(μ M), standardna devijacija (SD), standardna greška (SE) i interval poverenja (95%) (CL) dobijenih DPPH[•] metodom za 7,8C i standardne antioksidanse.

Jedinjenje	EC ₅₀	SD	SE	CL
BHT	302,486	9,567	5,524	278,723-326,255
BHA	326,683	5,365	3,098	313,355-340,010
Troloks	95,464	1,502	0,867	91,733-99,196
α -tokoferol	63,165	0,250	0,145	62,543-63,787
7,8C	55,755	2,212	1,277	50,260-61,249

5.1.2. ABTS^{•+} metoda

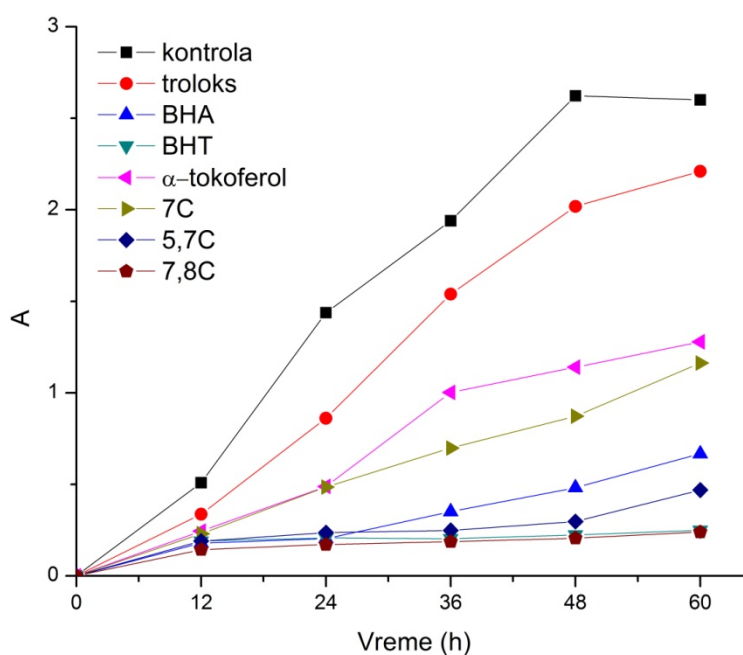
Od ispitivanih kumarinskih jedinjenja sposobnost hvatanja ABTS^{•+} radikala pokazao je samo 7,8C, dok 7C i 5,7C nisu pokazali tu aktivnost. Tabela 5.2. prikazuje sposobnost hvatanja ABTS^{•+} radikala za 7,8C i standardne antioksidanse (BHA, BHT, α -tokoferol i troloks) definisanu preko srednje vrednosti EC₅₀(μ M).

Tabela 5.2. Srednja vrednost EC_{50} (μM), standardna devijacija (SD), standardna greška (SE) i interval poverenja (95%) (CL) dobijenih ABTS⁺⁺ metodom za 7,8C i standardne antioksidanse.

Jedinjenje	EC_{50}	SD	SE	CL
BHT	23,9786	0,5834	0,3368	22,5293-25,4280
BHA	13,0291	0,2113	0,1220	12,5042-13,5539
Troloks	14,0765	0,3832	0,2212	13,1246-15,0283
α tokoferol	14,4272	0,0711	0,0410	14,2506-14,6038
7,8C	11,3044	0,0904	0,0522	11,0798-11,5289

5.1.3. Feri tiocijanat metoda

Slika 5.1. prikazuje uticaj 7C, 5,7C, 7,8C, BHT, BHA, troloksa i α -tokoferola koncentracije 20 $\mu g/mL$ na lipidnu peroksidaciju u sistemu linoleinske kiseline.



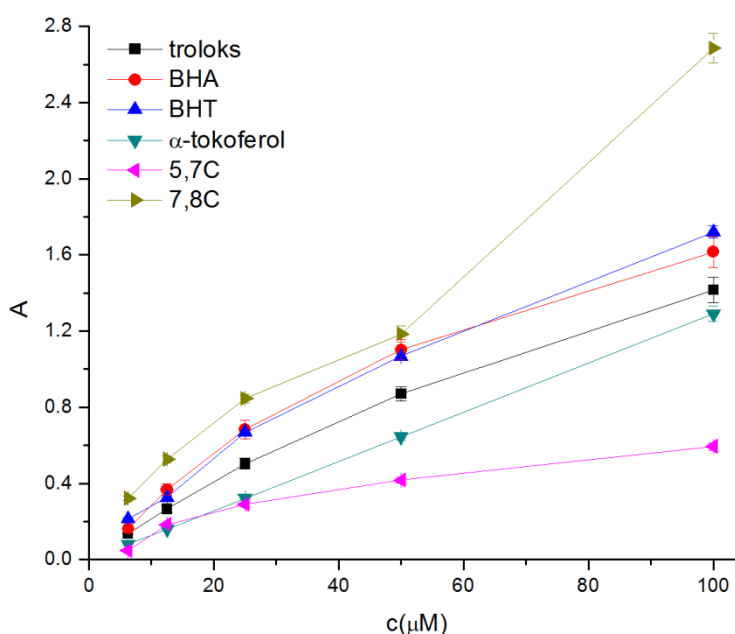
Slika 5.1. Zavisnost absorbancije od vremena u sistemu linoleinske kiseline za ispitivane kumarine i standardne antioksidanase (BHA, BHT, α -tokoferol i troloks) pri koncentraciji od 20 $\mu g/mL$.

Svi ispitivani molekuli su pokazali efekat inhibicije lipidne peroksidacije. Nakon 60 h trajanja reakcije procenat inhibicije lipidne peroksidacije (sa intervalom poverenja 95%) je

iznosio: 56,61 (52,67-60,55) % za 7C, 82,48 (75,24-89,72) % za 5,7C, 90,939 (88,542-93,324) % za 7,8C, 19,81 (15,42-24,2) % za troloks, 52,26 (47,85-56,68) % za α -tokoferol, 75,10 (70,43-79,77) % za BHA i 90,66 (86,79-94,53) % za BHT.

5.1.4. FRAP metoda

Rezultati dobijeni primenom FRAP metode prikazani su na slici 5.2.



Slika 5.2. Redukciona moć ispitivanih kumarina i standardnih antioksidanasa (BHA, BHT, α -tokoferol i troloks) različitih koncentracija (5-100 μM) određena FRAP metodom prikazana preko promene absorbancije u zavisnosti od koncentracije.

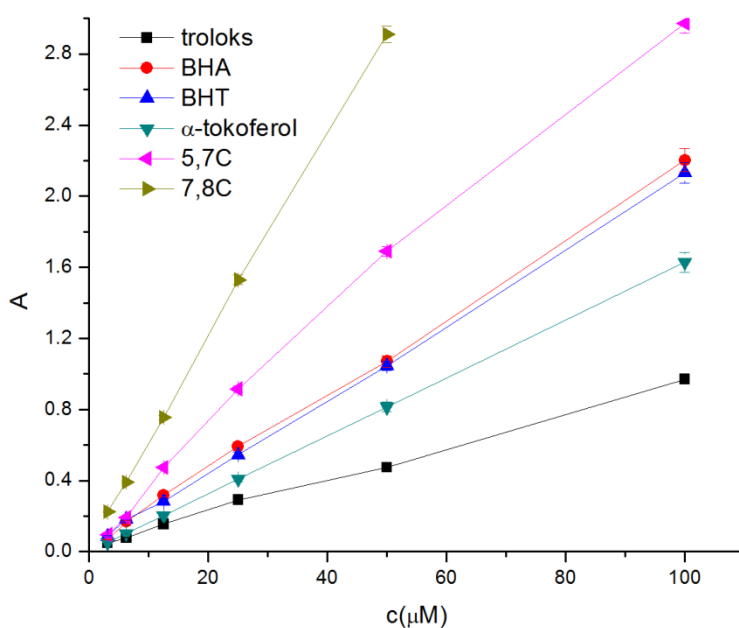
Od ispitivanih kumarinskih molekula jedino 7C nije pokazao redukcionu sposobnost određivanu FRAP metodom. Tabela 5.3. prikazuje srednju vrednosti nagiba prave (k), standardnu devijaciju (SD), standardnu grešku (SE), interval poverenja (95%) (CL) i korelacioni koeficijent (r^2) za 7,8C, 5,7C i standardne antioksidanse (BHA, BHT, α -tokoferol i troloks) dobijene FRAP metodom.

Tabela 5.3. Srednja vrednost nagiba prave (k), standardna devijacija (SD), standardna greška (SE), interval poverenja (95%) (CL) i korelacioni koeficijent (r^2) za 7,8C, 5,7C i standardne antioksidanse dobijenih FRAP metodom.

Jedinjenje	k	SD	SE	CL	r^2
BHT	0,0186	$5,359 \times 10^{-4}$	$3,0943 \times 10^{-4}$	0,01730-0,01993	0,974
BHA	0,01798	$9,340 \times 10^{-4}$	$5,3930 \times 10^{-4}$	0,01566-0,0203	0,958
Troloks	0,01518	$7,302 \times 10^{-4}$	$4,2158 \times 10^{-4}$	0,01337-0,01699	0,982
α -tokoferol	0,01292	$6,750 \times 10^{-4}$	$3,8970 \times 10^{-4}$	0,01124-0,0146	0,982
5,7C	0,0068	$4,007 \times 10^{-4}$	$2,3130 \times 10^{-4}$	0,00578-0,00777	0,929
7,8C	0,0269	0,00136	$7,6800 \times 10^{-4}$	0,02350-0,03030	0,985

5.1.5. CUPRAC metoda

Rezultati dobijeni primenom CUPRAC metode prikazani su na slici 5.3.



Slika 5.3. Redukciona moć ispitivanih kumarina i standardnih antioksidanasa (BHA, BHT, α -tokoferol i troloks) različitih koncentracija (5-100 μ M) određena CUPRAC metodom prikazana preko promene absorbancije u zavisnosti od koncentracije.

Od svih ispitivanih kumarinskih molekula jedino 7C nije pokazao redukcionu sposobnost određivanu CUPRAC metodom. Tabela 5.4. prikazuje srednju vrednosti nagiba prave (k),

standardnu devijaciju (SD), standardnu grešku (SE), interval poverenja (95%) (CL) i korelacioni koeficijent (r^2) za 7,8C, 5,7C i standardne antioksidanse (BHA, BHT, α -tokoferol i troloks) dobijenih CUPRAC metodom.

Tabela 5.4. Srednja vrednost nagiba prave (k), standardna devijacija (SD), standardna greška (SE), interval poverenja (95%) (CL) i korelacioni koeficijent (r^2) za 7,8C, 5,7C i standardne antioksidanse dobijenih CUPRAC metodom.

Jedinjenje	k	SD	SE	CL	r ²
BHT	0,0213	$9,820 \times 10^{-4}$	$5,670 \times 10^{-4}$	0,01886-0,02374	0,9993
BHA	0,0220	0,0011	$6,470 \times 10^{-4}$	0,01927-0,02483	0,9990
Troloks	0,00979	$2,800 \times 10^{-4}$	$1,617 \times 10^{-4}$	0,00910-0,01049	0,9961
α -tokoferol	0,0162	$8,153 \times 10^{-4}$	$4,707 \times 10^{-4}$	0,01418-0,01823	0,9996
5,7C	0,0314	0,0161	$9,267 \times 10^{-4}$	0,0275-0,0354	0,9940
7,8C	0,059	0,00168	$9,688 \times 10^{-4}$	0,0548-0,06316	0,9992

5.2. Mikrodiluciona metoda za određivanje antibakterijske aktivnosti

Antibakterijska aktivnost ispitivanih kumarina predstavljena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC umg/mL) prikazana je u tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC u mg/mL) 7C, 5,7C, 7,8C i referentnih antibiotika (tetraciklina za Gram (-) bakterije i hloramfenikola za Gram (+) bakterije).

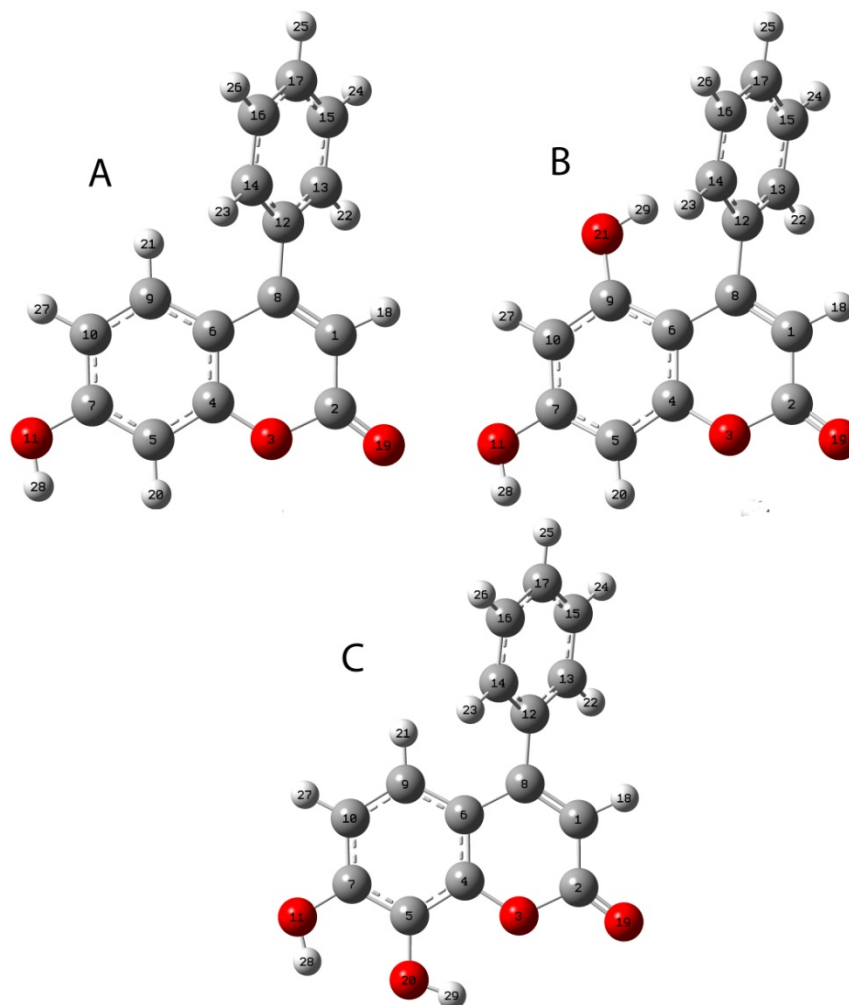
Bakterijski soj	Izvor	7,8C	7C	5,7	Antibiotik
	ATCC kolekcija	MIC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MIC (mg/mL)
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	5,00	10,00	5,00	0,08
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	0,16	10,00	0,63	0,16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	10,00	>10,00	5,00	0,08
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	2,50	5,00	1,25	0,04
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931	2,50	5,00	2,50	0,160
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427	1,25	10,00	0,31	0,040
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 49656	5,00	>10,00	2,50	0,160
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	5,00	10,00	10,0	0,080
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	1,25	10,00	0,31	0,160
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 13182	0,62	5,00	0,16	0,080
Gram (+)					
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341	0,16	0,63	0,08	0,005
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	0,16	0,02	0,02	0,010
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	0,08	0,04	0,02	0,020
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	0,63	0,63	0,08	0,080
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	1,25	2,50	0,63	0,040
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	0,04	0,08	0,08	0,005
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 51742	0,01	0,08	0,04	0,005
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	0,63	0,63	0,16	0,020
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240	0,08	0,16	0,02	0,003
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 19404	1,25	2,50	0,63	0,040

Svi ispitivani kumarini su imali inhibitorni efekat na Gram (-) bakterije u opsegu koncentracija od 0,16-10,0 mg/mL. Za Gram (+) bakterije opseg MIC vrednosti je iznosio

0,01-2,50 mg/mL. 5,7 C i 7,8C su imali najslabiji efekat, dok 7C, i pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 10mg/mL, nije delovao inhibitoryno protiv *P. aeruginosa* i *P. mirabilis*.

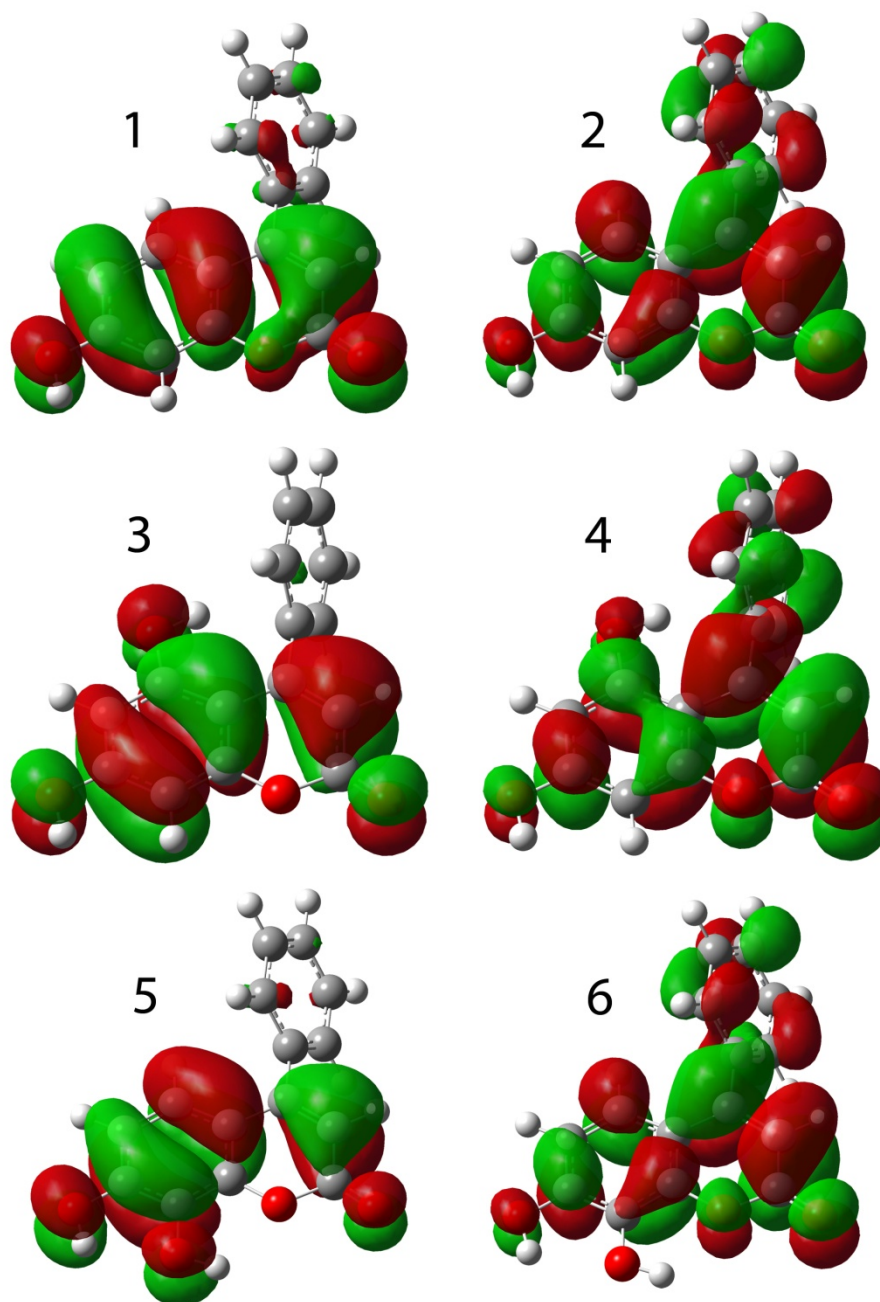
5.3. DFT (*Density Functional Theory*) metoda

DFT metoda je primenjena za određivanje najstabilnijih konformera odabranih 4-fenil hidroksikumarina (slika 5.4.).



Slika 5.4. Trodimenzionalna struktura najstabilnijih konformera za: A) 7C, B) 5,7C i C) 7,8C.

Na slici 5.5. prikazane su HOMO i LUMO orbitale za ispitivane 4-fenil hidroksikumarine.



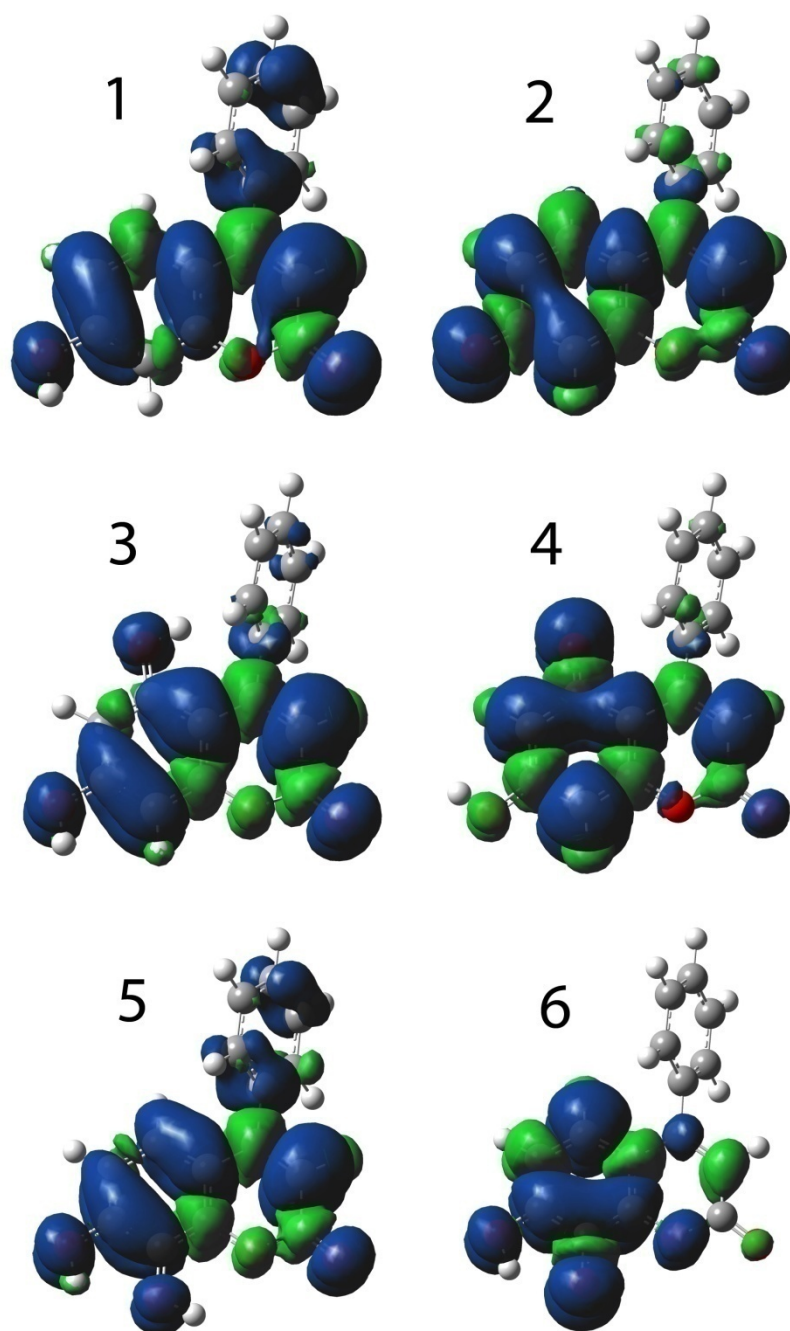
Slika 5.5. HOMO i LUMO molekulske orbitale ispitivanih kumarina: 7C (1-HOMO i 2-LUMO), 5,7C (3-HOMO i 4-LUMO) i 7,8C (5-HOMO i 6-LUMO).

Vrednosti molekulskih deskriptora koji su korišćeni za uspostavljanje odnosa između strukture i aktivnosti su prikazane u tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Izračunate vrednosti (energija HOMO, energija LUMO, energetska razlika, IP, ΔE_{iso} i dipolni moment) za ispitivane kumarine u vakuumu, n-oktanolu, etanolu i vodi.

	HOMO (eV)	LUMO (eV)	En. razlika (eV)	IP (kcal/mol)	$\Delta E(\text{iso})$ (kcal/mol)	Dip. moment (Debay)
Vakuum						
7C	-6,47	-2,16	4,32	182,19	-9,97	4,5950
7,8C	-6,42	-2,27	4,14	181,02	-11,14	3,9053
5,7C	-6,46	-2,15	4,31	181,80	-10,36	4,0514
n-Oktanol						
7C	-6,51	-2,24	4,27	147,77	-1,09	6,3336
7,8C	-6,41	-2,31	4,10	145,46	-3,40	5,1276
5,7C	-6,50	-2,21	4,29	147,10	-1,76	5,2829
Etanol						
7C	-6,52	-2,26	4,26	145,35	-0,57	6,5211
7,8C	-6,41	-2,32	4,10	142,89	-3,03	5,2576
5,7C	-6,50	-2,22	4,28	144,67	-1,25	5,4076
Voda						
7C	-6,52	-2,26	4,26	144,26	-0,33	6,6042
7,8C	-6,41	-2,32	4,09	141,73	-2,87	5,3126
5,7C	-6,50	-2,22	4,28	143,57	-1,03	5,4628

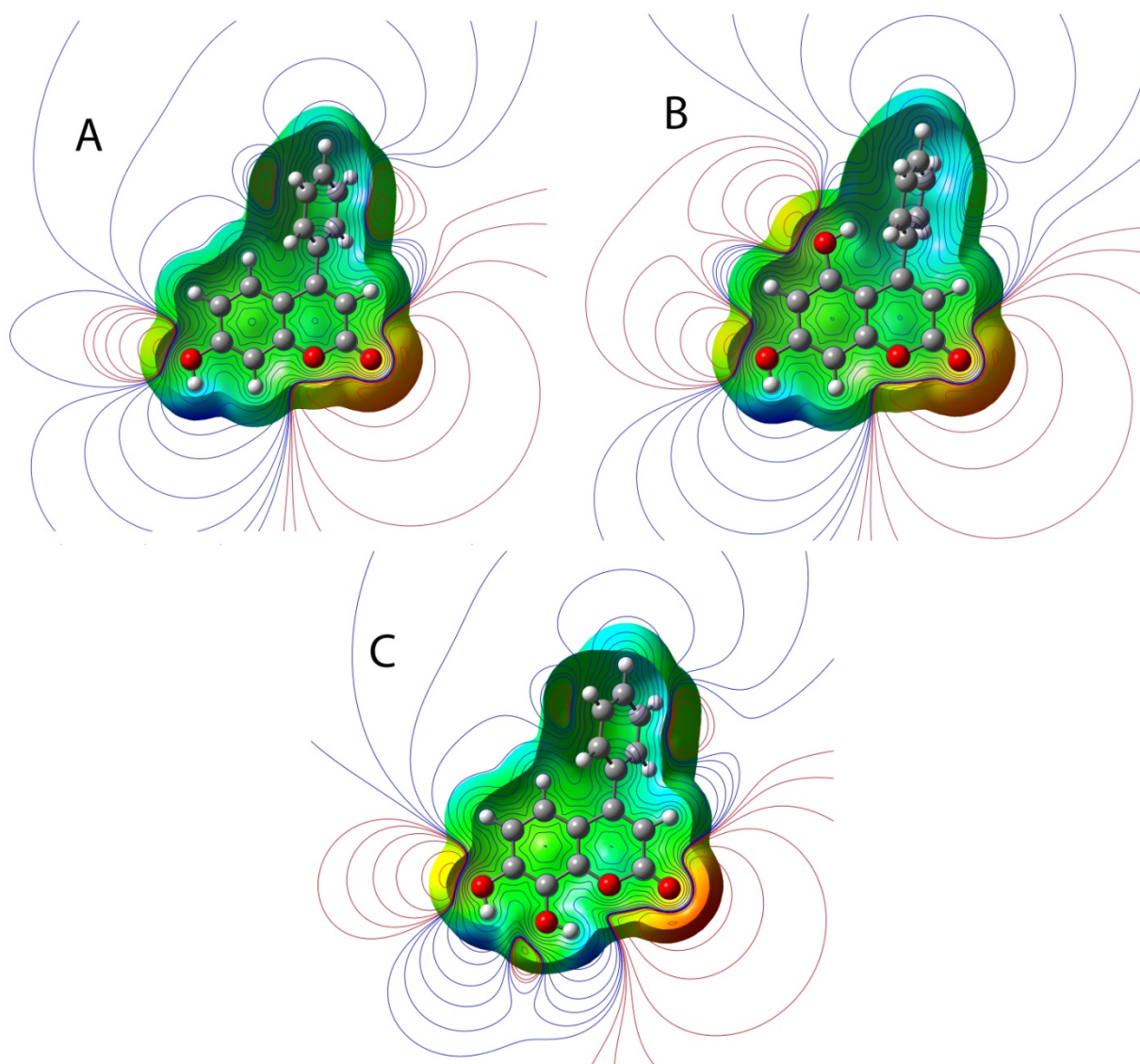
Ukupna spinska gustina (USG) ispitivanih kumarina je prikazana na slici 5.6.



Slika 5.6. Ukupna spinska gustina ispitivanih kumarina: 7C (1-katjon radikal i 2-neutralni radikal), 5,7C (3-katjon radikal i 4-neutralni radikal) i 7,8C (5-katjon radikal i 6-neutralni radikal).

Na slici 5.7. je prikazana mapa elektrostatičkog potencijala za ispitivane kumarine. Različite vrednosti elektrostatičkog potencijala su predstavljene različitim bojama: crvena predstavlja regiju sa negativnim elektrostatičkim potencijalom, plava predstavlja regiju sa pozitivnim

elektrostatičim potencijalom i zelena predstavlja regiju sa nultim potencijalom. Elektrostatički potencijal se povećava u nizu crvena < narandžasta < žuta < zelena < plava.



Slika 5.7. Mapa elektrostatičkog potencijala za ispitivane molekule: A) 7C, B) 5,7C i C) 7,8C.

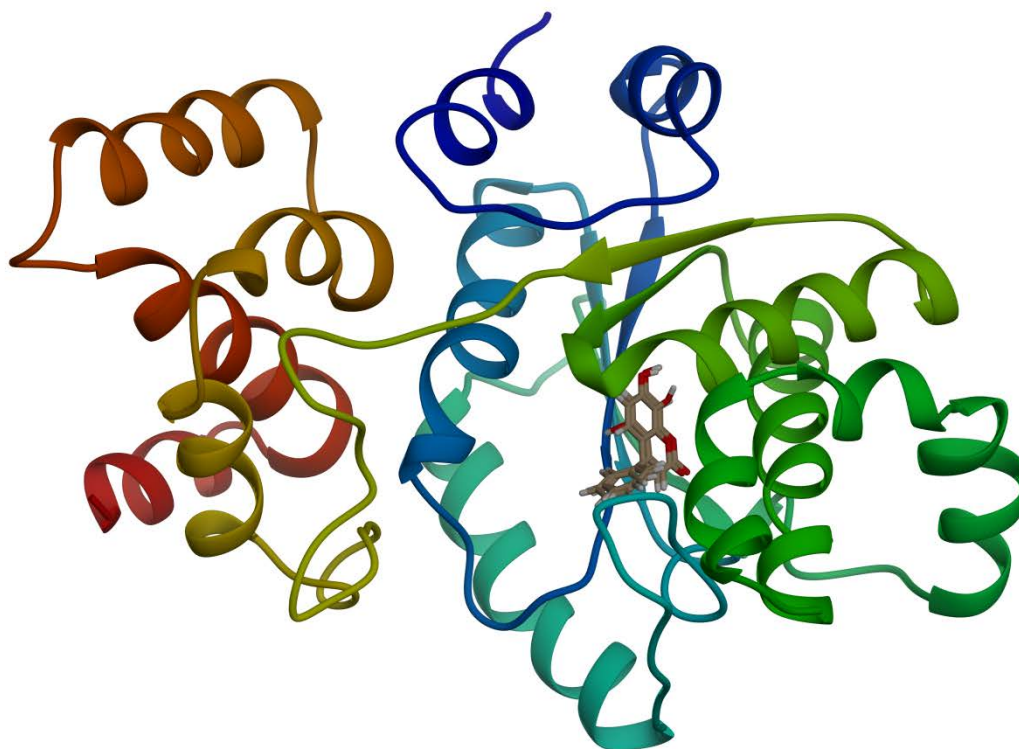
Izračunate vrednosti fizičko-hemijskih parametara ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina u vakuumu, n-oktanolu, etanolu i vodi, koje su korišćene za određivanje mehanizma antioksidativne aktivnosti, prikazane su u tabeli 5.7.

Tabela 5.7. Izračunate vrednosti (BDE, PDE, ETE i PA) –OH grupakod ispitivanih kumarina u vakuumu, n-oktanolu, etanolu i vodi.

	(-OH)'	BDE (kcal/mol)	PDE (kcal/mol)	ETE (kcal/mol)	PA (kcal/mol)
Vakuum					
7C	7	85,19	216,75	72,47	326,48
7,8C	8	79,89	212,62	68,92	329,35
	7	81,07	213,80	70,10	324,72
5,7C	5	84,96	216,91	72,55	326,16
	7	86,67	218,63	74,27	327,08
n-Oktanol					
7C	7	86,28	0,12	109,71	38,18
7,8C	8	78,83	-5,02	102,50	37,94
	7	80,48	-3,37	104,16	35,43
5,7C	5	85,35	-0,14	108,43	38,53
	7	87,33	1,84	110,41	38,09
Etanol					
7C	7	85,95	3,70	112,40	36,65
7,8C	8	78,28	-1,51	105,29	36,10
	7	80,00	0,22	107,01	33,82
5,7C	5	84,97	3,41	110,99	37,09
	7	86,95	5,39	112,97	36,48
Voda					
7C	7	84,10	10,28	113,62	40,92
7,8C	8	76,32	5,03	106,55	40,22
	7	78,09	6,80	108,31	38,05
5,7C	5	83,09	9,97	112,14	41,40
	7	85,07	11,95	114,12	40,70
(-OH)' - položaj hidroksilne grupe u odgovarajućem molekulu kumarina					

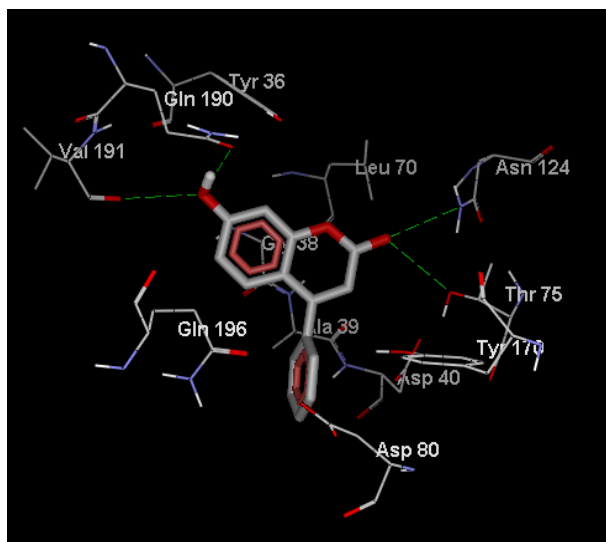
5.4. Molekulski doking za antibakterijsko delovanje

Na slici 5.8. prikazana je struktura tirozil tRNK sintetaze u čijem se aktivnom mestu nalaze ispitivani 4-fenil hidroksikumarini.

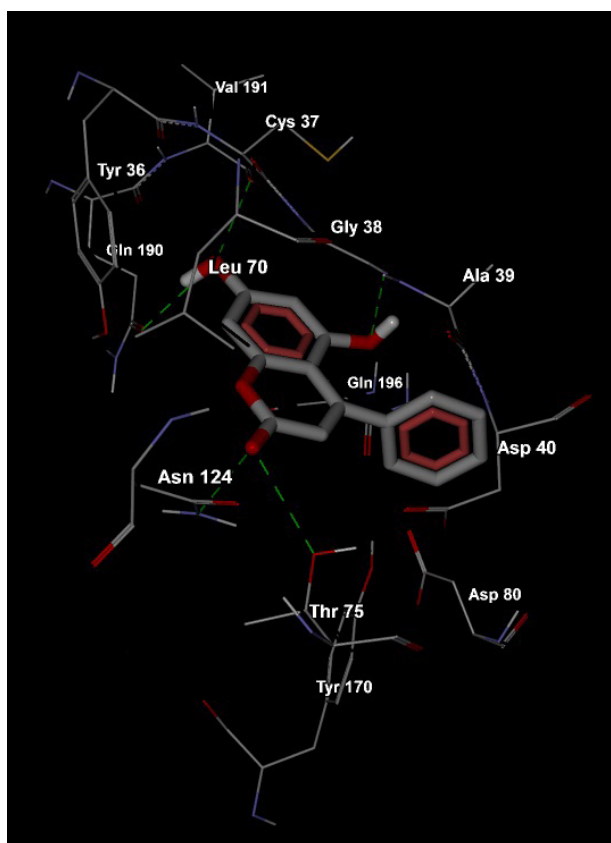


Slika 5.8. Struktura tirozil tRNK sintetaze sa ispitivanim 4-fenil hidroksikumarinima u aktivnom mestu enzima.

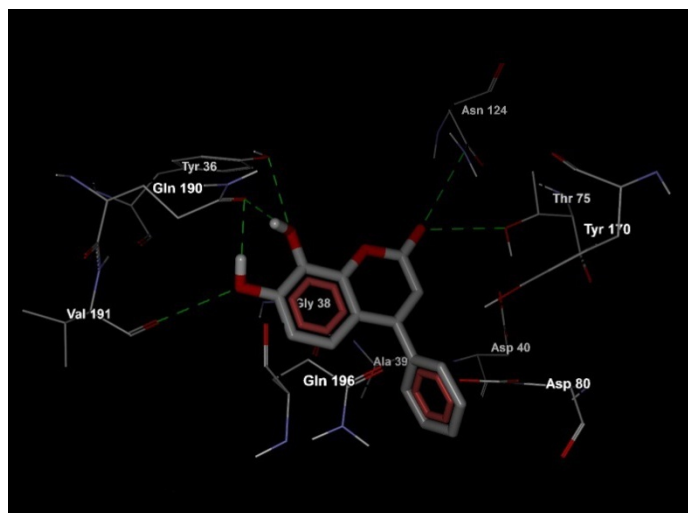
Na slikama 5.9., 5.10. i 5.11. su prikazane najpovoljnije orijentacije 7C, 5,7C i 7,8C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze.



Slika 5.9. Energetski najpovoljnija orijentacija 7C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze.

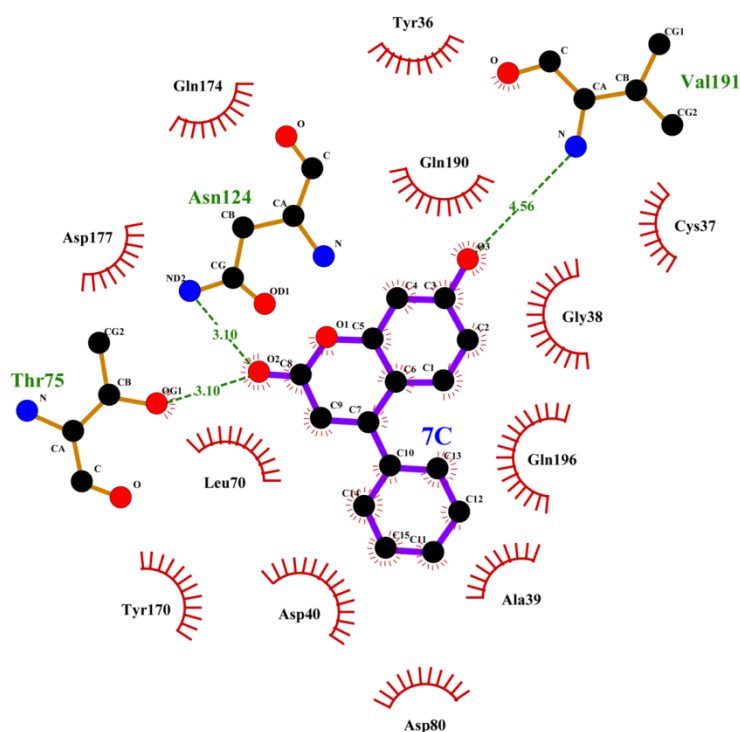


Slika 5.10. Energetski najpovoljnija orijentacija 5,7C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze.

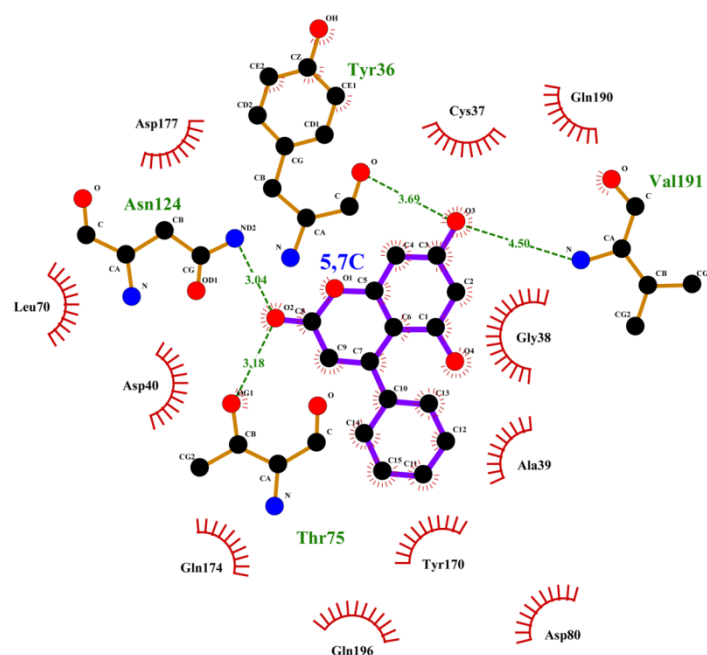


Slika 5.11. Energetski najpovoljnija orijentacija 7,8C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze.

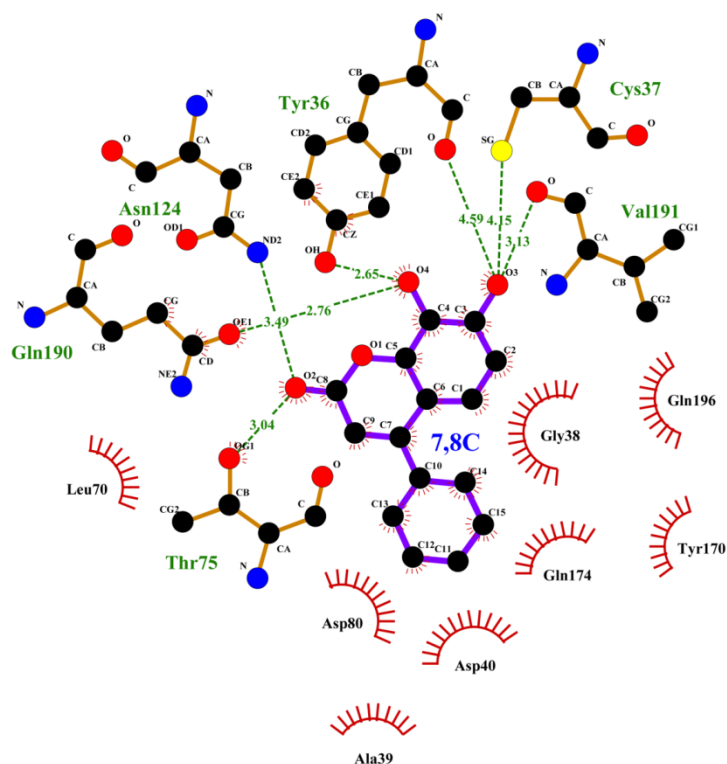
Na slikama 5.12., 5.13. i 5.14. su dati dvodimenzionalni prikazi energetski najpovoljnijih konformera 7C, 5,7C i 7,8C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze. Slike prikazuju i dužinu vodoničnih veza koje ispitivani kumarini formiraju sa aminokiselinama u aktivnom mestu enzima.



Slika 5.12. Dvodimenzionalni prikaz energetski najpovoljnijeg konformera 7C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze.

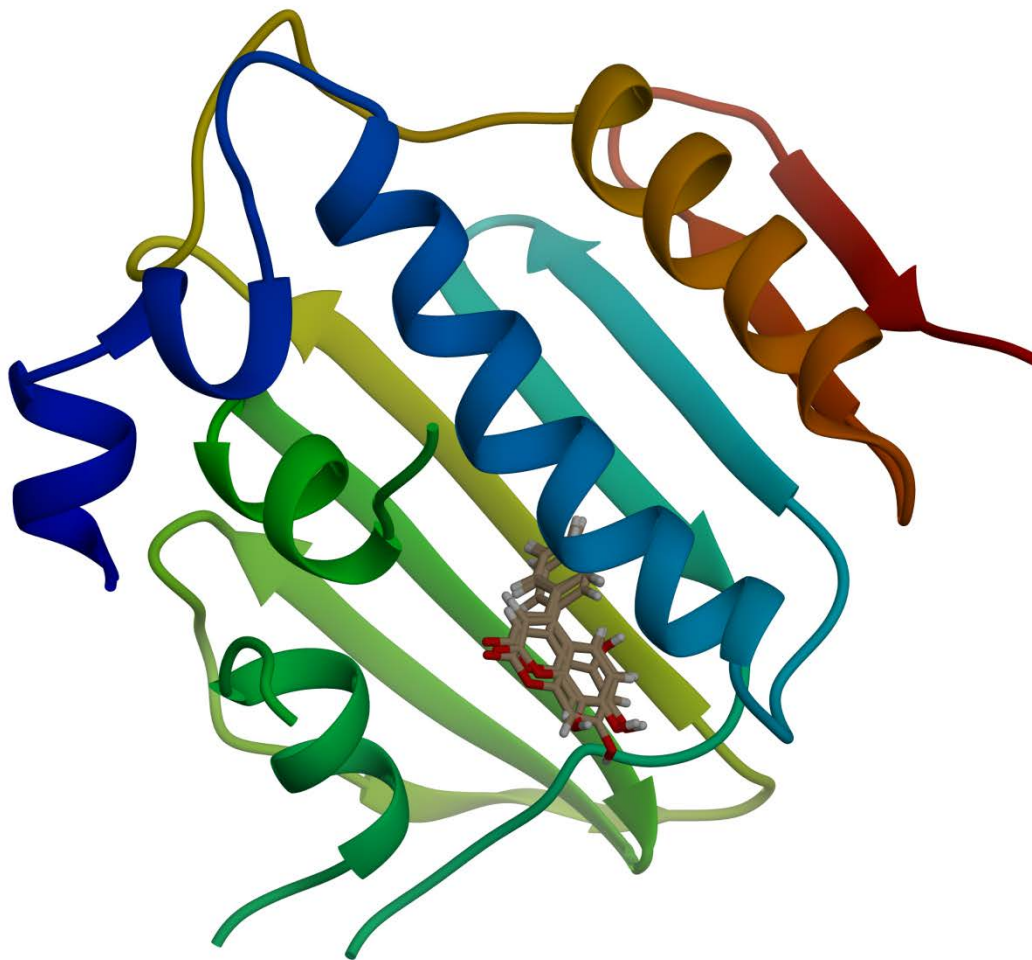


Slika 5.13. Dvodimenzionalni prikaz energetski najpovoljnijeg konformera 5,7C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze.



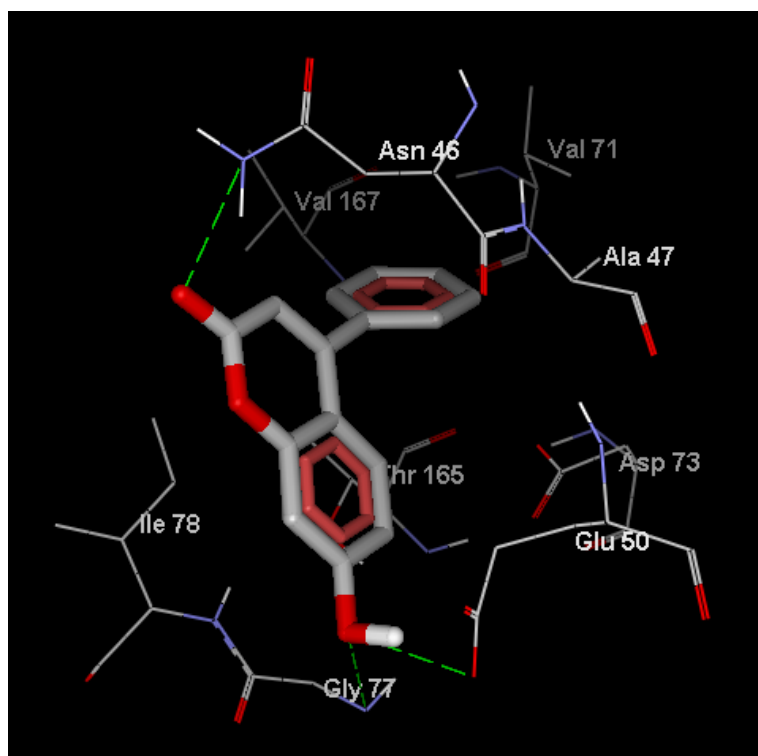
Slika 5.14. Dvodimenzionalni prikaz energetski najpovoljnijeg konformera 7,8C unutar aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze.

Na slici 5.15. prikazana je struktura topoizomeraze II DNK Giraze β u čijem se aktivnom mestu nalaze ispitivani 4-fenil hidroksikumarini.

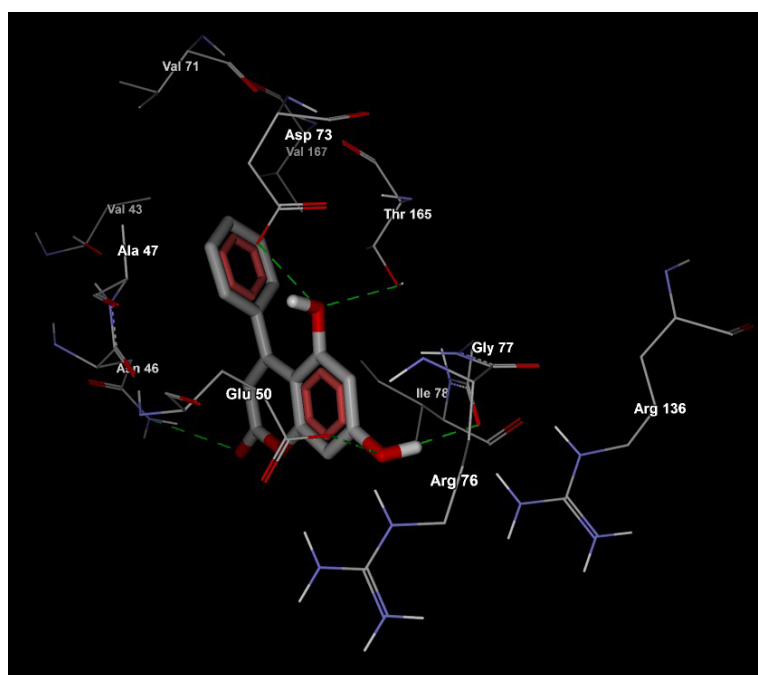


Slika 5.15. Struktura topoizomeraze II DNK Giraze β sa ispitivanim 4-fenil hidroksikumarinima u aktivnom mestu enzima.

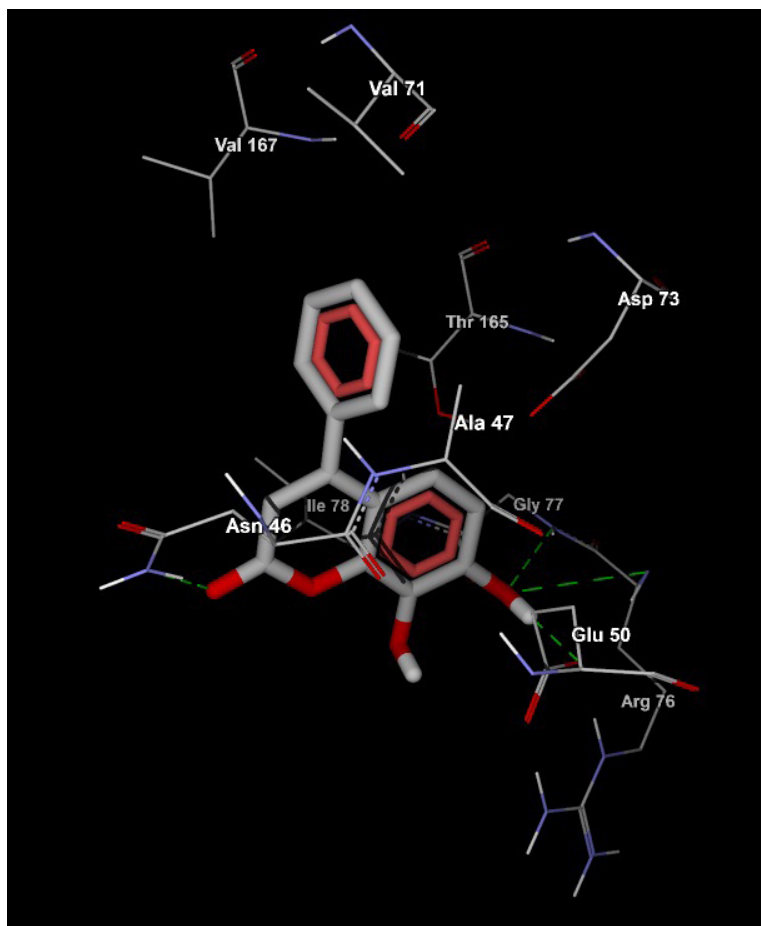
Na slikama 5.16., 5.17. i 5.18. su prikazane najpovoljnije orijentacije 7C, 5,7C i 7,8C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β .



Slika 5.16. Energetski najpovoljnija orijentacija 7C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β .

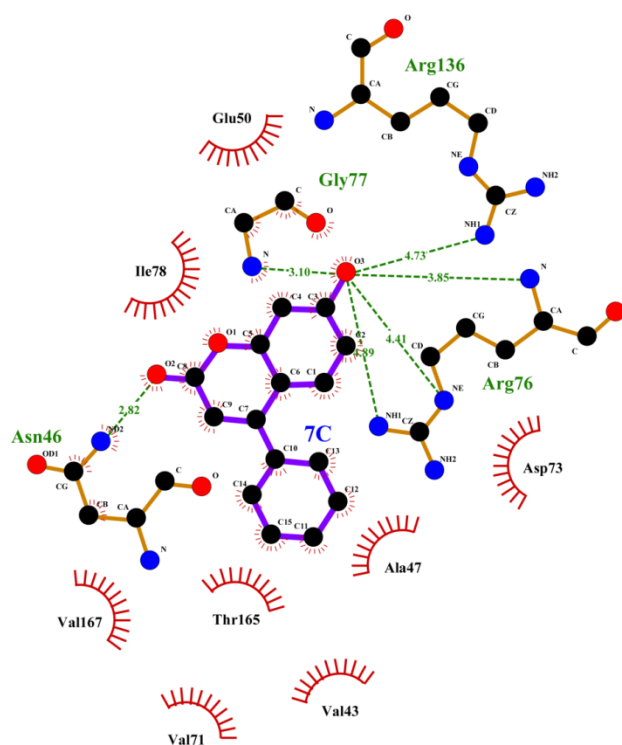


Slika 5.17. Energetski najpovoljnija orijentacija 5,7C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β .

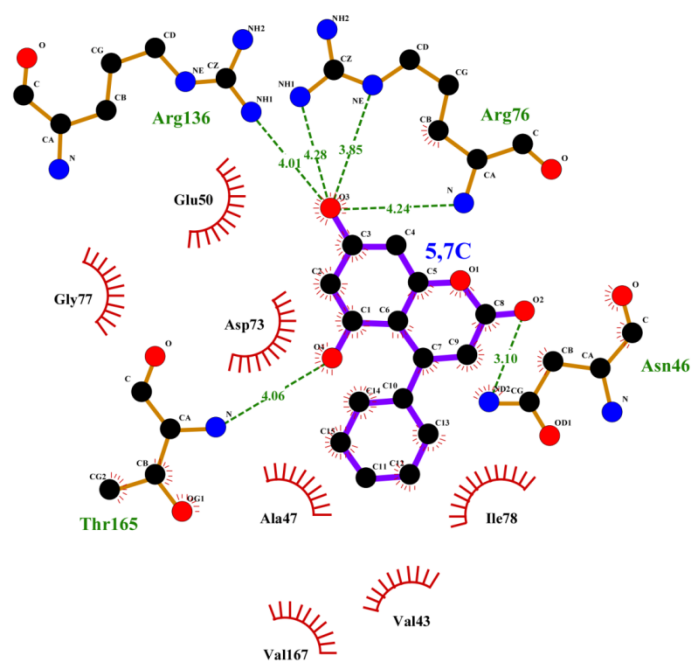


Slika 5.18. Energetski najpovoljnija orijentacija 7,8C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β .

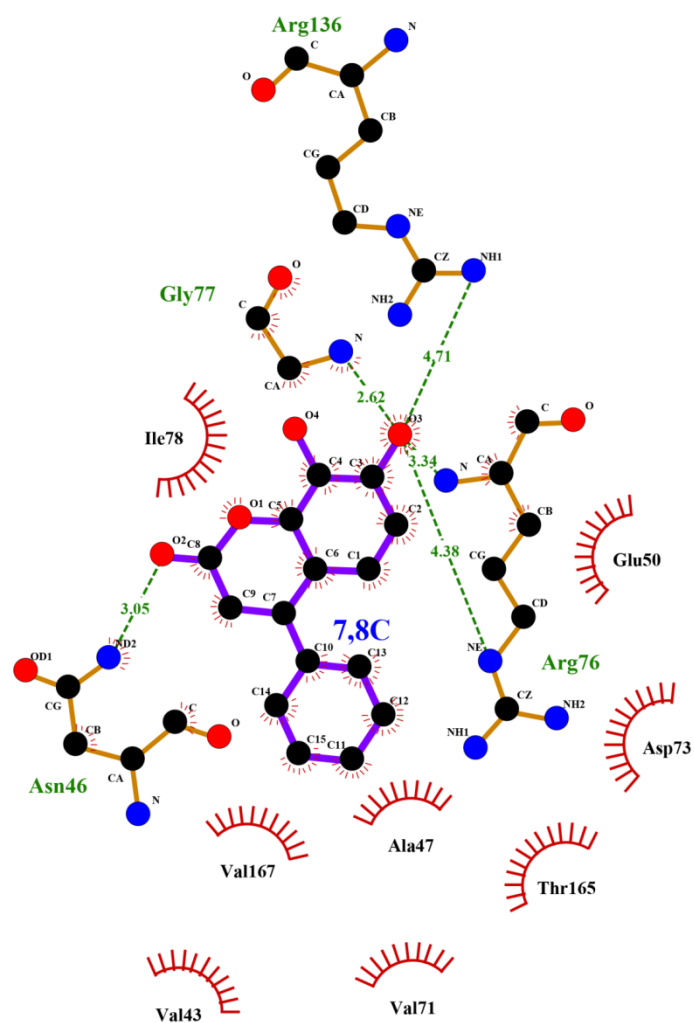
Na slikama 5.19., 5.20. i 5.21. su dati dvodimenzionalni prikazi energetski najpovoljnijih konformera 7C, 5,7C i 7,8C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β . Slike prikazuju i dužinu vodoničnih veza koje ispitivani kumarini formiraju sa aminokiselinama u aktivnom mestu enzima.



Slika 5.19. Dvodimenzionalni prikaz energetske najpovoljnijeg konformera 7C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β .



Slika 5.20. Dvodimenzionalni prikaz energetske najpovoljnijeg konformera 5,7C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β .



Slika 5.21. Dvodimenzionalni prikaz energetski najpovoljnijeg konformera 7,8C unutar aktivnog mesta topoizomeraze II DNK Giraze β .

Score vrednosti dobijene primenom *scoring* funkcija su prikazane u tabeli 5.8. za tirozil tRNK sintetazu i u tabeli 5.9. za topoizomerazu II DNKGirazu β .

Tabela 5.8. Score vrednosti (kcal/mol) vezivanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina za aktivno mesto tirozil tRNK sintetaze.

Ligand	MolDock Score	Rerank Score	Protein	Hbond	Docking Score
5,7C	-121,949	-102,51	-133,88	-11,4546	-120,408
7,8C	-121,19	-103,402	-135,554	-12,8033	-130,125
7C	-121,285	-100,133	-131,343	-9,59212	-121,285

Tabela 5.9. *Score* vrednosti (kcal/mol) vezivanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina za aktivno mesto topoizomerase II DNKGiraze β .

Ligand	MolDock Score	Rerank Score	Protein	Hbond	Docking Score
5,7C	-105,492	-87,1353	-118,839	-11,1954	-107,959
7,8C	-112,796	-87,4502	-117,122	-5,32726	-116,793
7C	-100,924	-84,3647	-113,173	-3,7492	-100,664

5.5. QSAR metoda

Hemijske strukture 26 ispitivanih kumarinska molekula (inhibitori HIV-1 integraze) predstavljene korišćenjem SMILES notacije, izračunate vrednosti za DCW, eksperimentalne vrednosti za enzimsku aktivnost - pIC50 (expr) [Zhao et al., 1997], izračunate vrednosti za enzimsku aktivnost - pIC50 (calc) korišćenjem CORAL softvera i vrednost razlike između expr i calc (diff) su prikazane u tabeli 5.10.

Tabela 5.10. Hemijske strukture 26 ispitivaih kumarinska molekula (inhibitori HIV-1 integraze) predstavljene korišćenjem SMILES notacije, izračunate vrednosti za DCW, eksperimentalne vrednosti za enzimsku aktivnost - pIC₅₀ (expr), izračunate vrednosti za enzimsku aktivnost - pIC₅₀ (calc) korišćenjem CORAL softvera i vrednost razlike između expr i calc.

	SMILES notacija	Set	3' Processing aktivnost				Integration aktivnost			
			DCW	Expr	Calc	Diff	DCW	Expr	Calc	Diff
1	<chem>OC=1c5ccccc5OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c4ccccc4</chem>	Train	133,901	4,367	4,362	0,005	130,045	4,411	4,423	-0,012
2	<chem>Oc1ccc(cc1)C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)C4=C(O)c5ccccc5OC4=O</chem>	Test	112,152	3,893	3,956	-0,063	117,992	4,131	4,191	-0,06
3	<chem>Oc1ccc(cc1OC)C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)C4=C(O)c5ccccc5OC4=O</chem>	Train	101,154	3,752	3,75	0,002	114,24	4,119	4,119	0
4	<chem>CN(C)c1ccc(cc1)C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)C4=C(O)c5ccccc5OC4=O</chem>	Train	116,902	4,055	4,044	0,011	123,728	4,301	4,301	0
5	<chem>[O-][N+](=O)c1ccc(cc1)C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)C4=C(O)c5ccccc5OC4=O</chem>	Train	130,123	4,301	4,292	0,009	156,225	4,921	4,925	-0,004
6	<chem>O=C(O)c1ccc(cc1)C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)C4=C(O)c5ccccc5OC4=O</chem>	Train	131,395	4,319	4,315	0,004	124,463	4,31	4,315	-0,005
7	<chem>OC=4c5ccccc5OC(=O)C=4C(C=1C(=O)Oc2ccccc2C=1O)c3cccs3</chem>	Train	114,362	4	3,997	0,003	99,275	3,83	3,832	-0,002
8	<chem>OC=1c5ccccc5OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c4ccco4</chem>	Test	129,901	4,468	4,288	0,18	126,551	3,951	4,355	-0,404
9	<chem>OC=1c6ccccc6OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c4cc5ccccc5nc4</chem>	Train	142,612	4,538	4,525	0,013	152,307	4,854	4,85	0,004
10	<chem>OC=1c6ccccc6OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c4cc5ccccc5cc4</chem>	Train	155,618	4,721	4,768	-0,047	163,071	5,046	5,057	-0,011
11	<chem>OC=1c6ccccc6OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c4ccc(cc4)c5ccccc5</chem>	Train	160,847	4,854	4,866	-0,012	154,801	4,886	4,898	-0,012
12	<chem>OC=1c7ccccc7OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c4ccc5c6ccccc6Cc5c4</chem>	Train	167,13	5	4,984	0,016	165,807	5,108	5,109	-0,001
13	<chem>OC=1c6ccccc6OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c5ccc(/C=C/c4ccccc4)cc5</chem>	Train	180,856	5,26	5,24	0,02	182,81	5,432	5,436	-0,004
14	<chem>OC=1c6ccccc6OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c5ccc(OCc4ccccc4)cc5</chem>	Test	154,346	5,071	4,745	0,326	157,301	4,854	4,946	-0,092
15	<chem>OC=1c7ccccc7OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c6cc(OCc4ccccc4)cc(OCc5ccccc5)c6</chem>	Train	172,077	5,097	5,076	0,021	183,03	5,432	5,44	-0,008
16	<chem>OC=1c9ccccc9OC(=O)C=1C(C2=C(O)c3ccccc3OC2=O)c4ccc(cc4)C(C5=C(O)c6ccccc6OC5=O)C7=C(O)c8ccccc8OC7=O</chem>	Train	204,771	5,699	5,688	0,011	217,421	6,097	6,1	-0,003
17	<chem>Oc3ccc4C(O)=C(CC1=C(O)c2ccc(O)cc2OC1=O)C(=O)Oc4c3</chem>	Train	131,927	4,334	4,325	0,009	126,441	4,348	4,353	-0,005
18	<chem>Oc1ccc2C(O)=C(C(=O)Oc2c1)C(C3=C(O)c4ccc(O)cc4OC3=O)c5ccccc5</chem>	Train	150,123	4,764	4,666	0,098	141,188	4,654	4,637	0,017
19	<chem>Oc1ccc2C(O)=C(C(=O)Oc2c1)C(C3=C(O)c4ccc(O)cc4OC3=O)c5ccc(cc5)C(C6=C(O)c7ccc(O)cc7OC6=O)C8=C(O)c9ccc(O)cc9OC8=O</chem>	Train	244,311	6,432	6,427	0,005	237,543	6,481	6,487	-0,006
20	<chem>Oc1ccc2C(O)=C(C(=O)Oc2c1)C(C3=C(O)c4ccc(O)cc4OC3=O)c5ccccc5</chem>	Train	122,112	4,076	4,142	-0,066	124,932	4,31	4,324	-0,014
21	<chem>Oc1ccc2C(O)=C(C(=O)Oc2c1)C(C3=C(O)c4ccc(O)cc4OC3=O)c5ccccc5</chem>	Train	123,609	4,208	4,17	0,038	139,441	4,602	4,603	-0,001
22	<chem>Oc1ccc2C(O)=C(C(=O)Oc2c1)C(C3=C(O)c4ccc(O)cc4OC3=O)c5cc6ccccc6cc5</chem>	Test	161,091	5,377	4,871	0,506	171,71	5,45	5,223	0,227
23	<chem>Oc1ccc2C(O)=C(C(=O)Oc2c1)C(C3=C(O)c4ccc(O)cc4OC3=O)c6ccc(/C=C/c5ccccc5)cc6</chem>	Train	177,588	5,155	5,179	-0,024	199,447	5,745	5,755	-0,01
24	<chem>Oc5ccc6C(O)=C(C2c4ccccc4OC=1c3ccc(O)cc3OC(=O)C=12)C(=O)Oc6c5</chem>	Train	109,849	3,917	3,913	0,004	103,785	3,914	3,918	-0,004
25	<chem>Oc6ccc7C(O)=C(C2C=5C(=O)Oc1ccccc1C=5OC4=C2C(=O)Oc3cc(O)ccc34)C(=O)Oc7c6</chem>	Test	124,82	4,447	4,193	0,254	140,916	4,648	4,631	0,017
26	<chem>Oc1ccc2c(c1)OC(=O)C=C2O</chem>	Train	88,717	3,523	3,517	0,006	81,441	3,488	3,489	-0,001

Statistički parametri za procenu validnosti dobijenih QSAR modela prikazani su u tabeli 5.11.

Tabela 5.11. Statistički parametri za procenu validnosti dobijenih QSAR modela.

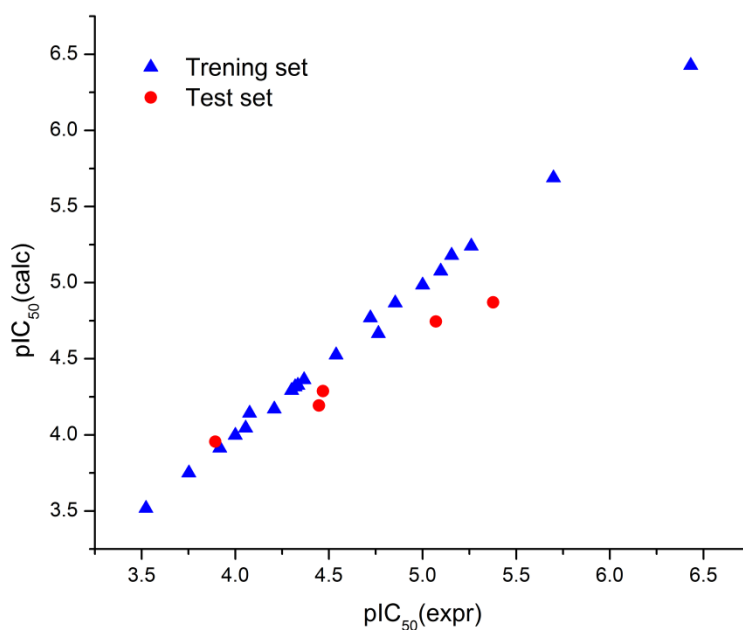
<i>3' Processing</i> aktivnost							
Trening set				Test set			
	R^2	Q^2	s	R^2	$r_{m(av)}^2$	Δr_m^2	s
1	0,9993	0,9992	0,02	0,9671	0,8083	0,0577	0,305
2	0,9977	0,9974	0,033	0,9368	0,6138	0,1677	0,265
3	0,998	0,9977	0,032	0,9788	0,6213	0,1467	0,341
Av	0,9983	0,9981	0,028	0,9609	0,6811	0,124	0,304
<i>Integration</i> aktivnost							
Trening set				Test set			
	R^2	Q^2	s	R^2	$r_{m(av)}^2$	Δr_m^2	s
1	0,9999	0,9998	0,01	0,9185	0,523	0,1825	0,248
2	0,9999	0,9998	0,005	0,9213	0,5678	0,2041	0,268
3	0,9999	0,9998	0,008	0,9186	0,5798	0,1965	0,239
Av	0,9999	0,9998	0,008	0,9195	0,5569	0,1945	0,252
Av je srednja vrednost tri nezavisna Monte Karlo ciklusa (1,2 i 3)							
R^2 je korelacioni koeficijent							
Q^2 je <i>cross-validacioni</i> koeficijent							
s je standardna greška							
$r_{m(av)}^2$ treba da bude > 0.5 [Roy&Roy, 2006]							
Δr_m^2 treba da bude > 0.5 [Roy&Roy, 2006]							

Dobijeni QSAR modeli za odgovarajući *endpointsu* prikazani u skladu sa jednačinom 4.2.

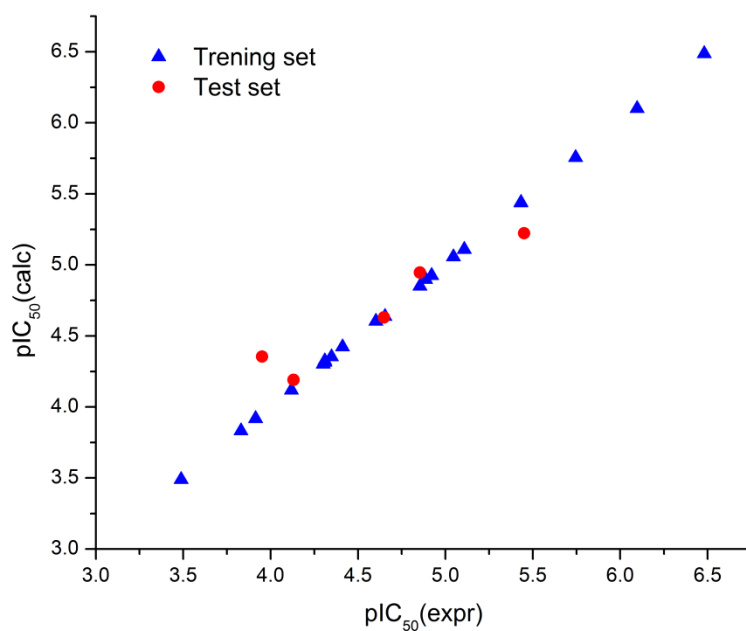
$$3' \text{ Processing: } pIC_{50} = 1,8584 (\pm 0,0036) + 0,0187 (\pm 0,0000215) \times DCW(0,3) \quad (5.1.)$$

$$Integration: pIC_{50} = 2,5636 (\pm 0,0004) + 0,0180 (\pm 0,0000034) \times DCW(0,3) \quad (5.2.)$$

Dobijeni QSAR modeli su prikazani grafički na slikama 5.22. za *3'Processing* aktivnost i 5.23. za *Integration* aktivnost.



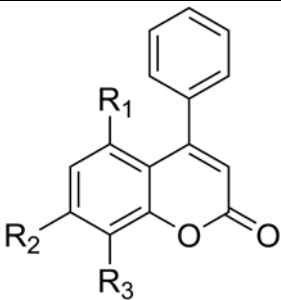
Slika 5.22. Grafički prikaz QSAR modela za *3' Processing* aktivnost.



Slika 5.23. Grafički prikaz QSAR modela za *Integration* aktivnost.

U tabeli 5.12. su prikazane izračunate pIC_{50} vrednosti za 7C, 5,7C i 7,8C za odgovarajuće aktivnosti enzima (*3' Processing* i *Integration*) korišćenjem jednačina 5.1. i 5.2.

Tabela 5.12. Molekulska struktura ispitivanih kumarinskih molekula sa njihovim izračunatim pIC_{50} za odgovarajuće aktivnosti enzima (*3' Processing* i *Integration*).

					
Molekul	R1	R2	R3	pIC_{50} (<i>3' Processing</i>)	pIC_{50} (<i>Integration</i>)
7C	H	OH	H	3,329	3,640
5,7C	OH	OH	H	3,138	3,451
7,8C	H	OH	OH	3,259	3,402

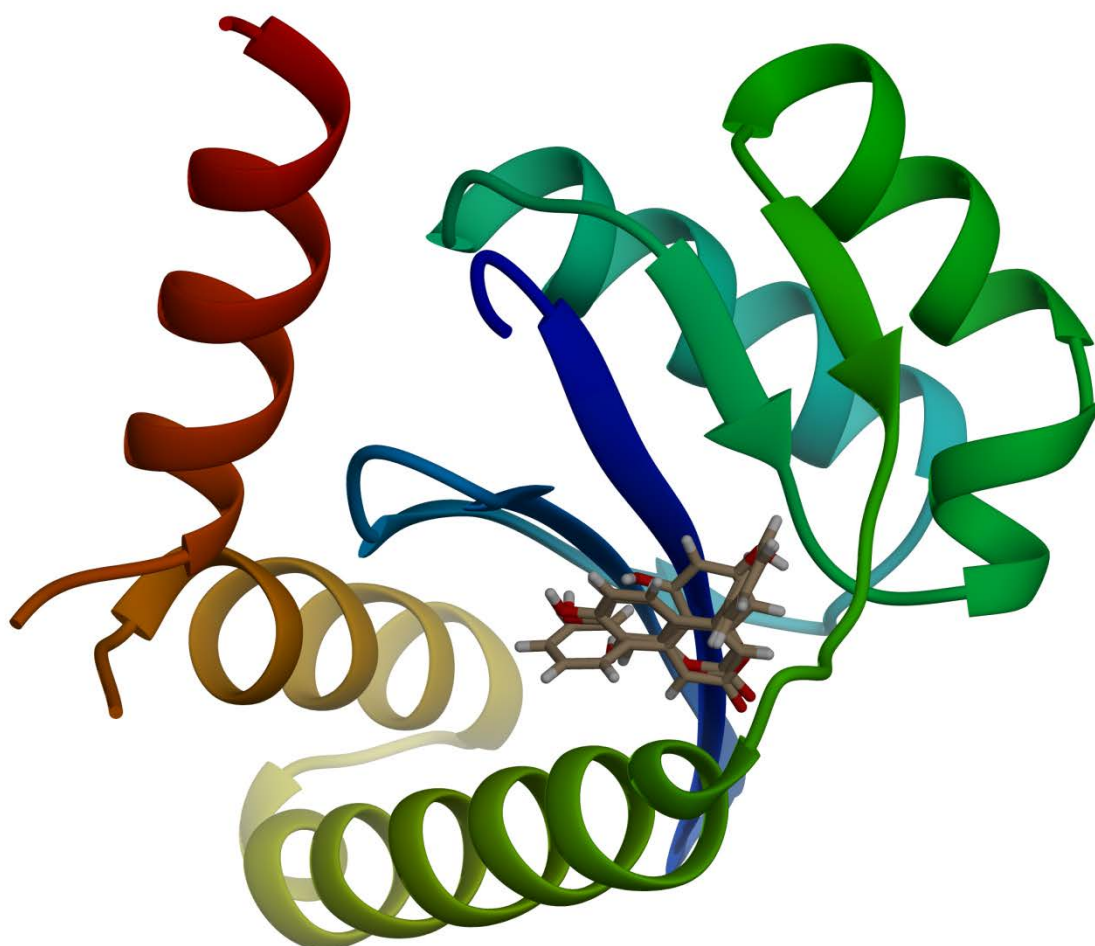
Identifikovani SMILES fragmenati sa povoljnim/nepovoljnim uticajem na pIC_{50} su prikazani u tabeli 5.13.

Tabela 5.13. Lista SMILES fragmenata sa brojčanim vrednostima (SA_k) iz tri nezavisna Monte Karlo ciklusa sa povoljnim/nepovoljnim uticajem na pIC_{50} .

	<i>3' Processing</i> aktivnost				<i>Integration</i> aktivnost			
	SA_k	Ciklus 1	Ciklus 2	Ciklus 3	SA_k	Ciklus 1	Ciklus 2	Ciklus 3
Smanjenje	n.....	-3,997	-3,248	-5,004	n...c...c...	-3,999	-3,002	-2,497
	s...c.....	-1,002	-1,502	-4,005	n.....	-2,998	-2,248	-2,247
	N...+.....	-0,745	-1,252	-0,004	O...C...=...	-1,253	-0,996	-1,245
	C...(...C...	-0,502	-1,249	-0,999	O...=...(...	-1	-0,998	-0,998
	N...(...C...	-0,496	-1,246	-2,251	O...=.....	-0,496	-0,997	-1,005
Povećanje	O...(...C...	0,252	1,003	1,25	c...O.....	0,245	0,753	1,001
	c.....	0,504	0,746	0,998	O...C.....	0,502	0,996	0,999
	o.....	0,997	0,996	0,997	C.../.....	0,997	0,504	0,004
	C...=.....	4,254	4,5	2,748	c...C.....	1,001	1,501	1
	C...C.....	4,5	3,496	3,497	C...(...	1,505	0,747	0,998

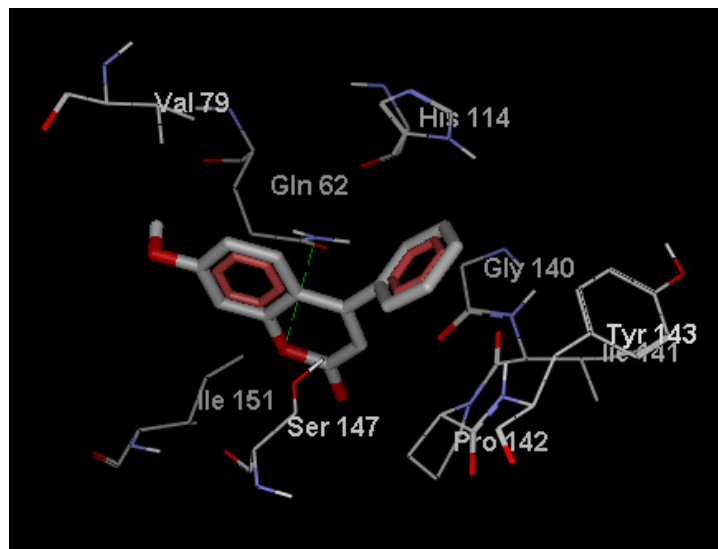
5.6. Molekulski doking za anti HIV delovanje

Na slici 5.24. prikazana je struktura HIV-1 integraze u čijem se aktivnom mestu nalaze ispitivani 4-fenil hidroksikumarini.

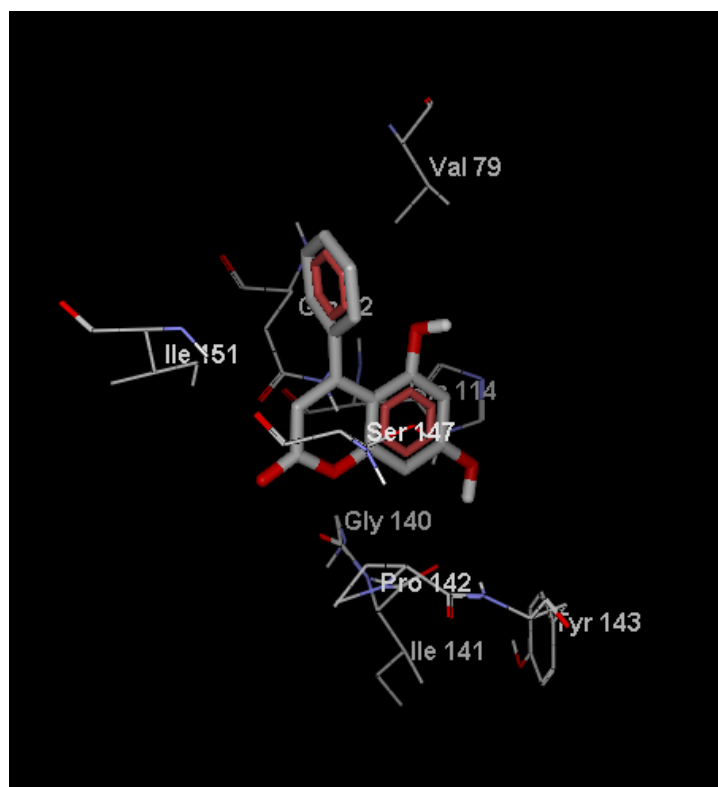


Slika 5.24. Struktura HIV-1 integraze sa ispitivanim 4-fenil hidroksikumarinima u aktivnom mestu enzima.

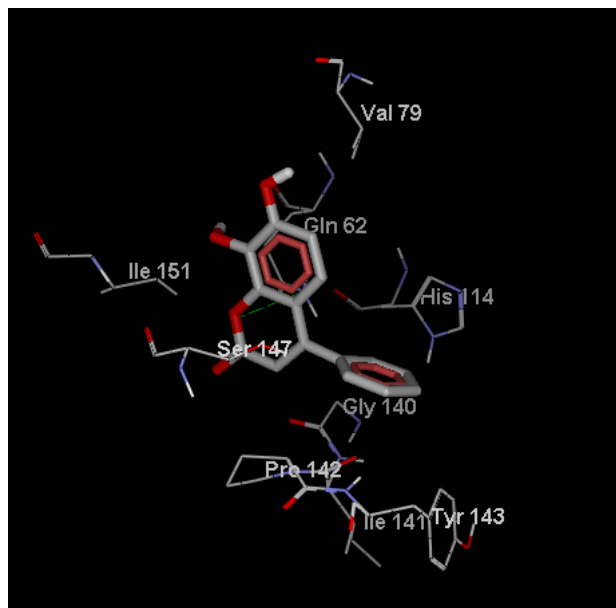
Na slikama 5.25., 5.26. i 5.27. su prikazane najpovoljnije orijentacije 7C, 5,7C i 7,8C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze.



Slika 5.25. Energetski najpovoljnija orijentacija 7C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze.

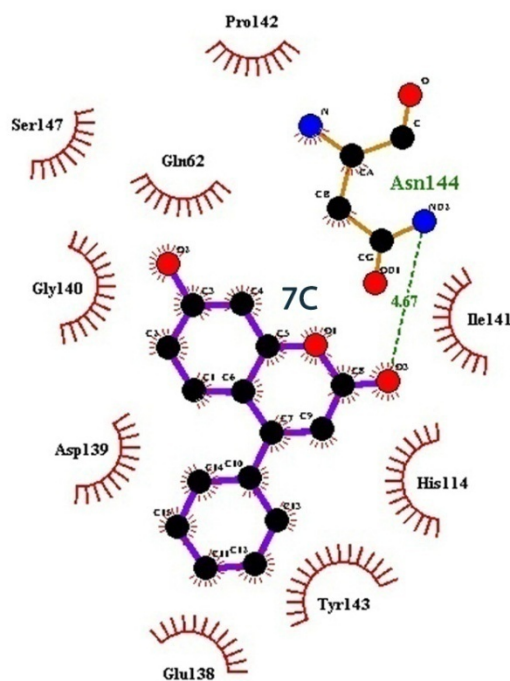


Slika 5.26. Energetski najpovoljnija orijentacija 5,7C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze.

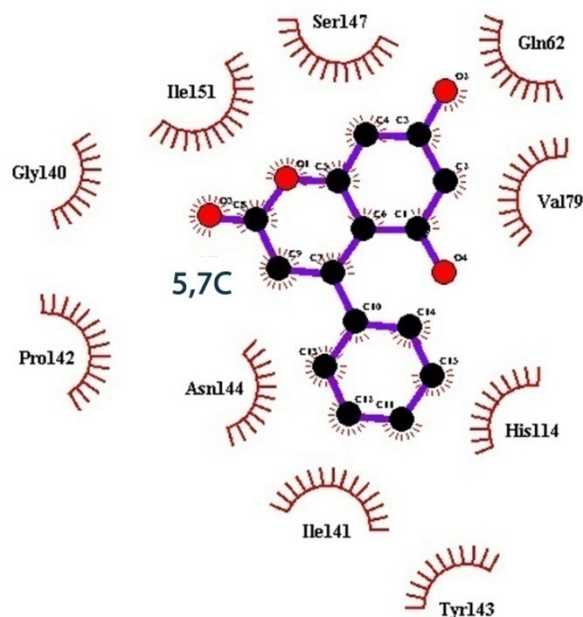


Slika 5.27. Energetski najpovoljnija orijentacija 7,8C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze.

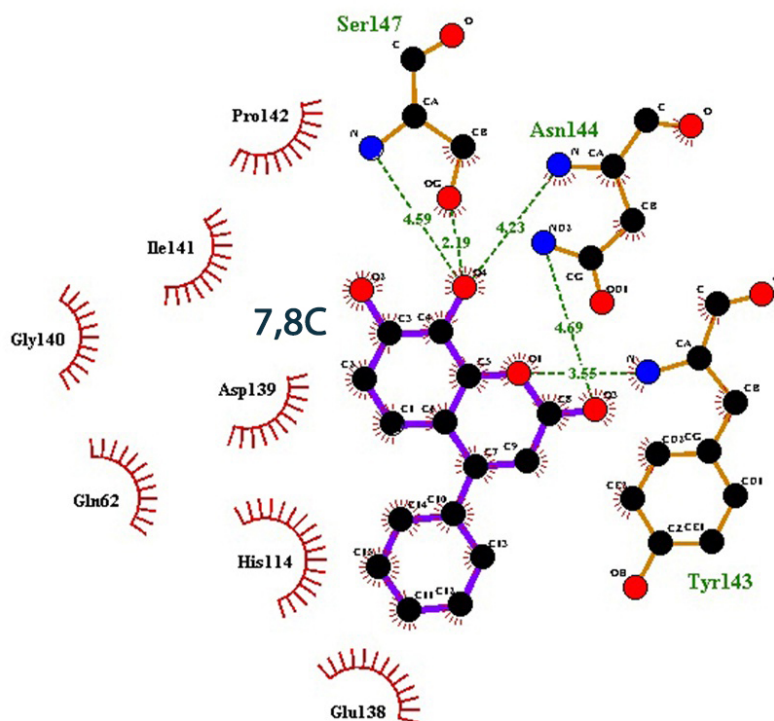
Na slikama 5.28., 5.29. i 5.30. su dati dvodimenzionalni prikazi energetski najpovoljnijih konformera 7C, 5,7C i 7,8C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze. Slike prikazuju i dužinu vodoničnih veza koje odabrani kumarini formiraju sa aminokiselinama u aktivnom mestu enzima.



Slika 5.28. Dvodimenzionalni prikaz energetski najpovoljnijeg konformera 7C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze.



Slika 5.29. Dvodimenzionalni prikaz energetske najpovoljnijeg konformera 5,7C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze.



Slika 5.30. Dvodimenzionalni prikaz energetske najpovoljnijeg konformera 7,8C unutar aktivnog mesta HIV-1 integraze.

Score vrednosti dobijene primenom *scoring* funkcija za HIV-1 integrazu su prikazane u tabeli 5.14.

Tabela 5.14. Score vrednosti (kcal/mol) vezivanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina za aktivno mesto HIV-1 integraze.

Ligand	MolDock Score	Rerank Score	Protein	Hbond	Docking Score
7,8C	-90,2775	-78,7822	-103,958	-1,30912	-99,4148
7C	-92,4303	-77,6155	-102,058	-1,26927	-90,3321
5,7C	-85,338	-70,7614	-96,5843	-0,06356	-83,5204

5.7. Pravila Lipinskog kod ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina

U tabeli 5.15. su prikazane fizičko-hemijske i molekulske karakteristike ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina izračunate primenom Molinspiration programa (Molinspiration Cheminformatics 2013). Rezultati pokazuju da se svi ispitivani kumarini povinuju pravilima Lipinskog.

Tabela 5.15. Izračunate fizičko-hemijske i molekulske karakteristike odabranih 4-fenil hidroksikumarina koje se koriste za procenu *druglikeness*.

	LogP ^a	TPSA ^b	N _{atoma} ^c	MW ^d	N _{ON} ^e	N _{OHNH} ^f	N _{viol.} ^g	N _{rotb.} ^h	Vol ⁱ
7C	3.234	50.439	18.0	238.242	3	1	0	1	208.013
5,7C	2.943	70.667	19.0	254.241	4	2	0	1	216.031
7,8C	2.974	70.667	19.0	254.241	4	2	0	1	216.031

^aLogaritamska vrednost particionog koeficijenta za sistem oktanol/voda

^bPolarna površina

^cBroj nevodonikovih atoma

^dMolekulska masa

^eBroj akceptora vodoničnih veza (O i N atomi)

^fBroj donora vodoničnih veza (OH i NH grupe)

^g Broj narušenih pravila Lipinskog

^hBroj rotacionih veza

ⁱMolekulska zapremina

6. Diskusija

6.1. Antioksidativna aktivnost ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina

Većina radova i studija odnosa strukture i aktivnosti ukazuje na to da broj i položaj hidroksilnih grupa na osnovnoj kumarinskoj strukturi utiču na antioksidativnu aktivnost kumarina zbog mogućnosti hidroksilnih grupa da učestvuju u slobodno-radikalnim reakcijama. Za antioksidativni efekat hidroksikumarina odgovorna je hidroksilna grupa zbog sposobnosti da deluje kao donor $H^\bullet$ radikala i mogućnosti dalje delokalizacije elektrona unutar molekula [Kostova et al., 2011].

Od 4-fenil hidroksikumarina ispitivanih u ovom radu jedino je 7,8C pokazao efikasnu sposobnost hvatanja radikala (određenu kao EC_{50}) primenom DPPH $^\bullet$ i ABTS $^{++}$ metoda. Ovo je u skladu sa rezultatima dosadašnjih ispitivanja derivata dihidroksikumarina koja su potvrdila da je *orto* položaj hidroksilnih grupa odgovoran za izraženu antioksidativnu aktivnost, jer je *orto* dihidroksi raspored u stanju da formira rezonantno stabilan radikal i da nagradi intramolekulske vodonične veze [Barzegar et al., 2011]. Dosadašnja *in vitro* ispitivanja kumarinskih derivata su pokazala da eskuletin (6,7-dihidroksikumarin) pokazuje bolju sposobnost hvatanja (neutralisanja) slobodnih radikala u odnosu na kumarin i monohidroksikumarine [Lin et al., 2008].

Niža vrednost za EC_{50} ukazuje na bolju sposobnost hvatanja DPPH $^\bullet$ i ABTS $^{++}$ radikala i bolju antioksidativnu aktivnost. 7,8C je pokazao statistički značajno veću antioksidativnu aktivnost ($p < 0,01$) u poređenju sa standardnim antioksidansima i u DPPH $^\bullet$ i u ABTS $^{++}$ metodi. Sposobnost hvatanja radikala 7,8C i standardnih antioksidanasa se može prikazati rastućim nizom:

1. BHA < BHT < Troloks < α -tokoferol < 7,8C određen primenom DPPH $^\bullet$ metode i
2. BHT < α -tokoferol < Troloks < BHA < 7,8C određen primenom ABTS $^{++}$ metode.

Inhibicija lipidne peroksidacije je takođe jedan od parametara za definisanje antioksidativne aktivnosti molekula. Fero tiocijanat metoda meri količinu nagrađenog peroksida u inicijalnoj fazi oksidacije. Od jedinjenja ispitivanih u ovom radu 7,8C je pokazao najveći procenat inhibicije lipidne peroksidacije sličan BHT. 5,7C je pokazao manju inhibiciju od 7,8C, ali

veću u odnosu na BHA, dok je 7C, iako je pokazao najmanji stepen inhibicije od ispitivanih kumarina, pokazao veću aktivnost nego α -tokoferol i troloks. Stepennih inhibicije lipidne peroksidacije za ispitivana jedinjenja se može predstaviti rastućim nizom:

Troloks < α -tokoferol < 7C < BHA < 5,7C < BHT $\approx$ 7,8C

Od 4-fenil hidroksikumarina ispitivanih u ovom radu 7C nije pokazao redukcionu moć određivanu FRAP i CUPRAC metodama što ukazuje da broj hidroksilnih grupa značajno utiče na ovu aktivnost. Redukciona moć 5,7C, 7,8C i standardnih antioksidanasa se ravnomerno povećavala sa povećanjem koncentracije. Rezultati dobijeni primenom FRAP i CUPRAC metoda su pokazali da je povećanje apsorbancije u linearnoj zavisnosti od koncentracije (bez odsečka na y osi). Izračunata vrednost za nagib prave (iz jednačine prave, $y=kx$, dobijene primenom metode najmanjih kvadrata) može se iskoristiti za međusobno poređenje redukcionne moći ispitivanih jedinjenja. Korelacioni koeficijent za sve ispitivane molekule dobijen linearnom regresijom ima visoke vrednosti. Veća vrednost za nagib prave ukazuje na jaču redukcionu moć i bolju antioksidativnu aktivnost. Rezultati za 7,8C dobijeni primenom FRAP i CUPRAC metoda su pokazali da navedeni kumarin ima statistički značajno ($p < 0,01$) bolju redukcionu sposobnost u odnosu na standardne antioksidanse. 5,7C ima sličnu redukcionu moć kao standardni antioksidansi. Redukciona moć 7,8C, 5,7C i standardnih antioksidanasa se može prikazati rastućim nizom:

1. 5,7C < α -tokoferol < Troloks < BHA < BHT < 7,8C za FRAP metodu i

2. Troloks < α -tokoferol < BHT $\approx$ BHA < 5,7C < 7,8C za CUPRAC metodu.

Na osnovu rezultata dobijenih primenom različitih metoda za ispitivanje antioksidativne aktivnosti utvrđeno je da 7,8C pokazuje izraženiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na 7C i 5,7C, odnosno pokazano je da *orto* položaj hidroksilnih grupa kod 4-fenil hidroksikumarina značajno doprinosi antioksidativnoj aktivnosti. Dobijeni rezultati u ovom istraživanju slažu se sa rezultatima prethodnih ispitivanja uticaja broja i položaja hidroksilnih grupa na antioksidativnu aktivnost kod supstituisanih kumarina [Barzegar et al., 2011; Kostova et al., 2011; Lin et al., 2008].

Konformacija fenolnih jedinjenja takođe ima vrlo značajnu ulogu u ispoljavanju antioksidativne aktivnosti jer je farmakohemijsko ponašanje molekula direktna posledica elektronskih efekata svih funkcionalnih grupa i celokupne molekulske geometrije.

Fenolna jedinjenja imaju mogućnost građenja intramolekulskih vodoničnih veza koje stabilizuju sam fenolni molekul i njegov slobodni radikal [Frontana & González, 2005]. U strukturi najstabilnijeg 7,8C konformera identifikovana je jedna intramolekulska vodonična veza.

Energija i izgled graničnih molekulskih orbitala (HOMO i LUMO) su značajni deskriptori za uspostavljanje odnosa stukture i antioksidative aktivnosti jer učestvuju u slobodno-radikalnim reakcijama kao glavne orbitale. Molekul koji ima niske vrednosti za HOMO energiju pokazuje osobine slabog donora elektrona [Dhaouadi et al., 2009; Queiroz et al., 2009]. Vrednosti HOMO energija odabranih 4-fenil hidroksikumarina ukazuju da su sposobni da učestvuju u reakcijama hvatanja slobodnih radikala. Kod svih ispitivanih kumarina i HOMO i LUMO orbitale imaju izgled π orbitala i delokalizovane su preko celog molekula. Energetska razlika između energija HOMO i LUMO orbitala određuje hemijsku reaktivnost. Dobijene vrednosti HOMO i LUMO energija i njihova energetska razlika za ispitivane 4-fenil hidroksikumarine pokazuju da 7,8C ima najbolju antioksidativnu aktivnost jer su kod njega navedene energetske vrednosti najpovoljnije u odnosu na definisane kriterijume. Na osnovu dalje analize energetske vrednosti HOMO i LUMO orbitala može se očekivati da 5,7C ima bolju antioksidativnu aktivnost od 7C.

Stabilizaciona energija (ΔE_{iso}) se takođe može upotrebiti kao jednostavan parametar za procenu sposobnosti molekula da hvata slobodne radikale. Dobijene vrednosti ΔE_{iso} za ispitivane 4-fenil hidroksikumarine takođe ukazuju da 7,8C ima najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala.

Značajna kvantno-mehanička karakteristika slobodnih radikala je njihova ukupna spinska gustina (USG). USG karakteriše raspodelu spinske gustine nesparenog elektrona koja utiče na stabilnost radikala. Kod svih ispitivanih kumarina u neutralnoj radikalskoj formi USG je raspoređena preko celog molekula, pre svega preko osnovne kumarinske strukture, dok je USG u fenil grupi u položaju 4 mala. Kod katjon radikala USG je takođe uglavnom skoncentrisana na osnovnom kumarinskom delu molekula. Međutim, kod 7,8C katjon radikala fenil grupa u položaju 4 ne poseduje USG, što ukazuje da navedena fenil grupa nema efekta na antioksidativne aktivnosti koje uključuju formiranje radikal katjona. Što se tiče raspodele USG na hidroksilnim grupama, ona je više izražena na hidroksilnoj grupi u položaju 5 kod 5,7C i na hidroksilnoj grupi u položaju 8 kod 7,8C u odnosu na hidroksilnu

grupu u položaju 7. Ovakav raspored USG ukazuje da je za slobodno-radikalske reakcije od svih ispitivanih rasporeda najmanje favorizovan položaj 7.

Analiza kvantno-mehaničkih deskriptora ukazuje da od ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje 7,8C, što je u skladu sa dobijenim eksperimentalnim podacima.

Reaktivno mesto za elektrofilni i nukleofilni napad na ispitivane 4-fenil hidroksikumarine može se odrediti pomoću MEP površina koje su generisane preko geometrijske strukture energetski najstabilnijih 7C, 5,7C i 7,8C konformera. MEP površine ukazuju da je negativna oblast uglavnom lokalizovana na atomu kiseonika iz laktonske grupe. Maksimum pozitivne oblasti je lokalizovan na vodonikovim atomima hidroksilnih grupa. Iz dobijenih rezultata se može predvideti da laktonski deo molekula predstavlja najreaktivnije mesto za elektrofilni napad, a da hidroksilne grupe predstavljaju mesto za nukleofilni napad.

BDE je fizičko-hemijski parametar koji determiniše HAT mehanizam antioksidativne aktivnosti. Izračunate vrednosti BDE za ispitivane 4-fenil hidroksikumarine pokazuju da je kod 5,7C favorizovana disocijacija hidroksilne grupe u položaju 5 u odnosu na položaj 7, a kod 7,8C u položaju 8 u odnosu na položaj 7.

IP je fizičko-hemijski parametar koji determiniše ET-PT mehanizam antioksidativne aktivnosti. On opisuje proces doniranja elektrona od strane antioksidansa. Molekuli sa malim IP vrednostima su podložni jonizaciji i imaju izraženu antioksidativnu aktivnost. Male IP vrednosti molekula su dalja indikacija da se antioksidativna reakcija odigrava preko ET-PT mehanizma. Za ispitivane 4-fenil hidroksikumarine dobijene su relativno visoke IP vrednosti što ukazuje da je ET-PT mehanizam malo verovatan. Drugi fizičko-hemijski parametar koji karakteriše ET-PT je PDE. Dobijene visoke PDE vrednosti u vakuumu za odabrane 4-fenil hidroksikumarine dalje potvrđuju da se antioksidativna aktivnost ne odigrava preko ET-PT mehanizma u vakuumu. Međutim, dobijene niske vrednosti za PDE u vodi ukazuju da se antioksidativna aktivnost preko ovog mehanizma može odigravati u polarnim rastvaračima.

PA i ETE su fizičko-hemijski parametri koji determinišu SPLET mehanizam. Za sve ispitivane kumarine izračunate su visoke PA vrednosti u vakuumu i niske u polarnim rastvaračima, a isto važi i za izračunate ETE parametre.

Za procenu mehanizma antioksidativnog delovanja preko vrednosti fizičko-hemijskih parametara primenjuju se Wright-ova pravila [Wright et al., 2001]. Po ovim pravilima ako je $IP \geq -151 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-36 \text{ kcal mol}^{-1}$) i BDE oko -188 kJ mol^{-1} ($-45 \text{ kcal mol}^{-1}$) dominantan mehanizam je HAT, a ako je $IP < -188 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-45 \text{ kcal mol}^{-1}$) dominantan mehanizam je ET-PT.

Izračunate PA vrednosti za ispitivane 4-fenil hidroksikumarine u gasnoj fazi su znatno više u odnosu na izračunate vrednosti BDE hidroksilne grupe i IP vrednosti. Izračunate PA vrednosti u vodi i etanolu su znatno niže u odnosu na PA vrednosti u gasnoj fazi, pre svega zbog visoke vrednosti entalpije solvatacije protona [Bartmess, 1994]. Razlika PA vrednosti u gasnoj fazi i vodi i gasnoj fazi i etanolu je veća od $150 \text{ kcal mol}^{-1}$ što ukazuje da rastvarač favorizuje proces deprotonizacije. Pored toga, PA vrednosti u vodi su niže u odnosu na odgovarajuće BDE i IP vrednosti. Izračunate ETE vrednosti anjonskih formi ispitivanih kumarina su znatno niže u odnosu na IP vrednosti odgovarajućih neutralnih formi, što ukazuje da je kod anjonskog oblika favorizovan mehanizam transfera jednog elektrona kao i kod većine fenolnih jedinjenja [Li et al., 2013; Perez-Gonzalez et al., 2011; Xue et al., 2013]. Takođe, ETE vrednost svih ispitivanih kumarina u vodi je viša u odnosu na ETE vrednost u gasnoj fazi. Kod svih ispitivanih kumarina u vodenoj fazi ETE vrednosti su više u odnosu na PA vrednosti, a u gasnoj fazi ETE vrednosti su niže u odnosu na PA vrednosti.

Analiza navedenih kompjuterski određenih parametara ukazuje da je HAT termodinamički dominantan mehanizam antioksidativnog delovanja u gasnoj fazi, dok je u drugim ispitivanim sistemima najverovatniji SPLET mehanizam. Dobijeni rezultati pokazuju da je kod 7,8C termodinamički favorizovan položaj 8 hidroksilne grupe u reakcijama koje uključuju BDE, PDE i ETE parametre i položaj 7 u reakcijama koje uključuju PA parametar. Za 5,7C u gasnoj fazi favorizovan je položaj 5 hidroksilne grupe za sve mehanizme. U drugim ispitivanim sistemima za reakcione mehanizme koji uključuju BDE, PDE i ETE parametre termodinamički je favorizovan položaj 5, a za mehanizme koji uključuju parametar PA položaj 7 [Veselinović et al., 2014].

6.2. Antibakterijska aktivnost ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina

Kumarini se smatraju potencijalnim antibakterijskim agensima jer pokazuju sposobnost da inhibiraju ATP-aznu aktivnost bakterijske DNK giraze [Damu et al., 2012; Zhang et al., 2012]. *In vitro* studije odnosa strukture i aktivnosti kumarina su pokazale da broj i položaj

hidroksilnih grupa na osnovnoj kumarinskoj strukturi utiču na antibakterijsku aktivnost. U odnosu na osnovni kumarin, prisustvo hidroksilne grupe u položaju 7 kod umbeliferona značajno smanjuje antibakterijsku aktivnost, dok pomeranje hidroksilne grupe iz položaja 7 u položaj 8 (kod 8-hidroksikumarina) ne dovodi do značajnih razlika u delovanju u poređenju sa osnovnim molekulom. Odnos antibakterijske aktivnosti kod disupstituisanih derivata koji sadrže dve hidroksilne grupe može se prikazati sledećim nizom:

7,8- dihidroksikumarin < 6,7-dihidroksikumarin (eskuletin) < 5,7- dihidroksikumarin [Kayser & Kolodziej, 1999].

Eskuletin i kumarin pokazuju sličnu aktivnost protiv Gram (+) bakterija. Razlog njihove antibakterijske aktivnosti je verovatno interakcija sa peptidoglikanom prisutnim u ćelijskom zidu [de Souza et al., 2005].

Ispitivanja su pokazala da uvođenje fenil grupe u položaj 4 dovodi do poboljšanja antibakterijske aktivnosti što je potvrdilo činjenicu da benzen kao donor π elektrona daje veći doprinos antibakterijskoj aktivnosti u poređenju sa alifatičnim supstituentima [Chin et al., 2011].

Na osnovu dobijenih vrednosti za MIC utvrđeno je da ispitivani kumarini pokazuju bolji inhibicioni efekat na Gram (+) bakterije (opseg MIC vrednosti je iznosio 0,01-2,50 mg/mL) u odnosu na Gram (-) (opseg MIC vrednosti je iznosio 0,16-10,0 mg/mL). 5,7C i 7,8C su imali najslabiji efekat, dok 7C i pri najvećoj testiranoj koncentraciji od 10mg/mL, nije delovao inhibiciono protiv *P. aeruginosa* i *P. mirabilis*. Svi ispitivani kumarini su najjače inhibirali rast sojeva *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* i *M. luteus*. Najslabiju aktivnost od svih ispitivanih kumarina je imao 7C. 5,7C je pokazao bolji inhibicioni efekat na većinu testiranih sojeva u odnosu na 7,8C, što se može prikazati sledećim nizom:

7C < 7,8C < 5,7 C

Dobijeni rezultati u ovom istraživanju u saglasnosti su sa rezultatima prethodnih ispitivanja uticaja broja i položaja hidroksilnih grupa na antibakterijsku aktivnost kod supstituisanih kumarina [Kayser & Kolodziej, 1999].

Studije molekulskog modelovanja i doking kompjuterska metoda su pokazale da su nekovalentne interakcije, pre svega nagrađene vodonične veze kojima se kumarini vezuju za aminokisline unutar aktivnog mesta enzima značajne za njihovu antibakterijsku aktivnost.

Kompleks enzima i ispitivanog liganda konstruisan je na osnovu utvrđene strukture topozomerase II DNK giraze β za koju je vezan kumarinski antibiotik klorobiocin [Lafitte et al., 2002]. Utvrđeno je da klorobiocin formira dve vodonične veze sa Asp-73 i tri sa Thr-165 [Farag et al., 2010].

Da bi se dobio uvid u mogući mehanizam antibakterijske aktivnosti ispitivani 4-fenil hidrosikumarini su podvrgnuti doking simulacijama. *S. aureus* tirozil tRNK sintetaza [Xiao et al., 2011] i *E. coli* topoizomerase II DNK Giraza β [Abdel-Aziz et al., 2011] su izabrane kao ciljni enzimi za proučavanje inhibitorne aktivnosti u skladu sa literaturnim podacima [Kaushik et al., 2014].

Rezultati molekulskog dokinga pokazuju sledeće interakcije (broj i dužina vodoničnih veza) između ispitivanih 4-fenil hidrosikumarina i aminokiselina iz aktivnog mesta tirozil tRNK sintetaze:

- 7C gradi tri vodonične veze. Atom kiseonika iz karbonilne grupe laktonskog dela molekula gradi dve vodonične veze - sa Asn-124 (3,10 Å) i sa Thr-75 (3,10 Å). Hidroksilna grupa gradi jednu vodoničnu vezu sa Val-191 (4,56 Å).
- 5,7C gradi četiri vodonične veze. Atom kiseonika iz karbonilne grupe laktonskog dela molekula gradi dve vodonične veze - sa Asn-124 (3,04 Å) i sa Thr-75 (3,18 Å). Hidroksilna grupa iz položaja 7 gradi dve vodonične veze - sa Tyr-36 (3,69 Å) i sa Val-191 (4,50 Å).
- 7,8C gradi sedam vodoničnih veza. Atom kiseonika iz karbonilne grupe laktonskog dela molekula gradi dve vodonične veze - sa Asn-124 (3,49 Å) i sa Thr-75 (3,04 Å). Hidroksilna grupa iz položaja 7 gradi tri vodonične veze - sa Tyr-36 (4,59 Å), sa Val-191 (3,13 Å) i sa Cys-37 (4,15 Å). Hidroksilna grupa iz položaja 8 gradi dve vodonične veze - sa Gln-190 (2,76 Å) i sa Tyr-36 (2,65 Å).

Rezultati molekulskog dokinga pokazuju sledeće interakcije (broj i dužina vodoničnih veza) između ispitivanih 4-fenil hidrosikumarina i aminokiselina iz aktivnog mesta topozomerase II DNK Giraze β :

- 7C gradi šest vodoničnih veza. Atom kiseonika iz karbonilne grupe laktonskog dela molekula gradi jednu vodoničnu vezu sa Asn-46 (2,82 Å). Hidroksilna grupa iz

položaja 7 gradi pet vodoničnih veza - sa Gly-77 (3,10 Å), sa Arg-136 (4,73 Å) i tri sa Arg-76 (3,85 Å, 4,41 Å i 4,89 Å).

- 5,7C gradi šest vodoničnih veza. Atom kiseonika iz karbonilne grupe laktorskog dela molekula gradi jednu vodoničnu vezu sa Asn-46 (3,10 Å). Hidroksilna grupa iz položaja 5 gradi vodoničnu vezu sa Thr-165 (4,06 Å). Hidroksilna grupa iz položaja 7 gradi četiri vodonične veze - sa Arg-136 (4,01 Å) i trisa Arg-76 (3,85 Å, 4,24 Å i 4,28 Å).
- 7,8C gradi 5 vodoničnih veza. Atom kiseonika iz karbonilne grupe laktorskog dela molekula gradi jednu vodoničnu vezu sa Asn-46 (3,05 Å). Hidroksilna grupa iz položaja 7 gradi četiri vodonične veze - jednu sa Arg-136 (4,71 Å), dve sa Arg-76 (3,34 Å i 4,38 Å) i jednu sa Gly-77 (2,62 Å).

Jačina afiniteta vezivanja liganda za aktivno mesto enzima može biti procenjena na osnovu *score* vrednosti dobijenih primenom molekulskog dokinga. MolDock *score* vrednosti vezivanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina za aktivno mesto tirozil tRNK sintetaze pokazuju da najveći afinitet vezivanja ima 5,7C, dok 7,8C pokazuje najveći afinitet vezivanja za aktivno mesto topoizomeraze II DNKGiraze β.

Bolji afinitet vezivanja 5,7C za aktivno mesto tirozil tRNK sintetaze u odnosu na 7,8C se može dovesti u korelaciju sa eksperimentalno dobijenim vrednostima za MIC jer je 5,7C pokazao bolji inhibitorni efekat na *S.aureus* u odnosu na 7,8C. Sa druge strane, 7,8C je pokazao bolju aktivnost protiv *E.coli* (ATCC 11775) u poređenju sa 5,7C što se može objasniti većim afinitetom vezivanja 7,8C za aktivno mesto topoizomeraze II DNK Giraze β u odnosu na 5,7C (tabela 5.5.).

Hbond vrednost prikazuje ukupnu energiju vodoničnih veza između liganda i aminokiselina u aktivnom mestu enzima. *Hbond* vrednosti za tirozil tRNK sintetazu pokazuju da je najjača interakcija za 7,8C, dok je kod topoizomeraze II DNK Giraze β najjača interakcija veza za 5,7C.

Broj, dužina i energija formiranih vodoničnih veza imaju uticaja na jačinu interakcija između liganda i enzima. Konformacione analize odabranih 4-fenil hidroksikumarina pomoću DFT metode identifikuju intramolekulsku vezu kod 7,8C formiranu između hidroksilnih grupa u položajima 7 i 8. Tako formirana vodonična veza može da "blokira" hidroksilne grupe kod 7,8C za interakcije sa aminokiselinama u aktivnom mestu enzima. Molekulski doking nije

identifikovao nijednu vodoničnu vezu između hidrokline grupe iz položaja 8 i aminokiselina u aktivnom mestu topoizomeraze II DNK Giraze β .

Protein vrednost pokazuje ukupnu energiju elektrostatičkih interakcija između liganda i aktivnog mesta enzima. *Protein* vrednosti za tirozil tRNK sintetazu pokazuju da je najjača interakcija za 7,8C, dok je kod topoizomeraze II DNK Giraze β najjača interakcija za 5,7C.

Po svim *Score* vrednostima 7C pokazuje najslabije interakcije sa enzimima čime se može objasniti slabija antibakterijska aktivnost ovog molekula u odnosu na 7,8C i 5,7C.

6.3. QSAR studija i molekularni doking anti-HIV aktivnosti

Brojčane vrednosti za SMILES fragmente iz dobijenih QSAR modela se mogu iskoristiti za klasifikaciju SMILES fragmenata na one sa pozitivnim i one sa negativnim uticajem na *endpoint* (vrednost ispitivanog parametra). SMILES fragmenti se mogu povezati sa funkcionalnim grupama, pa dobijeni QSAR modeli imaju mehanističko tumačenje [Veselinović et al., 2013a,b].

Na osnovu dobijenih rezultata QSAR modelaza 3' *Processing* aktivnost SMILES fragmenti (funkcionalne grupe) koji povećavaju *endpoint* (pIC₅₀) su: "C...C....." - etil grupa, "C...=....." sp² hibridizovani ugljenikov atom, "o....." - aromatični atom kiseonika (atom kiseonika u aromatičnom prstenu), "c....." - aromatični atom ugljenika (atom ugljenika u aromatičnom prstenu) i "O...(C..." - atom kiseonika povezan sa atomom ugljenika na kome postoji dalje račvanje molekula. SMILES fragmenti koji smanjuju *endpoint* (pIC₅₀) su: "n....." - aromatični atom azota (atom azota u aromatičnom prstenu), "N...+....." - kvaternarni azotov atom, "C...(C..." molekularno račvanje alifatičnog niza, "s...c....." - aromatični atom sumpora (atom sumpora u aromatičnom prstenu) i "N...(C..." - atom azota povezan sa atomom ugljenika na kome postoji dalje račvanje molekula.

Na osnovu dobijenih rezultata QSAR modelaza *Integration* aktivnost SMILES fragmenti (funkcionalne grupe) koji povećavaju *endpoint* (pIC₅₀) su: "c...O....." - atom kiseonika vezan za benzenov prsten, "O...C....." - alkoholni ili etarski kiseonik, "C.../....." - cis/trans izomerija, "c...C....." - atom ugljenika vezan za benzenov prsten i "C...(....." - molekularno račvanje. SMILES fragmenti koji smanjuju *endpoint* (pIC₅₀) su: "n...c...c..." i "n....." - aromatični atom azota, "O...C...=..." - keto grupa, "O...=...(..." - keto grupa povezana sa

atomom ugljenika na kome postoji dalje račvanje molekula i “O...=.....” - dvostruka veza na atomu kiseonika.

Da bi se dobio uvid u mogući mehanizam anti-HIV aktivnosti ispitivani 4-fenil hidroksikumarini su podvrgnuti molekulskom dokingu. Kao ciljno mesto izabrana je HIV-1 integraza sa novoidentifikovanim aktivnim mestom [Rhodes et al., 2011]. Pristup pronalaženja novih inhibitora HIV-1 integraze sa navedenim aktivnim mestom ovog enzima primenom molekulskog dokinga već je korišćen u molekulskom modelovanju i dizajnu [Al-Mawsawi & Neamati, 2011].

Rezultati molekulskog dokinga pokazuju sledeće interakcije (broj i dužina vodoničnih veza) između ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina i aminiokiselina iz aktivnog mesta HIV-1 integraze:

- 7C gradi jednu vodoničnu vezu, atom kiseonika iz karbonilne grupe laktonskog dela molekula sa Asn144 (4,67 Å).
- 5,7C nije nagrađio nijednu vodoničnu vezu sa aktivnim mestom enzima.
- 7,8C gradi pet vodoničnih veza. Atom kiseonika iz karbonilne grupe laktonskog dela molekula gradi jednu vodoničnu vezu sa Asn-144 (4,69 Å). Zasićeni atom kiseonika iz laktonskog dela molekula gradi jednu vodoničnu vezu sa Tyr-143 (3,55 Å). Hidroksilna grupa iz položaja 8 gradi tri vodonične veze - jednu sa Asn-144 (4,23 Å) i dve sa Ser-147 (2,19 Å i 4,59Å).

Dobijeni rezultati ukazuju na mogući značaj interakcije liganada sa aminokiselinom Asn-144 jer su i 7,8C i 7C formirali vodonične veze sa njom.

Jačina vezivanja liganda za aktivno mesto enzima može biti procenjena na osnovu *score* vrednosti dobijenih primenom molekulskog dokinga. Dobijene *score* vrednosti vezivanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina za aktivno mesto HIV-1 integraze pokazuju da najveći afinitet vezivanja ima 7,8C. Dobijeni rezultati za afinitet vezivanja su u korelaciji sa izračunatim pIC_{50} vrednostima za *Integration* enzimsku aktivnost, koja je bila najniža za 7,8C.

6.4. Pravila Lipinskog

Deskriptori Lipinskog omogućavaju predviđanje apsorpcije i distribucije odnosno biološke raspoloživosti ispitivanih jedinjenja. Apsorpcija i distribucija su dva od četiri osnovna parametra koje proučava farmakokinetika. Rezultati su pokazali da se ispitivani 4-fenil hidroksikumarini povinuju pravilima Lipinskog što ukazuje na njihov zadovoljavajući farmakokinetički profil.

7. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršeno je ispitivanje uticaja broja i položaja hidroksilnih grupa na antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost 7-hidroksi-4-fenilkumarina (7C), 5,7-dihidroksi-4-fenilkumarina (5,7C) i 7,8-dihidroksi-4-fenilkumarina (7,8C). Određivanje antioksidativne aktivnosti vršeno je primenom *in vitro* metoda (DPPH[•], ABTS^{•+}, feri tiocijanat metoda, FRAP i CUPRAC). Određivanje antibakterijske aktivnosti vršeno je primenom mikrodilucione metode. Kompjuterske metode (DFT metoda i molekularni doking) su primenjene za uspostavljanje povezanosti između strukture i aktivnosti ispitivanih kumarina, kao i za identifikaciju mehanizama kojima se ta povezanost ostvaruje. QSAR metoda je primenjena za dobijanje matematičkog modela za izračunavanje farmakohemijske aktivnosti ispitivanih kumarina.

Analizom dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Broj i položaj hidroksilnih grupa značajno utiču na antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost 4-fenil hidoksikumarina ispitivanih u ovom radu.
- Od 4-fenil hidoksikumarina ispitivanih u ovom radu jedino je 7,8C pokazao sposobnost hvatanja radikala određenu kao EC₅₀ primenom DPPH[•] i ABTS^{•+} metoda. Ovo jedinjenje je takođe pokazalo bolja antioksidativna svojstva u ovim testovima od standardnih antioksidanasa (BHA, BHT, troloks, α -tokoferol).
- 7,8C je pokazao najveći procenat inhibicije lipidne peroksidacije sličan BHT. 5,7C je pokazao manju inhibiciju od 7,8C, ali veću u odnosu na BHA. 7C je pokazao najmanju inhibiciju lipidne peroksidacije od ispitivanih kumarina, ali veću u odnosu na α -tokoferol i troloks.
- Od kumarina ispitivanih u ovom radu 7C nije pokazao redukcionu moć određivanu FRAP i CUPRAC metodama. Obe metode su pokazale da 7,8C ima veću redukcionu moć od 5,7C i standardnih antioksidanasa ispitivanih u ovom radu. 5,7C prema FRAP metodi ima manju redukcionu moć od ispitivanih standardnih antioksidanasa, dok prema CUPRAC metodi pokazuje veću redukcionu moć od njih.
- 7,8C pokazuje mnogo bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na 7C i 5,7C što ukazuje da *orto* položaj hidroksilnih grupa kod 4-fenil hidoksikumarina značajno doprinosi njihovoj antioksidativnoj aktivnosti.

- Rezultati kompjuterskih proračuna primenom DFT metode su saglasni sa rezultatima eksperimentalnog određivanja antioksidativne aktivnosti 4-fenil hidroksikumarina ispitivanih u ovom radu što dokazuje da se DFT deskriptori mogu uspešno primenjivati za uspostavljanje odnosa između strukture i aktivnosti kao i za identifikaciju mehanizma antioksidativne aktivnosti.
- HOMO i LUMO energija i njihova energetska razlika za 4-fenil hidroksikumarine ispitivane u ovom radu ukazuju da 7,8C ima nabolju antioksidativnu aktivnost, dok 5,7C pokazuje bolju antioksidativnu aktivnost od 7C. ΔE_{iso} vrednosti ukazuju da 7,8C ima najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Raspored ukupne spinske gustine ukazuje da je od svih ispitivanih rasporeda hidroksilnih grupa u ispitivanim kumarinima za slobodno-radikalske reakcije najmanje favorizovan položaj 7. DFT deskriptori kao i eksperimentalni podaci potvrđuju 7,8C kao jedinjenje sa najboljom antioksidativnom aktivnošću u odnosu na ostale ispitivane kumarine.
- Termodinamički proračuni ukazuju da je dominantan mehanizam aktivnosti u gasnoj fazi HAT, a u drugim ispitivanim sistemima najverovatniji je SPLET mehanizam antioksidativnog delovanja ispitivanih kumarina.
- Ispitivani kumarini pokazuju bolji inhibitorni efekat na Gram (+) bakterije u odnosu na Gram (-) bakterije. Svi ispitivani kumarini su najjače inhibirali rast sojeva *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* i *M. luteus*. Najslabiju aktivnost od svih ispitivanih kumarina je imao 7C. 5,7C je pokazao bolji inhibitorni efekat na većinu testiranih sojeva u odnosu na 7,8C.
- Molekulski doking primenjen je za procenu antibakterijske aktivnosti na osnovu afiniteta vezivanja ispitivanih kumarina za aktivno mesto tirozil tRNK sintetaze (*S. aureus*) i topoizomeraze II DNKGiraze β (*E. coli*). Afinitet vezivanja liganda za aktivno mesto enzima je procenjen na osnovu *score* vrednosti dobijenih primenom molekulskog dokinga. MolDock *score* vrednosti vezivanja 4-fenil hidroksikumarina ispitivanih u ovom radu za aktivno mesto tirozil tRNK sintetaze pokazuju da najveći afinitet vezivanja ima 5,7C, dok 7,8C pokazuje najveći afinitet vezivanja za aktivno mesto topoizomeraze II DNK Giraze β . Bolji afinitet vezivanja 5,7C za aktivno mesto tirozil tRNK sintetaze u odnosu na 7,8C se može dovesti u korelaciju sa eksperimentalno dobijenim vrednostima za MIC jer je 5,7C pokazao bolji inhibitorni efekat na *S. aureus* u odnosu na 7,8C. Sa druge strane, 7,8C je pokazao bolju aktivnost protiv *E. coli* (ATCC 11775) u poređenju sa 5,7C, što se može objasniti većim

afinitetom vezivanja 7,8C za aktivno mesto topoizomerase II DNK Giraze β u odnosu na 5,7C.

- QSAR metoda je primenjena za dobijanje matematičkog modela za izračunavanje anti-HIV aktivnosti ispitivanih kumarina na osnovu inhibicije HIV-1 integraze. Molekulski doking je primenjen za procenu validnosti dobijenog QSAR modela na osnovu afiniteta vezivanja ispitivanih kumarina za aktivno mesto HIV-1 integraze. 7,8C pokazuje najveći afinitet vezivanja za aktivno mesto HIV-1 integraze. 7,8C ima najmanju pIC_{50} vrednost za *Integration* enzimsku aktivnost izračunatu QSAR modelom. Postoji korelacija između rezultata za afinitet vezivanja i izračunatih pIC_{50} vrednosti. 5,7C ima najmanju pIC_{50} vrednost za *3'Processing* enzimsku aktivnost izračunatu dobijenim QSAR modelom.
- 4-fenil hidroksikumarini ispitivani u ovom radu se povinuju pravilima Lipinskog što ukazuje na njihov zadovoljavajući farmakokinetički profil.

Dobijeni rezultati omogućavaju identifikaciju farmakofore odgovorne za farmakohemijske aspekte delovanja ispitivanih 4-fenil hidroksikumarina i bolje razumevanje mehanizama njihove antioksidativne i antibakterijske aktivnosti što je od značaja za njihovu potencijalnu primenu u terapijske svrhe ili njihove dalje hemijske modifikacije u cilju dobijanja novih molekula sa izraženijim antioksidativnim ili antibakterijskim delovanjem.

8. Literatura

- Abdel-Aziz AA, Asiri YA, Al-Agamy MH. Design, synthesis and antibacterial activity of fluoroquinolones containing bulky arenesulfonyl fragment: 2D-QSAR and docking study. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 5487-5497.
- Acworth IN. *The Handbook of Redox Biochemistry*. Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA, 2003.
- Ak T, Gulcin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Int* 2008; 174: 27-37.
- Akeson WR, Gorz HJ, Haskins FA. Effect of genotype and growth stage on distribution of mellilotic acid, O-coumaric acid, and coumarinic acid in *Melilotus alba* Desr. *Crop Sci* 1963; 3: 167-171.
- Al-Mawsawi LQ, Neamati N. Allosteric inhibitor development targeting HIV-1 integrase. *Chem Med Chem* 2011; 6: 228-41.
- Anand P, Singh B, Singh N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 1175-1180.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Çelik SE. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta* 2008; 160: 413-419.
- Arora A, Nair GM, Strasburg MG. Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad Biol Med* 1998; 24: 1355-1363.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 205–214.
- Barone V, Cossi M. Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *J Phys Chem A* 1998; 102: 1995-2001.
- Bartmess JE. The thermodynamics of the electron and the proton. *J Phys Chem* 1994; 98: 6420-6424.

- Barzegar A, Davari MD, Chaparzadeh N, Zarghami N, Pedersen JZ, Incerpi S, Saso L, Moosavi-Movahedi AA. Theoretical and experimental studies on the structure-antioxidant activity relationship of synthetic 4-methylcoumarins. *J Iran Chem Soc* 2011; 8: 973-982.
- Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys* 1993; 98: 5648-5652.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199-1200.
- Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, Matern U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev* 2006; 5: 293-308.
- Brude RI, Drevon AC, Hjermann I, Seljeflot I, Lund-Katz S, Saarem K, Sandstad B, Salvoll K, Halvorsen B, Arnesen H, Neuser S.M. Peroxidation of LDL From Combined-Hyperlipidemic Male Smokers Supplied with ω -3 Fatty Acids and Antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2576-2588.
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222-230.
- Campbell S J, Gold ND, Jackson RM, Westhead DR. Ligand binding: functional site location, similarity and docking. *Curr Opin Struc Biol* 2003; 13: 389–395.
- Cavasotto CN, Phatak SS. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov Today* 2009; 14: 676-683.
- Chin Y-P, Huang W-J, Hsu F-L, Lin Y-L, Lin M-H. Synthesis and Evaluation of Antibacterial Activities of 5,7-Dihydroxycoumarin Derivatives. *Arch Pharm* 2011; 11: 386-393.
- Chong J, Baltz R, Schmitt C, Belffa R, Fritig B, Saindrenan P. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, weakens virus resistance. *Plant Cell* 2002; 14: 1093-1107.

- Chu CY, Tsai YY, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Induction of apoptosis by esculentin in human leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 2001; 416: 25-32.
- Cook NC, Samman S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem* 1996; 7: 66- 76.
- Cozzini P, Kellogg GE, Spyrakis F, Abraham DJ, Costantino G, Emerson A, Fanelli F, Gohlke H, Kuhn LA, Morris GM, Orozco M, Pertinhez TA, Rizzi ML, Sottriffer CA. Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design. *J Med Chem* 2008; 51: 6237–6255
- Damu GLV, Wen QM, Cui SF, Peng XM, Zhou CH. Coumarin based triazole compounds with preparation method and pharmaceutical use thereof. CN Patent 103422813 (A). 2012
- De Proft F, Geerlings P. Conceptual and computational DFT in the study of aromaticity. *Chem Rev* 2001; 101: 1451-1464.
- De Souza SM, Monache FD, Smania A Jr. Antibacterial Activity of Coumarins. *Z Naturforsch C* 2005; 60: 693-700.
- Dewor MJS, Kelemen J. LCAO MO Theory Illustrated by Its Application to H₂. *J Chem Educ* 1971; 48: 494-501.
- Dhaouadi Z, Nsangou M, Garrab N, Anouar EH, Marakchi K, Lahmar S. DFT study of the reaction of quercetin with $\bullet\text{O}_2^-$ and $\bullet\text{OH}$ radicals. *J Mol Struct THEOCHEM* 2009; 904: 35-42.
- Djordjević VB. Free Radicals in Cell Biology. *Int Rev Cytol* 2004; 237: 57-89.
- Đorđević V, Pavlovic D, Kocic G. Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet Nis, 2000.
- Drlica K, Zhao X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61 : 377-392.
- Efferth T, Koch E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Curr Drug Targets* 2011; 12: 122-132.

- Ehlers D, Pfister M, Bork WR, Toffelnadolny P. HPLC Analysis of Tonka Bean Extracts. *Z Lebensm Unters Forsch* 1995; 201: 278-282.
- Eloff JNP. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 64: 711-713.
- Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* 2000; 43: 3714-3717.
- Estévez-Braun A, González AG. Coumarins. *Nat Prod Rep* 1997; 14: 465-475.
- Farag NAH, El-Tayeb W. Design, synthesis and docking studies of new furobenzopyranones and pyranobenzopyranones as photoreagent towards DNA and as antimicrobial agents. *Eur J Med Chem* 2010; 45: 317-325.
- Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 2009; 325: 1089-1093.
- Fleming I. *Molecular Orbitals and Organic Chemical Reactions*, Student Edition. Wiley-Blackwell, 2009.
- Frisch MJ, et al. *Gaussian 09*, Revision C.02, Wallingford, CT, 2004.
- Fritig B, Hirth L, Ourisson G. Biosynthesis of the coumarins: scopoletin formation in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 1970; 9: 1963-1975.
- Frontana C, González I. The Role of Intramolecular Hydrogen Bonding in the Electrochemical Behavior of Hydroxy-Quinones and in Semiquinone Stability. *J Braz Chem Soc* 2005; 16: 299-307.
- Fukui K, Yonezawa T, Shingu H. A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. *The J Chem Phys* 1952; 20: 722-725.
- Galkin A, Fallarero A, Vuorela PM. Coumarins permeability in Caco-2 cell model. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 177-184.

- Games DE. Identification of 4-phenyl and 4-alkylcoumarins in *mammea americana* L., *mammea africana* G. Don and *calophyllum inophyllum* by gas chromatography - mass spectrometry. *Tetrahedron Lett* 1972; 13: 3187-3190.
- Garazd MM, Garazd YL, Khilya VP. Neoflavones. 1. natural distribution and spectral and biological properties. *Chem Nat Compd* 2003; 39: 54-121.
- Geerlings P, De Proft F, Langenaeker W. Conceptual density functional theory. *Chem Rev* 2003; 103: 1793-1873.
- Gomez-Outes A, Suarez-Gea ML, Calvo-Rojas G, Lecumberri R, Rocha E, Pozo-Hernández C, Terleira-Fernández AI, Vargas-Castrillón E. Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. *Curr Drug Discovery Technol* 2012; 9: 83-104.
- Groves TJ. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 226-235.
- Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor–ligand molecular docking. *Biophys Rev* 2014; 6: 75-87.
- Gulcin I, Dastan A. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities. *J Enzym Inhib Med Chem* 2007; 22: 685-695.
- Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 2006; 217: 213-220.
- Gulcin I. Antioxidant activity of L-adrenaline: a structure – activity insight. *Chem Biol Int* 2009; 179: 71-80.
- Halgren TA. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem* 1996; 17: 490-519.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygentoxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Com* 1990; 9: 1-32.

- Halliwell, B. Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, 1999.
- Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* 2002; 47: 409-443.
- Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *Brit Med J* 1998; 317: 657-660.
- Ikawa M, Stahmann M, Link P. Studies on 4-hydroxycoumarin. V. The Condensation of α,β -Unsaturated Ketones with 4-Hydroxycoumarin. *J Am Chem Soc* 1944; 66: 902-906.
- Itoigawa M, Ito C, Tan HTW, Kuchide M, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Cancer Lett* 2001; 169: 15-19.
- Jain AN. Scoring functions for protein-ligand docking. *Curr Protein Pept Sci* 2006; 7: 407-420.
- Kai K, Mizutani M, Kawamura N, Yamamoto R, Tamai M, Yamaguchi H, Sakata K, Shimizu B. Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutaratedependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2008; 55: 989-999.
- Karbowiak T, Gougeon RD, Alinc JB, Brachains L. Wine Oxidation and the Role of Cork. *Crit Rev Food Sci* 2010; 50: 20-52.
- Karelson M, Lobanov VS, Katritzky AR. Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies. *Chem Rev* 1996; 96:1027-1044.
- Kaufmann SHE. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 373.
- Kaushik CP, Lal K, Kumar A, Kumar S. Synthesis and biological evaluation of amino acid-linked 1,2,3-bistriazole conjugates as potential antimicrobial agents. *Med Chem Res* 2014; 23: 2995-3004.
- Kayser O, Kolodziej H. Antibacterial activity of simple coumarins: structural requirements for biological activity. *Z. Naturforsch. C* 1999; 54: 169-174.

- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 935-949.
- Klein E, Lukeš V, Iličin M. DFT/B3LYP study of tocopherols and chromans antioxidant action energetics. *Chem Phys* 2007; 336: 51-57.
- Koch W, Holthausen MC. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Second Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001
- Kohn W, Becke AD, Parr RG. Density functional theory of electronic structure. *J Phys Chem* 1996; 100: 12974-12980.
- Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, Balkansky S, Parmar VS, Prasad AK, Saso L. Coumarins as antioxidants. *Curr Med Chem* 2011; 18: 3929-3951.
- Kovačević N. *Osnovi farmakognoziije*. Srpska školska knjiga, Beograd, Srbija, 2004.
- Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2005; 6, 248-261.
- Krishnan R, Binkley JS, Seeger R, Pople JA. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions. *J Chem Phys* 1980; 72: 650-654.
- Kroemer RT. Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring. *Curr Protein Pept Sci* 2007; 8: 312-328.
- Kromhout D. Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids* 1999; 34: S27-S31.
- Kùc J. Phytoalexins from the Solanaceae. In: Bailey JA, Mansfield JW (eds) *Phytoalexins*. Blackie & Sons, Glasgow, 1982: 81-105.
- Lafitte D, Lamour V, Tsvetkov PO, Makarov AA, Klich M, Deprez P, Moras D, Briand C, Gilli R. DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* 2002; 41: 7217-7223.
- Laposata M, Van Cott EM, Lev MH. (2007) 40-Year-Old Woman with Epistaxis, Hematemesis, and Altered Mental Status. *N Engl J Med* 2007; 356:174-182.

- Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model* 2011; 51: 2778-2786.
- Leach AR, Shoichet BK, Peishoff CE. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps. *J Med Chem* 2006; 49: 5851-5855.
- Lewis RJ, Singh OM, Smith CV, Skarzynski T, Maxwell A, Wonacott AJ, Wigley DB. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J* 1996; 15: 1412-1420.
- Li MJ, Liu WX, Peng CR, Ren QH, Lu WC, Deng W. A DFT study on reaction of eupatilin with hydroxyl radical in solution. *Int J Quantum Chem* 2013; 113: 966-974.
- Lin HC, Tsai SH, Chen CS, Chang YC, Lee CM, Lai ZY, Lin CM. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1416-1425.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 3-26.
- Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Tech* 2004; 1: 337-341.
- Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2002; 106: 927-932.
- Mata R, Calzada F, Garcia MR. Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, VI. Additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *J Nat Prod* 1988; 51: 851-856.
- Matern U, Luer P, Kreusch D. Biosynthesis of coumarins. *In: Sankawa, U. (Ed.), Comprehensive Natural Products Chemistry, Elsevier Sci. Amsterdam, 1999; 1: 623-637.*
- Maxwell, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol Microbiol* 1993; 9: 681-686.

- Mazzanti A, Casarini D. Recent trends in conformational analysis. *WIREs Comput Mol Sci* 2012; 2: 613–641.
- McCulloch P, George WD. Warfarin inhibits metastasis of Mtlⁿ3 rat mammary carcinoma without affecting primary tumour growth. *Br J Cancer* 1989; 59: 179-183.
- McLean AD, Chandler GS. Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18. *J Chem Phys* 1980; 72: 5639-5648.
- Mohan V, Gibbs AC, Cummings MD, Jaeger EP, DesJarlais RL. Docking: Successes and Challenges. *Curr Pharm Design* 2005; 11: 323-333.
- Morabito G, Trombetta D, Singh Brajendra K, Prasad Ashok K, Parmar Virinder S, Naccari C, Mancari F, Saija A, Cristani M, Firuzi O, Saso L. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in vitro cell-free systems. *Biochimie* 2010; 92: 1101-1107.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417: 1-13.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiology. Medical* 5th Edition. Mosby, 2005
- Murray RD, Mendéz J, Brown SA. *The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. Wiley, New York, 1982.
- Murray RD. Naturally occurring plant coumarins. *Prog Ch Org Nat Prod* 1991; 58: 83-316.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA, 2003.
- Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992; 257: 1064-1073.
- OECD. 2007 Quantitative Structure-Activity Relationships Project [(Q)SARs]. Available online:
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2007\)2](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2007)2)
- Ohara Z, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-2551.

- O'Kennedy R, Thornes RD. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1997.
- Oldenburg J, Watzka M, Rost S, Muller CR. VKORC1: molecular target of coumarins. J Thromb Haemost 2007; 5: 1-6.
- Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. Jpn J Nutr 1986; 44: 307-315.
- Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. Acta Physiol Scand 1986; 548: 87-99.
- Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, Caranfa MJ, Breen AL, Bartus HR, Johnson RK, Hertzberg RT, Westley JW. The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. J Med Chem 1993; 36: 4131-4138.
- Perez-Gonzalez A, Galano A. OH radical scavenging activity of Edaravone: mechanism and kinetics. J Phys Chem B 2011; 115: 1306-1314.
- Prasanna S, Doerksen RJ. Topological polar surface area: A useful descriptor in 2D-QSAR. Curr Med Chem 2009; 16: 21-41.
- Pré J. La lipoperoxydation. Path Biol 1991; 39: 716-736.
- Pryor WA. The role of free radical reactions in biological systems. In: Pryor, W.A.: Free radicals in biology, Vol. I: 1-50, Academic Press Inc., New York, 1976.
- Qiu X, Janson CA, Smith WW, Green SM, McDevitt P, Johanson K, Carter P, Hibbs M, Lewis C, Chalker A, Fosberry A, Lalonde J, Berge J, Brown P, Houge-Frydrych CS, Jarvest RL. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. Protein Sci 2001; 10: 2008-2016.
- Quadri-Spinelli T, Heilmann J, Rali T, Sticher O. Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*. Planta Med 2000; 66: 728-733.
- Queiroz AN, Gomes BAQ, Moraes WM Jr, Borges RS. A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. Eur J Med Chem 2009; 44: 1644-1649.

- Randic M, Basak SC. New Descriptor for Structure-Property and Structure-Activity Correlations. *J Chem Inf Comp Sci* 2001; 41: 650-656.
- Randic M, Basak SC. Optimal Molecular Descriptors Based on Weighted Path Numbers. *J Chem Inf Comp Sci* 1999; 39: 261-266.
- Randic M, Pompe M. The Variable Connectivity Index 1Xf versus the Traditional Molecular Descriptors: A Comparative Study of 1Xf Against Descriptors of CODESSA. *J Chem Inf Comp Sci* 2001; 41: 631-638.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija, Urednik Todorović Z. Data status, Beograd, Srbija, 2005.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 1231-1237.
- Rhodes DI, Peat TS, Vandegraaff N, Jeevarajah D, Le G, Jones ED, Smith JA, Coates JA, Winfield LJ, Thienthong N, Newman J, Lucent D, Ryan JH, Savage GP, Francis CL, Deadman JJ. Structural basis for a new mechanism of inhibition of HIV-1 integrase identified by fragment screening and structure-based design. *Antivir Chem Chemother* 2011; 21: 155-168.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* 1996; 20: 933-956.
- Rimarčík J, Lukeš V, Klein E, Ilčin M. Study of the solvent effect on the enthalpies of homolytic and heterolytic N–H bond cleavage in p-phenylenediamine and tetracyano-p-phenylenediamine, *J Mol Struct THEOCHEM* 2010; 952: 25-30.
- Riveiro ME, Kimpe ND, Moglioni A, Vázquez R, Monczor F, Shayo C, Davio C. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Curr Med Chem* 2010; 17: 1325-1338.
- Roy PP, Roy K. QSAR studies of CYP2D6 inhibitor aryloxypropanolamines using 2D and 3D descriptors. *Chem Biol Drug Des* 2009; 73: 442-455.

- Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep* 2010; 27: 238–254.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 1998; 76: 270-276.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35: 275-280.
- Sharan M, Taguchi G, Gonda K, Jouke T, Shimosaka M, Hayashida N, Okazaki M. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Sci* 1998; 132: 13-19.
- Sharma BK. *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. Krishna Prakashan Media, 2000
- Shinar E, Rachmilewitz EA, Shifter A, Rahamim E, Saltman P. Oxidative damage to human red cells induced by copper and iron complexes in the presence of ascorbate. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1014: 66-72.
- Teutsch HG, Hasenfratz MP, Lesot A, Stoltz C, Garnier JM, Jeltsch JM, Durst F, Werckreichhart D. Isolation and Sequence of a Cdna-Encoding the Jerusalem-Artichoke Cinnamate 4-Hydroxylase, a Major Plant Cytochrome-P450 Involved in the General Phenylpropanoid Pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4102-4106.
- Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 2006; 49: 3315–3321.
- Toropov AA, Benfenati E. Additive SMILES-based optimal descriptors in QSAR modelling bee toxicity: using rare SMILES attributes to define the applicability domain. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 4801-4809.
- Toropov AA, Toropova AP, Lombardo A, Roncaglioni A, Benfenati E, Gini G. CORAL: building up the model for bioconcentration factor and defining it's applicability domain. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 1400-1403.

- Toropov AA, Toropova AP, Raska I Jr. QSPR modeling of octanol/water partition coefficient for vitamins by optimal descriptors calculated with SMILES. *Eur J Med Chem* 2008; 43: 714-740.
- Toropov AA, Toropova AP, Rasulev BF, Benfenati E, Gini G, Leszczynska D, Leszczynski J. Coral: QSPR modeling of rate constants of reactions between organic aromatic pollutants and hydroxyl radical. *J Comput Chem* 2012; 33: 1902-1906.
- Toropova AP, Toropov AA, Veselinović JB, Miljković FN, Veselinović AM. QSAR models for HEPT derivatives as NNRTI inhibitors based on Monte Carlo method. *Eur J Med Chem* 2014; 77: 298-305.
- Tsai K-C, Chen Y-C, Hsiao N-W, Wang C-L, Lin C-L, Lee Y-C, Li M, Wang B. A comparison of different electrostatic potentials on prediction accuracy in CoMFA and CoMSIA studies. *Eur J Med Chem* 2010; 45: 1544-1551.
- Ulubelen A, Kerr RR, Mabry TJ. Two new neoflavonoids and C-glycosylflavones from *Passiflora serratodigitata*. *Phytochemistry* 1982; 21: 1145-1147.
- Varagić VM, Milošević MP. Farmakologija, urednik Gavrilović S. Elit Medica, Beograd, 2005.
- Velasco-Velazquez MA, Agramonte-Hevia J, Barrera D, Jimenez-Orozco A, Garcia-Mondragon MJ, Mendoza-Patino N, Landa A, Mandoki J. 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Lett* 2003; 198: 179-186.
- Veselinović AM, Milosavljević JB, Toropov AA, Nikolić GM. SMILES-Based QSAR models for the calcium channel-antagonistic effect of 1,4-dihydropyridines. *Arch Pharm* 2013; 346: 134-139.
- Veselinović AM, Milosavljević JB, Toropov AA, Nikolić GM. SMILES-based QSAR model for arylpiperazines as high-affinity 5-HT_{1A} receptor ligands using CORAL. *Eur J Pharm Sci* 2013; 48: 532-541.

- Veselinović JB, Veselinović AM, Vitnik ŽJ, Vitnik VD, Nikolić GM. Antioxidant properties of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated in vitro and computational studies. *Chem-Biol Interact* 2014; 214: 49-56.
- Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med* 1998; 64: 97-109.
- Wang C, Schueler-Furman O, Baker D. Improved side-chain modeling for protein-protein docking. *Protein Sci* 2005; 14: 1328-1339.
- Wang QP, Zhang JQ, Damu GLV, Wan K, Zhang HZ, Zhou CH. Synthesis and biological activities of thio-triazole derivatives as novel potential antibacterial and antifungal agents. *Sci China Ser B:Chem* 2012; 55: 2134-2153.
- Warren GL1, Andrews CW, Capelli AM, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, Lindvall M, Nevins N, Semus SF, Senger S, Tedesco G, Wall ID, Woolven JM, Peishoff CE, Head MS. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem* 2006; 49: 5912-5931.
- Weber US, Steffen B, Siegers CP. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998; 99: 193-206.
- Weininger D, Weininger A, Weininger JL. SMILES. 2. Algorithm for generation of unique SMILES notation. *J Chem Inf Comp Sci* 1989; 29: 97–101.
- Weininger D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J Chem Inf Comp Sci* 1988; 28: 31–36.
- Weininger D. SMILES. 3. Depict. Graphical depiction of chemical structures. *J Chem Inf Comp Sci* 1990; 30: 237–243.
- Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *J Am Chem Soc* 2001; 123: 1173-1183.

- Wu L, Wang X, Xu W, Farzaneh F, Xu R. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. *Curr Med Chem* 2009; 16: 4236-4260.
- Xiao ZP, Ma TW, Liao ML, Feng YT, Peng XC, Li JL, Li ZP, Wu Y, Luo Q, Deng Y, Liang X, Zhu H-L. Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents: Synthesis, molecular docking and structure–activity relationship analysis of 3-aryl-4-arylamino-furan-2(5H)-ones. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 4904-4914.
- Xue Y, Zheng Y, Zhang L, Wu W, Yu D, Liu Y. Theoretical study on the antioxidant properties of 2'-hydroxychalcones: H-atom vs. electron transfer mechanism. *J Mol Model* 2013; 19: 3851-3862.
- Yin H, Musiek ES, Gao L, Porter NA, Morrow JD. Regiochemistry of neuroprostanes generated from the peroxidation of docosahexaenoic acid in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2005; 280: 26600-26611.
- Yu D, Suzuki M, Xie L, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent anti-HIV agents. *Med Res Rev* 2003; 23: 322-345.
- Zhang HZ, Li QX, Yin BT, Zhou CH. 7-(6-Bromo-hex-yloxy)-4- methyl-2H-chromen-2-one. *Acta Crystallogr Sect E: Struct Rep Online* 2012; 68: o1709.
- Zhao H, Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Milne GW, Pommier Y, Burke TR Jr. Coumarin-based inhibitors of HIV integrase. *J Med Chem* 1997; 40: 242-249.
- Zipse H. Radical Stability-A Theoretical Perspective. *Top Curr Chem* 2006; 263: 163-189.

Biografija autora

Jovana Veselinović (rođena Milosavljević) diplomirani farmaceut, rođena je u Skoplju 07.04.1983. godine. Osnovnu školu i gimnaziju „Stevan Sremac“, matematički smer, završila je u Nišu kao dobitnik Vukove diplome. Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Odsek Farmacija je upisala 2002. godine i diplomirala 2008. sa prosečnom ocenom 9,03 i ocenom 10 na diplomskom ispitu odbranjenom na temu „Savremeni biohemijski aspekti delovanja ACE inhibitora“. Za vreme osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije. Akademske doktorske studije - toksikologija upisala je 2008. godine kao prvi student. Kao student doktorskih studija bila je uključena u realizaciju praktične nastave iz predmeta Bromatologija i Farmaceutska hemija za studente farmacije na Medicinskom fakultetu u Nišu. Aktivno se služi engleskim jezikom.

Jovana Veselinović je autor i koautor većeg broja naučnih radova publikovanih u domaćim i stranim časopisima. U toku svog profesionalnog rada redovno se stručno usavršava i pohađa stručne edukacije iz oblasti farmacije i medicine. Član je Farmaceutske komore Srbije.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
Фармакохемијски аспекти деловања одабраних 4-фенил хидроксикумарина -
интегисана *in vitro* и компјутерска студија

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

У Нишу, 01.09.2014.

Аутор дисертације:
Јована Веселиновић

Потпис докторанда:

Јована Веселиновић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Јована Веселиновић

Студијски програм: Токсикологија

Наслов рада: Фармакохемијски аспекти деловања одабраних 4-фенил хидроксикумарина - интегрисана *in vitro* и компјутерска студија

Ментор: Проф. др Горан М. Николић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

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

У Нишу, 01.09.2014.

Аутор дисертације:
Јована Веселиновић

Потпис докторанда:

Јована Веселиновић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Фармакохемијски аспекти деловања одабраних 4-фенил хидроксикумарина - интегрисана *in vitro* и компјутерска студија која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 01.09.2014.

Аутор дисертације:
Јована Веселиновић

Потпис докторанда:

Јована Веселиновић