



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

НЕВЕНА СТАНКОВИЋ

**ФАРМАКОЛОГИЈА И ТОКСИКОЛОШКИ ПРОФИЛ
НОВОСИНТЕТИСАНИХ ДЕРИВАТА ХРОМАН-2,4-ДИОНА
У ФУНКЦИЈИ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ *IN VIVO***

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Доцент др Милан Младеновић

Крагујевац, 2018.

I Аутор

Име и презиме: **Невена Станковић**

Датум и место рођења: **27.02.1987. године, Пожаревац, Србија**

Садашње запослење: **асистент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

II Докторска дисертација

Наслов: **Фармакологија и токсиколошки профил новосинтетисаних деривата хроман-2,4-диона у функцији антикоагулативне активности *in vivo***

Број страница : Број слика: 135, Број шема: 66, Број табела: 26

Број библиографских података: 195

Установа и место где је израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област (УКД): **Хемија – Биохемија (577.1)**

Ментор: **др Милан Младеновић**, доцент, Природно-математички факултет, Крагујевац

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 22.09.2015. године

Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: 1110/XIV-3 од 18.11.2015. године; IV-01-719/6 од 09.12.2015. године

Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 900/IX-2 од 30.09.2015. године; IV-01-532/8 од 14.10.2015. године

1. **др Милан Младеновић**, доцент на ПМФ-у у Крагујевцу, ужа научна област биохемија
2. **др Владимир Михаиловић**, научни сарадник на ПМФ-у Крагујевцу, научна област хемија
3. **др Ненад Вуковић**, доцент на ПМФ-у у Крагујевцу, ужа научна област биохемија
4. **др Мирјана Михаиловић**, научни саветник на Институту за биолошка испитивања „др Симиша Станковић“, ужа научна област молекуларна биологија

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 70/XI-1, 31.01.2018.; IV-01-102/9, 14.02.2018.

1. **др Данијела А. Костић**, редовни професор Природно-математичког факултета у Нишу, *ужа научна област*: Органска хемија и биохемија (председник Комисије)
2. **др Мирјана Михаиловић**, научни саветник Института за биолошка истраживања „Симиша Станковић“ у Београду, *научна област*: Биологија
3. **др Ненад Вуковић**, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу, *ужа научна област*: Биохемија
4. **др Владимир Михаиловић**, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу; *ужа научна област*: Биохемија
5. **др Сања Матић**, научни сарадник Природно-математичког факултета у Крагујевцу, *научна област*: Биологија

Датум одбране дисертације:

МЕНТОР

др Милан Младеновић, доцент,
Природно-математички факултет
Универзитет у Крагујевцу

КОМИСИЈА

др Данијела А. Костић, председник Комисије
редовни професор
Природно-математички факултет
Универзитет у Нишу

др Мирјана Михаиловић, научни саветник
Институт за биолошка истраживања
„Синиша Станковић” у Београду

др Ненад Вуковић, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Крагујевцу

др Владимир Михаиловић, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Крагујевцу

др Сања Матић, научни сарадник
Природно-математички факултет
Универзитет у Крагујевцу

Приложена докторска дисертација урађена је у Лабораторији за биохемију и хемију природних производа и Крагујевачком центру за компјутациону биохемију, Института за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, под менторством доцента др Милана Младеновића. Један део експеримената урађен је у Лабораторији за генетику Института за биологију и екологију истог факултета; на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду, као и на Катедри за патологију, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Посебну захвалност дугујем ментору, доценту др Милану Младеновићу који је предложио тему и руководио израдом ове докторске дисертације. Пре свега, захваљујем на указаној прилици да postanем део истраживачког тима Лабораторије за биохемију и хемију природних производа и Крагујевачког центра за компјутациону биохемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, те да тиме започнем своју научну каријеру. Такође, захваљујем на саветима, подршци, великом стрпљењу и разумевању, као и свом знању које ми је пренео током докторских студија.

Захваљујем се члановима Комисије и ментору на темељном прегледању и свим корисним саветима и сугестијама које су значајно допринеле квалитету ове дисертације.

Колегама истраживачке групе Лабораторије за биохемију и хемију природних производа, Крагујевачког центра за компјутациону биохемију и у Лабораторије за генетику Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Сањи, Влади, Јеци и Незрини захваљујем на великој помоћи и подршци коју су ми пружили у току свог научно-истраживачког рада.

Мојој породици, мом Александру, његовој породици и свим пријатељима дугујем неизмерну захвалност на пруженој љубави и подршци која ми је дала мотивацију и истрајност у сваком сегменту израде рада.

	РЕЗИМЕ	I
	SUMMARY	VI
	СКРАЋЕНИЦЕ	XI
	ЛИСТА СЛИКА	XIV
	ЛИСТА ТАБЕЛА	XXIX
	ЛИСТА ШЕМА	XXXI
1.	УВОД	1
1.1.	ХЕМОСТАЗА И ТРОМБОЗА	2
1.1.1.	ВАЗОКОНСТРИКЦИЈА.....	3
1.1.2.	ТРОМБОЦИТНА ФАЗА.....	7
1.1.2.1.	СТРУКТУРА ТРОМБОЦИТА.....	7
1.1.2.2.	АДХЕЗИЈА НА ОГОЉЕНИ КОЛАГЕН ОШТЕЋЕНОГ КРВНОГ СУДА И ОСЛОБАЂАЊЕ САДРЖАЈА ТРОМБОЦИТНИХ ГРАНУЛА.....	12
1.1.2.3.	АГРЕГАЦИЈА ТРОМБОЦИТА.....	14
1.1.3.	ФАЗА КАСКАДНЕ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ.....	17
1.1.3.1.	СПОЉАШЊИ ПУТ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ.....	21
1.1.3.2.	УНУТРАШЊИ ПУТ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ.....	31
1.1.3.3.	ЗАЈЕДНИЧКИ ПУТ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ.....	39
1.1.4.	АНТИКОАГУЛАЦИЈА.....	61
1.1.4.1.	РЕГУЛАЦИЈА СПОЉАШЊЕГ И УНУТРАШЊЕГ ПУТА КОАГУЛАЦИЈЕ.....	61
1.1.4.2.	РЕГУЛАЦИЈА НИВОА ТРОМБИНА.....	61
1.1.4.3.	УТИЦАЈ ЕНДОТЕЛНИХ ЋЕЛИЈА НА ХЕМОСТАЗУ И ТРОМБОЗУ.....	64
1.1.5.	ФИБРИНОЛИЗА.....	65
1.1.6.	ЦИКЛУС ВИТАМИНА К У ПРОЦЕСУ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ.....	68
1.1.6.1.	КРИСТАЛНА СТРУКТУРА <i>syn</i> VKOR – ХОМОЛОГА <i>h</i> VKORC1.....	71
1.1.6.2.	ХОМОЛОГИ МОДЕЛ <i>h</i> VKORC1.....	73
1.1.6.2.1.	КОНЗЕРВИРАНЕ АМИНОКИСЕЛИНЕ У <i>h</i> VKORC1.....	74
1.1.6.2.2.	ТОПОЛОШКИ МОДЕЛ VKORC1 СА ТРИ ТРАНСМЕМБРАНСКА α -ХЕЛИКСА...	75
1.1.6.2.3.	ТОПОЛОШКИ МОДЕЛ VKORC1 СА ЧЕТИРИ ТРАНСМЕМБРАНСКА α -ХЕЛИКСА.....	77
1.1.6.3.	ХОМОЛОГИ МОДЕЛ <i>r</i> VKORC1.....	78
1.1.6.4.	МЕХАНИЗАМ РЕДУКЦИЈЕ ВИТАМИНА К VKOR КОМПЛЕКСОМ.....	79
1.1.6.5.	МЕХАНИЗАМ ИНХИБИЦИЈЕ VKORC1 КУМАРИНИМА.....	83
1.1.6.5.1.	КОВАЛЕНТНИ МЕХАНИЗАМ ИНХИБИЦИЈЕ VKORC1 ВАРФАРИНОМ.....	86
1.1.6.5.2.	РЕВЕРЗИБИЛНИ МЕХАНИЗАМ ИНХИБИЦИЈЕ VKORC1 ВАРФАРИНОМ.....	87
1.2.	БИОСИНТЕЗА ХРОМАН-2,4-ДИОНА У БИЉКАМА	88
1.2.1.	ХЕМИЈСКА СИНТЕЗА И АКТИВНОСТИ ХРОМАН-2,4-ДИОНА.....	92
1.2.2.	ХЕМИЈСКА СИНТЕЗА 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА.....	94
2.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	98
2.1.	ПРОТОКОЛИ СИНТЕЗЕ ДЕРИВАТА 2a-h	99
2.1.1.	ОПШТА ПРОЦЕДУРА ЗА ПРИПРЕМУ ДЕРИВАТА 2a-h.....	101
2.1.1.1.	КОНВЕНЦИОНАЛНА СИНТЕЗА ДЕРИВАТА 2a-f.....	101
2.1.1.2.	СИНТЕЗА ДЕРИВАТА 2g-h У МЕДИЈУМУ МИКРОТАЛАСНОГ ЗРАЧЕЊА.....	104
2.2.	ПРОТОКОЛИ <i>IN VITRO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ПРОЦЕНЕ МОГУЋНОСТИ ИЗАЗИВАЊА УНУТРАШЊЕГ КРВАРЕЊА ДЕРИВАТА 2a-h..	106
2.2.1.	ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН.....	106

САДРЖАЈ

2.2.1.1	СНИМАЊЕ АПСОРПЦИОНИХ СПЕКТАРА ДЕРИВАТА 2a-h И ОДРЕЂИВАЊЕ ТАЧАКА НУЛТОГ ПРЕЛАЗА И НЕЗАВИСНЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ.....	106
2.2.1.2.	ОДРЕЂИВАЊЕ ИНТЕНЗИТЕТА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЈЕ ХУМАНОГ СЕРУМСКОГ АЛБУМИНА ПО КОМПЛЕКСИРАЊУ СА ДЕРИВАТИМА 2a-h.....	110
2.2.1.3.	ОДРЕЂИВАЊЕ ПРОЦЕНТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h ПО КОМПЛЕКСИРАЊУ СА ХУМАНИМ СЕРУМСКИМ АЛБУМИНОМ.....	111
2.2.1.3.1.	ПРИПРЕМА ХУМАНОГ СЕРУМСКОГ АЛБУМИНА, ДЕРИВАТА 2a-h И ВАРФАРИНА ЗА HPLC АНАЛИЗУ.....	111
2.2.1.3.2.	ПОСТУПАК HPLC АНАЛИЗЕ РЕЗУЛТАТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h И ВАРФАРИНА ЗА ХУМАНИ СЕРУМСКИ АЛБУМИН.....	111
2.2.1.3.3.	ОБРАДА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h И ВАРФАРИНА ЗА ХУМАНИ СЕРУМСКИ АЛБУМИН.....	112
2.3.	ПРОТОКОЛИ <i>IN SILICO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ПРОЦЕНЕ МОГУЋНОСТИ ИЗАЗИВАЊА УНУТРАШЊЕГ КРВАРЕЊА ДЕРИВАТА 2a-h..	113
2.3.1.	ПРИПРЕМА КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА ХУМАНОГ СЕРУМСКОГ АЛБУМИНА У КОМПЛЕКСУ СА (R)-ВАРФАРИНОМ.....	113
2.3.2.	ДЕФИНИСАЊЕ ПРАВИЛА ЗА МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ.....	114
2.3.2.1.	ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTO DOCK ПРОГРАМА.....	116
2.3.2.2.	ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTO DOCK VINA ПРОГРАМА.....	119
2.3.2.3.	ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА DOCK6 ПРОГРАМА.....	119
2.3.3.	МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h НА ХУМАНОМ СЕРУМСКОМ АЛБУМИНУ.....	120
2.4.	ПРОТОКОЛИ <i>IN SILICO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ПРОЦЕНЕ ТОКСИЧНОСТИ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h НА РАЗЛИЧИТИМ МОДЕЛ ОРГАНИЗМИМА.....	121
2.5.	ПРОТОКОЛИ <i>IN VIVO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ДЕФИНИСАЊА АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h.....	122
2.5.1.	ТРЕТМАН ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ЖИВОТИЊА ПРЕ ПРОЦЕНЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h.....	122
2.5.2.	ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНА АПЛИКАЦИЈА ДЕРИВАТА 2a-h НА ЛАБОРАТОРИЈСКИМ ПАЦОВИМА WISTAR СОЈА.....	122
2.5.3.	ОРАЛНА АПЛИКАЦИЈА ДЕРИВАТА ХРОМАН-2,4-ДИОНА.....	123
2.5.4.	ПРИПРЕМАЊЕ УЗОРАКА КРВНЕ ПЛАЗМЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ХЕМАТОЛОШКИХ МАРКЕРА.....	123
2.5.5.	ПОСТУПАК ОДРЕЂИВАЊА ПРОТРОМБИНСКОГ ВРЕМЕНА ПО QUICK-У.....	123
2.6.	ПРОТОКОЛИ <i>IN VIVO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА БИОХЕМИЈСКИХ МАРКЕРА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН АДМИНИСТАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	125
2.6.1.	ПРИПРЕМАЊЕ УЗОРАКА СЕРУМА.....	125
2.6.2.	ПОСТУПЦИ ОДРЕЂИВАЊА БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗ СЕРУМА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	125
2.6.3.	ПОСТУПЦИ ОДРЕЂИВАЊА БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗ СЕРУМА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	125
2.6.3.1.	ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ AST.....	126
2.6.3.2.	ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ ALT.....	129
2.6.3.3.	ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ ALP.....	131
2.6.3.4.	ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ γ -GT.....	132
2.6.3.5.	ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ УКУПНОГ БИЛИРУБИНА.....	133

2.7.	ПРОТОКОЛИ <i>IN VIVO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА АНТИОКСИДАТИВНОГ СТАТУСА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	137
2.7.1.	ПРИПРЕМА ХОМОГЕНАТА ЈЕТРЕ НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	137
2.7.2.	ПРИПРЕМА ХОМОГЕНАТА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	137
2.7.2.1.	ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ УКУПНИХ ПРОТЕИНА.....	137
2.7.2.2.	ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ GSH.....	139
2.7.2.3.	ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ САТ.....	141
2.7.2.4.	ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ТВARS.....	143
2.7.2.5.	ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ SOD.....	146
2.8.	ПРОТОКОЛИ <i>IN VIVO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ДЕФИНИСАЊА МОРФОЛОШКИХ ПРОМЕНА НА ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	149
2.8.1.	ХИСТОПАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ.....	149
2.8.2.	СТАТИСТИЧКЕ АНАЛИЗЕ.....	150
2.9.	ПРОТОКОЛИ <i>IN SILICO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА МЕХАНИЗАМА АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h <i>IN VIVO</i>.....	151
2.9.1.	ХОМОЛОГО МОДЕЛОВАЊЕ <i>r</i> VKORC1.....	151
2.9.2.	МОЛЕКУЛСКА ОПТИМИЗАЦИЈА ТЕСТИРАНИХ ЈЕДИЊЕЊА.....	153
2.9.3.	СТУДИЈЕ МОЛЕКУЛСКОГ ДОКОВАЊА И ЕНЕРГЕТСКА МИНИМИЗАЦИЈА ЛИГАНД-ЕНЗИМ КОМПЛЕКСА.....	154
2.9.4.	ПОРАВЊАЊЕ БИОАКТИВНИХ КОНФОРМАЦИЈА ДЕРИВАТА 2a-h.....	155
2.9.5.	3-D QSAR СТУДИЈЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h..	156
2.9.5.1.	ГЕНЕРИСАЊЕ ПОЉА МОЛЕКУСКИХ ИНТЕРАКЦИЈА CoMFA и CoMSIA МЕТОДОЛОГИЈОМ.....	156
2.9.5.2.	АНАЛИЗА ПРИНЦИПИЈЕЛНИХ КОМПОНЕНТИ.....	166
2.9.5.3.	ПРОЈЕКЦИЈЕ ЛАТЕНТНИХ СТРУКТУРА.....	176
2.9.5.4.	УНУТРАШЊА ВАЛИДАЦИЈА 3-D QSAR МОДЕЛА.....	185
2.9.5.5.	ЕКСТЕРНА ВАЛИДАЦИЈА 3-D QSAR МОДЕЛА.....	191
2.9.6.	ГЕНЕРИСАЊЕ МОДЕЛА 3-D ФАРМАКОФОРЕ ЗАСНОВАНОГ НА БИОАКТИВНИМ КОНФОРМАЦИЈАМА 2a-h.....	191
2.9.6.1.	ЕКСТЕРНА ВАЛИДАЦИЈА 3-D ФАРМАКОФОРНОГ МОДЕЛА.....	191
2.9.7.	КОНФОРМАЦИОНА АНАЛИЗА 2a- <i>r</i> VKORC1 и 2f- <i>r</i> VKORC1 КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛСКОМ ДИНАМИКОМ.....	192
2.10.	ПРОТОКОЛИ <i>IN VIVO</i> ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ И АНТИГЕНОТОКСИЧНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h.....	193
2.10.1.	ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ.....	195
2.10.2.	ИСПИТИВАЊЕ АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a, 2b и 2f НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ.....	195
2.10.3.	ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a и 2f НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ.....	195
2.10.4.	ИСПИТИВАЊЕ АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a и 2f НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ.....	196
2.10.5.	ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА ОШТЕЋЕЊА ДНК АЛКАЛНИМ КОМЕТ ТЕСТОМ.....	196
2.10.6.	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА.....	198

2.10.7.	ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРКАЛАЦИЈЕ ДНК ДЕРИВАТИМА 2a-h ПОМОЋУ ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ СПЕКТРОСКОПИЈЕ.....	199
2.10.8.	ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ АТРАЗЕ.....	200
2.10.8.1.	ПРОЦЕНА ИНХИБИЦИЈЕ <i>h</i> TOPII α -АТРАЗЕ.....	201
2.10.9.	МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ НА <i>r</i> TOPII α	201
2.10.9.1.	ПРЕГЛЕД СТРУКТУРА TOPII α	201
2.10.9.2.	СЕЛЕКЦИЈА КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА TOPII α	202
2.10.9.3.	ХОМОЛОГО МОДЕЛОВАЊЕ <i>r</i> TOPII α	202
2.10.9.4.	ПРИМЕНА МОЛЕКУЛСКОГ ДОКОВАЊА.....	203
2.10.9.4.1.	ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTODOCK ПРОГРАМА.....	204
2.10.9.4.2.	ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTODOCK VINA ПРОГРАМА.....	204
2.10.9.4.3.	ПОДЕШАВАЊА ПАРАМЕТАРА DOCK6 ПРОГРАМА.....	204
2.10.9.5.	МОДЕЛИРАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h И МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ НА <i>r</i> TOPII α	205
2.10.9.6.	СИМУЛАЦИЈЕ МОЛЕКУЛСКЕ ДИНАМИКЕ.....	205
2.10.9.6.1.	ММ-GBSA ПРОРАЧУНИ И СЛОБОДНА ЕНЕРГИЈА РАЗЛАГАЊА.....	206
3.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	207
3.1.	СИНТЕЗА НОВИХ ДЕРИВАТА 2a-h КАО ПОТЕНЦИЈАЛНИХ АНТАГОНИСТА ВИТАМИНА К У ПРОЦЕСУ КОАГУЛАЦИЈЕ.....	208
3.2.	ПРЕДВИЂАЊЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ НОВОСИНТЕТИСАНИХ ДЕРИВАТА 2a-h.....	210
3.2.1.	ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН.....	210
3.2.2.	ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН У ПРИСУСТВУ АСПИРИНА.....	216
3.2.3.	ОДРЕЂИВАЊЕ ПРОЦЕНТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН.....	217
3.2.4.	МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a И 2f НА ХУМАНОМ СЕРУМСКОМ АЛБУМИНУ.....	220
3.2.5.	ПРЕДВИЂАЊЕ КАРАКТЕРИСТИКА ДЕРИВАТА 2a-h ПОМОЋУ ADMETOX ДЕСКРИПТОРА.....	223
3.3.	АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ, ТОКСИЧНОСТ И ФАРМАКОЛОШКИ ПРОФИЛ ДЕРИВАТА 2a-h.....	224
3.3.1.	АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ.....	224
3.3.2.	АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА 2a И 2f НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ.....	227
3.3.3.	ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ХЕПАТОЦИТА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	229
3.3.4.	ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ХЕПАТОЦИТА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a И 2f.....	230
3.3.5.	АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	231
3.3.6.	АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a И 2f.....	234
3.3.7.	ХИСТОПАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ ТКИВА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА 2a-h.....	236
3.3.8.	ХИСТОПАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ ТКИВА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a И 2f.....	239
3.4.	СТРУКТУРНИ АСПЕКТИ НЕОПХОДНИ ЗА АНТИКОАГУЛАТИВНУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА 2a-h.....	244

3.4.1.	ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2f и 2a за rVKORC1 ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ НЕКОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ.....	245
3.4.2.	ВЕЗИВАЊЕ НЕАКТИВНИХ ДЕРИВАТА ЗА rVKORC1 ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ НЕКОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ.....	248
3.4.3.	ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2f и 2a ЗА rVKORC1 ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ КОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ.....	250
3.4.4.	ВЕЗИВАЊЕ НЕАКТИВНИХ ДЕРИВАТА ЗА rVKORC1 ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ КОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ.....	253
3.4.5.	3-D QSAR СТУДИЈЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h.....	254
3.4.6.	ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D ФАРМАКОФОРЕ КОЈА ОПИСУЈЕ АНТИКОАГУЛАТИВНУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА 2a-h.....	264
3.4.7.	СТУДИЈЕ МОЛЕКУЛСКЕ ДИНАМИКЕ 2f и 2a У КОМПЛЕКСУ СА rVKORC1 КОЈЕ ОПИСУЈУ АНТАГОНИСТИЧКУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА.....	269
3.5.	ПРОЦЕНА УТИЦАЈА АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h НА ГЕНОМ.....	277
3.5.1.	ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ДНК У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h.....	277
3.5.2.	АНТИГЕНОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА 2a, 2b и 2f У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА.....	279
3.5.3.	ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ДНК У ЈЕТРИ, БУБРЕЗИМА И КОСНОЈ СРЖИ НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА 2a и 2f.....	281
3.5.4.	АНТИГЕНОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА 2a и 2f У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА.....	283
3.5.5.	ФИЗИОЛОШКИ И ФАРМАКОЛОШКИ АСПЕКТИ ГЕНОТОКСИЧНЕ И АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА.....	285
3.5.5.1.	ИНТЕРАКЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h СА TOPIIα ТОКОМ КАТЕНАЦИЈЕ ДНК.....	290
3.5.5.2.	ИНТЕРАКЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h СА hАТРАЗА ДОМЕНОМ hTOPIIα.....	292
3.5.5.3.	ИНХИБИЦИЈА АКТИВНОСТИ hАТРАЗЕ КАО СТРУКТУРНОГ КОНСТИТУЕНТА hTOPIIα ДЕРИВАТИМА 2a-h.....	293
3.5.5.4.	ПРЕТПОСТАВЉЕНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ ЕМС-А И ДЕРИВАТА 2a-h СА rTOPIIα...	294
3.5.5.5.	РЕПРОДУКЦИЈА КО-КРИСТАЛИЗОВАНИХ СТРУКТУРА ИНХИБИТОРА hTOPIIα.....	296
3.5.5.6.	МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ЕМС-А – ДНК ОШТЕЋЕЊЕ ИЗАЗВАНО АЛКИЛИРАЈУЋИМ АГЕНСОМ.....	299
3.5.5.7.	МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ АТР-А – НАСТАНАК КОМЕТА.....	301
3.5.5.8.	МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a, 2b и 2f – УВИД У МЕХАНИЗАМ АНТИГЕНОТОКСИЧНОСТИ.....	302
3.5.5.9.	МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА 2c, 2d, 2e, 2g и 2h – УВИД У МЕХАНИЗАМ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ.....	307
3.5.5.10.	МОЛЕКУЛСКА ДИНАМИКА 2a-, 2b- и 2f-АТР-rTOPIIα КОМПЛЕКСА – ЗАШТО НИЈЕ ДОШЛО ДО РАЗВОЈА КОМЕТА?.....	313
3.5.5.11.	МОЛЕКУЛСКА ДИНАМИКА 2c-, 2d-, 2e-, 2g- и 2h-АТР-rTOPIIα КОМПЛЕКСА – ЗАШТО ЈЕ ДОШЛО ДО РАЗВОЈА КОМЕТА?.....	318
3.5.5.12.	ДЕКОМПОЗИЦИЈА СЛОБОДНЕ ЕНЕРГИЈЕ ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h ЗА rАТРАЗУ.....	324
3.5.5.13.	МЕХАНИЗАМ АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a, 2b и 2f И ГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2c, 2d, 2e, 2g и 2h.....	325

САДРЖАЈ

4.	ЗАКЉУЧАК.....	330
5.	ЛИТЕРАТУРА.....	335
6.	БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ.....	348
7.	ПРИЛОЗИ.....	359

Резиме

Приложени рукопис сумира синтезу шест нових деривата 3-(1-аминоетилиден) хроман-2,4-диона, означених као **2a-f**, и два нова деривата 4-хидрокси-3-(1-иминоетил)-2*H*-хромен-2-она означених као **2g-h**, односно евалуацију њихове *in vivo* антикоагулативне активности након интраперитонеалне и оралне апликације на одраслим пацовима Wistar соја, са циљем процене њиховог клиничког антикоагулативног потенцијала, фармакологије и токсичности.

Процена антикоагулативног потенцијала започета је одређивањем афинитета везивања деривата **2a-h**, односно варфарина, за серумски албумин *in vitro*, протеин крви који омогућава транспорт једињења ка витамин К 2,3-епоксид редуктази субјединици 1 (VKORC1). Интеракција испитваних кондензата са крвним транспортером сагледана је у циљу процене безбедности апликације нових антикоагуланата пре саме администрације *in vivo*. Применом студија емисије флуоресцентног зрачења, којом су добијене вредности константи асоцијације и броја везивних места након интеракције са албумином, односно HPLC анализе, са циљем дефинисања константе дисоцијације и броја не-везаних молекула антикоагуланта, утврђено је да се хроман-2,4-дионски деривати **2a** и **2f** везују за албумин на начин сличан варфарину, што их издваја од осталих деривата као потенцијалне антикоагуланте. Надаље, студијама молекулског доковања потврђено је везивање деривата **2a** и **2f** у субдомену Па хуманог серумског албумина, који је кристалографским студијама нотиран као центар везивања варфарина за крвни транспортер. Такође, доказано је да **2a** и **2f** показују већи афинитет везивања за албумин у односу на варфарин, што имплицира смањену могућност изазивања унутрашњег крварења у односу на клинички антикоагулант.

Предвиђање ADMETох особина деривата **2a-h** помоћу *in silico* дескриптора спроведено је ради сагледавања фармакокинетичких и фармакодинамичких особина тестираних деривата након доспећа у организам. Антиципирано је да ће се сва једињења, изузев **2h**, лако ресорбовати у цревима. Деривати **2b** и **2d** умерено су растворни у води, а остали добро. За једињење **2f** постоји већа вероватноћа да ће се везати за албумин, као транспортни протеин, него **2a**, што је имплицирало већи антикоагулативни потенцијал овог једињења. Пролазак деривата кроз крвно-мождану баријеру умерено је остварив. Обзиром да испитивани деривати не инхибирају ензим

Цитохром P450 2D6, у првој фази метаболизма могу лако подлећи хидроксилацији и екскрецији у виду глукуронида. ADMETоx особине деривата **2a** и **2f** не имплицирају потенцијалну токсичност по хепатоците.

Почетна евалуација синтетисаних деривата у *in vitro* условима праћена је администрацијом деривата **2a-h** *in vivo* на лабораторијским животињама Wistar соја. Потенцијални антикоагуланти администрирани су најпре интраперитонеално у три различите концентрације (0,5, 1 и 2 mg/kg телесне масе), током седмодневног третмана. Као позитивна контрола коришћен је раствор варфарина еквивалентних концентрација. Деривати **2a** и **2f**, у концентрацији од 2 mg/kg телесне тежине, показали су одличну антикоагулативну активност (PT = 90 секунди за **2a**, PT = 130 секунди за **2f**), упоредиву или бољу у односу на варфарин (PT = 89 секунди), те су укључени у даља испитивања активности оралном апликацијом у концентрацији од 20 mg/kg телесне масе (референтни начин примене антикоагуланата у клиничкој пракси). На основу добијених INR вредности за деривате **2a** (INR = 2,6) и **2f** (INR = 2,8), може се антиципирати да би ови деривати хроман-2,4-диона били делотворни медикаменти намењени пацијентима који болују од тромбозе и фибрилације срчаних преткомора.

Фармакологија антикоагулативне активности тестираних деривата сагледана је применом молекулског моделирања на молекуларном нивоу. Молекулска мета био је хомологи модел *Rattus norvegicus* VKORC1 (*r*VKORC1). Студијама молекулског доковања генерисане су биоактивне конформације деривата **2a-h** као антагониста *r*VKORC1, као основ за разумевање интеракција антикоагуланата са молекулском метом, односно, фармакологије антагонизма циклуса витамина К. Резултати доковања указали су да **2a-h** јесу реверзибилни антагонисти *r*VKORC1. Из дефинисаних биоактивних конформација проистиче да **2a** и **2f** своју антикоагулативну активност испољавају након остваривања есенцијалне водоничне везе са аминокиселином из активног центра *r*VKORC1, *r*Cys135. Као антикоагуланти, **2a** и **2f** прихватају протон са сулфхидрилне групе *r*Cys135 и понашају се као акцептори водоничне везе. Механизам антикоагулативне активности деривата **2a** и **2f** одвија се трансфером протона са SH групе *r*Cys135, на карбонилни кисеоник са положаја C4 хроман-2,4-дионског језгра антикоагуланата.

Механизам антикоагулативне активности потврђен је на више нивоа: генерисањем 3-D QSAR студија, 3-D фармакофорног модела и молекулском динамиком. Генерисани робустни 3-D QSAR модели, добијени преклапањем антагониста на основу структуре рецептора (CoMFA: $r^2 = 0,927$, $q^2_{\text{LOO}} = 0,793$; CoMSIA

стерни модел: $r^2 = 0,908$, $q^2_{\text{LOO}} = 0,785$; CoMSIA хидрофобни модел: $r^2 = 0,929$, $q^2_{\text{LOO}} = 0,724$; CoMSIA модел донора и акцептора водоничне везе: $r^2 = 0,853$, $q^2_{\text{LOO}} = 0,764$) пружили су увид у фармаколошки активне регионе аплицираних једињења, који су укључени у интеракције са rVKORC1. Све интеракције значајне за антикоагулативну активност сумиране су у 3-D фармакофорни модел, који садржи карактеристике акцептора водоничне везе и хидрофобних ароматичних интеракција, а квантификован је најбољим корелационим коефицијентом са вредношћу $r = 0,97$. Констатовано је да постоји висок степен корелације између позиционирања CoMFA/CoMSIA PLS-коефицијената и генерисаних фармакофорних особина. Финална потврда предложеног механизма антикоагулативне активности антагониста **2f** и **2a** добијена је након студија молекуларске динамике. Симулацијама интеракција деривата **2f** и **2a** са rVKORC1 у ћелијској мембрани ендоплазматског ретикулума јетре, потврђено је присуство већ поменутих водоничних веза са rCys135 (која је кључна за антикоагулативну активност **2f** и **2a**), односно осталих хидрофобних и електростатичких интеракција које деривати остварују у активном центру молекуларске мете. Приликом симулације индукованог прилагођавања деривата **2f** у активном центру rVKORC1, констатована је још једна, веома стабилна водонична веза, која се формира између амидног азота rAsn142 и C2 карбонилног кисеоника другог језгра хроман-2,4-диона. Формирање ове додатне везе код **2f** може бити узрок бољег антикоагулативног потенцијала овог једињења у односу на **2a**.

Токсиколошки профил нотираних антикоагуланата дефинисан је на три нивоа: проценом хемијског оштећења јетре и бубрега праћењем вредности клиничких маркера, проценом изазваног оксидативног стреса и проценом утицаја на геном. Процена хемијски изазваног оштећења јетре након интраперитонеалне администрације деривата **2a-h**, односно оралне администрације **2a** и **2f**, извршена је одређивањем каталитичких активности ензима серума, аспартат трансминазе (AST), аланин трансминазе (ALT) и алкалне фосфатазе (ALP), γ -глутамил трансферазе (γ -GT), те праћењем концентрације билирубина. Вредности маркера показали су да испитивани деривати изазивају мања оштећења хепатоцита у односу на клинички антикоагулант варфарин. Каталитичка активност и концентрације маркера оксидативног стреса јетре и бубрега такође су указали на то да једињења, у поређењу са варфарином, проузрокују мањи степен оштећења хепатоцита и нефроцита, те да је ниво оксидативног оштећења виталних органа занемарљив. Надаље, хистопатолошким испитивањима узорака ткива јетре и бубрега након интраперитонеалне администрације деривата **2a-h**, односно

оралне администрације **2a** и **2f**, утврђено је да испитивана једињења изазивају знатно блаже патолошке промене на јетри и бубрезима у односу на варфарин.

Последња процена нивоа токсичности деривата **2a-h** након интраперитонеалне и оралне администрације била је у смислу дефинисања утицаја потенцијалних антикоагуланата на геном јетре и бубрега помоћу комет теста. Генотоксичност и антигенотоксичност свих деривата дефинисана је у односу на етил метансулфонат, ЕМС, доказани мутаген. У поређењу са ЕМС-ом, вредности просечног момента репа и процента денатуриране ДНК у репу комете, односно параметара на основу којих се процењује оштећење ДНК, за тестиране деривате биле су ниже. Деривати **2a**, **2b** и **2f** нису се понашали генотоксично, те су подвргнути испитивањима у циљу потврђивања антигенотоксичности. Са друге стране, деривати **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h** испољили су генотоксични потенцијал. Антигенотоксичност селектованих деривата дефинисана је након претретмана лабораторијских животиња антикоагулантима у односу на ЕМС. У узорцима засићеним антикоагулантима, вредности параметара укупног скорa и процената редукције укупног скорa комета указале су на умањење генотоксичног ефекта ЕМС-а. ЕМС као алкилујући агенс изазива оштећења ДНК на нивоу гуанина и тимина; у присуству алкилујућег агенса циљани нуклеотиди трпе електрофилни напад етил групе након чега долази до формирања лезија O^6 -етилгуанинског или O^4 -етилтиминског типа. Настанак лезија најпре се рефлектује на процес неприродног спаривања база G=T и T=G; уколико не дође до уклањања лезије каталитичким деловањем O^6 -алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазе, неприродно спаривање последично може утицати и на репликацију, транскрипцију и транслацију. Експериментално се патофизиолошки процес формирања лезија потврђује електрофоретским стварањем комета, катализованим пацовском Топоизомеразом II α (*Rattus norvegicus* TopII α , rTopII α). Комет есеј квантификује денатурацију структуре суперувијања ДНК, односно процесе декатенације и катенације. Деловањем ЕМС-а, лезије O^6 -етилгуанинског типа формирају се на нивоу структуре суперувијања ДНК. Лезије се могу формирати непосредно пре декатенације, на двострукој спирали суперувијене ДНК са функцијом капије, G-ДНК (енг. Gate-DNA), односно на мигрирајућој двострукој спирали суперувијене ДНК, T-ДНК (енг. Transport-DNA), која након декатенације пролази кроз G-ДНК. Формирање комета одвија се након АТР-зависне декатенације двоструког α -хеликса ДНК у структури суперувијања. Стога је механизам генотоксичности деривата **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h**, односно антигенотоксичног

деловања деривата **2a**, **2b** и **2f** испитиван на нивоу $r\text{TopII}\alpha$, применом молекулског доковања, молекулске динамике и израчунавањем слободне енергије везивања деривата **2a-h** за $r\text{ATP}\alpha$. Молекулским доковањем и молекулском динамиком потврђено је да антигенотоксични агенси **2a**, **2b** и **2f** јесу компетитивни инхибитори $r\text{ATP}\alpha$ домена $r\text{TopII}\alpha$, да инхибирају хидролизу АТР-а пре процеса раскидања G-ЕМС који је катализован ензимом $r\text{TopII}\alpha$, те да свој потенцијал испољавају ускраћивањем метаболичке енергије за процес декатенације. Ускраћивањем метаболичке енергије за физиолошку функцију $r\text{TopII}\alpha$ не долази до декатенације двоструке спирале G-ЕМС и проласка T-ЕМС. Тиме се спречава испољавање мутагених и генотоксичних својстава ЕМС-а. Стога се деривати **2a**, **2b** и **2f** могу користити у антиканцер терапији алкилујућим агенсима као контролори степена алкилације. Са друге стране, генотоксична једињења **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h** не инхибирају хидролизу АТР-а и на тај начин подстичу $r\text{TopII}\alpha$ да се понаша као физиолошки отров. Ова једињења додатно стабилизују $r\text{TopII}\alpha$ -G-ЕМС раскидајући комплекс и инхибирају религацију ДНК пацова, што се и бележи настанком комета. Ипак, и једињења са генотоксичним ефектом **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h**, такође се могу користити у антиканцер терапији као агенси који активирају цитотоксично деловање ензима топоизомеразе II α и на тај начин спречавају биосинтезу протеина ћелија тумора.

Физиолошки активна једињења **2a** и **2f** јесу потенцијални клинички антикоагуланти. Њихов фармаколошки и токсиколошки профил детаљно је представљен након *in vitro-in vivo-in silico* претклиничких испитивања.

Summary

The enclosed manuscript summarizes the efforts of synthesis and evaluation of six novel 3-(1-aminoethylidene)chromane-2,4-diones, namely **2a-f**, as well as of two novel 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2*H*-chromene-2-one derivatives, namely **2g-h**, as *in vivo* anticoagulants by means of *intraperitoneal* and *per os* administration to adult male Wistar rats. Condensates were screened to expose their anticoagulant potential, pharmacology and toxicity.

The biochemical evaluation started with the comparison of binding affinities of **2a-h**, as potential hits, and warfarin, as clinical anticoagulant, to serum albumin *in vitro*, a blood protein that mediates the transport of compounds to vitamin K 2,3-epoxide reductase subunit 1 (VKORC1). The understanding of potential anticoagulants interactions with the carrier protein shed a light on compounds safety prior to the actual administration *in vivo* to the model organism. Hence, the results obtained from fluorescence quenching studies, in the form of association constants and number of binding sites, as well as from HPLC analysis, by means of providing the dissociation constants and number of un-bound molecules, implied that derivatives **2a** and **2f** bind to the serum albumin in the same manner as warfarin, which distinguishes particular leads from other hits as potential clinical anticoagulants. Furthermore, molecular docking studies described the binding modes of **2a** and **2f** within the subdomain IIa of human serum albumin, a pocket where, according to the previously performed crystallographic studies, the binding of warfarin to the blood transporter occurs. It was also shown that, in relation to warfarin, **2a** and **2f** exhibit higher binding affinity to albumin, which implies a reduced possibility of causing internal bleeding against a clinical anticoagulant.

The prediction of derivatives **2a-h** ADMETox features, by means of collecting *in silico* descriptors values, was performed to anticipate the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of tested derivatives after the maturation in model organism. It is foreseen that all the compounds, except **2h**, can be easily absorbed in the intestines. Moreover, derivatives **2b** and **2d** are moderately water-soluble whereas the others are well water-soluble. Compound **2f** is more likely to be bound to albumin than **2a**, indicating higher anticoagulant potential. The entire battery of compounds possesses the medium potency to penetrate the blood-brain-barrier. Since they do not inhibit the Cytochrome P450 2D6,

compounds can readily undergo hydroxylation in the first phase of metabolism and are going to be excreted as glucuronides. Summarizing the ADMETox properties, results do not proclaim potential toxicity towards hepatocytes in the future treatment of tissue with **2a** and **2f**.

The introductory *in vitro* evaluation of synthesized derivatives was followed by the administration of **2a-h** *in vivo* on laboratory rats of Wistar strain. Potential anticoagulants were first administered intraperitoneally in three different concentrations (0.5, 1 and 2 mg/kg of body weight), during a seven-days treatment. As a positive control, a solution of warfarin was used, in the same concentration. Composites **2a** and **2f** showed excellent anticoagulant activity upon the administration in concentration of 2 mg/kg of body weight (PT = 90 seconds for **2a**, PT = 130 seconds for **2f**), comparable or better in relation to warfarin (PT = 89 seconds), and were included in further examination as oral anticoagulants in concentration of 20 mg/kg of body weight (*i.e.* the reference method for administration of anticoagulants in clinical practice). According to the obtained INR values for **2a** and **2f** (INR equal to 2.6 and 2.8, respectively), a closure can be made that chroman-2,4-dione derivatives would be effective medicaments for patients suffering from thrombosis and atrial fibrillation.

The pharmacology of anticoagulant activity of tested derivatives was investigated on molecular level using the prominent molecular modelling techniques. Modelling studies were conducted on homology-modelled *Rattus norvegicus* VKORC1 (*r*VKORC1) as molecular target. Molecular docking studies revealed the bioactive conformations of **2a-h** as a prerequisite for *r*VKORC1 antagonism. Hence, docking results indicated that **2a-h** are reversible *r*VKORC1 antagonists and that **2a** and **2f** exert anticoagulant activity upon establishing the essential hydrogen bond with *r*Cys135, the *r*VKORC1 active site residue. As anticoagulants, **2a** and **2f** accept the proton from *r*Cys135 sulfhydryl group and behave as hydrogen-bond acceptors. The pharmacology of **2a** and **2f** anticoagulant activity is carried out by transferring the proton from *r*Cys135 SH group towards the carbonyl oxygen at position C4 of the chroman-2,4-dione core. And so forth, molecular docking provided the basic understanding of **2a** and **2f** pharmacology as vitamin K cycle antagonists.

The mechanism of anticoagulant activity was externally validated by several different approaches: by conducting the 3-D QSAR studies, by generating a unique 3-D pharmacophore model, was well as by managing the molecular dynamics simulations. Generated robust structure-based 3-D QSAR models (CoMFA: $r^2 = 0.927$, $q^2_{\text{LOO}} = 0.793$;

CoMSIA steric model: $r^2 = 0.908$, $q^2_{\text{LOO}} = 0.785$; CoMSIA hydrophobic model: $r^2 = 0.929$, $q^2_{\text{LOO}} = 0.724$; CoMSIA hydrogen donor and acceptor model: $r^2 = 0.853$, $q^2_{\text{LOO}} = 0.764$) confirmed the pharmacologically active regions of administered compounds involved in the interactions with *r*VKORC1. At the end, all the crucial interactions for the anticoagulant activity were summarized into the structure-based 3-D pharmacophore model, complied of hydrogen-bond acceptors (HBA) and hydrophobic aromatic (Hy) features, and quantified by a best correlation coefficient $r = 0.97$. In a few words, there is a high degree of correlation between the alignment of CoMFA/CoMSIA PLS-coefficients and generated 3-D pharmacophoric properties. The final confirmation of proposed mechanism of anticoagulant activity of **2f** and **2a** antagonists was derived after the structure-based molecular dynamics studies have been performed. The simulations of induced fit interactions in the cell membrane of liver endoplasmic reticulum between the **2f** and **2a** and *r*VKORC1 proved the inauguration of already described hydrogen bond with *r*Cys135, as well as of other hydrophobic and electrostatic bioforces generated between the anticoagulants and the molecular target active site. During the simulation of structure-based alignment of **2f** within the *r*VKORC1 active site, an additional stable hydrogen bond was formulated between the *r*Asn142 amide oxygen and the C2 carbonyl oxygen of the second chroman-2,4-dione core. Particular bond may lead to the better anticoagulant potential of **2f** in relation to **2a**.

The toxicological profile of remarked anticoagulants was defined on three levels: an assessment of chemically induced damage of liver and kidneys by monitoring the clinical marker values, the appraisal of chemically induced oxidative stress, and the estimation of chemically induced damage on the genome. The assessment of chemically induced liver damage, after the *intraperitoneal* administration of **2a-h**, as well as after the following oral administration of **2a** and **2f**, was performed by determining the catalytic activity of serum enzymes, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transferase (γ -GT), and by monitoring the bilirubin concentration. The results showed that investigated derivatives caused less damage to hepatocyte than the clinical anticoagulant warfarin. Furthermore, the catalytic activities and concentrations of liver and kidneys oxidative stress markers also indicated that compounds, when compared to warfarin, generated less damage to hepatocytes and nephrons, as well as the level of oxidative damage to vital organs is negligible. Furthermore, the histopathological studies of liver and kidney after the *intraperitoneal* administration of derivatives **2a-h**, or the

oral administration **2a** and **2f**, showed that the tested compounds provoke minor pathological changes related to warfarin.

The final stage in the **2a-h**-based toxicity level estimation was to define the effects of potential anticoagulants on the liver and kidney genome by comet assay, either after *intraperitoneal* or oral administration. The genotoxicity and antigenotoxicity of all derivatives were compared to ethyl methanesulfonate, EMS, a proven mutagen. Hence, according to the parameters that can be used to evaluate the DNA damage, *i.e.* the average tail moment and the percentage of denatured DNA in the comet tail values, tested compounds were inferior genotoxins compared to EMS. In fact, derivatives **2a**, **2b** and **2f** showed no genotoxic activity and were further included in trials to confirm their antigenotoxicity. On the other hand, derivatives **2c**, **2d**, **2e**, **2g**, and **2h** behaved as genotoxic agents. The antigenotoxicity of **2a**, **2b** and **2f** in the presence of EMS was defined after the pre-treatment of laboratory animals with anticoagulants. In the samples saturated with anticoagulants, the total score as well as the percentage of the comets total score reduction values indicated an alleviation of EMS genotoxic potency. EMS, as an alkylating agent causes DNA damage on guanine and thymine level; in the presence of an alkylating agent, particular nucleotides suffer an ethyl group electrophilic attack, followed by the formation of *O*⁶-ethylguanine or *O*⁴-ethylthymine lesions. The lesions formation is primarily reflected on the unnatural pairing of G=T and T=G. If there is no lesion repair catalyzed by *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, unnatural coupling can consequently influence the replication, transcription and translation processes. The aberration-based pathophysiological process can be experimentally confirmed by the electrophoretic comet formation, catalyzed by rat topoisomerase II α (*Rattus norvegicus* TopII α , *rTopII* α). The comet assay quantifies the denaturation of the supercoiled DNA structure, *i.e.* the processes of decatenation and catenation. Upon the EMS-induced alkylation, the *O*⁶-ethylguanine-type lesions are formed on the supercoiled DNA level, before the decatenation of the double strands of supercoiled DNA. The alkylation may occur on two sites: on a migrating double strand of supercoiled DNA, *i.e.* the T-DNA (Transport-DNA), as well as on the G-DNA (*i.e.* the Gate-DNA), serving as a gate for the T-DNA passage upon the decatenation process. Hence, the comet formation occurs after the ATP-dependent decatenation of supercoiled DNA double α -helix. Therefore, the mechanism of either genotoxicity of **2c**, **2d**, **2e**, **2g** and **2h**, or antigenotoxicity of **2a**, **2b** and **2f**, was investigated on *rTopII* α level, using molecular docking and molecular dynamics, as well as by calculating the free binding energy of **2a-h** within the *rATPase*.

Molecular docking and molecular dynamics simulations confirmed that the antigenotoxic agents **2a**, **2b**, and **2f** are competitive inhibitors of *r*ATP-ase domain in *r*TopII α . Compounds exert antigenotoxic activity by inhibiting the ATP hydrolysis, prior to the *r*TopII α -catalyzed G-EMS cleavage, thus reducing the metabolic energy needed for the decatenation process. When the absence of metabolic energy occurs, there is no *r*TopII α -mediated decatenation of G-EMS double strand and therefore no passage of T-EMS double strand. In such manner **2a**, **2b**, and **2f** prevent the expression of EMS mutagenic and genotoxic properties. Therefore, derivatives **2a**, **2b**, and **2f** may be used in alkylation agents-based anticancer therapy as supplements that may control the rate of alkylation. On the other hand, genotoxic compounds **2c**, **2d**, **2e**, **2g** and **2h** do not inhibit ATP hydrolysis and *de facto* stimulate *r*TopII α to act as a physiological poison. These compounds additionally stabilize the *r*TopII α -G-EMS cleavage complex and inhibit the religation of rat DNA, which is also noted during the comet formation. However, compounds with a genotoxic effect like **2c**, **2d**, **2e**, **2g** and **2h** can be also used in anticancer therapy as agents that activate the cytotoxic activity of the Topoisomerase II α and thus prevent the biosynthesis of proteins in tumor cells.

Conclusive, physiologically active compounds **2a** and **2f** are potential clinical anticoagulants. Their pharmacological and toxicological profile have been presented in detail after *in vitro*, *in vivo* and *in silico* preclinical tests.

СКРАЋЕНИЦЕ

ADP	– аденозин дифосфат (енг. Adenosine diphosphate)
AGT	– алкилгуанин ДНК трансфераза (енг. <i>O</i> ⁶ -alkylguanine DNA transferase)
ALP	– алкална фосфатаза (енг. Alkaline phosphatase)
ALT	– аланин трансминаза (енг. Alanine aminotransferase)
AMPPNP	– аденозин 5'-(β,γ-имидо)трифосфат (енг. Adenosine 5'-(β,γ-imido)triphosphate)
APC	– активирани протеин C (енг. Activated protein C)
AST	– аспартат трансминаза (енг. Aspartate aminotransferase)
ATP	– аденозин трифосфат (енг. Adenosine triphosphate)
cAMP	– циклични аденозин монофосфат (енг. Cyclic adenosine monophosphate)
CAT	– каталаза (енг. Catalase)
CCPms	– модули комплементарних контролних протеина (енг. complement control protein modules)
CoMFA	– упоредна анализа поља молекулских интеракција (енг. Comparative Molecular Field Analysis)
CoMSIA	– упоредна анализа индикатора сличности молекула (енг. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis)
COX	– циклооксигеназа (енг. Cyclooxygenase)
DA	– тачност доковања (енг. Docking Accuracy)
DAG	– диацилглицерол (енг. Diacylglycerol)
DOX	– доксорубицин (енг. Doxorubicin)
DTT	– дитиотреитол (енг. Dithiothreitol)
EC	– експериментална конформација (енг. Experimental Conformation)
ECCD	– унакрсно доковање експерименталне конформације (енг. Experimental Conformation Cross-Docking)
ECRD	– поновно доковање експерименталне конформације (енг. Experimental Conformation Re-Docking)
EGF	– епидермални фактор раста (енг. Epidermal growth factor)
FPA	– фибринопептид А (енг. Fibrinopeptide A)
FPB	– фибринопептид В (енг. Fibrinopeptide B)
GAS6	– протеини регулатори ћелијског раста (енг. Growth arrest specific gene 6 protein)
GFP	– протеин који флуоресцира зеленом бојом (енг. Green fluorescent protein)
GGCX	– γ-глутамил карбоксилаза (енг. γ-glutamyl carboxylase)
Gla	– γ-карбоксиглутаминска киселина (енг. γ-carboxyglutamic acid)
GP	– гликопротеин (енг. Glycoprotein)
GSH	– редуковани глутатион (Reduced glutathione)
HC	– тешки ланац (енг. Heavy Chain)
HСII	– хепарин кофактор II (енг. Heparin cofactor II)
HK	– високомолекуларни кининоген (енг. High molecular weight kininogen)
ICAM	– интрацелуларни адхезиони молекул (енг. Intercellular adhesion molecule)
IFCC	– интернационална федерација за клиничку хемију (енг. International Federation of Clinical Chemistry)

СКРАЋЕНИЦЕ

IgA	– имуноглобулин А (енг. Immunoglobulin A)
IgG	– имуноглобулин G (енг. Immunoglobulin G)
IL	– интерлеукини (енг. Interleukin)
INR	– International Normalized Ratio
IP	– рецептори на мембрани тромбоцита преко којих се везује простагландин (енг. Prostaglandin I ₂ receptor)
IP ₃	– инозитол-1,4,5-трифосфат (енг. Inositol trisphosphate)
ISI	– интернационални индекс сензитивности (енг. International Sensitivity Index)
K	– каликреин
LC	– лаки ланац (енг. Light Chain)
LMPA	– агароза са ниском тачком топљења (енг. Low melting point agarose)
LOO	– избаци-један-напоље (енг. Leave-One-Out) приступ
MDA	– малондиалдехид (енг. Malondialdehyde)
MIF	– поље молекулских интеракција (енг. Molecular Interaction Field)
MM-GBSA	– енг. Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area
PARs	– рецептори активирани протеазама (енг. Protease-activated receptors)
PBS	– фосфатни пуфер (енг. Phosphate-buffered saline)
PCA	– анализа принципијелних компонени (енг. Principal Component Analysis)
PDI _s	– протеин дисулфид изомеразе (енг. Protein disulfide isomerases)
PGI ₂	– простагландин I ₂ (енг. Prostaglandin I ₂), простагландин
PIP ₂	– фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (енг. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PK	– прекаликреин (енг. Prekallikrein)
PKC	– протеин киназа C (енг. Protein kinase C)
PLA ₂	– фосфолипаза A ₂ (енг. Phospholipase A ₂)
PLCβ	– фосфолипаза Cβ (енг. Phospholipase Cβ)
PLS	– пројекција латентних структура (енг. Projection of Latent Structures или Partial Least Squares)
PNI	– протеаза нексин I (енг. Protease nexin I)
PRGPs	– протеини са високом концентрацијом пролина (енг. proline-rich Gla-proteins)
PT	– протромбинско време (енг. Prothrombin time)
RCCD	– унакрсно доковање насумичне конформације (енг. Randomized Conformation Cross-Docking)
RCRD	– поновно доковање насумичне конформације (енг. Randomized Conformation Re-Docking)
RMSD	– Root Mean Square Deviation
RMSF	– Root-Mean-Square Fluctuations
RRHO	– енг. Rigid Rotor Harmonic Oscillator
SDEP	– стандардна девијација грешке предвиђања (енг. Standard deviation error of prediction)
SOD	– супероксид дизмутаза (енг. Superoxide dismutase)

СКРАЋЕНИЦЕ

TAFI	– тромбин-активирајући инхибитор фибринолизе (енг. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor)
TBARS	– тиобарбитурна киселина-реагујуће супстанце (енг. Thiobarbituric acid reactive substances)
Tdp2	– тирозил-ДНК фосфодиестераза 2 (енг. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2)
TF	– ткивни фактор (енг. Tissue factor)
TFPI	– инхибитор пута ткивног фактора (енг. Tissue factor pathway inhibitor)
TGs	– трансглутаминаза (енг. Transglutaminases)
TMGPs	– трансмембрански Gla протеини (енг. Transmembrane Gla proteins)
TMs	– трансмембрански хеликси (енг. Transmembrane helices)
TopII α	– топоизомераза II α (енг. Topoisomerase II α)
TOPRIM	– Topoisomerase/PRIMase
t-PA	– ткивни активатор плазминогена (енг. tissue plasminogen activator)
TS	– прелазно стање (енг. Transition state)
TxA ₂	– тромбоксан A ₂ (енг. Thromboxane A ₂)
VCAM	– васкуларног ћелијског адхезионог молекула (енг. Vascular cell adhesion molecule)
VKA	– антагониста витамина К (енг. Vitamin K antagonist)
VKC	– витамин К-зависна карбоксилаза (енг. Vitamin K carboxylase)
VKOR	– витамин К епоксид редуктаза (енг. Vitamin K epoxide reductase)
VKORC1	– субјединица 1 витамин К епоксид редуктаза мултипротеинског комплекса (енг. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1)
vWF	– von Willebrand-ов фактор
W	– варфарин (енг. Warfarin)
WHD	– Winged-Helix Domain
λ_{CICP}	– тачка независне концентрације (енг. Concentration-invariant crossing point)
γ -GT	– γ -глутамил трансфераза (енг. γ -glutamyl transferase)
λ_{ZCP}	– тачка нултог прелаза (енг. Zero-crossing point)
EMC	– етил метансулфонат

1. **Слика 1.1.** Пресек артерије и приказ кретања крви под нормалним околностима хемостазе. 1) еритроцити, 2) тромбоцити, 3) појединачни наддражајни облици тромбоцита, 4) ендотел крвног суда, 5) еластична и колагена влакна, 6) фиброцит. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације, Југоремедија Зрењанин, 1980.*
2. **Слика 1.2.** Структура крвног суда приказана у попречном пресеку.
3. **Слика 1.3.** Приказ Ca^{2+} канала. Структурни елементи су субјединице α_1 , $\alpha_2\delta$, β и γ . Субјединица α_1 садржи четири хомолога домена, а сваки од домена обухвата шест трансмембранских хеликса (хеликси осетљиви на промену напона су приказани розе бојом).
4. **Слика 1.4.** Приказ тромбоцита у крвном суду. 1) псевдоподије, 2) микротубули, 3) микрофиламенти, 4) Голџијева телашца, 5) гликогенске грануле, 6) митохондрије, 7) грануле, 8) вакуоле, 9) ендоплазматски ретикулум, 10) азурофилне грануле. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације, Југоремедија Зрењанин, 1980.*
5. **Слика 1.5.** Приказ тромбоцита посматран под електронским микроскопом.
6. **Слика 1.6.** Везивање тромбоцита за колагена влакна. 1) ендотелне ћелије, 2) дефект у ендотелу, 3) тромбоцити (наддражајни облик) се везују уз колагена влакна и на ендотел, 4) изразито набубрели тромбоцит, 5) леукоцит у моменту напуштања крвног суда, 6) фиброцит. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације, Југоремедија Зрењанин, 1980.*
7. **Слика 1.7.** Процес адхезије тромбоцита. Представљени су GPIa/IIa и GPIb-V-IX као рецептори крвних плочица и њихова интеракција von Willebrand-овим фактором што доводи до адхезије крвних плочица на субендотелијум оштећеног крвног суда.
8. **Слика 1.8.** Приказ процеса агрегације који се наставља на адхезију тромбоцита (приказани су сивом бојом). Представљени су рецептори активирани протеазама, PAR1 и PAR4 на површини тромбоцита, начин на који се они активирају тромбином; затим P2Y₁ и P2Y₁₂ рецептори на површини тромбоцита за ADP; тромбоксан A₂ који настаје из фосфолипида ћелијске мембране тромбоцита и простагландин I₂ који се синтетише у ендотелним ћелијама и инхибира активацију тромбоцита.
9. **Слика 1.9.** Сигнални путеви активације тромбоцита. IP, PAR-1, 5HT_{2A}, TP и P2Y₁₂ су рецептори смештени на површини тромбоцита преко којих се везују простациклин, тромбин, серотонин, тромбоксан A₂ и ADP. Гликопротеини који се куплују са наведеним рецепторима су G_s, G_{12/13}, G_q и G_i. β и γ су субјединице G_i-типа хетеротрименог G-протеина. Скраћенице: PLC β - фосфолипаза C β , PIP₂ - фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, IP₃ - инозитол

трифосфат, DAG - диацил глицерол, PKC - протеин киназа C, ER - ендоплазматски ретикулум MLCK - миозин киназа светлог ланца.

10. **Слика 1.10.** Коагулациона фаза хемостазе. Стрелице означене плавом бојом су укључене у спољашњи пут коагулације крви; Стрелице означене наранџастом бојом су укључене у унутрашњи пут коагулације крви; Стрелице означене зеленом бојом су укључене у заједнички пут коагулације крви. Пуне стрелице приказују примарне реакције у којима су активни наведени фактори, а испрекидане стрелице приказују споредне реакције ових фактора.
11. **Слика 1.11.** Спољашњи пут коагулације крви. TF представља ткивни фактор, а TFPI инхибитор ткивног фактора.
12. **Слика 1.12.** Топологија коагулационог фактора III.
13. **Слика 1.13.** Кристална структура екстрацелуларног домена ткивног фактора снимљена у резолуцији од 1,7 Å (PDB ID: 1BOY). Терцијарна структура ткивног фактора приказана је тамно црвеном бојом док су дисулфидне везе приказане жутом. Центри гликолизације јесу аминокиселине Asn11, Asn134, Asn137 (плава површина); интеракција са фактором VII остварују се помоћу аминокиселина Thr17, Lys20, Ile22, Glu24, Gln37, Asp44, Lys46, Lys48, Asp48, Thr60, Phe76, Tyr78, Glu110, Leu133, Arg135, Phe146, Val207 (зелена површина); интеракција са фактором X остварује се помоћу аминокиселина Gln118, Val119, Thr121, Lys159, Asp180, Lys181, Gln183 (сива површина); парови цистеина градитеља дисулфидних веза су Cys49-Cys57 и Cys186-Cys209.
14. **Слика 1.14.** Сличности и разлике у структурним доменима фактора VII, X, IX и II. Редослед је намерно одабран да би се поштовао редослед укључивања у коагулациону каскаду.
15. **Слика 1.15.** Сличност у топологији фактора II, VII, IX, X и протеина C.
16. **Слика 1.16.** Кристална структура коагулационог фактора VII снимљена у резолуцији од 1,9 Å (PDB ID: 5TQE). Тешки ланац представљен је љубичастом бојом док је структура лаког ланца представљена плавом. Јони Ca²⁺ комплексирани са остацима Glu приказани су зеленом бојом.
17. **Слика 1.17.** Кристална структура екстрацелуларног домена ткивног фактора у комплексу са фактором VIIa снимљена у резолуцији од 2,0 Å (PDB ID: 1DAN). Тешки ланац фактора VIIa представљен је љубичастом бојом, док је структура лаког ланца представљена плавом. Новонастали ланци ткивног фактора обележени су црвеном и наранџастом бојом. Јони Ca²⁺ комплексирани са остацима Glu приказани су зеленом бојом.
18. **Слика 1.18.** Кристална структура фактора X снимљена у резолуцији од 2,3 Å (PDB ID: 1XKA). Тешки ланац фактора X представљен је жутом бојом док је структура лаког ланца представљена розе бојом. Јони Ca²⁺ комплексирани са остацима Glu приказани су зеленом бојом. Регион γ-

- карбоксиглутаминских киселина (аминокиселине 1-39) обележен је транспарентном плавом сфером, хидрофобни регион (аминокиселине 40-45) је црвена сфера, регион везивања EGF1 (аминокиселине 46-84) је транспарентно зелен, регион везивања EGF2 (аминокиселине 85-128) је транспарентно окер.
19. **Слика 1.19.** Теоретски модел кристалне структуре комплекса ткивног фактора са комплексом Ха (PDB ID: 1NL8). Ткивни фактор означен је црвеном бојом, тешки ланац фактора VIIa представљен је љубичастом бојом, док је структура лаког ланца представљена зеленом бојом. Тешки ланац фактора Ха илустрован је жутом а лаки ланац обојен је плавом бојом.
 20. **Слика 1.20.** Унутрашњи пут коагулације крви. РК - прекаликреин, НК - високомолекуларни кининоген, TF - ткивни фактор.
 21. **Слика 1.21.** Сличности и разлике у структурним доменима фактора XII и XI. Редослед је намерно одабран да би се поштовао редослед укључивања у коагулациону каскаду.
 22. **Слика 1.22.** Кристална структура лаког ланца фактора XII снимљена у резолуцији од 2,14 Å (PDB ID: 4XDE). Лаки ланац фактора XII представљен је светло сивом бојом. Регион каталитичке триаде обележен је транспарентном црвеном сфером.
 23. **Слика 1.23.** Кристална структура фактора XI снимљена у резолуцији од 2,85 Å (PDB ID: 5I25). A1-A4 домени у облику јабуке обележени су зелено, жуто, тиркизно и црвено, респективно. Каталитички домен обележен је љубичасто, суб-регион раскидања означен је транспарентном црном сфером, док је каталитички центар обележен белом сфером.
 24. **Слика 1.24.** Кристална структура фактора IX снимљена у резолуцији од 1,9 Å (PDB ID: 3CL3). Тешки ланац фактора IX представљен је светло сивом бојом. Јони Ca^{2+} комплексирани са остацима Glu приказани су зеленом бојом. Регион γ -карбоксиглутаминских киселина (аминокиселине 1-64) обележен је транспарентном плавом сфером док регион везивања EGF2 (аминокиселине 64-128) је транспарентно црвено обојен.
 25. **Слика 1.25.** Активација фактора IX.
 26. **Слика 1.26.** Кристална структура фактора VIII снимљена у резолуцији од 15 Å (PDB ID: 3J2Q). Тешки ланац фактора VIII представљен је жутом бојом, лаки ланац представљен је љубичастом. Јони Ca^{2+} приказани су зеленом бојом, јони Cu^{2+} тамно црвеном. Део C1 домена који интерагује са мембраном приказан је транспарентном зеленом сфером док је одговарајући део C2 суб-домена приказан транспарентно црвеном сфером.
 27. **Слика 1.27.** Коагулациона фаза хемостазе. Стрелице означене плавом бојом су укључене у спољашњи пут коагулације крви; Стрелице означене наранџастом бојом су укључене у унутрашњи пут коагулације крви; Стрелице означене зеленом бојом су укључене у заједнички пут коагулације

- крви. Пуне стрелице приказују примарне реакције у којима су активни наведени фактори, а испрекидане стрелице приказују споредне реакције ових фактора.
28. **Слика 1.28.** (А) Кристална структура фактора V снимљена у резолуцији од 1,9 Å (PDB ID: 1CZS); (Б) Топологија фактора V.
29. **Слика 1.29.** Структурни домени фактора II.
30. **Слика 1.30.** Примарна структура препро-протромбина. Сиве стрелице указују на места раскидања пептида. Glu остаци обележени су са γ . Места везивања шећера обележена су дијамантима. Аминокиселине каталитичке триаде обележене су кружићима. Места протеолитичке протромбина обележена су црним стрелицама. Места секундарног раскидања унутар тромбина обележена су белим стрелицама.
31. **Слика 1.31.** Кристална структура фактора II, без Glu домена, снимљена у резолуцији од 3,3 Å (PDB ID: 4HZN). Крингл 1 под-сегмент обележен је браон транспарентном сфером, крингл 2 жутом сфером, ланац А црвеном сфером, ланац В плавом сфером.
32. **Слика 1.32.** Формирање протромбиназа комплекса на плазма мембрани активiranог тромбоцита. Положаји цепања протромбина фактором Ха су приказани стрелицама. Део протромбина који ће формирати тромбин је означен као претромбин, док (F-1.2) означава фрагменте 1 и 2 који се такође налазе у примарној структури протромбина.
33. **Слика 1.33.** Кристална структура тромбина у резолуцији од 2,4 Å (PDB ID: 4I7Y). Лаки ланац обележен је црвено, тешки ланац наранџасто. Егзодео I представљен је плавом транспарентном сфером, егзодео II љубичастом транспарентном сфером. Каталитичка триада унутар активног центра обележена је белом сфером. Јон натријума обележен је зеленом куглицом.
34. **Слика 1.34.** Кристална структура тромбина у комплексу са хепарином снимљена у резолуцији од 1,85 Å (PDB ID: 1XMN). Лаки ланац обележен је црвено, тешки ланац наранџасто. Молекул хепарина обележен је небеским плавим, протромбински гликозид обележен је љубичасто. Инхибитор који окупира S9 регион активног центра обележен је црном сфером. Јон натријума обележен је зеленом куглицом.
35. **Слика 1.35.** Дијаграмски приказ структуре фибриногена.
36. **Слика 1.36.** А) Кристална структура хуманог фибриногена снимљена у резолуцији од 2,9 Å (PDB ID: 3GHG). А α -ланци обележени су плавом бојом, В β -ланци обележени су жутом, γ -ланци обележени су црвеном бојом. Сегменти дисулфидних веза обележени су жутом бојом. „Кноб” А обележен је црним сферама, „Кноб” Б обележен је љубичастим сферама. Б) Увећани приказ преплетања А α -, В β - и γ -ланца.
37. **Слика 1.37.** Контакти у кристалној структури хуманог фибриногена који укључују „end-to-end” интеракције γ C домена,

латералне антипаралелне интеракције β C домена и антипаралелну асоцијацију „вишеструко увијеног сегмента” (CC). Кластери угљених хидрата представљени су сивом бојом, А и В „кнобови” γ C и β C „рупе” жутом бојом. α ланци су представљени зелено, β ланци плавом, γ ланци црвено. Централни домен је означен са словом Е у кругу. Тамнија и светлија нијанса основних боја означавају два повезана молекула фибриногена.

38. **Слика 1.38.** А) Кристална структура фактора XIII-A снимљена у резолуцији од 2,1 Å (PDB ID: 1F13). AP-FXIII секвенца приказана је тамно зеленом бојом. Први ланац у хомодимеру приказан је розом бојом, други је приказан плавом бојом. β -сендвич обележен је белим транспарентним сферама, каталитички домен наранџастим транспарентним сферама, β -буре 1 црвеним транспарентним сферама, β -буре 2 плавим транспарентним сферама.
39. **Слика 1.39.** Хомологи модели пет „sushi” домена фактора XIII-B који приказују локализацију седам детектованих мутација. Бројеви испод указују на број „sushi” домена. Унутар модела, β -наборане конформације приказане су зеленом бојом при чему стрелице показују правац од N- ка C-терминусу. Остаци аминокиселина Cys које граде дисулфидне мостове приказани су van der Waals-овим сферама (сумпор жутом бојом, угљеник белом бојом). Нативне аминокиселине и њихов положај означене су љубичастом сфером, такође назначен је њихов положај у секвенци и аминокиселина мутант.
40. **Слика 1.40.** Формирање фибринске мреже на месту повреде крвног суда. 1) наслаге тромбоцита на ендотелу, 2) активирани тромбоцит, 3) садржај тромбоцита ослобођен приликом активације тромбоцита, 4) мрежа фибринских влакана, 5) ендотелне ћелије оштећеног крвног суда. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације, Југоремедија Зрењанин, 1980.*
41. **Слика 1.41.** Приказ процеса који се одвијају у тромбоцитима.
42. **Слика 1.42.** Процес фибринолизе у оштећеном крвном суду.
43. **Слика 1.43.** Теоријски модел хетеродимера VKOR. Трансмембрански хеликси VKC обележени су плавом бојом и ознакама 1-5, док су трансмембрански хеликси VKORC1 назначени наранџастом бојом и ознакама А-С.
44. **Слика 1.44.** Приказ кристалне структуре *Syn*VKOR у комплексу са убихиноном. ТМ хеликси 1-4, који су хомолози VKOR сисара приказани су розе бојом, петља између првог и другог ТМ хеликса, која садржи 1/2-хеликс, приказана је зеленом бојом. Структура убихинона је приказана сивом бојом. PDB ID: 3KP9.
45. **Слика 1.45.** Приказ тополошких модела *h*VKORC1 са три (лево) и четири (десно) трансмембранских α -хеликса. CXXC мотив је представљен зеленом бојом, а цистеини из петље су

- представљени плавом бојом.
46. **Слика 1.46.** Приказ предложене структуре 3ТМ модела хумане VKORC1.
 47. **Слика 1.47.** Приказ хомологог 4ТМ модела хумане VKORC1. ТМ1 обележен је плавом бојом, ТМ2 зеленом бојом, ТМ3 жутом бојом, ТМ4 наранџастом бојом. Каталитичке аминокиселине означене су беж транспарентном сфером.
 48. **Слика 1.48.** Приказ хомологог 4ТМ модела rVKORC1. ТМ1 обележен је зеленом бојом, ТМ2 беж бојом, ТМ3 жутом бојом, ТМ4 љубичастом бојом.
 49. **Слика 1.49.** (А) Молекулско доковање депротоване отворене форме варфарина на хомологом моделу хумане VKORC1; (Б) Интеракциони дијаграм (R)-варфарина са активним центром VKORC1.
 50. **Слика 2.1.** Упоређивање секвенци серумског албумина *Homo sapiens* (P02768) и *Rattus norvegicus* (P02770) преузетих са UniProtKB базе података.
 51. **Слика 2.2.** UV-Vis апсорпциони спектри деривата **2a** (А), **2b** (Б), **2c** (В), **2d** (Г), **2e** (Д) и варфарина (Ђ) растворених у фосфатном пуферу при рН 7,4 у концентрацији 20 mg/L.
 52. **Слика 2.3.** UV-Vis апсорпциони спектри деривата **2f** (А), **2g** (Б), **2h** (В) и варфарина (Г) растворених у фосфатном пуферу при рН 7,4 у концентрацији 20 mg/L.
 53. **Слика 2.4.** Енергетски дијаграм Ламаркиановог алгоритма.
 54. **Слика 2.5.** Генерисање биоактивне конформације варфарина помоћу DOCK6 алгоритма.
 55. **Слика 2.6.** Стандардна права редукованог глутатиона.
 56. **Слика 2.7.** Стандардна права за каталазу.
 57. **Слика 2.8.** Стандардна права за малондиалдехид.
 58. **Слика 2.9.** Методологија снимања фотомикрографа хистопатолошких узорака.
 59. **Слика 2.10.** Тродимензионална просторна решетка антагониста VKORC1 пацова.
 60. **Слика 2.11.** Lennard-Jones-ове и Coulomb-ове криве потенцијалне енергије које описују интеракцију између пробе и биомолекула.
 61. **Слика 2.12.** Антагонисти VKORC1 смештен у CoMFA просторну решетку и израчунавање поља молекулских интеракција.
 62. **Слика 2.13.** Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија на принципијелне осе.
 63. **Слика 2.14.** Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија на прву принципијелну осу.
 64. **Слика 2.15.** Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија на две принципијелне компоненте.
 65. **Слика 2.16.** Декомпозиција оригиналне матрице поља молекулских интеракција.
 66. **Слика 2.17.** Декомпозиција оригиналне матрице поља молекулских интеракција.
 67. **Слика 2.18.** Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија

- на принципијелне осе.
68. **Слика 2.19.** Прва компонента мултиваријатног PLS модела састоји се од две линије, једна у X-простору (t_1) и једна у Y-простору (u_1). Свака линија даје добру апроксимацију вредности енергија MIF и биолошке активности, али такође доприноси максималној интеркорелацији. Латентне варијабле које су добијене пројекцијом вредности енергија и биолошке активности могу се изразити у дводимензионалном простору. Уколико постоји корелација између x и y вредности, корелација би требала да буде око нагиба праве.
69. **Слика 2.20.** Пројекција PLS-кофицијената у тродимензионалну просторну решетку.
70. **Слика 2.21.** Однос између израчунате и експерименталне биолошке активности.
71. **Слика 2.22.** Процедура унакрсне валидације 3-D QSAR модела.
72. **Слика 2.23.** Процедура Y-мешања.
73. **Слика 2.24.** Изглед комете настале оштећењем ДНК.
74. **Слика 2.25.** Принцип извођења комет теста.
75. **Слика 3.1.** Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата А) **2a** (■) и **2b** (◆); (Г) **2c** (■) и **2d** (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, коришћени за одређивање тачке нултог прелаза; Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата Б) **2a** (■) и **2b** (◆); (Д) **2c** (■) и **2d** (◆) растворених у раствору PBS-а при рН 7,4, у присуству албумина (35 g/L у раствору PBS-а, при рН 7,4), коришћени за одређивање тачке независне концентрације; Калибрационе криве деривата (В) **2a** (■) и **2b** (◆); (Ђ) **2c** (■) и **2d** (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, конструисане помоћу спектра изведеног из тачке независне концентрације.
76. **Слика 3.2.** Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата А) **2e** (■) и **2f** (◆); (Г) **2g** (■) и **2h** (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, коришћени за одређивање тачке нултог прелаза; Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата Б) **2e** (■) и **2f** (◆); (Д) **2g** (■) и **2h** (◆) растворених у раствору PBS-а при рН 7,4, у присуству албумина (35 g/L у раствору PBS-а, при рН 7,4), коришћени за одређивање тачке независне концентрације; Калибрационе криве деривата (В) **2e** (■) и **2f** (◆); (Ђ) **2g** (■) и **2h** (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, конструисане помоћу спектра изведеног из тачке независне концентрације.
77. **Слика 3.3.** А) Изотерме везивања деривата **2a-h** и варфарина (W) растворених у раствору PBS-а, на рН 7,4 и 310.15 K, при константној концентрацији албумина (35 g/L) у раствору PBS-а, на рН 7,4 без присуства аспирина; Б) Резултати Hill-ове анализе за деривате **2a-h** и варфарин (W) у раствору PBS-а, при рН 7,4, засноване на равнотежној концентрацији слободних деривата **2a-h** и варфарина (W). Интензитет флуоресценције упоређиван је са аминокиселином триптофан из активног центра серумског албумина која

- емитује флуоресцентно зрачење на 340 nm, док се екситација врши на 280 nm.
78. **Слика 3.4.** А) Изотерме везивања деривата **2a-h** и варфарина растворених у раствору PBS-а, на рН 7,4 и 310,15 К, при константној концентрацији албумина (35 g/L) у раствору PBS-а, на рН 7,4 у присуству аспирина; Б) Резултати Hill-ове анализе за деривате **2a-h** и варфарин у раствору PBS-а, при рН 7,4, засноване на равнотежној концентрацији слободних деривата **2a-h** и варфарина. Интензитет флуоресценције упоређиван је са аминокиселином триптофан из активног центра серумског албумина која емитује флуоресцентно зрачење на 340 nm, док се екситација врши на 280 nm.
79. **Слика 3.5.** А) Scatchard-ов дијаграм слободних деривата **2a-h**, и варфарина у раствору албумина (35 g/L у PBS-у, рН 7,4); В) Lineweaver-Burk-ов дијаграм везаних једињења **2a-h** и варфарина у раствору албумина. Апсциса: реципрочна вредност концентрације слободног (невезаног) молекула. Ордината: реципрочна вредност броја везаних молекула по молекулу албумина.
80. **Слика 3.6.** (А) Кристална структура хуманог серумског албумина. (Б) Ко-кристализована експериментална конформација варфарина (сива боја), конформација варфарина добијена поновним доковањем (љубичаста боја), конформација варфарина добијена поновним доковањем насумичне конформације (плава боја), конформација варфарина добијена унакрсним доковањем (наранџаста боја), конформација варфарина добијена унакрсним доковањем насумичне конформације (црвена боја) (В) Најбоље докована структура деривата **2f**. (Г) Најбоље докована структура деривата **2a**.
81. **Слика 3.7.** Крива зависности *in vivo* антикоагулативне активности и концентрације деривата **2a-h**.
82. **Слика 3.8.** Фотомикрографи пресека јетри деривата **2f** (А), **2a** (Б), варфарина (В), и негативне контроле (Г). Стрелице указују на: С – конгестија (енг. Congestion); DHL – дисконтинуиране линије хепатоцита (енг. Discontinuous hepatocytes lines); BD – балонирајућа дегенерација (енг. Balloon degradation); SR – знаци регенерације (енг. Signs of regenerations); I – инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага (енг. Infiltration of lymphocytes, leucocytes and magrophagi); FN – фокална некроза (енг. Focal necrosis); PN – постепена некроза (енг. Piecemeal necrosis); BDR – реакција жучних канала (енг. Biliary ductular reaction); F – фиброза (енг. Fibrosis).
83. **Слика 3.9.** Фотомикрографи пресека јетри третираних дериватима **2b** (А), **2c** (Б), **2d** (В), **2e** (Г), **2g** (Д) и **2h** (Ђ). Стрелице указују на: С – конгестија (енг. Congestion); DHL – дисконтинуиране линије хепатоцита (енг. Discontinuous hepatocytes lines); BD – балонирајућа дегенерација (енг.

Balloon degradation); SR – знаци регенерације (енг. Signs of regenerations); I – инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага (енг. Infiltration of lymphocytes, leucocytes and macrophagi); FN – фокална некроза (енг. Focal necrosis); PN – постепена некроза (енг. Piecemeal necrosis); BDR – реакција жучних канала (енг. Biliary ductular reaction); F – фиброза (енг. Fibrosis).

84. **Слика 3.10.** Фотомикрографи пресека јетри третираних дерватима **2a** (А), **2f** (Б), варфарином (В), и негативном контролом (Г). Стрелице указују на С – конгестија (енг. Congestion, пасивна хиперемија); CVD – Проширене централне вене (енг. Central veins distension); ZHD – Зонална хидропсна дегенерација хепатоцита (енг. Zonal hydropic degeneration of hepatocytes); FLN – Фокална некроза лизирањем (енг. Focal lytic necrosis); КСН – Хиперплазија Купферових ћелија (енг. Kupffer cell hyperplasia); F – Фиброза (енг. Fibrosis); Н – Крварење (енг. Hemorrhaging); IE – Едем интерстицијума (енг. Interstitial edema); GA – Атрофија гломерула са проширењем субкапсуларног простора (енг. Glomerular atrophy distension of capsular space); HD – Хидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића (енг. Hydropic degenerescence in tubular epithelium); NTE – Некроза епитела тубула и сабирних каналића (енг. Necrosis of tubular epithelial cells).
85. **Слика 3.11.** Фотомикрографи пресека бубрега третираних дериватима **2a** (А), **2f** (Б), варфарином (В), и негативном контролом (Г). Стрелице указују на С – конгестија (енг. congestion, пасивна хиперемија); CVD – Проширене централне вене (енг. Central veins distension); ZHD – Зонална хидропсна дегенерација хепатоцита (енг. Zonal hydropic degeneration of hepatocytes); FLN – Фокална некроза лизирањем (енг. Focal lytic necrosis); КСН – Хиперплазија Купферових ћелија (енг. Kupffer cell hyperplasia); F – Фиброза (енг. Fibrosis); Н – Крварење (енг. Hemorrhaging); IE – Едем интерстицијума (енг. Interstitial edema); GA – Атрофија гломерула са проширењем субкапсуларног простора (енг. Glomerular atrophy distension of capsular space); HD – Хидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића (енг. Hydropic degenerescence in tubular epithelium); NTE – Некроза епитела тубула и сабирних каналића (енг. Necrosis of tubular epithelial cells).
86. **Слика 3.12.** Везивање најбоље доковане биоактивне конформације **2f** (А) и **2a** (Б) у активном центру VKORC1 пацова (*rVKORC1*, представљен је љубичастом бојом; због прегледности слика, приказани су само поларни атоми водоника).
87. **Слика 3.13.** Везивање најбоље доковане биоактивне конформације **2b** (А), **2c** (Б), **2d** (В), **2e** (Д), **2g** (Ђ) и **2h** (Е) у активном центру VKORC1 пацова (*rVKORC1*, представљен је љубичастом бојом; због прегледности слика, приказани су само поларни

- атоми водоника).
88. **Слика 3.14.** Везивање биоактивне конформације добијене из најбољег кластера деривата **2f** (А) и **2a** (Б) у активном центру VKORC1 пацова (*r*VKORC1, представљен је љубичастом бојом; због прегледности приказани су само поларни водоникови атоми; растојања између првог прстена и Cys35 и Thr138 приказана су пуном линијом, док су одговарајућа растојања за други прстен приказана испрекиданом линијом).
89. **Слика 3.15.** Везивање биоактивне конформације добијене из најбољег кластера деривата **2b** (А), **2c** (Б), **2d** (В), **2e** (Г), **2g** (Д) и **2h** (Ђ) у активном центру VKORC1 пацова (*r*VKORC1, представљен је љубичастом бојом; због прегледности приказани су само поларни водоникови атоми, растојања између првог прстена и Cys35 и Thr138 приказана су пуном линијом, док су одговарајућа растојања за други прстен приказана испрекиданом линијом).
90. **Слика 3.16.** Дијаграм односа поново израчунатих/предвиђених и експерименталних рЕС₅₀ вредности помоћу CoMFA (А); CoMSIA 1 (Б); CoMSIA 2 (В); CoMSIA 3 (Г) модела.
91. **Слика 3.17.** CoMFA стерни PLS-коэффициенти деривата **2f** (А) и **2a** (В); CoMFA електростатички PLS-коэффициенти деривата **2f** (Б) и **2a** (Г). (Због прегледности, приказани су само поларни водоникови атоми).
92. **Слика 3.18.** CoMSIA стерни PLS-коэффициенти деривата **2f** (А) и **2a** (Г); CoMSIA хидрофобни PLS-коэффициенти деривата **2f** (Б) и **2a** (Д); CoMSIA PLS-коэффициенти донора и акцептора водоничних веза деривата **2f** (В) и **2a** (Ђ). (Због прегледности, приказани су само поларни водоникови атоми).
93. **Слика 3.19.** Поравњање тест сета у активном центру VKORC1 пацова.
94. **Слика 3.20.** Најбољи фармакофорни модел *Huro1* преклопљен преко **2f** (А) и **2a** (Б), HuroGen фармакофорни модел *Huro1* (В), 3-D просторна зависност и геометријски параметри *Huro1* (Г). Фармакофорне особине су обојене различитим бојама: зелена – акцептор водоничне везе, љубичаста – донор водоничне везе; плава: хидрофобна ароматична функција.
95. **Слика 3.21.** График корелације између експерименталних и предвиђених рЕС₂₀₀ вредности тренинг сета (троуглови) и тест сета (кругови) добијен *Huro1* моделом.
96. **Слика 3.22.** Комплекс **2f-r**VKORC1 припремљен за молекулску динамику. Топологија *r*VKORC1 представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2f** приказан је белом бојом окружен зеленом сфером, фосфолипидна мембрана приказана је сивом бојом, док је водена фаза приказана црвеном. Атоми натријума коришћени за неутрализацију система приказани су љубичастим сферама, атоми хлора коришћени за неутрализацију приказани су зеленим сферама.
97. **Слика 3.23.** (А) RMSD вредности *r*VKORC1 у комплексу са **2f**. (Б)

- RMSF вредности *rVKORC1* у комплексу са **2f**. (B) Дијаграм интеракција **2f-rVKORC1** комплекса. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције а плаве траке водоничне мостове.
98. **Слика 3.24.** Приказ формирања водоничних веза између **2f** и *rVKORC1*. Топологија рецептора представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2f** приказан је белом бојом, фосфолипидна мембрана приказана је сивим линијама док су атоми кисеоника из молекула воде црвеном. Ради једноставности приказа представљен је само атом водоника из водоничне везе између **2f** и *rCys135* и **2f** и *rAsn142*.
99. **Слика 3.25.** Комплекс **2a-rVKORC1** припремљен за молекулску динамику. Топологија *rVKORC1* представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2a** приказан је белом бојом, црвеном сфером, фосфолипидна мембрана приказана је сивом бојом док је водена фаза приказана црвеном. Атоми натријума коришћени за неутрализацију система приказани су љубичастим сферама, атоми хлора коришћени за неутрализацију приказани су зеленим сферама.
100. **Слика 3.26.** (A) RMSD вредности *rVKORC1* у комплексу са **2a**. (B) RMSF вредности *rVKORC1* у комплексу са **2a**. (B) Дијаграм интеракција **2a-rVKORC1** комплекса. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.
101. **Слика 3.27.** Приказ формирања водоничних веза између **2a** и *rVKORC1*. Топологија рецептора представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2a** приказан је белом бојом, фосфолипидна мембрана приказана је сивим линијама док су атоми кисеоника из молекула воде црвеном. Ради једноставности приказа представљен је само атом водоника из водоничне везе између **2a** и *Cys135*, и **2a** и карбонилног кисеоника пептидне везе између *Asp130* и *Phe131*.
102. **Слика 3.28.** Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри и бубрезима након бојења са етидијум бромидом. Нетретиране животиње (А-јетра и В-бубрези), животиње третиране ЕМС-ом (В-јетра и Г-бубрези), **2a**-третиране животиње (Д-јетра и Ђ-бубрези), **2b**-третиране животиње (Е-јетра и Ж-бубрези), **2c**-третиране животиње (З-јетра и И-бубрези) и **2d**-третиране животиње (Ј-јетра и К-бубрези).
103. **Слика 3.29.** Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри и бубрезима након бојења са етидијум бромидом. Нетретиране животиње (А-јетра и Б-бубрези), животиње третиране ЕМС-ом (В-јетра и Г-бубрези), **2e**-третиране животиње (Д-јетра и Ђ-бубрези), **2f**-третиране животиње (Е-јетра и Ж-бубрези), **2g**-третиране животиње

- (З-јетра и И-бубрези) и 2h-третиране животиње (Ј-јетра и К-бубрези).
104. **Слика 3.30.** Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри и бубрезима након бојења са етидијум бромидом. Нетретиране животиње (А-јетра и Б-бубрези), животиње третиране ЕМС-ом (В-јетра и Г-бубрези), животиње третиране дериватом 2a и ЕМС-ом (Д-јетра и Ђ-бубрези), животиње третиране дериватом 2b и ЕМС-ом (Е-јетра и Ж-бубрези) и животиње третиране дериватом 2f и ЕМС-ом (З-јетра и И-бубрези).
105. **Слика 3.31.** Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри (А), бубрезима (Б) и косној сржи (В) након бојења са етидијум бромидом.
106. **Слика 3.32.** Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри (А) и бубрезима (Б) након бојења са етидијум бромидом.
107. **Слика 3.33.** Организација ДНК унутар једра ћелије.
108. **Слика 3.34.** Кристална структура топоизомеразе II α .
109. **Слика 3.35.** Кораци у хидролизи фосфодиестарских веза G-сегмента ДНК и пролазак T-сегмента кроз топоизомеразу II α .
110. **Слика 3.36.** Флуоресцентни емисиони спектри система 2a-h-ДНК и доксорубицин-ДНК у раствору 10 mM Tris-HCl пуфера на pH 7.4 и 25°C.
111. **Слика 3.37.** График зависности $\log[(F_0-F)/F]$ од $\log[\text{ДНК}]$ за рачунање броја везаних молекула (n) по молекулу ДНК.
112. **Слика 3.38.** (А) Активност hАТРаза области у хуманој TopII α одређена помоћу малахит зелено теста у функцији од времена и протеина. (Б) Подаци са графика (А) приказани као однос активности хумане TopII α -АТРаза области и протеина у току 2 h. (В) Каталитичка активност пречишћеног АТР-везујућег домена хумане TopII α према Michaelis-Menten-овој једначини. (Г) Lineweaver-Burk-ов дијаграм односа реципрочних вредности ($1/V$) и ($1/S$).
113. **Слика 3.39.** Крива зависности инхибиције активности АТРаза дериватима (А) 2b, 2a и 2f; (Б) 2c, 2d, 2e, 2g и 2h. Однос реципрочних вредности $1/[V]$ и $1/[S]$ у присуству деривата (В) 2b, 2a и 2f; (Г) 2c, 2d, 2e, 2g и 2h.
114. **Слика 3.40.** (А) Примена доковања за репродукцију ко-кристализоване структуре AMPPNP у активном центру људске TopII α (PDB код: 1ZXМ). Кристализовани лиганд је обојен тамно зеленом бојом, поновно доковани у плаво, моделовани поновно доковани у розе, унакрсно доковани у жуто, моделовани унакрсно доковани у црвено. Активни центар АТРаза је обојен у љубичасто, док су каталитичке аминокиселине представљене белом бојом, Mg²⁺ јон је обојен зеленом бојом. (Б) Примена доковања за репродукцију конформације инхибитора унутар региона везивања и раскидања ДНК (PDB код: 2XСТ). Кристализовани лиганд је обележен жутом бојом, поновно доковани зеленом, моделирани поновно доковани розом,

унакрсно доковани плавом, моделовани унакрсно доковани наранџастом бојом. TOPRIM област *S. aureus* је обојена тамно зеленом бојом, док је регион везивања и раскидања ДНК обојен корално црвеном бојом. Јон Mg^{2+} је означен зеленом бојом.

115. **Слика 3.41.** Молекулско доковање ЕМС-а (угљеникови атоми су представљени светло плавом бојом) на G-сегменту ДНК пацова (тамно плави ланац). Гуанин је представљен љубичастом бојом, *r*WHD област је означена коралном бојом, *r*TOPRIM област зеленом бојом. Аминокиселине обе области су означене белом бојом.
116. **Слика 3.42.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом.
117. **Слика 3.43.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} су представљени зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2b** (угљеникови атоми су представљени плавом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2b**.
118. **Слика 3.44.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} су представљени зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2f** (угљеникови атоми су представљени плавом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2f**.
119. **Слика 3.45.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2a** (угљеникови атоми су представљени жутом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2a**.
120. **Слика 3.46** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2e** (угљеникови атоми су означени розом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2e**.

121. **Слика 3.47.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2c** (угљеникови атоми су означени плавом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2c**.
122. **Слика 3.48.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2d** (угљеникови атоми су означени тамно црвеном бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2d**.
123. **Слика 3.49.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2g** (угљеникови атоми су означени розом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2g**.
124. **Слика 3.50.** (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2h** (угљеникови атоми су означени маслинасто зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2h**.
125. **Слика 3.51.** (А) RMSD вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ом. (Б) RMSF вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ом. (В) АТР-*r*ТорIIа дијаграм интеракција. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције, а плаве траке водоничне мостове.
126. **Слика 3.52.** (А) RMSD вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ом у присуству **2b**. (Б) RMSF вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ому присуству **2b**. (В) АТР-*r*ТорIIа дијаграм интеракција у присуству **2b**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције, а плаве траке водоничне мостове.
127. **Слика 3.53.** (А) RMSD вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ом у присуству **2f**. (Б) RMSF вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ом у присуству **2f**. (В) АТР-*r*ТорIIа дијаграм интеракција у присуству **2f**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.

128. **Слика 3.54.** (А) RMSD вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2a**. (Б) RMSF вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2a**. (В) АТР- $r\text{TopIIa}$ дијаграм интеракција у присуству **2a**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.
129. **Слика 3.55.** (А) RMSD вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2e**. (Б) RMSF вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2e**. (В) АТР- $r\text{TopIIa}$ дијаграм интеракција у присуству **2e**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.
130. **Слика 3.56.** (А) RMSD вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2c**. (Б) RMSF вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2c**. (В) АТР- $r\text{TopIIa}$ дијаграм интеракција у присуству **2c**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.
131. **Слика 3.57.** (А) RMSD вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2d**. (Б) RMSF вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2d**. (В) АТР- $r\text{TopIIa}$ дијаграм интеракција у присуству **2d**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.
132. **Слика 3.58.** (А) RMSD вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2g**. (Б) RMSF вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2g**. (В) АТР- $r\text{TopIIa}$ дијаграм интеракција у присуству **2g**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.
133. **Слика 3.59.** (А) RMSD вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2h**. (Б) RMSF вредности $r\text{TopIIa}$ комплекса са АТР-ом у присуству **2h**. (В) АТР- $r\text{TopIIa}$ дијаграм интеракција у присуству **2h**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.
134. **Слика 3.60.** Предложени ток катализе $r\text{TopIIa}$ започет ЕМС-ом и инхибиран дериватима **2a**, **2b** и **2f**. Т-сегмент је означен црном бојом, G-сегмент плавом бојом, N-терминус $r\text{TopIIa}$ домена љубичастом бојом, TOPRIM област зеленом бојом, WHD корално црвеном бојом, C-капија пинк бојом.
135. **Слика 3.61.** Предложени ток катализе $r\text{TopIIa}$ започет ЕМС-ом и индукован једињењима **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h**. Т-сегмент је означен црном бојом, G-сегмент плавом бојом, N-терминус $r\text{TopIIa}$ домена љубичастом бојом, TOPRIM област зеленом бојом, WHD корално црвеном бојом, C-капија пинк бојом.

1. ТАБЕЛА 1.1. Нумеричко означавање фактора коагулације и њихови уобичајени називи.
2. ТАБЕЛА 1.2. Подела коагулационих протеина према групама и њихова улога у коагулацији крви.
3. ТАБЕЛА 1.3. Молекули који се биосинтетишу у ендотелним ћелијама крвних судова и њихов утицај на процесе тромбозе и фибринолизе.
4. ТАБЕЛА 3.1. Константе асоцијације (K_A и K_A') и број центара (n и n') на којима се врши везивање деривата **2a-h** и варфарина (W) на серумски албумин у одсуству и у присуству аспирина (ознака ' изнад константе), израчунате помоћу Hill-ове и Scatchard-ове анализе титрације на 310,15 K у раствору PBS-a, на pH 7,4.
5. ТАБЕЛА 3.2. Процентуалне вредности слободних једињења и параметри везивања за **2a-h** и варфарин у раствору хуманог серумског албумина.
6. ТАБЕЛА 3.3. Резултати репродукције кристалне структуре варфарина у активном центру хуманог серумског албумина помоћу програма AutoDock, Vina и DOCK6.
7. ТАБЕЛА 3.4. Предвиђене ADMETох карактеристике испитиваних деривата.
8. ТАБЕЛА 3.5. Вредности коагулационих и биохемијских параметара из плазме и серума након седмодневне интраперитонеалне апликације деривата **2a-h** на одраслим пацовима соја Wistar.
9. ТАБЕЛА 3.6. Вредности коагулационих и биохемијских параметара из плазме и серума након седмодневног оралног третмана дериватима **2a**, **2f** и варфарином у концентрацији 20 mg/kg телесне тежине на одраслим пацовима соја Wistar.
10. ТАБЕЛА 3.7. Укупан садржај протеина и каталитичка активност антиоксидативних ензима јетре након седмодневне континуиране интраперитонеалне апликације деривата **2a-h** и варфарина на одраслим пацовима соја Wistar.
11. ТАБЕЛА 3.8. Укупни садржај протеина и каталитичка активност антиоксидативних ензима јетре и бубрега након седмодневне оралне апликације деривата **2a**, **2f** и варфарина на одраслим пацовима соја Wistar.
12. ТАБЕЛА 3.9. Морфолошке промене забележене на јетрама пацова након континуиране седмодневне апликације деривата **2a-h** и варфарина у концентрацији од 2 mg/kg телесне тежине.
13. ТАБЕЛА 3.10. Морфолошке промене забележене на јетрама и бубрезима пацова након континуиране седмодневне оралне апликације деривата **2a**, **2f** и варфарином у концентрацији од 20 mg/kg телесне тежине.
14. ТАБЕЛА 3.11. Статистички параметри генерисаних CoMFA и CoMSIA 3-D QSAR модела.
15. ТАБЕЛА 3.12. Предиктивна моћ генерисаних CoMFA и CoMSIA 3D-QSAR модела након поновног израчунавања.
16. ТАБЕЛА 3.13. Предиктивна моћ генерисаних CoMFA и CoMSIA 3D-QSAR модела након унакрсне валидације LOO методом.
17. ТАБЕЛА 3.14. Екстерна валидација 3-D QSAR модела.

18. ТАБЕЛА 3.15. Статистички значајне информације и предиктивни капацитет за 10 најбољих хипотеза као резултат аутоматизованог генерисања 3-D фармакофоре базиране на структури активног центра рецептора.
19. ТАБЕЛА 3.16. Експерименталне и предвиђене вредности тренинг сета на основу *Hypol* фармакофорног модела.
20. ТАБЕЛА 3.17. Експерименталне и предвиђене вредности тест сета на основу *Hypol* фармакофорног модела.
21. ТАБЕЛА 3.18. Параметри комет теста након седмодневне интраперитонеалне апликације деривата **2a-h** на одрасле пацове соја Wistar.
22. ТАБЕЛА 3.19. Детекција ДНК оштећења помоћу комет теста у јетри и бубрезима пацова након претретмана дериватима **2a**, **2b** и **2f**.
23. ТАБЕЛА 3.20. Дистрибуција класа комета, укупног скорa, и учесталости ћелија са кометом у јетри, бубрезима и косној сржи након седмодневног континуираног оралног третмана пацова соја Wistar дериватима **2a** и **2f** у концентрацији од 20 mg/kg телесне тежине.
24. ТАБЕЛА 3.21. Детекција ДНК оштећења помоћу комет теста у јетри и бубрезима пацова након оралног претретмана дериватима **2a** и **2f**.
25. ТАБЕЛА 3.22. Примена молекулског доковања у репродукцији ко-кристализованих инхибитора TopII α у региону АТРазае и региону везивања и раскидања ДНК.
26. ТАБЕЛА 3.23. Слободне енергије везивања и индивидуални енергетски услови АТР-*r*TopII α комплекса са различитим инхибиторима.

1. **Шема 1.1.** Процес превођења фосфатидилинозитола у инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерол у присуству фосфолипазе С.
2. **Шема 1.2.** Приказ регулације контракције глатких мишића инициран привременим растом унутарћелијских јона калцијума, затим интеракцијом Ca^{2+} и калмодулина, активацијом миозин киназе светлог ланца и фосфорилацијом светлог ланца миозина.
3. **Шема 1.3.** Шематски приказ метаболизма арахидонске киселине у тромбоцитима и у ћелијама ендотела крвних судова.
4. **Шема 1.4.** Механизам инхибиторног дејства аспирина.
5. **Шема 1.5.** Класично представљање механизма коагулационе каскаде.
6. **Шема 1.6.** Карбоксилација и активација фактора II, VII, IX и X, и протеина C и S у присуству витамина K.
7. **Шема 1.7.** Биосинтеза тромбина из препро-протромбина.
8. **Шема 1.8.** Структуре полисахарида протромбина.
9. **Шема 1.9.** Приказ процеса активације протромбина.
10. **Шема 1.10.** Аутолиза хуманог тромбина. Дисулфидне везе обележене су танким линијама, каталитичке аминокиселине кружићима, док су остаци угљених хидрата представљени дијамантом.
11. **Шема 1.11.** Механизам дејства тромбина на фибриноген.
12. **Шема 1.12.** Укрштање два фибринска ланаца у присуству фактора XIIIa.
13. **Шема 1.13.** Регулација процеса коагулације крви најважнијим факторима антикоагулације. Фактори антикоагулације и место њиховог утицаја приказани су црвеном бојом.
14. **Шема 1.14.** Шематски приказ активације плазминогена разним активаторима из крви.
15. **Шема 1.15.** Приказ позитивног утицаја стрептокиназе, ткивног активатора плазминогена (t-PA) и урокиназе, и негативног утицаја инхибитора активатора плазминогена и α_2 -антиплазмина на процес активације плазминогена.
16. **Шема 1.16.** Приказ структура витамина K: А) витамин K₁, Б) витамин K₂, В) витамин K₃.
17. **Шема 1.17.** Улога VKORC1 у циклусу витамина K.
18. **Шема 1.18.** Циклус витамина K.
19. **Шема 1.19.** Механизам настанка витамин K-2,3-епоксида по Dowd-у.
20. **Шема 1.20.** Предложени механизам редукције витамин K-2,3-епоксида катализован VKORC1 по Silverman-у.
21. **Шема 1.21.** Квантно-механичка модификација предложеног механизма редукције витамина K-2,3-епоксида катализованог VKORC1 по Silverman-у.
22. **Шема 1.22.** Приказ преноса протона са липоамида на NAD^+ у присуству липоамид редуктазе.
23. **Шема 1.23.** Структура варфарина.
24. **Шема 1.24.** Структуре синтетичких антикоагуланата хемијски сличних варфарину који се користе у клиничкој пракси.
25. **Шема 1.25.** Кристална структура варфарина и таутомерни облици у воденом раствору. Скраћенице: ОФ – отворена форма; ХЦФ – хемикетална циклична форма; ДОФ – депротонована отворена форма; ДОТФ – депротонована отворена таутомерна форма; ДОХФ – депротонована отворена

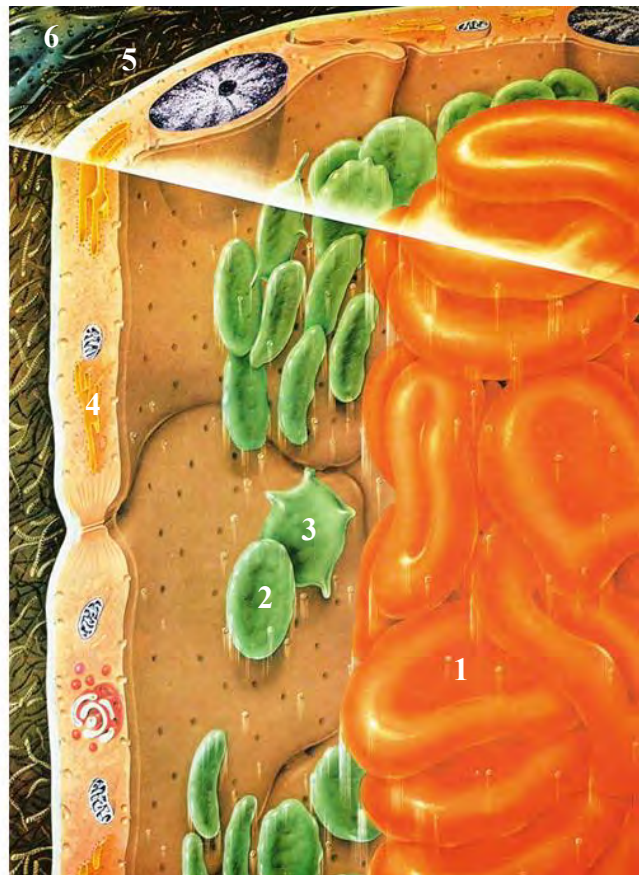
- хроменска форма; ЦХХФ – циклична хроменска хемикетална форма.
26. **Шема 1.26.** Предложени механизам ковалентне инхибиције VKOR варфарином.
 27. **Шема 1.27.** Биосинтеза *trans*-циметне киселине из угљен-диоксида и глукозе.
 28. **Шема 1.28.** Биосинтеза кумарина и 4-хидроксикумарина из *trans*-циметне киселине.
 29. **Шема 1.29.** Кето-енолна таутомерија 4-хидроксикумарина.
 30. **Шема 1.30.** Општи приказ хемијске синтезе 3-супституисаних деривата хроман-2,4-диона. R₁ може бити група са супституисаним бензеновим прстеном или фураном, R₂ могу бити атоми H, Cl и F, а R₃ атоми H, Cl, F и метил група.
 31. **Шема 1.31.** Синтеза хидразинилиденских деривата хроман-2,4-диона. Супституенти могу бити следеће групе: R₁- H, CH₃; R₂- H, CH₃, *tert*-Bu, Br; R₃- H, X- N, O, C; Y- NH, C, S.
 32. **Шема 1.32.** Синтеза хроман-2,4-дионских деривата из 4-хидроксикумарина и ароматичних алдехида.
 33. **Шема 1.33.** Синтеза деривата хроман-2,4-диона из хромон-3-карбоксилне киселине и фосфонијумове соли RuBOP.
 34. **Шема 1.34.** Хроман-2,4-дионски деривати као инхибитори ацетилхолинестеразе.
 35. **Шема 1.35.** Синтеза 4-хидроксикумарина помоћу 2-хидроксиацетофенона и ацилирајућих агенаса.
 36. **Шема 1.36.** Синтеза 4-хидроксикумарина кондензацијом 2-хидроксиацетофенона и трихлороацетонитрила.
 37. **Шема 1.37.** Синтеза 4-хидроксикумарина помоћу фенола и малонске киселине.
 38. **Шема 1.38.** Приказ синтезе 4-хидроксикумарина деловањем Мелдрумове киселине на фенол. А: Eaton-ов реагенс, 70 °C, 1 h; Б: 116% раствор полифосфорне киселине, 120 °C, 15 h.
 39. **Шема 1.39.** Синтеза 4-хидроксикумарина кисело-катализованом хидролитичком Diels-Alder-овом реакцијом.
 40. **Шема 1.40.** Синтеза 4-хидроксикумарина из алил кумаринил етра.
 41. **Шема 1.41.** Примена реакције деацетиловања у синтези 4-хидроксикумарина.
 42. **Шема 1.42.** Примена кисело катализоване хидролизе и декарбоксилације у синтези 4-хидроксикумарина.
 43. **Шема 1.43.** Синтеза 4-хидроксикумарина применом реакције фитооксигенације.
 44. **Шема 2.1.** Преглед општег поступка хемијске синтезе деривата **2a-h**.
 45. **Шема 2.2.** Алгоритам конформационе анализе генетским алгоритмом.
 46. **Шема 2.3.** Механизам трансминације аспартата катализован аспартат трансминазом.
 47. **Шема 2.4.** Механизам малатног шатла катализован малат дехидрогеназом. Ознаке: 1 - митохондријална малат дехидрогеназа; 2 - цитосолна малат дехидрогеназа; 3 - фосфоенолпируват карбоксиказа; 4 - трансминаза.
 48. **Шема 2.5.** Механизам трансминације аланина катализован аланин трансминазом.

49. **Шема 2.6.** Механизам редукције пирувата катализован лактат дехидрогеназом.
50. **Шема 2.7.** Дефосфорилација *p*-нитрофенилфосфата катализована алкалном фосфатазом.
51. **Шема 2.8.** Реакција кондензације глицил-глицина и L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида катализована γ -глутамил трансферазом.
52. **Шема 2.9.** Катаболизам хема.
53. **Шема 2.10.** Реакција грађења комплекса билирубин-диазо једињења.
54. **Шема 2.11.** Механизам биуретске реакције.
55. **Шема 2.12.** Оксидо-редукциона реакција глутатиона.
56. **Шема 2.13.** Приказ процеса деградације полинезасићене масне киселине и настанка малондиалдехида.
57. **Шема 2.14.** Грађење комплекса малондиалдехида и тиобарбитурне киселине.
58. **Шема 2.15.** Приказ реакције неутрализације супероксида ензимом SOD.
59. **Шема 2.16.** Биохемијска основа обојења ткива за хистопатолошке анализе.
60. **Шема 2.17.** Алгоритам конформационе анализе *Monte Carlo* методом.
61. **Шема 3.1.** Преглед општег поступка хемијске синтезе деривата **2a-h**.
62. **Шема 3.2.** Предложени механизам реверзибилног пута антагонизма коагулационог циклуса дериватима **2a** и **2f**.
63. **Шема 3.3.** Предложени механизам ковалентне инхибиције коагулационог циклуса дериватима **2f** и **2a**.
64. **Шема 3.4.** Структуре 4-хидроксикумарина коришћене као тест сет за валидацију 3-D QSAR и 3-D фармакофорног модела.
65. **Шема 3.5.** Алкилирајући ефекат EMC-а и настанак мутација унутар ДНК.
66. **Шема 3.6.** Предложени механизам привременог раздвајања *rG-EMC* катализованог *rTopII α* (кораца 1 и 2), религација *rG-EMC* катализована ензимом *rTdp2* (кораца 3 и 4) и репарација G-сегмента катализована ензимом AGT (корак 5).

УВОД

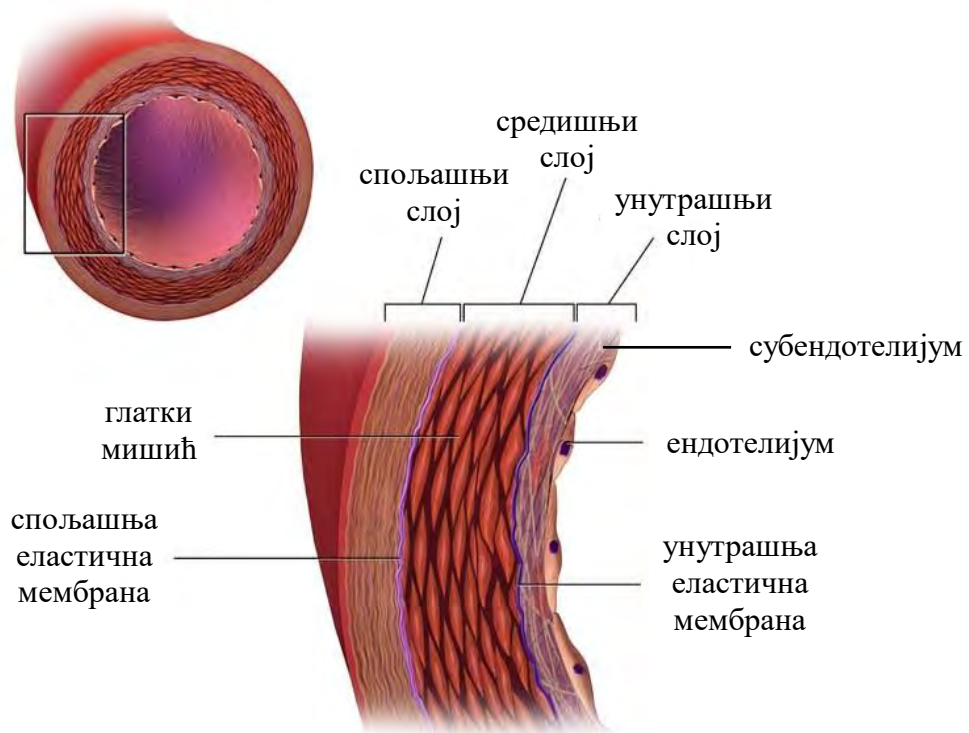
1.1. ХЕМОСТАЗА И ТРОМБОЗА

Хемостаза је физиолошки процес који омогућава нормалан проток крви кроз крвне судове (Слика 1.1) и представља механизам одржавања течног стања крви као ткива током процеса циркулације крви.¹ Стога, хемостаза представља скуп регулаторних механизма који доводе до згрушавања крви и механизма који згрушавање спречавају. Такође, хемостаза представља природни прекид крварења из оштећеног крвног суда или повреде, односно спречавање изласка крви кроз неозлеђени крвни суд. Тромбоза је, са друге стране, физиолошки процес који се одвија при оштећењу или уклањању крвних судова ендотелијума, при чему настаје крвни угрушак или тромб.



Слика 1.1. Пресек артерије и приказ кретања крви под нормалним околностима хемостазе. 1) еритроцити, 2) тромбоцити, 3) појединачни наддражајни облици тромбоцита, 4) ендотел крвног суда, 5) еластична и колагена влакна, 6) фиброцит. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације, Југоремедија Зрењанин, 1980.*

Структура крвног суда као носиоца хемостазе представљена је на Слици 1.2. Хемостаза се одвија на месту повреде крвног суда, на такозваној „контактној фази” који чине субендотелијум крвног суда, ендотелне ћелије те колагена влакна која улазе у састав спољашњег слоја крвног суда.



Слика 1.2. Структура крвног суда приказана у попречном пресеку.¹

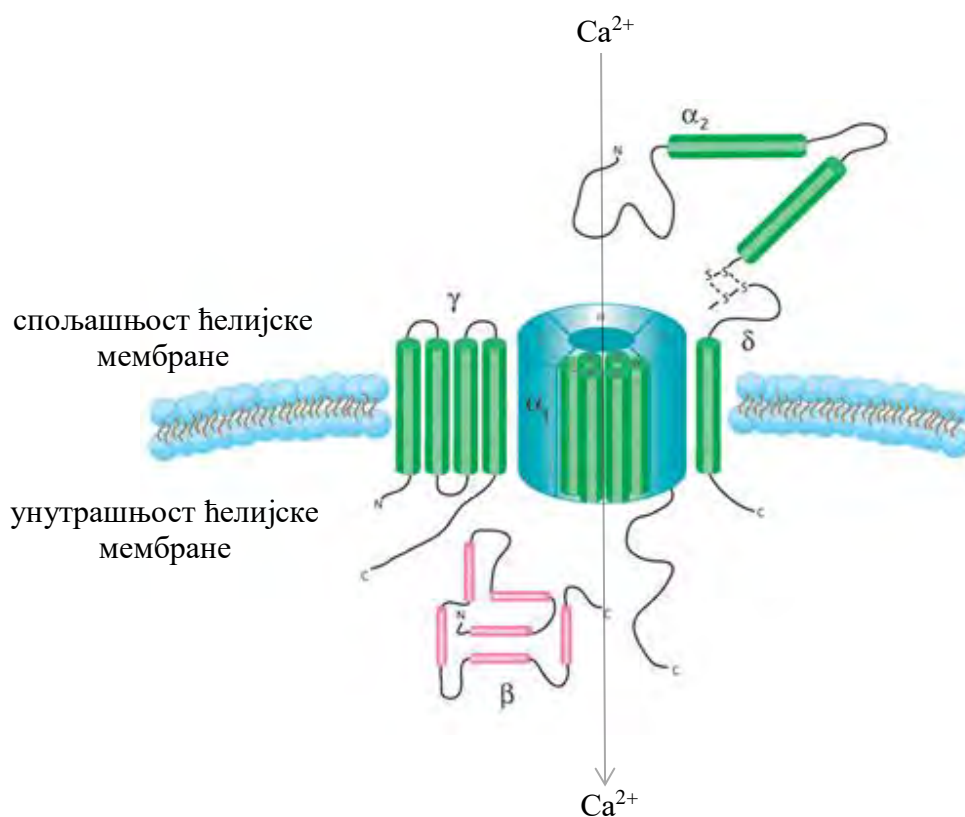
1.1.1. ВАЗОКОНСТРИКЦИЈА

Иницијални процес хемостазе назива се вазоконстрикција оштећених крвних судова и представља тзв. васкуларну фазу којом се смањује проток крви до повреде и спречава обилно крварење.² Потом, хемостаза и тромбоза деле заједничке кораке:

1. тромбоцитна фаза
2. фаза каскадне коагулације крви
3. антикоагулација
4. фибринолиза

Вазоконстрикција повређеног крвног суда траје врло кратко, обично мање од једне минуте, а узрокује смањену циркулацију крви ка повреди. То је заправо физиолошко сужавање крвих судова услед контракције мишића крвних судова. Одвија се у артеријама и артериолама, а сам процес је супротан вазодилатацији, односно ширењу крвних судова.² Вазоконстрикција се може визуелно опазити као обезбојење коже на месту повреде услед смањене циркулације крви ка површини коже, и спречава ширење топлоте коју крв носи. На вишем нивоу, вазоконстрикција јесте механизам којим се регулише артеријски притисак.

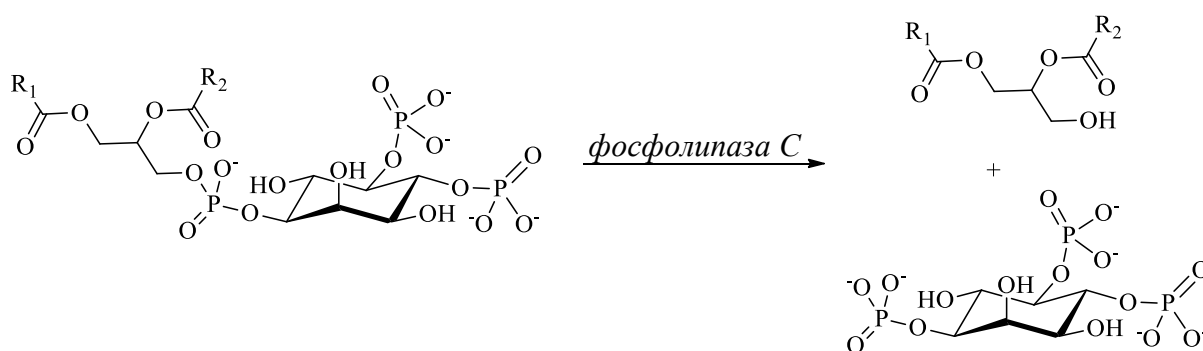
Вазоконстрикција започиње на нивоу ендотелних ћелија крвних судова. Наиме, ендотелне ћелије, поред тога што формирају баријеру између крви и ћелија глатких мишића, представљају и извор тзв. паракринских фактора које активирају суседне ћелије мишића и на тај начин покрећу њихову контракцију.² Такође, контракције су индуковане и медијаторским деловањем калцијумових јонских канала (Слика 1.3).



Слика 1.3. Приказ Ca^{2+} канала. Структурни елементи су субјединице α_1 , α_2 , β и γ . Субјединица α_1 садржи четири хомолога домена, а сваки од домена обухвата шест трансмембранских хеликса (хеликси осетљиви на промену напона приказани су розе бојом).ⁱⁱ

Прелазак јона калцијума из екстрацелуларне течности у цитосол васкуларних ћелија глатких мишића одвија се путем специфичних јонских канала. На процес рефлука и пораст концентрације калцијума у цитоплазми утичу и разни агонисти (вазоконстриктори) попут серотонина, норепинефрина, вазопресина итд., који олакшавају унипорт јона Ca^{2+} из екстрацелуларних извора.³ Поред спољашњих извора, постоје и метаболичке резерве (енг. *metabolic pool*) јона Ca^{2+} складиштене у интрацелуларној течности, односно у ендоплазматичном ретикулуму. Заједно са спољашњим изворима, оне обезбеђују неопходну концентрацију јона калцијума за несметано одвијање вазоконстрикције. Присуство оба извора Ca^{2+} указује да вазоконстрикција поседује способност саморегулације са изразитим механизмима који јој омогућавају да се увек одвија.

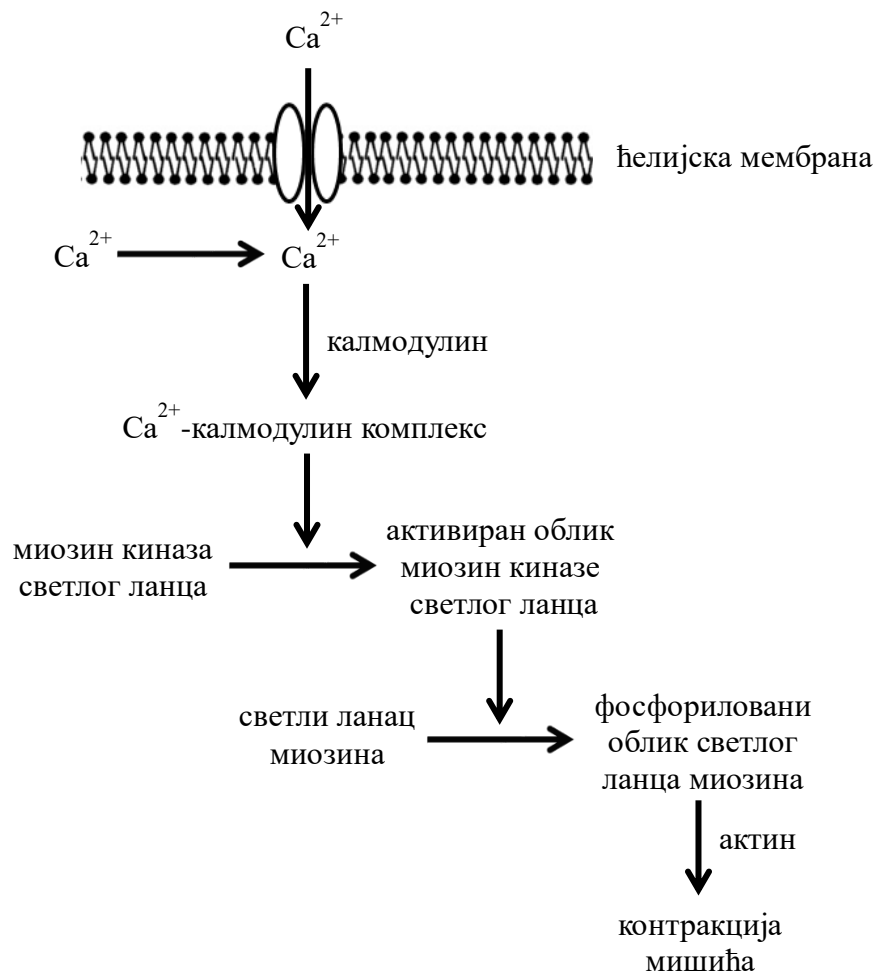
Активација спољашњих и унутрашњих извора калцијума одвија се каскадно. Тако, везивањем вазоконстриктора за рецепторе на ћелијској мембрани активира се фосфолипаза С (Шема 1.1). Овај ензим катализује реакцију хидролизе фосфоестарске везе на положају С3 фосфатидилинозитола, као једног од главних конституената ћелијске мембране, при чему се добијају инозитол-1,4,5-трифосфат (енг. *inositol trisphosphate, IP₃*) и диацилглицерол (енг. *1,2-diacylglycerol, DAG*). Инозитол-1,4,5-трифосфат отвара калцијумове канале (Слика 1.3) на мембрани ћелија васкуларних мишића. Идентичан механизам одвија се и на специјализованим одељцима ендоплазматичног ретикулума у интрацелуларној течности који такође садрже калцијумове јонске канале.



Шема 1.1. Процес превођења фосфатидилинозитола у инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерол у присуству фосфолипазе С.

Проласком јона Ca^{2+} кроз мембрану стичу се услови за њихово везивање за калмодулин (Шема 1.2).² Калмодулин је интрацелуларни протеин који иницира

контракције мишића након фосфорилације светлих ланаца миозина. Процес фосфорилације катализован је калмодулин-зависном миозин киназом светлог ланца. Фосфорилисани (активни) облик киназе врши даљу фосфорилацију светлог ланца миозина који у присуству актина врши контракције мишића. Енергија неопходна за контракцију обезбеђује се каталитичким деловањем миозин аденозин трифосфатазе.



Шема 1.2. Приказ регулације контракције глатких мишића инициран привременим растом унутарћелијских јона калцијума, затим интеракцијом Ca^{2+} и калмодулина, активацијом миозин киназе светлог ланца и фосфорилацијом светлог ланца миозина.

Ваља напоменути да вазоконстриктори утичу на повећање крвног притиска. Вазоконстрикција углавном узрокује пораст крвног притиска али се такође може одвијати и у појединим ткивима условљавајући локализовану редукцију протока крви.

1.1.2. ТРОМБОЦИТНА ФАЗА

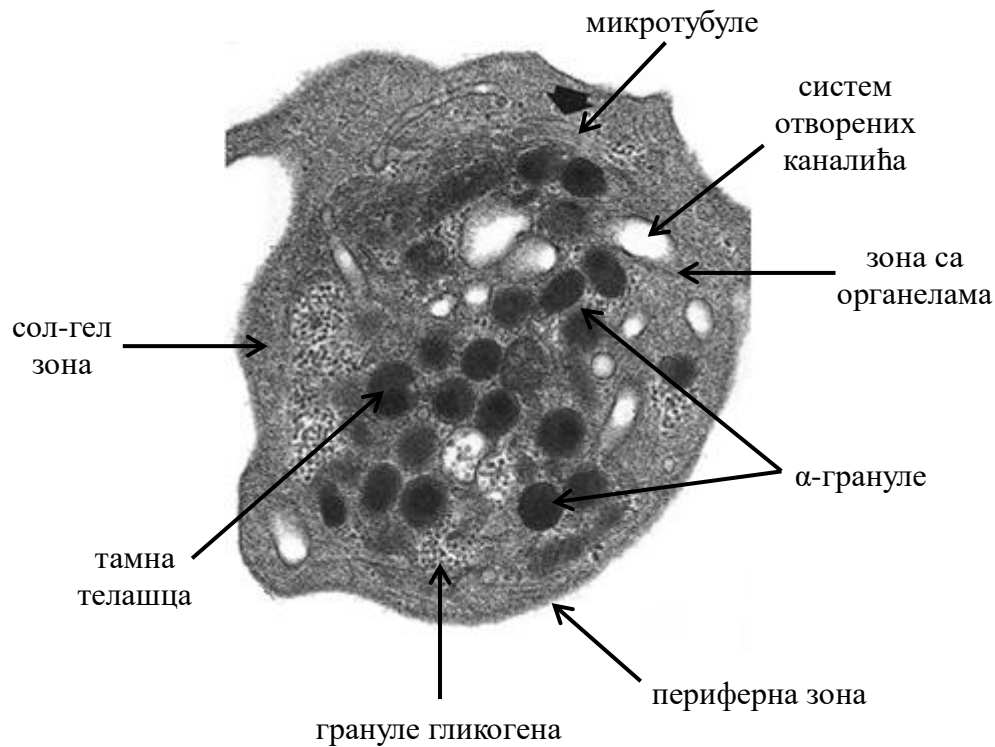
1.1.2.1. СТРУКТУРА ТРОМБОЦИТА

Тромбоцитна фаза почиње већ у првим секундама после повреде.⁴ Ова фаза заснива се на формирању белог тромба, који се углавном састоји од тромбоцита (плателета) и фибринских влакана. Тромбоцити (Слика 1.4) су мале ћелије неправилног облика, 2-3 μm у пречнику, које настају фрагментацијом прекурсорских ћелија, мегакариоцита. Они имају значајну улогу у хемостази и природан су извор фактора раста ћелије. У крви сисара циркулишу док се не укључе у процес формирања крвног угрушка. Ако је број тромбоцита мали, може доћи до сталног крварења, међутим, ако је њихов број врло висок, настаје крвни угрушак (тромб) у процесу који се назива тромбоза. Стварање и деградацију тромбоцита (путем фагоцитозе у слезини и Купферовим ћелијама јетре) регулише тромбопоиетин, хормон који се ствара у јетри или бубрезима.



Слика 1.4. Приказ тромбоцита у крвном суду. 1) псевдоподије, 2) микротубули, 3) микрофиламенти, 4) Голџијева телашца, 5) гликогенске грануле, 6) митохондрије, 7) грануле, 8) вакуоле, 9) ендоплазматски ретикулум, 10) азурофилне грануле. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације*, Југоремедија Зрењанин, 1980.

Електронским микроскопом могу се разликовати три зоне тромбоцита: периферна, сол-гел зона и зона са органелама (Слика 1.5).⁴ Периферна зона омогућава адхезију и агрегацију тромбоцита и одређује њихове морфолошке особине. Сол-гел зона омогућава контракцију тромбоцита, претварањем у гел стање и обратно. Зона са органелама одређује секреторну улогу тромбоцита. Периферну зону чине спољашњи слој, мембрана и предео испод мембране.



Слика 1.5. Приказ тромбоцита посматран под електронским микроскопом.ⁱⁱⁱ

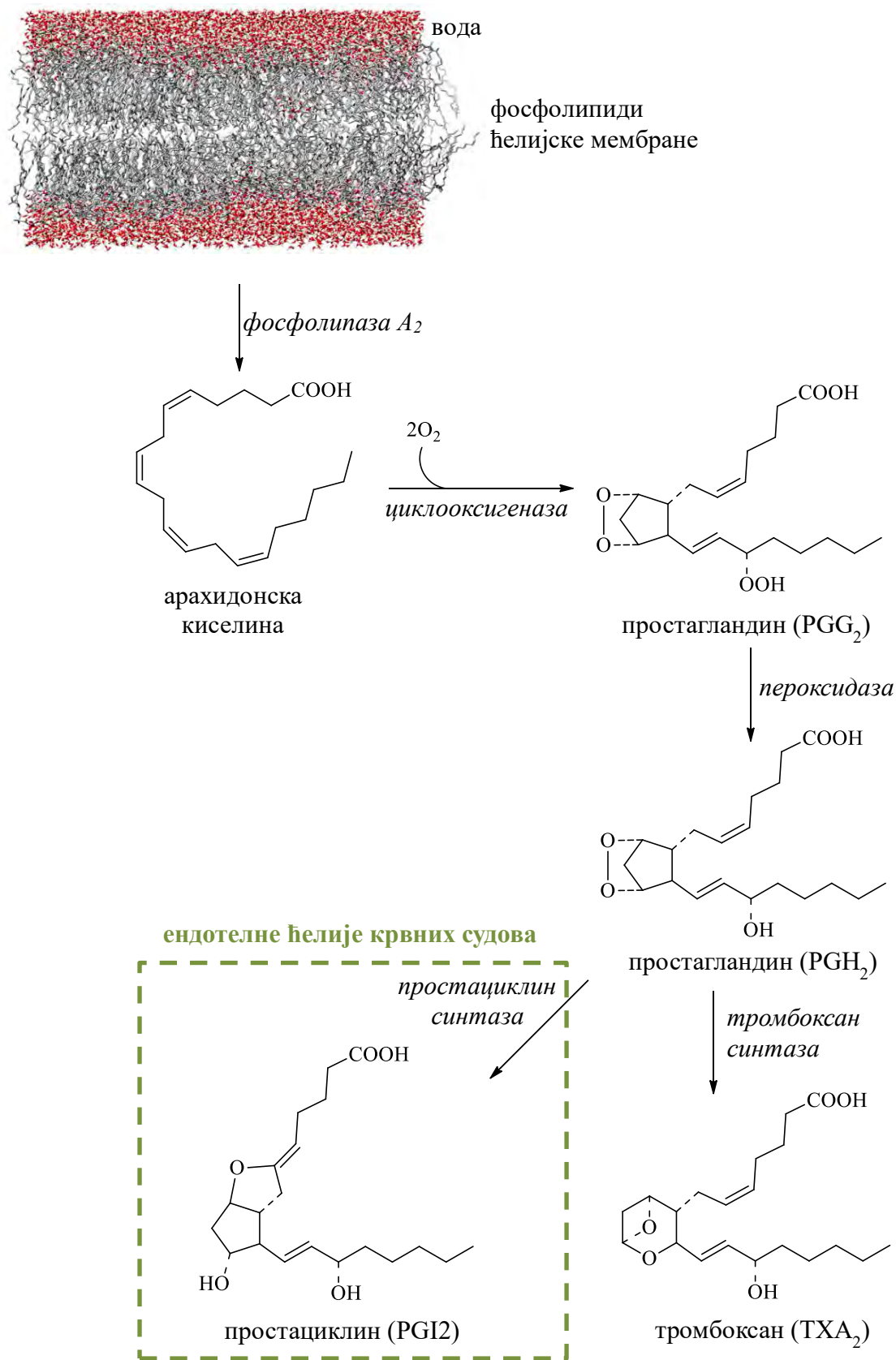
Спољашњи слој периферне зоне углавном се састоји од гликопротеина са рецепторском функцијом и адсорбованих протеина плазме. До сада је утврђено постојање девет гликопротеина: GPIa, GPIb, GPIIa, GPIIb, GPIIIa, GPIV, GPV и GPIX. Ови гликопротеини рецептори су агониста тромбоцита, затим простацikliна који делују антагонистички на тромбоците, те фактора коагулације крви. Детаљније, GPIa је највероватније посредник приликом везивања тромбоцита за колаген оштећеног крвног суда, GPIb је рецептор за von Willebrand-ов фактор, док су GPIIb и GPIIIa конституенти комплекса рецептора за који се везује протеин фибриноген, зимоген фибрина, односно крвног угрушка. Фибриноген је такође медијатор агрегације тромбоцита и за

тромбоцит-фибриноген комплекс накнадно се везују тромбоспондин и фибронектин. GPV је главни рецептор тромбина, ензима који катализује активацију фибриногена.

Мембрана периферне зоне тромбоцита састоји се од фосфолипида и ензима.⁴ Главна улога присутних фосфолипида је у формирању тромбоцитног фактора III који је неопходан за активирање већег броја фактора коагулације приликом стварања комплекса протромбиназе. Хидролизом фосфолипида мембране катализованом фосфолипазом A_2 , ензима који се активира при додиру тромбоцита са колагеном оштећеног крвног суда, ослобађа се арахидонска киселина. Арахидонска киселина је супстрат циклооксигеназе (енг. cyclooxygenase, COX) која катализује реакцију стварања ендопероксида простагландина G_2 (PGG_2) и простагландина H_2 (PGH_2). Оба пероксида изазивају агрегацију тромбоцита. Потом, ензим тромбоксан синтаза катализује конверзију PGH_2 у тромбоксан A_2 (TxA_2) и простациклин (PGI_2) (Шема 1.3). TxA_2 је најснажније агрегационо и вазоконстрикторно средство тромбоцита. Неопходан је за лучење садржаја гранула тромбоцита и за секундарни талас агрегације.

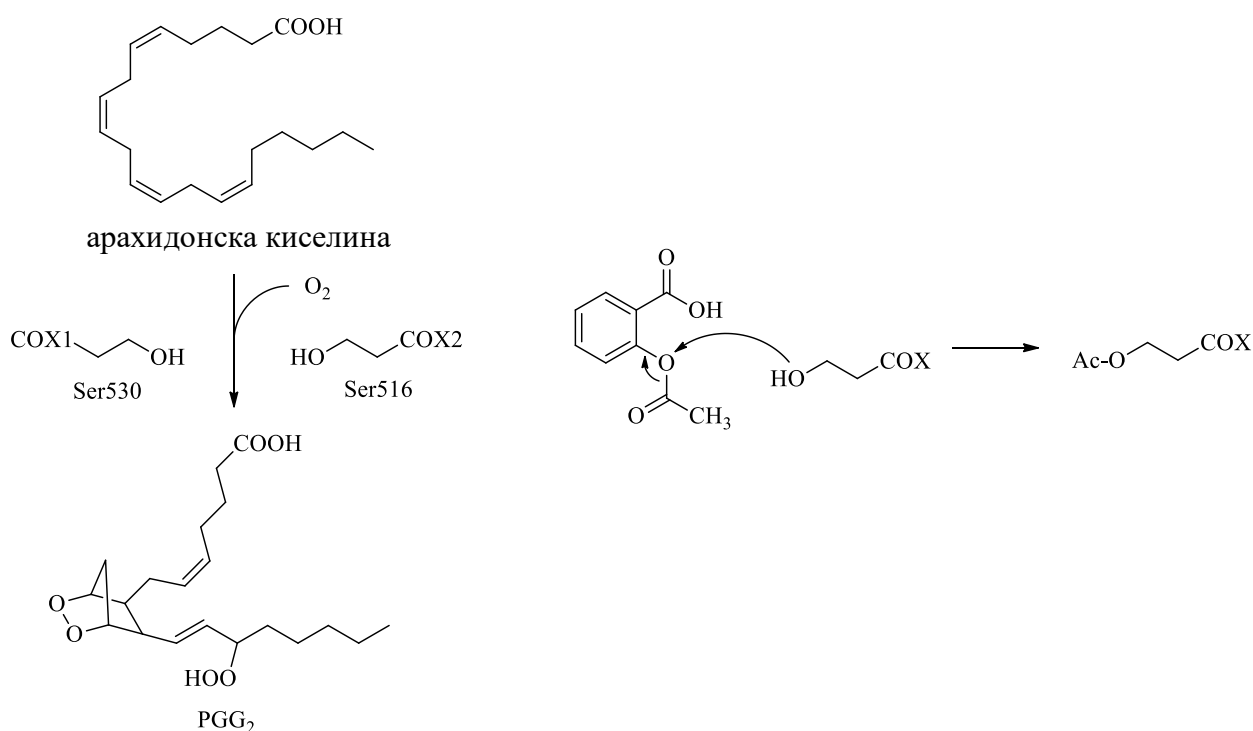
Биосинтеза тромбоксана A_2 неопходна је за активацију тромбоцита као додатног извора јона калцијума. Тромбоксан A_2 агонист је специфичних рецептора мембране тромбоцита који по активирању индукују отварање калцијумових канала на спољашњој мембрани тромбоцита. Отварањем канала омогућено је ослобађање калцијумових јона из интрацелуларних резерви те њихов прелазак у екстрацелуларну течност.⁵ Повећана концентрација екстрацелуларног Ca^{2+} може се усмерити ка калцијумовим каналима васкуларних мишићних ћелија чиме се додатно стимулише вазоконстрикција.

Истовремено, каталитичким деловањем ензима синтазе простациклина, у очуваним ћелијама ендотела, у околини оштећеног крвног суда, долази до биосинтезе простагландина I_2 (PGI_2), односно простациклина из ендопероксида (Шема 1.3). Простациклин има снажно антиагрегацијско дејство и изазива снажну вазодилатацију (ширење крвног суда). Простациклин, након везивања за рецепторе тромбоцита, утиче на повећање концентрације цикличног аденозин монофосфата (сАМР) и аденозин трифосфата (АТР). сАМР инхибира ослобађање арахидонске киселине из фосфолипида и спречава ослобађање Ca^{2+} . Нормално, постоји равнотежа између активности TxA_2 и антиагрегацијске активности сАМР, и управо та равнотежа игра значајну улогу у одржавању крви у течном стању.



Шема 1.3. Шематски приказ метаболизма арахидонске киселине у тромбоцитима и у ћелијама ендотела крвних судова.

Један од најпознатијих лекова који контролише агрегацију тромбоцита а самим тим и процес коагулације крви јесте аспирин. Наиме, аспирин, као антиинфламаторни лек, инхибира каталитичку активност циклооксигеназа 1 и 2 (енг. cyclooxygenases, COX-1 и COX-2), односно оксидацију арахидонске киселине до простагландина PGG₂.⁶ Метаболити из групе простагландина делују инфламаторно и проузрокују бол. Аспирин иреверсно инхибира каталитичку активност COX-1 и COX-2 ацетиловањем каталитичке аминокиселине Ser и спречава настанак PGG₂ (Шема 1.4).



Шема 1.4. Механизам инхибиторног дејства аспирина.

Предео периферне зоне испод мембране тромбоцита представља прелазну зону између периферне зоне и сол-гел зоне. У активираним тромбоцитима се у њој налазе влакна актина и миозина која одржавају облик тромбоцита и учествују у ретракцији коагулума.

Сол-гел зону чине контрактилни протеини актин и миозин и састоји се од микровлакна и микроканалнића. У активном стању тромбоцитна, у прелазној зони, налазе се микровлакна и микроканалнићи омогућавају ослобађање садржаја гранула тромбоцита.

У зони са органелама налазе се честице гликогена, митохондрије и три врсте гранула. Митохондрије играју улогу у метаболизму тромбоцита, а можда и у депоновању јона калцијума. У гранулама се налазе састојци тромбоцита који су или биосинтетисани у тромбоцитима или су преузети из плазме. У густим, тамним, δ -гранулама налазе се ADP, серотонин, катехоламини, калцијум и пиродифосфати. Ове грануле познате су и као тамна телашца (енг. dense bodies). Са друге стране, α -грануле садрже протеине који углавном учествују у хемостази. Прву групу чине протеини који се налазе у плазми: фибриноген, von Willebrand-ов фактор, те фактори V, IgG и IgA. Другу групу чине специфични протеини тромбоцита: тромбоцитни фактор IV, β -тромбоглобулин, тромбоспондин и тромбоцитни фактор раста.

Тромбоцити нормално циркулишу кроз крв, све док не започне процес хемостазе или тромбозе, када се активирају и потпомажу формирању хемостатског чепа или тромба. Тада постају интергални конституенти субсеквентних процеса:

1. адхезије на огољени колаген оштећеног крвног суда
2. ослобађања садржаја тромбоцитних гранула
3. агрегације

1.1.2.2. АДХЕЗИЈА НА ОГОЉЕНИ КОЛАГЕН ОШТЕЋЕНОГ КРВНОГ СУДА И ОСЛОБАЂАЊЕ САДРЖАЈА ТРОМБОЦИТНИХ ГРАНУЛА

Здраве ендотелне ћелије крвних судова прекривене су слојем негативно наелектрисаног гликопротеина гликокаликса, где простетичну групу протеина чини ендогени хепарин у облику хепарин сулфата.³ У нормалним физиолошким условима, када крвни суд није оштећен, долази до миграције тромбоцита кроз крвни суд. Миграција се одвија услед међусобног одбијања негативног наелектривања гликокаликса ћелија крвних судова и гликокаликса тромбоцита, сличног по саставу са гликокаликсом ендотелијума. Међутим, када дође до оштећења крвног суда, одбијање гликокаликса је умањено јер је спољашњи слој ендотелијума уклоњен па тада тромбоцити ступају у контакт са огољеним колагеном крвног суда и другим суб-ендотелним тромбогеним компонентама. Везивањем за колаген, долази до ширења тромбоцита на суб-ендотелијуму и ћелије трпе одређене морфолошке промене у виду формирања псевдоподија и бубрења, услед чега показују тенденцију ка узајамном

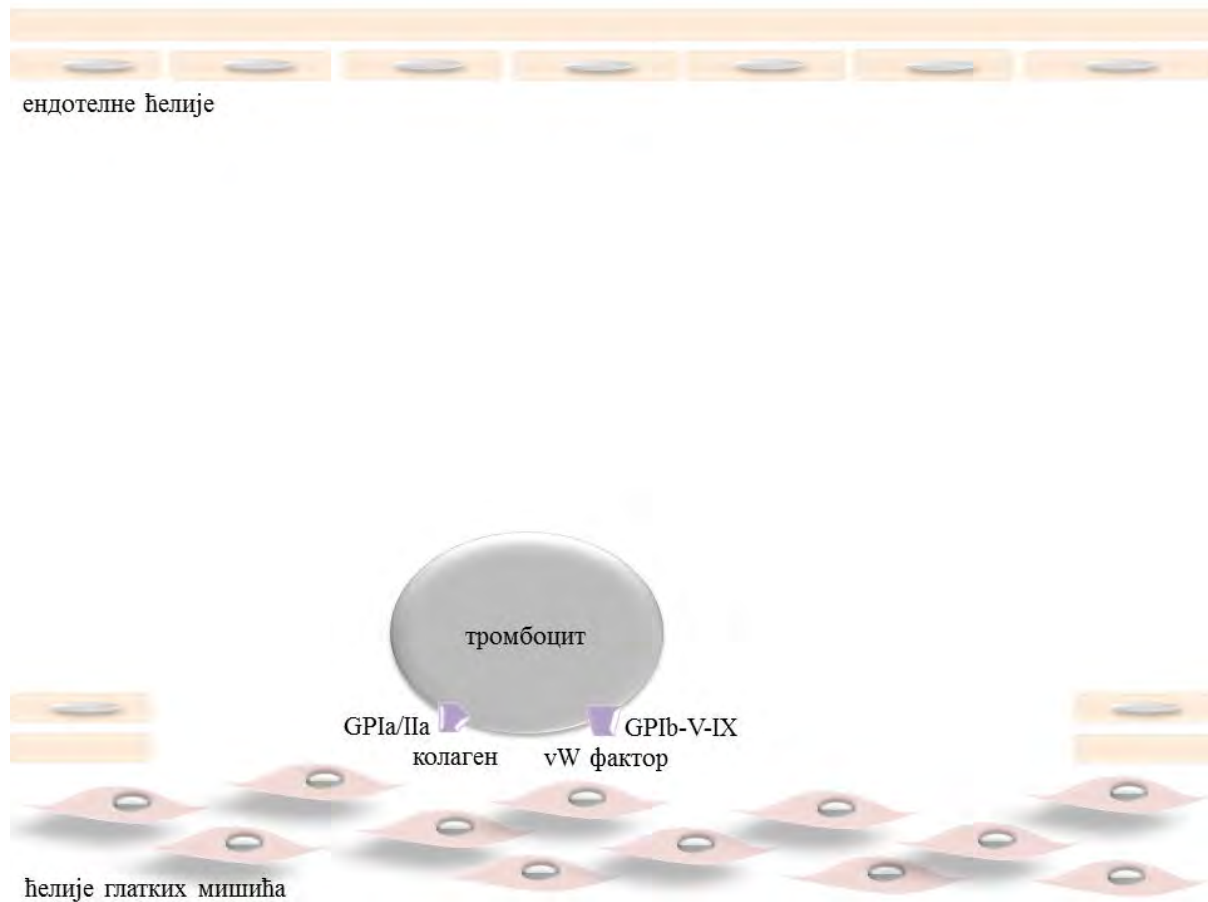
слепљивању (Слика 1.6). Тек када дође до промене сферичне структуре тромбоцита они се сматрају активираним.



Слика 1.6. Везивање тромбоцита за колагена влакна. 1) ендотелне ћелије, 2) дефект у ендотелу, 3) тромбоцити (надражајни облик) се везују уз колагена влакна и на ендотел, 4) изразито набубрели тромбоцит, 5) леукоцит у моменту напуштања крвног суда, 6) фиброцит. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације*, Југоремедија Зрењанин, 1980.

Везивање активираних тромбоцита олакшано је и присуством неких специфичних површинских рецептора на тромбоцитима, попут комплекса гликопротеина GPIa и GPIIa који се назива $\alpha_2\beta_1$ -интегрин (Слика 1.7). Додатна интеракција између тромбоцита и колагена остварује се преко von Willebrand-овог фактора и гликопротеинског комплекса GPIb-V-IX који се налази на површини тромбоцита. Von Willebrand-ов фактор (vW) је гликопротеин присутан у крвној плазми, а синтетишу га ендотелне ћелије крвних судова. Грађење vW-GPIb-V-IX комплекса суштински омогућава везивање тромбоцита за суб-ендотелијум. Везивању тромбоцита за оштећени крвни суд доприноси и тромбоцитни фактор IV који се ослобађа из α -

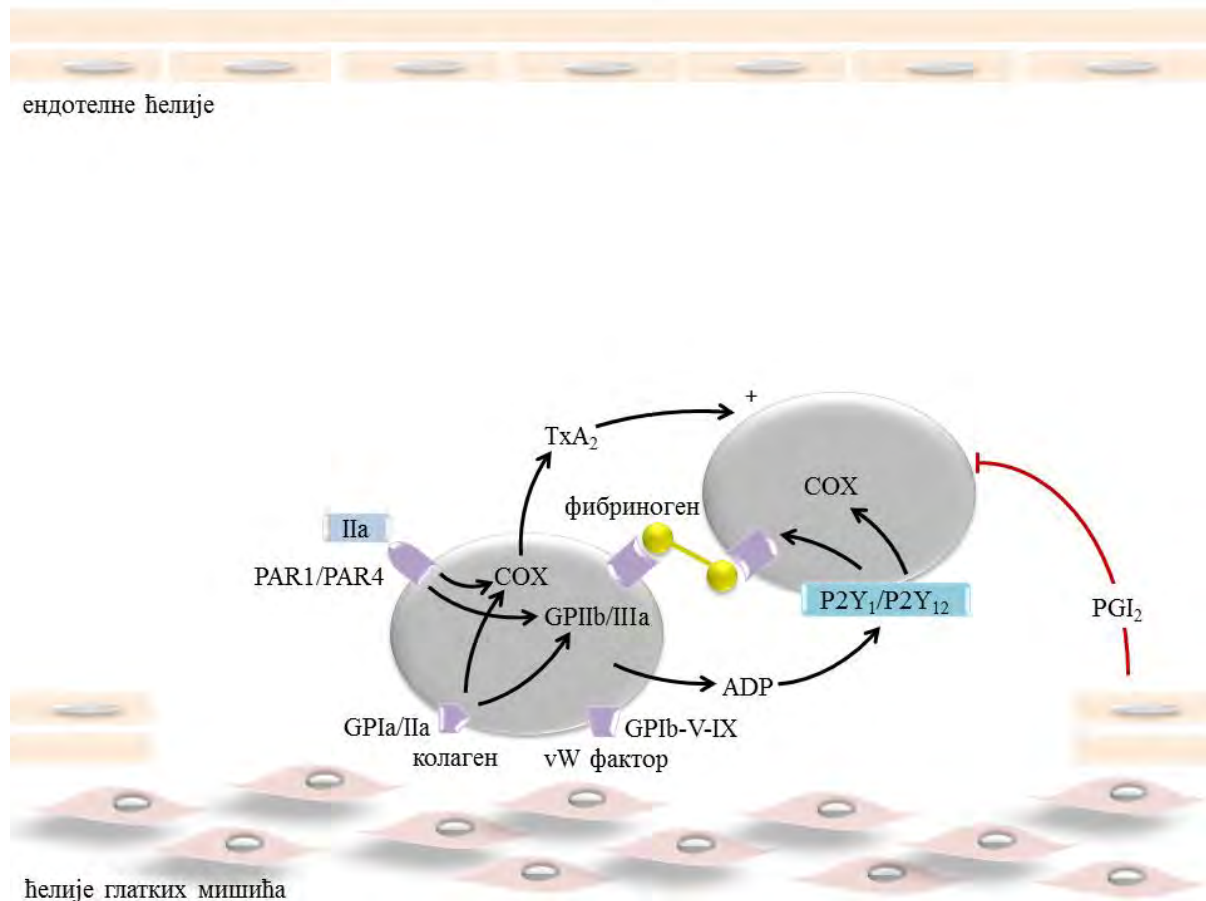
гранула активираних тромбоцита. Његова улога јесте да на површини ендотелијума крвних судова неутралише хепарин чиме се повећава осетљивост тромбоцита на агенсе агрегације.



Слика 1.7. Процес адхезије тромбоцита. Представљени су GPIa/IIa и GPIb-V-IX као рецептори крвних плочица и њихова интеракција von Willebrand-овим фактором, што доводи до адхезије крвних плочица на субендотелијум оштећеног крвног суда.

1.1.2.3. АГРЕГАЦИЈА ТРОМБОЦИТА

Тромбоцити везани за површину оштећеног ендотела јесу у даљем процесу медијум на коме се врши агрегација тромбоцита из циркулације (Слика 1.8).⁴ На овај начин долази до примарне агрегације тромбоцита (први талас агрегације тромбоцита) која је реверзибилна, при чему тромбоцити остају интактни и без поремећаја у функцији. Затим се новонастали слој тромбоцита активира, долази до контракције микротубула у тромбоцитима и избацује се садржај гранула; сама секреција је стимулисана тромбином.



Слика 1.8. Приказ процеса агрегације који се наставља на адхезију тромбоцита (приказани су сивом бојом). Представљени су рецептори активирани протеазама, PAR1 и PAR4 на површини тромбоцита, начин на који се они активирају тромбином; затим P2Y₁ и P2Y₁₂ рецептори на површини тромбоцита за ADP; тромбоксан A₂ који настаје из фосфолипида ћелијске мембране тромбоцита и простагландин I₂ који се синтетише у ендотелним ћелијама и инхибира активацију тромбоцита.

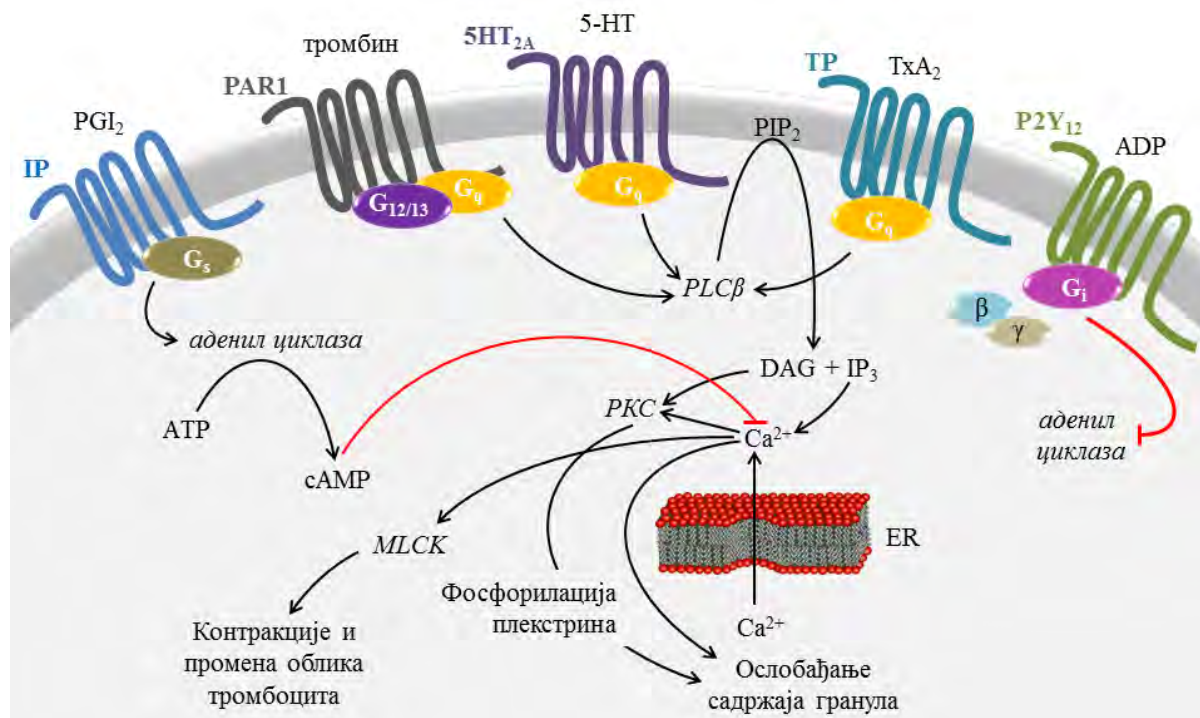
Тромбин, односно фактор II коагулационе каскаде, јесте један од завршних протеина коагулације крви и о њему ће бити више речи када се буде разматрала фаза каскадне коагулације крви. Поред улоге у самом процесу коагулације, тромбин је и најјачи активатор тромбоцита и иницира њихову активацију интеракцијом са рецепторима активираним помоћу протеаза (енг. protease-activated receptors, PARs) попут PAR1 и PAR4 који се налазе на плазма мембрани тромбоцита (Слика 1.9).⁷ Тромбин стимулише следећи корак активације тромбоцита јер као агонист PAR1 и PAR4 подстиче физиолошку активност како трансмембранских тако и интрацелуларних ефектора.

Тако, интеракција тромбина са плазма мембраном тромбоцита стимулише каталитичку активност интрацелуларне фосфолипазе C β (енг. phospholipase C β , PLC β) (Слика 1.9). Активирани ензим субсеквентно катализује хидролизу мембранског фосфолипида фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (енг. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂) до два унутрашња ефектора, 1,2-диацилглицерола (енг. 1,2-diacylglycerol, DAG) и 1,4,5-инозитол трифосфата (енг. inositol triphosphate, IP₃). Диацилглицерол даље као агонист активира протеин киназу C (енг. protein kinase C, PKC) која фосфорилише протеин плекстрин. Све ово узрокује отпуштање садржаја гранула и агрегацију.

Други продукт који настаје хидролизом PIP₂, IP₃, узрокује ослобађање јона калцијума у цитосол углавном из ендоплазматског ретикулума. Јони Ca²⁺ се потом везују за калмодулин и миозин киназу светлог ланца, што доводи до фосфорилације светлих ланаца миозина (Слика 1.9). Фосфорилисани мономери потом активирају актин, што доводи до контракције и промене облика тромбоцита. Аналоган процес се одвија и у ћелијама глатких мишића крвних судова током вазоконстрикције, када се врши контракција и сужавање крвних судова (Шема 1.2). Такође, јони Ca²⁺ неопходни су за активацију фактора коагулације и за међусобно повезивање тромбоцита.

Паралелно са претходно описаним процесима, активација тромбоцита може да се изврши и ослобађањем ADP из густих гранула тромбоцита у екстрацелуларну течност. Када се ADP као агонист комплексира са одговарајућим ADP рецепторима, P2Y₁ и P2Y₁₂ (Слике 1.8 и 1.9), иницира се агрегација и активација додатних тромбоцита. P2Y₁ и P2Y₁₂ могу даље подстаћи везивање фибриногена за тромбоците преко гликопротеинског комплекса GPIIb/IIIa и COX, те помоћи агрегацију тромбоцита и њихову секрецију.

Активација тромбоцитне фосфолипазе A₂ (енг. phospholipase A₂, PLA₂), индукована колагеном и повећањем цитосолног Ca²⁺, резултује ослобађањем арахидонске киселине из фосфолипида тромбоцита, и формирања тромбоксана A₂, TxA₂, у процесу аналогном оном описаном на Шеми 1.3. Тромбоксан A₂, поред тога што изазива локалну вазоконстрикцију крвних судова, деловањем на рецепторе тромбоцитне мембране може активирати и фосфолипазу C, те поспешити агрегацију тромбоцита. Додатно, TxA₂ активира гликопротеински комплекс GPIIb/IIIa, рецептор тромбоцитне мембране преко кога се остварује везивање за фибриноген.



Слика 1.9. Сигнални путеви активације тромбоцита. IP, PAR-1, 5HT_{2A}, TP и P2Y₁₂ су рецептори смештени на површини тромбоцита преко којих се везују простаглицин, тромбин, серотонин, тромбоксан A₂ и ADP. Гликопротеини који се куплују са наведеним рецепторима су G_s, G_{12/13}, G_q и G_i. β и γ су субјединице G_i-типа хетеротримерног G-протеина. Скраћенице: PLCβ - фосфолипаза Cβ, PIP₂ - фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, IP₃ - инозитол трифосфат, DAG - диацил глицерол, PKC - протеин киназа C, ER - ендоплазматски ретикулум, MLCK - миозин киназа светлог ланца.

1.1.3. ФАЗА КАСКАДНЕ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ

Коагулацијска фаза хемостазе одвија се након активације и агрегације тромбоцита на огољеном ендотелијуму. Сâм процес коагулације представља каскадни механизам и подразумева учествовање дванаест протеина који се називају фактори коагулације (фактори I до XIII), односно три протеина (протеини C, S и тромбодулин) који имају улогу регулатора (Табеле 1.1 и 1.2).⁴ Последица одвијања каскадног процеса је стварање фибринског угрушка, односно коагулума, који омогућава престанак крварења из већих крвних судова. Данас се сматра да су скоро сви фактори коагулације крви ензими који у плазми постоје у неактивном облику (зимогени ензими) а активирају се каскадним путем. Према конвенцији, свим активираним факторима коагулације крви се у називу додаје суфикс а.

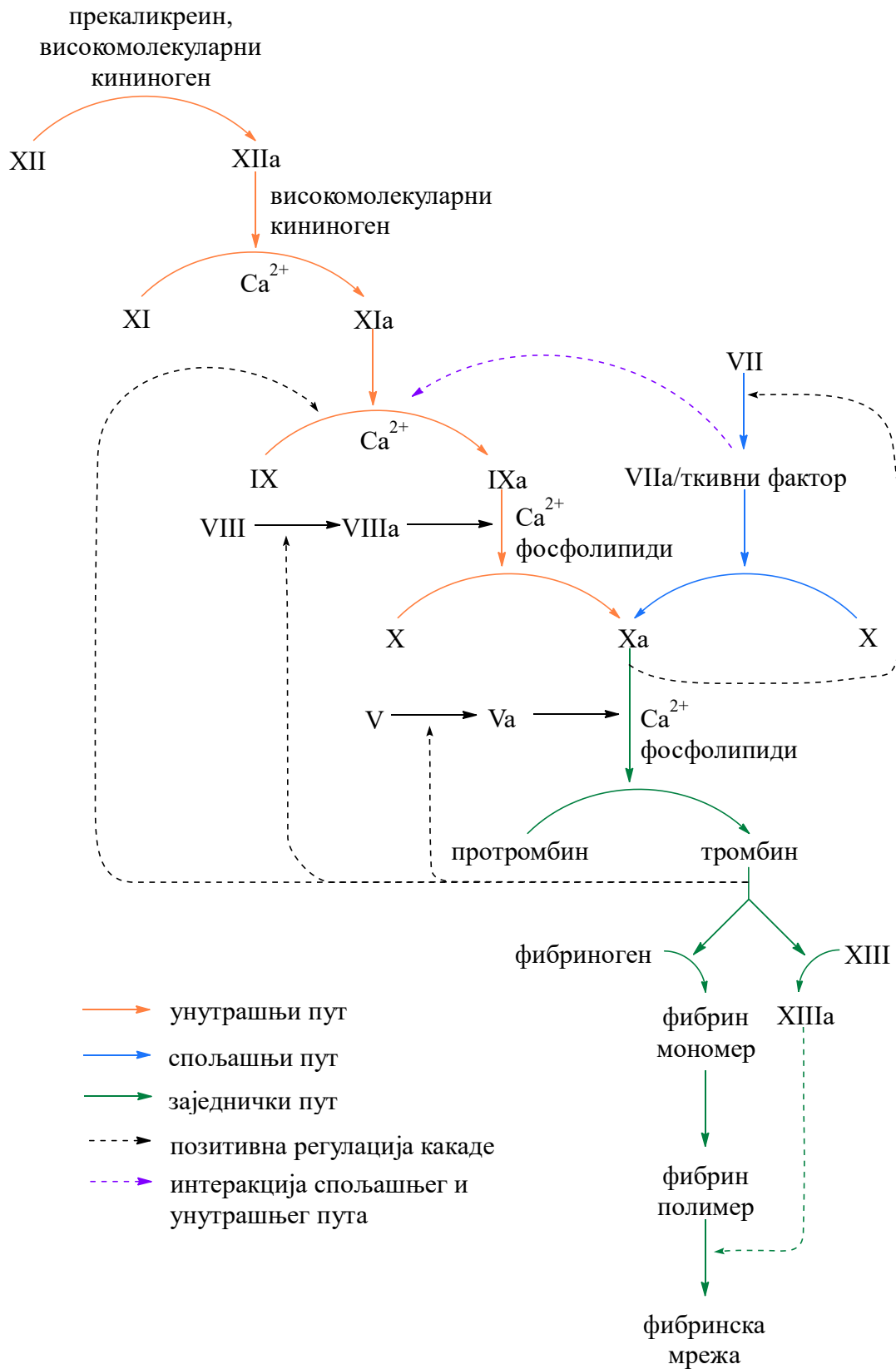
ТАБЕЛА 1.1. Нумеричко означавање фактора коагулације и њихови клинички називи.

ФАКТОР	УОБИЧАЈЕНО ИМЕ
I	Фибриноген
II	Протромбин
III	Ткивни фактор
IV	Ca ²⁺
V	Проакцелерин, лабилни фактор, акцелератор (Ac-) глобулин
VII ¹	Проконвертин, акцелератор конверзије серумског протромбина, котромбопластин
VIII	Антихемофилни фактор А, антихемофилни глобулин
IX	Антихемофилни фактор В, компонента тромбопластина плазме
X	Stuart-Prower-ов фактор
XI	Прекурсор тромбопластина плазме
XII	Hageman-ов фактор
XIII	Фактор који стабилизује фибрин, фибринолигаза

¹Не постоји фактор VI

Процес коагулације може се поделити у три фазе.⁴ У првој фази коагулације, сачињеној од егзогеног, односно спољашњег, те ендогеног, односно унутрашњег пута коагулације, формира се фактор коагулације који се назива активни тромбопластин (фактор III, ткивни фактор, протромбиназа). У другој фази, под дејством протромбиназе долази до настанка тромбина (фактор II) из протромбина (фактор IIa). У трећој фази, тромбин индукује превођење растворљивог фибриногена (фактор I) у нерастворан облик, фибрин (Шема 1.5).

Коагулација крви јесте динамички процес. Иако је традиционална класификација коагулационе каскаде и даље валидна, модерно разумевање своди се на баланс између про-коагулационог пута, који је одговоран за формирање коагулума, и механизма који инхибирају стварање угрушка на месту повреде.⁴

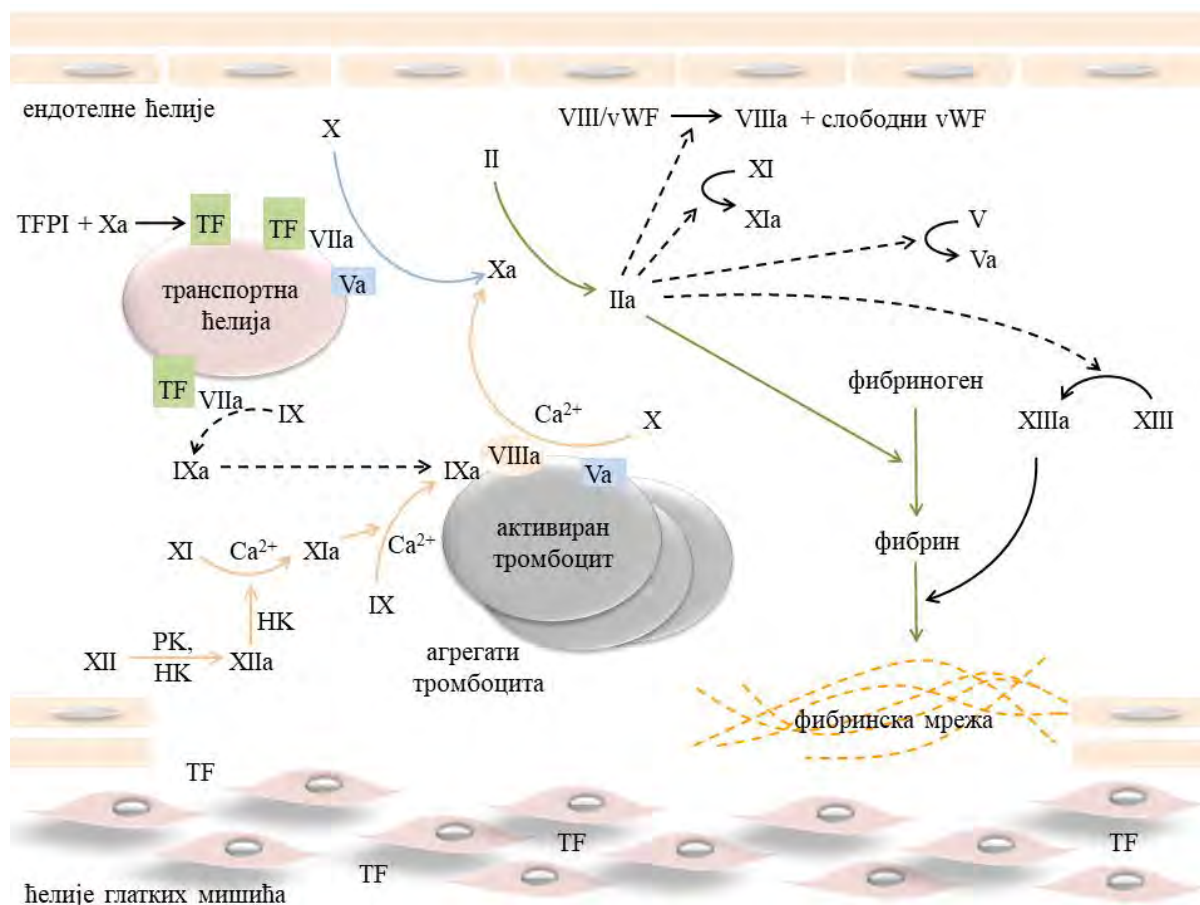


Шема 1.5. Класично представљање механизма коагулационе каскаде.

ТАБЕЛА 1.2. Подела коагулационих протеина према групама и њихова улога у коагулацији крви.

ГРУПА	КОАГУЛАЦИОНИ ПРОТЕИН	ФУНКЦИЈА
Зимогене серин-протеазе	Фактор XII	Везује се за негативно наелектрисану површину на месту повреде; активира се НМW кининогеном и каликреином
	Фактор XI	Активира се фактором XIIa
	Фактор IX	Активира се фактором XIa у присуству Ca^{2+}
	Фактор VII	Активирани тромбин у присуству Ca^{2+}
	Фактор X	Активира се на површини активираних тромбоцита теназа комплексом (Ca^{2+} , фактори VIIIa и IXa) и фактором VIIa у присуству ткивног фактора и Ca^{2+}
	Фактор II	Активира се на површини активираних тромбоцита протромбиназа комплексом (Ca^{2+} , фактори Va и Xa).
Кофактори	Фактор VIII	Активира се тромбином; фактор VIIIa је кофактор приликом активације фактора X фактором IXa
	Фактор V	Активира се тромбином; фактор Va је кофактор приликом активације протромбина фактором Xa
	Ткивни фактор (Фактор III)	Гликопротеин који се јавља на површини оштећене ендотелне ћелије и понаша се као кофактор фактора VIIa
Фибриноген	Фактор I	Разлаже се тромбином и формира фибрински (крвни) угрушак
Тиол-зависне трансглутаминазе	Фактор XIII	Активира се тромбином у присуству Ca^{2+} ; стабилизује фибрински угрушак ковалентним укрштањем
Регулаторски и остали протеини	Протеин C	Активира се тромбином који је везан за тромбомодулин; затим деградира факторе VIIIa и Va
	Протеин S	Понаша се као кофактор протеина C; оба протеина садрже Gla остатке
	Тромбомодулин	Протеин који се налази на површини ендотелних ћелија, везује тромбин који потом активира протеин C

Ипак, класично представљање коагулационе каскаде не пружа адекватан увид у то како се сама каскада одвија на нивоу тромбоцита и оштећеног ендотелијума (Слика 1.10).



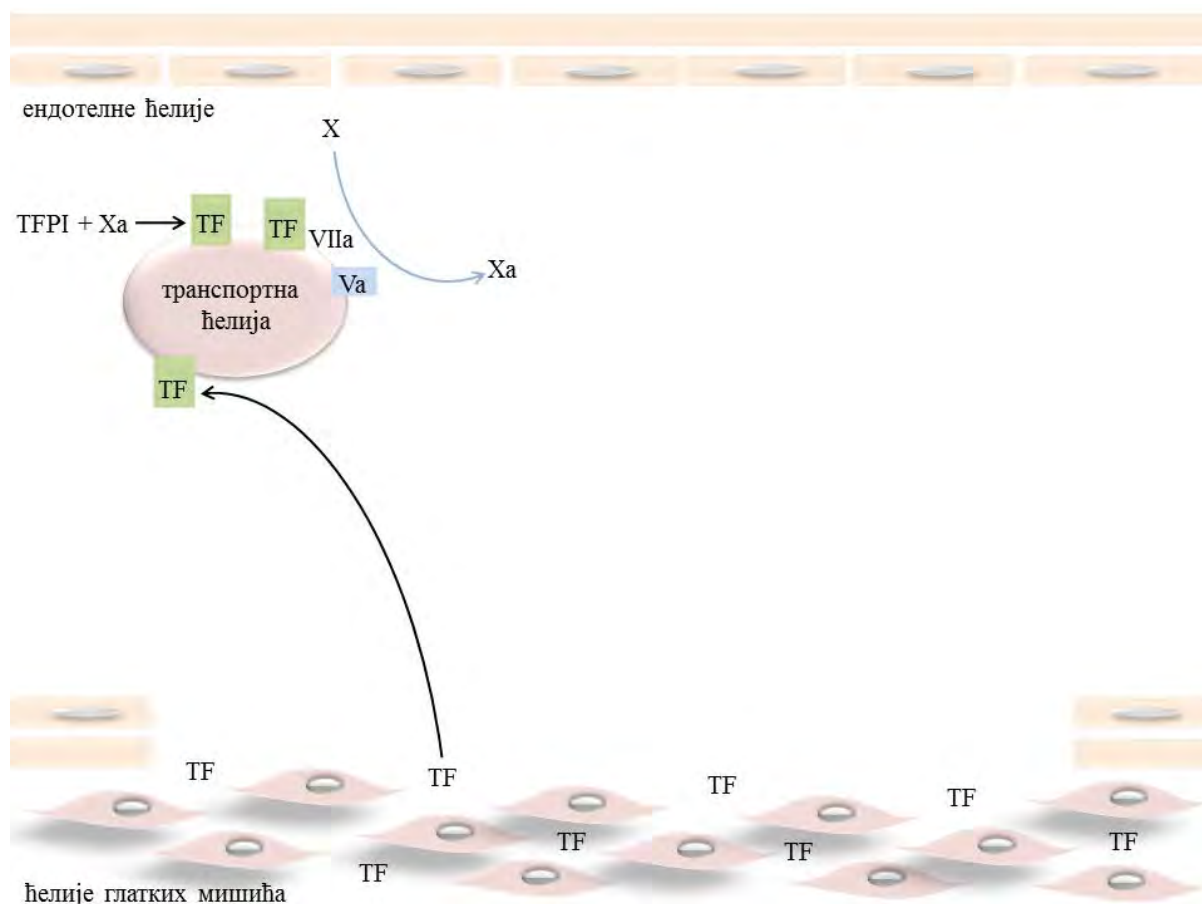
Слика 1.10. Коагулациона фаза хемостазе. Стрелице означене плавом бојом су укључене у спољашњи пут коагулације крви; Стрелице означене наранџастом бојом су укључене у унутрашњи пут коагулације крви; Стрелице означене зеленом бојом су укључене у заједнички пут коагулације крви. Пуне стрелице приказују примарне реакције у којима су активни наведени фактори, а испрекидане стрелице приказују споредне реакције ових фактора.

1.1.3.1. СПОЉАШЊИ ПУТ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ

Спољашњи пут коагулације крви започиње већ са адхезијом тромбоцита на оштећеном крвном суду, када се из суб-ендотелног ткива ослобађа ткивни фактор (енг. tissue factor, TF) са улогом да награди комплекс са фактором VIIa и јонима Ca²⁺. Овај процес траје јако кратко, око 10 секунди, па као крајњи производ настаје активирани фактор X (Слика 1.11).

Ткивни фактор се још назива и тромбоцитни ткивни фактор, фактор III или тромбопластин. Налази се у многим ткивима, а њиме су нарочито богати мозак, плућа, зидови крвних судова и плацента. Топологија и структурни домени фактора III још

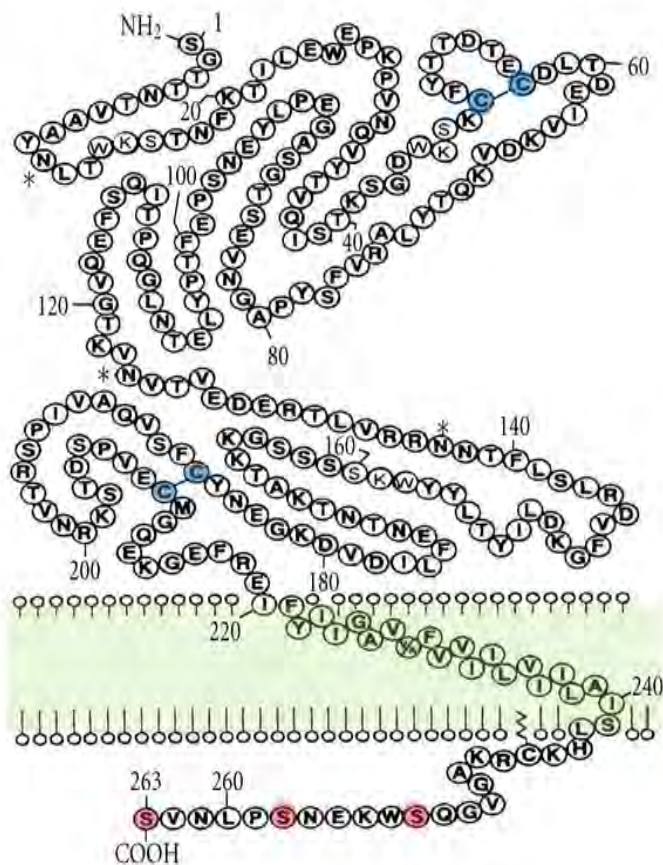
увек нису у потпуности дефинисани, мада се зна да овај трансмембрански протеин у примарној структури садржи 263 аминокиселине, при чему се остатак 1-219 налази на спољашњој страни мембране и представља екстрацелуларни домен за везивање фактора VII/VIIa и формирање комплекса који активира фактор X (Слика 1.12). Екстрацелуларни домен је гликолизован и садржи четири цистеинска остатка. Кристална структура екстрацелуларног домена је позната и приказана је на Слици 1.13.



Слика 1.11. Спољашњи пут коагулације крви. TF представља ткивни фактор, а TFPI инхибитор ткивног фактора.

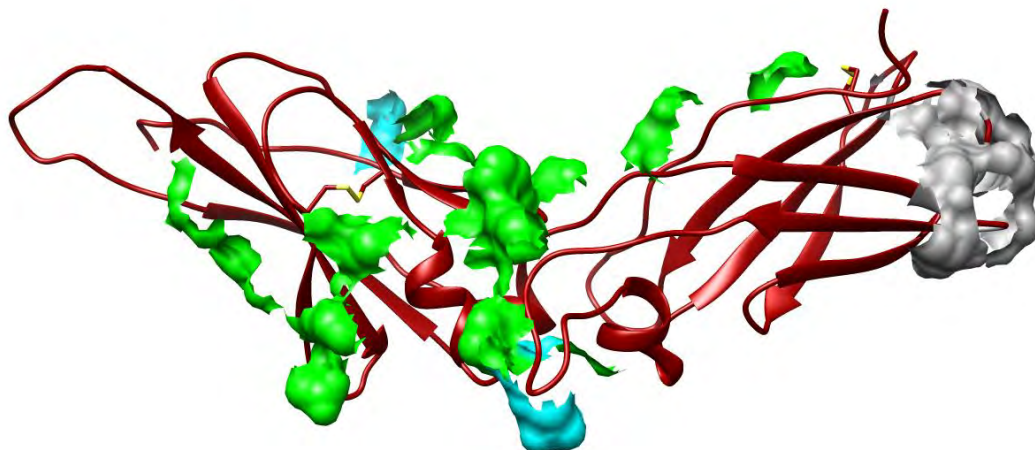
Ткивни фактор се ослобађа из ендотелних ћелија оштећеног крвног суда и прелази у крв путем транспортних ћелија попут фиброцита (конституенти везивног ткива крвних судова, односно леукоцити из крви) (Слика 1.11). При контакту ткивног фактора са фактором VII, који слободно циркулише кроз крв, долази до формирања фактора VIIa.⁸ Ткивни фактор има улогу трансмембранског рецептора за факторе VII/VIIa. Природно, ендотелијум физички раздваја ткивни фактор од циркулишућих

лиганада FVII/FVIIa и спречава неповољну активацију коагулационе каскаде. Раскидање баријере ендотелијума доводи до експресије екстраваскуларног ткивног фактора и брзе активације коагулационе каскаде. TF се такође биосинтетише у одређеним ткивима, попут срца и мозга, где представља вид хемостатске заштите ових органа. Постоји и „урођени” ткивни фактор чија концентрација расте када дође до развоја канцера, сепсе, а предуслов је и за развој тромбозе.



Слика 1.12. Топологија коагулационог фактора III.^{iv}

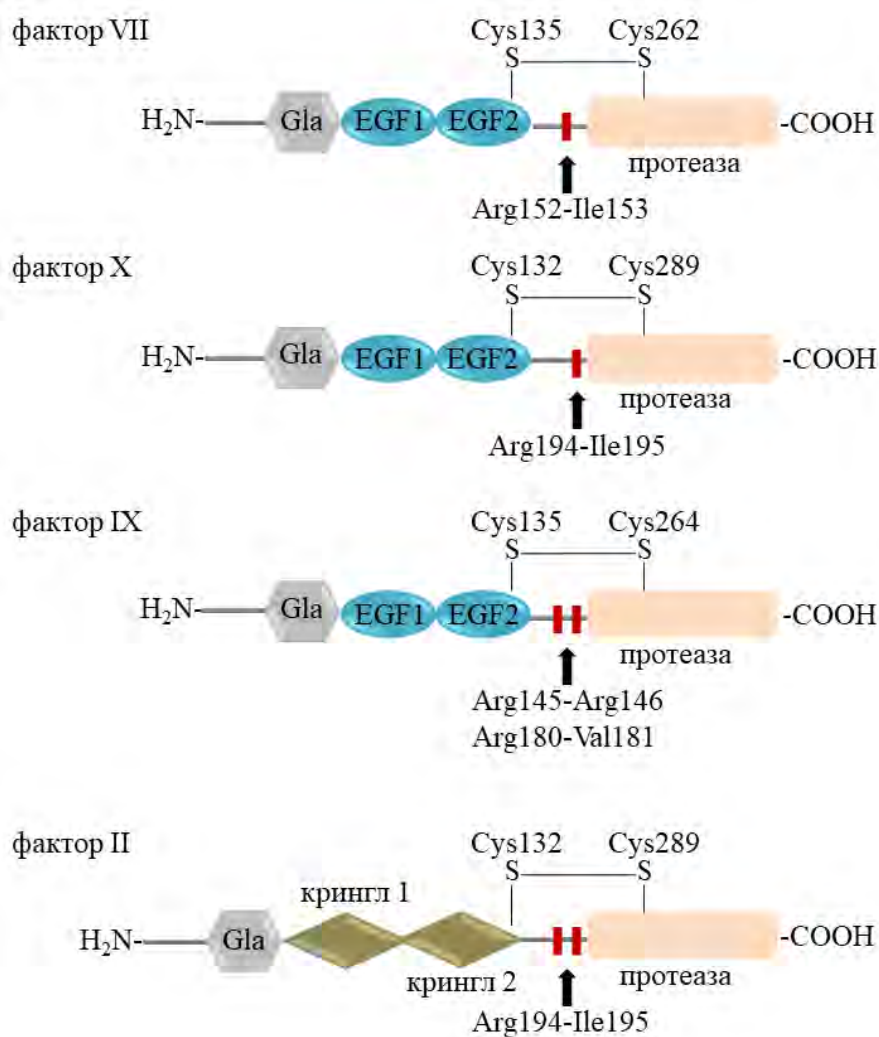
Фактор VII је серин протеаза (Слике 1.14 и 1.16) за чију је активацију неопходан витамин К као коензим. Активација овог фактора, као и фактора II, IX и X, и протеина С и S врши се карбоксилацијом Glu остатака у присуству витамина К (Шема 1.6).



Слика 1.13. Кристална структура екстрацелуларног домена ткивног фактора снимљена у резолуцији од 1,7 Å (PDB ID: 1BOY). Терцијарна структура ткивног фактора приказана је тамно црвеном бојом док су дисулфидне везе приказане жутом. Центри гликолизације јесу аминокиселине Asn11, Asn134, Asn137 (плава површина); интеракције са фактором VII остварују се помоћу аминокиселина Thr17, Lys20, Ile22, Glu24, Gln37, Asp44, Lys46, Lys48, Asp48, Thr60, Phe76, Tyr78, Glu110, Leu133, Arg135, Phe146, Val207 (зелена површина); интеракција са фактором X остварује се помоћу аминокиселина Gln118, Val119, Thr121, Lys159, Asp180, Lys181, Gln183 (сива површина); парови цистеина, градитеља дисулфидних веза, су Cys49-Cys57 и Cys186-Cys209.

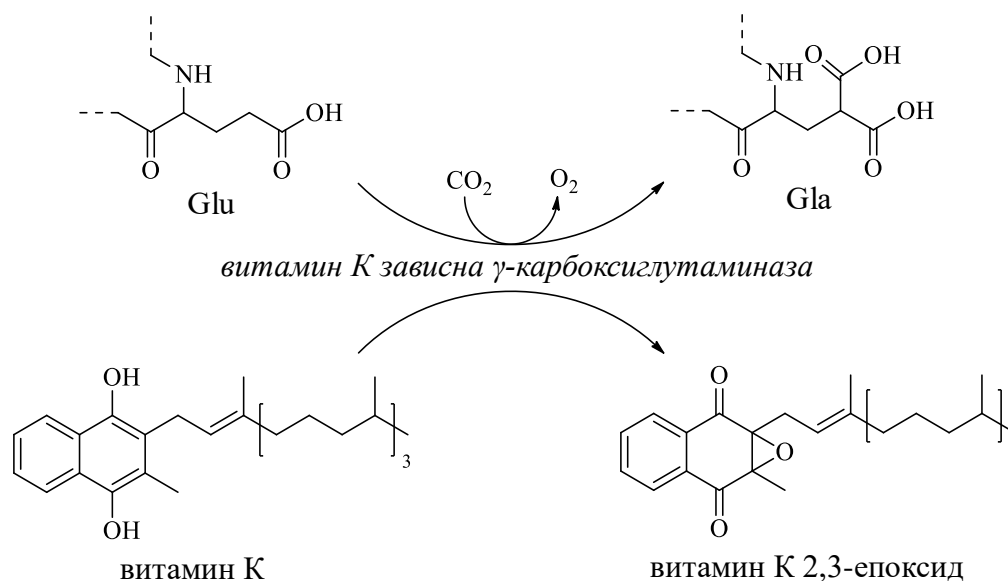
Витамин К је коензим карбоксилазе која катализује карбоксилацију глутаминске киселине унутар фактора II, VII, IX и X до γ -карбоксиглутаминске киселине (Gla) (Шема 1.6).⁹ Преко γ -карбоксиглутаминске киселине се поменути фактори коагулације везују за фосфолипиде транспортних ћелија (фактор VII) или фосфолипиде мембране тромбоцита (фактори II, IX и X) посредством калцијумових мостова.

Уколико се детаљније сагледа топологија фактора II, VII, IX, X и протеина С сасвим је разумљиво зашто витамин К зависна γ -карбоксиглутаминаза врши карбоксилацију ових протеина (Слика 1.15).



Слика 1.14. Сличности и разлике у структурним доменама фактора VII, X, IX и II. Редослед је намерно одабран да би се поштовао редослед укључивања у коагулациону каскаду.

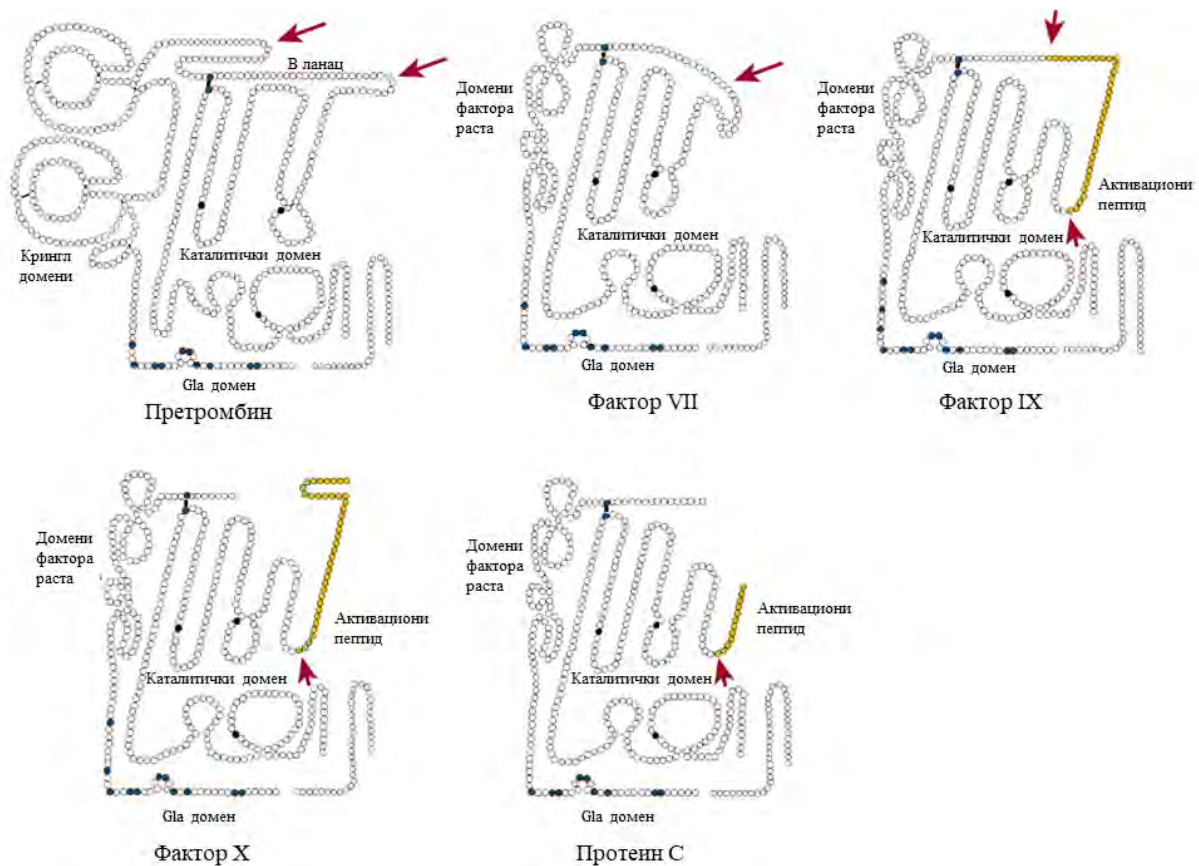
Наиме, свака од ових протеаза садржи готово идентичан каталитички регион у коме се налази Gla домен. Сличност у структури домена фактора раста такође је велика. Период идентичности у примарној структури Gla домена ових протеина износи преко 80%, док период идентичности у секвенци за све протеине износи између 60 и 73%, што указује да постоји висок степен аналогије у терцијарној и кватернерној структури фактора II, VII, IX, X и протеина C, која се најбоље огледа у томе да сви имају лаки и тешки ланац повезан дисулфидним везама и конзервиране домене.



Шема 1.6. Карбоксилација и активација фактора II, VII, IX и X, и протеина C и S у присуству витамина K.

Улога Gla домена јесте да веже метаболички калцијум хелатизацијом помоћу две карбоксилне групе. Код свих поменутих витамин K-зависних протеаза на *N*-терминусу постоји конзервирани Gla-X(3)-Gla-X-Cys мотив, лоциран на средини Gla домена, који је одговоран за хелатизациони капацитет протеаза. Тродимензионалне кристалне структуре неколико Gla домена су познате. По везивању, јони калцијума индукују конформационе промене у домену које су неопходне да би се успоставила правилна терцијарна структура овог домена. Обзиром на чињеницу да Gla-зависне протеазе представљају ензиме који се налазе на спољашњој мембрани ћелија ендотелијума у *N*-терминусу, постоје хидрофобне аминокиселине које креирају субструктуре у виду α -хеликса које остварују интеракције са површином мембране.

Поред поменутих фактора коагулације, Gla домени су структурна карактеристика и остеокалцина, протеина за изразитом улогом у физиологији костију, затим протеина матрикса који инхибира калцификацију (енг. the calcification-inhibiting matrix Gla protein MGP), протеина регулатора ћелијског раста GAS6 (енг. growth arrest specific gene 6 protein), периостина односно фактора који је неопходан за миграцију и адхезију ћелија епитела, трансмембранских Gla протеина (енг. transmembrane Gla proteins, TMGPs), те протеина са високом концентрацијом пролина (енг. proline-rich Gla-proteins, PRGPs) чија улога није довољно проучена.

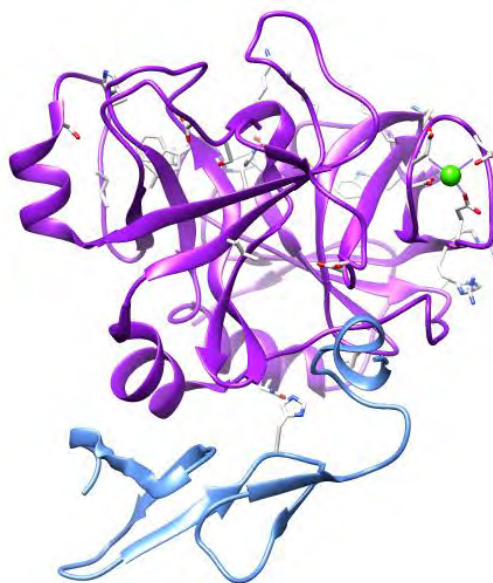


Слика 1.15. Сличност у топологији фактора II, VII, IX, X и протеина C.^v

Фактор VII је, дакле, фактор који се биосинтетише у јетри а као слободан циркулише у крви у траговима и то искључиво у облику инактивне форме зимогена. Као и све витамин K-зависне серин протеазе (Слика 1.15), терцијарна структура фактора VII формира се од тешког и лаког ланца (Слика 1.16).¹⁰ Унутар тешког ланца налази се домен са остацима глутаминске киселине (Glu), два домена са улогом да остваре интеракције са епидермалним факторима раста (енг. epidermal growth factor-like domains, EGF) за које се везују фактори EGF1 и EGF2. Лаки ланац представља домен протеазе и повезан је са тешким ланцем дисулфидном везом Cys132-Cys262.

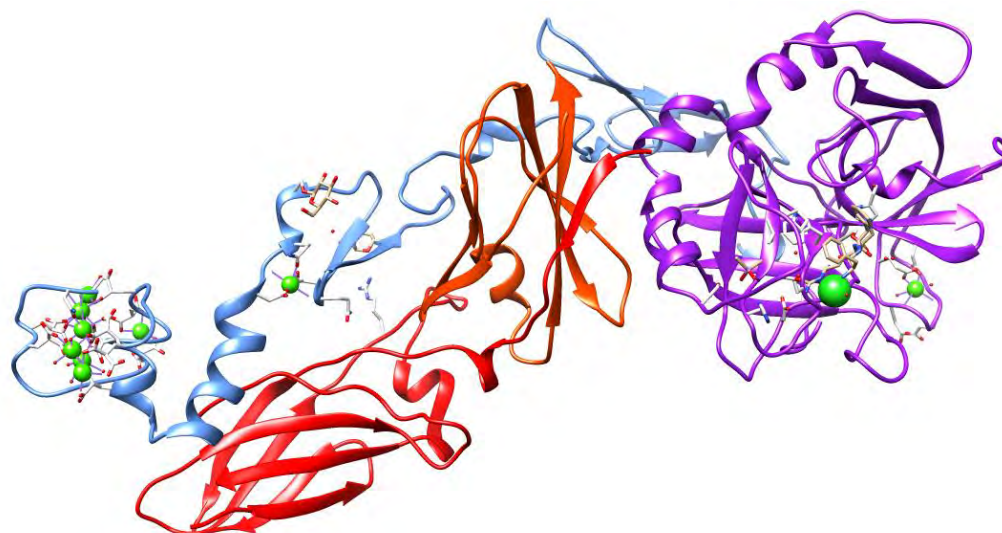
Неколико плазма ензима, међу којима и активирани фактори IX, X (у присуству фосфолипида), XII, тромбин, те фактор III могу конвертовати фактор VII у дволанчану форму. Назначајнији вид активације фактора VII јесте онај који се одвија након интеракције са фактором III, односно ткивним фактором. Интеракцијом ткивног фактора и фактора VII посредством калцијумових мостова настаје такозвани комплекс ткивног фактора, TF-VIIa-Ca²⁺ који је каталитички активан (Слика 1.17).¹¹ Притом долази до великих конформационих промена унутар самог фактора VII, раскида се

пептидна веза Arg152-Ile153, долази до структурне реорганизације на нивоу терцијарне структуре и настанка фактора VIIa. Такође, долази и до нарушавања терцијарне структуре фактора III са формирањем два независна домена. Активација фактора VII утиче и на то да *N*-терминус продире у структуру фактора VII и утиче на грађење електростатичког моста између амидног азота пептидне везе коју гради Ile153 и карбоксилне групе Asp343. Прелазак фактора VII у активну форму подразумева и формирање тзв. активационог домена од стране четири пептида: првог који се састоји од аминокиселина 16–19, другог сачињеног од аминокиселина 142–152 (фрагмент 140s), трећег кога чине аминокиселине 184–194 (фрагмент 1) и последњег у виду аминокиселина 216–223 (фрагмент 2).

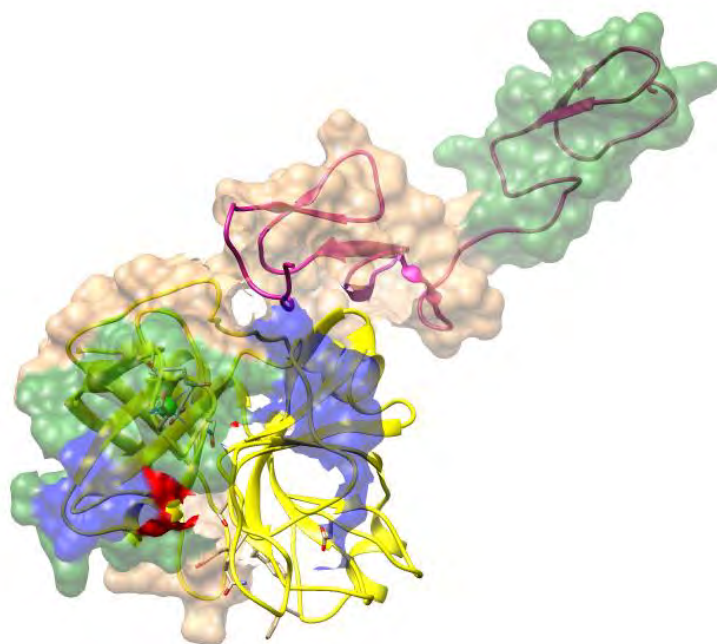


Слика 1.16. Кристална структура коагулационог фактора VII снимљена у резолуцији од 1,9 Å (PDB ID: 5TQE). Тешки ланац представљен је љубичастом бојом док је структура лаког ланца представљена плавом. Јони Ca²⁺ комплексирани са остацима Gln приказани су зеленом бојом.

По креирању комплекса ткивног фактора, његова улога је да преко фактора VIIa катализује процес раскидања пептидне везе Arg194-Ile195 везе унутар фактора X (Слика 1.18) и доведе до стварања дволанчане серин протеазе, фактора Xa. Но, пре тога ваља напоменути да инактивни зимоген фактор X поседује готово идентичну архитектуру структурних домена оној у фактору VII (Слика 1.14): у тешком ланцу налазе се *N*-терминални остаци γ -карбоксиглутаминске киселине и два EGF1 и EGF2 домена, у лаког ланцу налази се каталитички центар (Слика 1.18).¹²

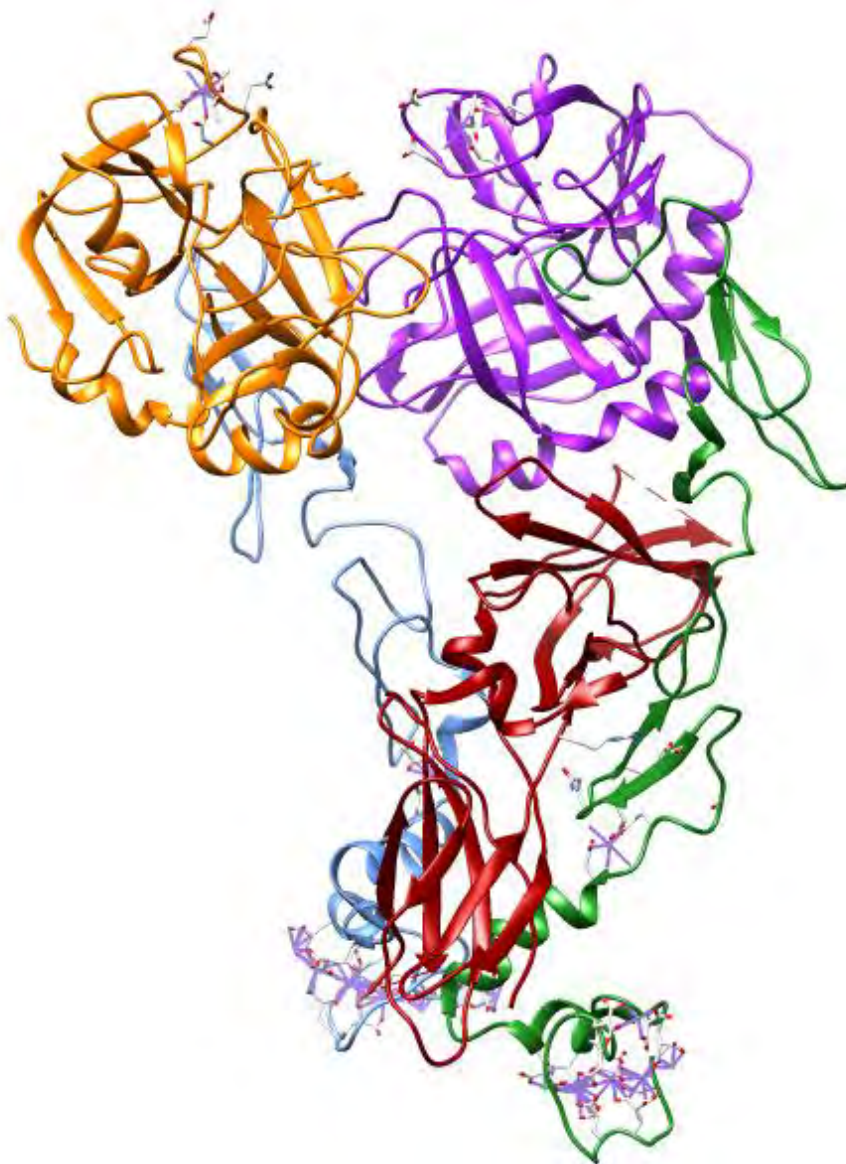


Слика 1.17. Кристална структура екстрацелуларног домена ткивног фактора у комплексу са фактором VIIa снимљена у резолуцији од 2,0 Å (PDB ID: 1DAN). Тешки ланац фактора VIIa представљен је љубичастом бојом, док је структура лаког ланца представљена плавом. Новонастали ланци ткивног фактора обележени су црвеном и наранџастом бојом. Јони Ca^{2+} комплексирани са остацима Glu приказани су зеленом бојом.



Слика 1.18. Кристална структура фактора X снимљена у резолуцији од 2,3 Å (PDB ID: 1XKA). Тешки ланац фактора X представљен је жутом бојом, док је структура лаког ланца представљена розе бојом. Јони Ca^{2+} комплексирани са остацима Glu приказани су зеленом бојом. Регион γ -карбоксиглутаминских киселина (аминокиселине 1-39) обележен је транспарентном плавом сфером, хидрофобни регион (аминокиселине 40-45) је црвена сфера, регион везивања EGF1 (аминокиселине 46-84) је транспарентно зелен, регион везивања EGF2 (аминокиселине 85-128) је транспарентно окер.

Након активације, фактор Ха остаје асоциран за TF/VIIa комплекс. Конгломерат (Слика 1.19) у различитим облицима (TF/VII/Ха, TF/VIIa/X или TF/VIIa/Ха) јесте физиолошки релевантан као молекулска мета за инхибирање коагулације крви и процеса сигналне трансдукције који се односе на кардиоваскуларна обољења и инфламацију. Сâм тројни комплекс у било ком облику везује се за епителни фактор раста (енг. Epithel Growth Factor, EFG), који има улогу у стабилизацији комплекса за оштећени крвни суд.

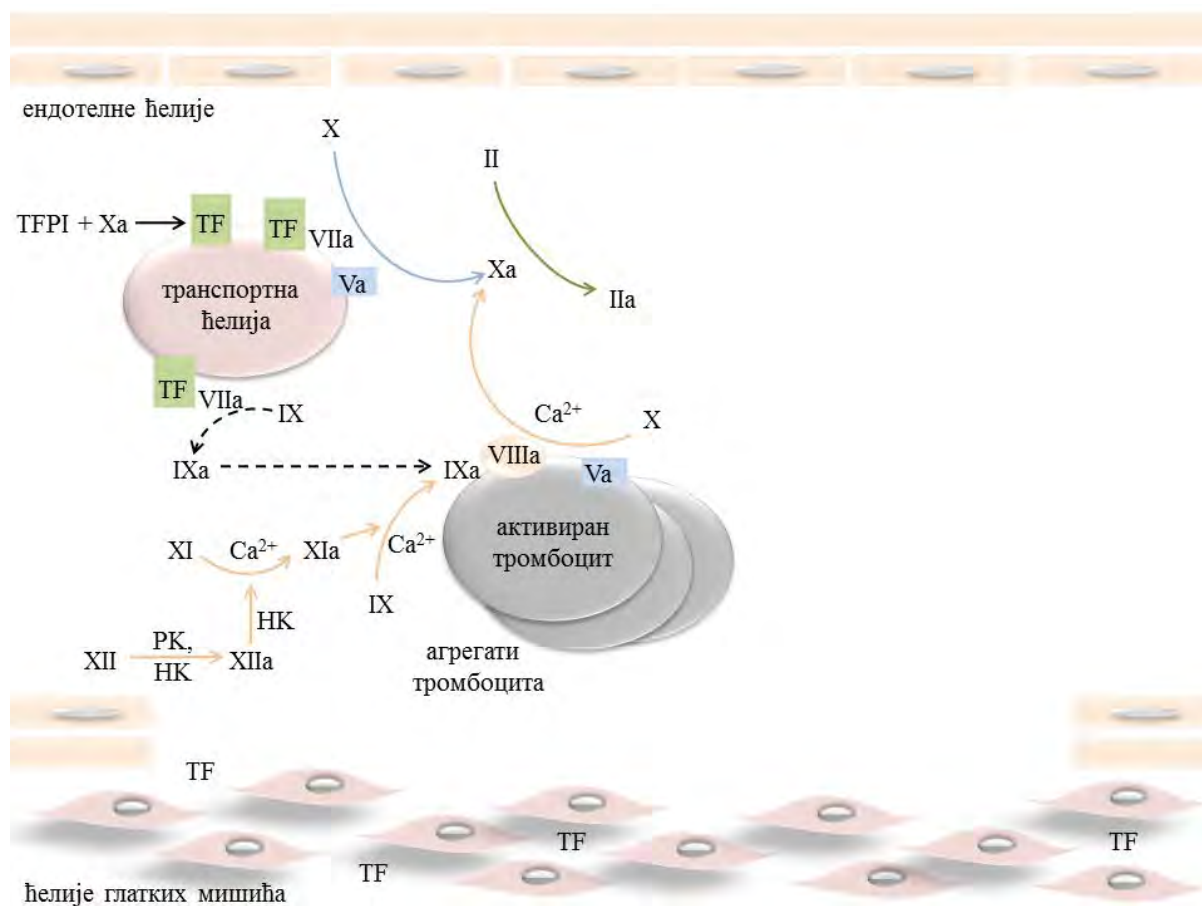


Слика 1.19. Теоретски модел кристалне структуре комплекса ткивног фактора са комплексом Ха (PDB ID: 1NL8). Ткивни фактор означен је црвеном бојом, тешки ланац фактора VIIa представљен је љубичастом бојом, док је структура лаког ланца представљена зеленом бојом. Тешки ланац фактора Ха илустрован је жутом а лаки ланац обојен је плавом бојом.

Инхибитор пута ткивног фактора (енг. tissue factor pathway inhibitor, TFPI) главни је физиолошки инхибитор коагулације. То је протеин који заједно са липопротеинима циркулише кроз крв и директно инхибира фактор Ха, везивањем за ензим близу активног центра. Комплекс Ха-TFPI даље инхибира комплекс ткивног фактора (Слика 1.11).

1.1.3.2. УНУТРАШЊИ ПУТ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ

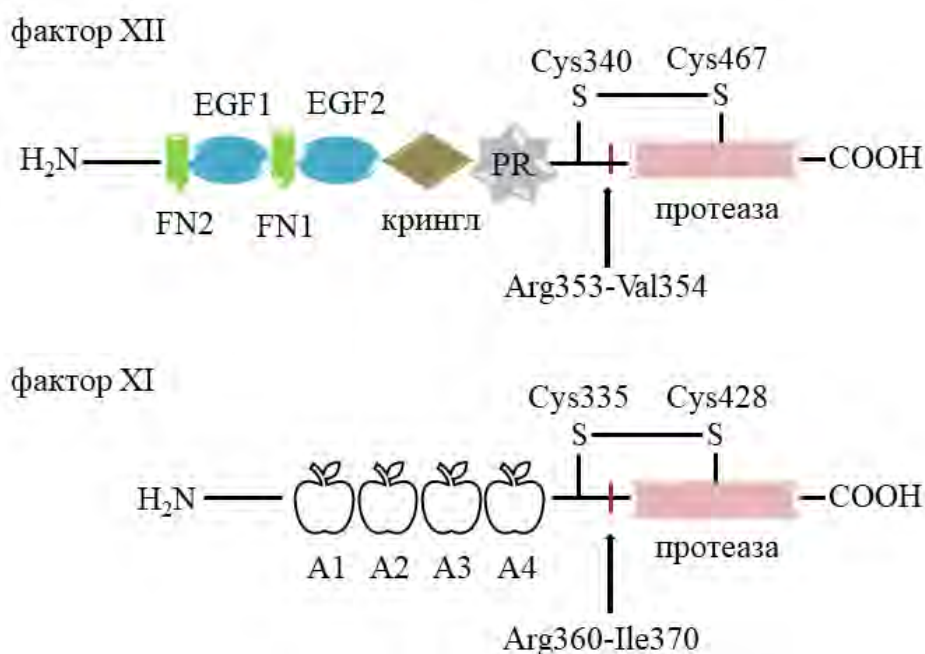
Унутрашњи пут коагулације крви започиње на тзв. "контактној фази" коју чине колаген и мембрана тромбоцита (Слика 1.20). Ово је најдужа фаза коагулације јер просечно траје 3-6 минута.



Слика 1.20. Унутрашњи пут коагулације крви. РК - прекаликреин, НК - високомолекуларни кининоген, TF - ткивни фактор.

Унутрашњи пут иницира се прекаликреином (ПК), протеином крвне плазме који се активира у присуству високомолекуларног кининогена (енг. high molecular weight kininogen, НК) до каликреина (К).⁴ Високомолекуларни кининоген је протеин присутан у крвној плазми. Неактиван је све док не ступи у контакт са ендотелним ћелијама оштећеног крвног суда. Не испољава ензимску активност, већ се понаша као кофактор приликом активације каликреина и фактора XII. У највишем нивоу организације садржи шест диференцираних домена: домен 1 у коме се везује Ca^{2+} , домен 2 у коме се врши инхибиција цистеин протеазе, домен 3 у коме се поред инхибиције цистеин протеазе врши и везивање тромбоцита и ендотелијалних ћелија, домен 4 у коме се одвија биосинтеза брадикинина, домен 5 који се везује за негативно наелектрисану површину ендотелијума на којој се одвија агрегација са хепарином, те домен 6 у коме се везују прекаликреин и коагулациони фактор XI. Каликреин је, са друге стране, серин протеаза одговорна за раскидање пептидне везе унутар фактора коагулације XII и његово активирање.

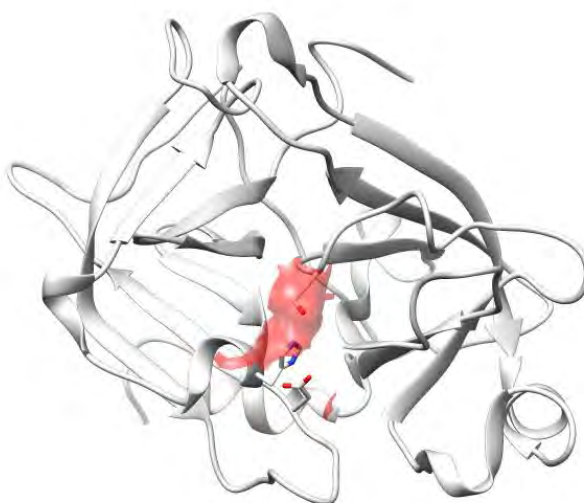
Као и већина фактора коагулације и фактор XII јесте серин протеаза (Слике 1.21 и 1.22) која се састоји од тешког и лаког ланца, међусобно повезаних дисулфидном везом.¹³



Слика 1.21. Сличности и разлике у структурним доменима фактора XII и XI. Редослед је намерно одабран да би се поштовао редослед укључивања у коагулациону каскаду.

Према примарној структури и у хомологији са другим серин протеазама које садрже висок степен идентичности у секвенци, тешки ланац садржи два фибронектинска домена (тип I и II), два EGF домена, регион богат пролином и тзв. крингл домен. Крингл домени су аутономни протеински домени који формирају велике петље стабилизоване са 3 дисулфидне везе. Они учествују у протеин-протеин интеракцијама са крвним коагулационим факторима. Име крингл потиче од скандинавског пецива на које ове структуре подсећају. У лаког ланцу налази се домен протеазе.

Не постоји кристална структура комплетног фактора XII депонована на Protein Data Bank већ су решене кристалне структуре протеаза (Слика 1.22) и EGF1 домена, што отежава разумевање каталитичког механизма и физиолошке функције фактора XII. Ипак познато је да каталитичку триаду овог протеина чине His394, Asp442 и Ser544 и да помоћу ње активирају фактор XI.



Слика 1.22. Кристална структура лаког ланца фактора XII снимљена у резолуцији од 2,14 Å (PDB ID: 4XDE). Лаки ланац фактора XII представљен је светло сивом бојом. Регион каталитичке триаде обележен је транспарентном црвеном сфером.

Након раскидања пептидне везе Arg353-Val354 настаје фактор XIIa који омогућава превођење зимогена XI у његов активни облик, XIa. Фактор XI јесте необична димерична протеаза (Слика 1.21) чије је структурне особине разликују од осталих витамин K-зависних коагулационих протеаза.¹⁴ У кватернерној структури, фактор XI јесте дисулфидном везом повезани димер, а сваки од мономера садржи по

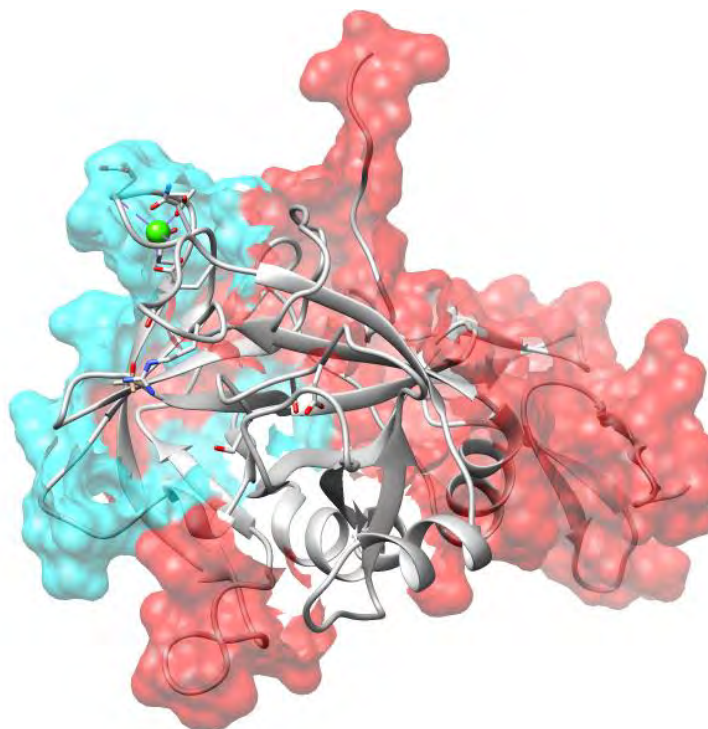
607 аминокиселина (Слика 1.23). У *N*-терминалном делу постоје 4 домена у облику јабуке обележених редом А1 до А4, сваки од домена садржи 90 до 91. аминокиселину и у терцијарној структури садржи један α -хеликс и седам β -набораних конформација, а заједно ови домени формирају облик диска. *N*-терминус се наставља на *C*-терминус са каталитичким доменом сличним ономе који се налази у трипсину. Регион раскидања фактора XI и настанка фактора XIa јесте Arg360-Ile370, док каталичку триаду чине аминокиселине Ser557, Asp462, и His413, аминокиселине које активирају фактор IX.



Слика 1.23. Кристална структура фактора XI снимљена у резолуцији од 2,85 Å (PDB ID: 5I25). А1-А4 домени у облику јабуке обележени су зелено, жуто, тиркизно и црвено. Каталитички домен обележен је љубичасто, суб-регион раскидања означен је транспарентном црном сфером, док је каталитички центар обележен белом сфером.

Фактор XI циркулише у крви у комплексу са НК. Прекаликреин, зимоген протеазе α -каликреина, хомологи је мономер фактора XI са идентичним структурним доменима и такође циркулише у крви са НК. Оба протеина везују се у суб-региону фактора XI кога чине аминокиселине са редним бројем од 150 до 160 и који се налази на А2 региону. Приликом настанка фактора XIa долази и до отпуштања брадикинина из домена 4 НК. Фактор XIIa на крају овог мини циклуса реагује са прекаликреином, при чему се стварају нове количине каликреина, те се тако врши реципрочна активација фактора XIIa. За суб-домен А1 везује се тромбин, док се у суб-региону А4 везују фактор IX и антикоагулант хепарин.

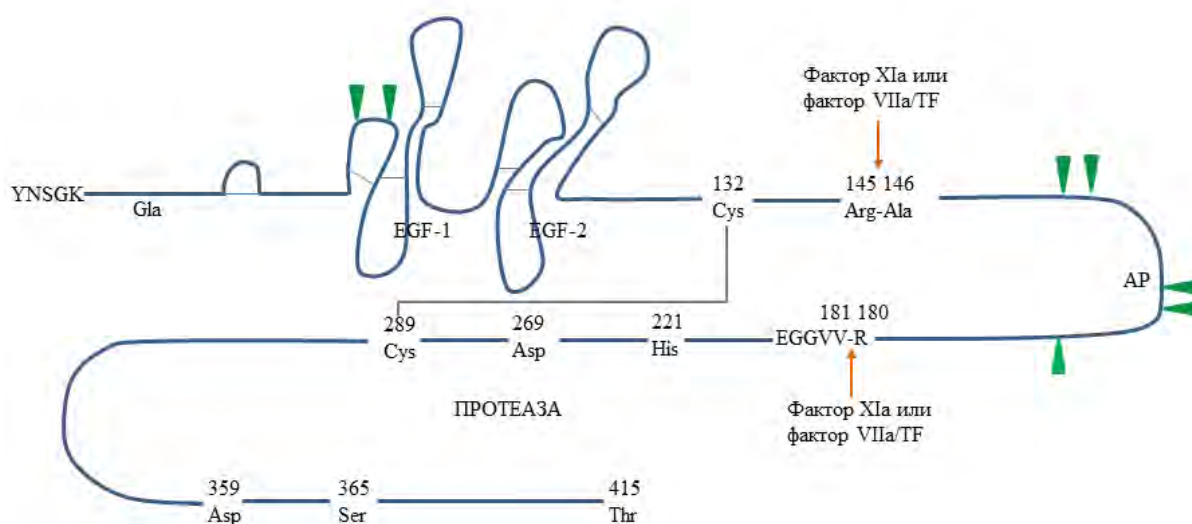
Фактор XIa, уз присуство Ca^{2+} , надаље преводи фактор IX (Слике 1.24 и 1.25), у свој активни облик IXa. По физиолошкој функцији, фактор IX је још једна витамин K-зависна протеаза те не чуди да дели сличности у структурним доменима са већ описаним факторима VII и X (Слика 1.14); кристалну структуру фактора IX карактеришу тешки и лаки ланац.¹⁵ У Gla домену тешког ланца дванаест аминокиселина подлеже карбоксилацији. Овај домен се, уз помоћ јона калцијума, везује за поларни део фосфолипидне мембране. На Gla домен се настављају EGF-1 и EGF-2 региони. Унутар EGF-1 суб-домена, на његовом N-темину, постоји још једно везивно место за Ca^{2+} , док је C-терминус повезан са хидрофобним делом EGF-2, електростатичким мостом који чине Lys122 (EGF-1 аминокиселина) и Gln174 (EGF-2 аминокиселина). EGF-2 се надаље наставља на лаки ланац, односно ланац серин протеазе. Не постоји комплетно решена кристална структура фактора IX депонова у Protein Data Bank; постоји структура тешког ланца у комплексу са EGF-2 (Слика 1.24), тако да је структура каталитичког центра протеазе непознаница.



Слика 1.24. Кристална структура фактора IX снимљена у резолуцији од 1,9 Å (PDB ID: 3CL3). Тешки ланац фактора IX представљен је светло сивом бојом. Јони Ca^{2+} комплексирани са остацима Glu приказани су зеленом бојом. Регион γ -карбоксиглутаминских киселина (аминокиселине 1-64) обележен је транспарентном плавом сфером, док регион везивања EGF2 (аминокиселине 64-128) је транспарентно црвено обојен.

Оно што је прва специфичност фактора IX јесте да је способан да гради комплексе са антителима. Обзиром да се фактор IX налази на средини коагулационе каскаде, он служи у исто време и као коагулациони фактор али и као вид механизма контролне регулације саме каскаде. Познато је да сâм Gla домен уз помоћ калцијумових мостова може да комплексира антитело Fab 10C12, чиме у очима имуног система коагулациони фактор постаје антиген. Везивање овог антитела блокира интеракцију фактора IX са ћелијском мембраном. Разлог овакве контроле фактора IX са антителима јесте што поремећај у активности фактора IX или његове мутације могу изазвати хемофилију типа B.

Иако постоји сличност у терцијарној структури са осталим витамин K-зависним протеазама, фактор IX је јединствен у коагулационој каскади по томе што његова активација до фактора IX α подразумева раскидање чак две пептидне везе, Arg145-Ala146 и Arg180-Val181, које је катализовано било фактором XIa или комплексом ткивног фактора (Слика 1.25). Након првог раскидања, уклања се секвенца од 35 аминокиселина која претходи каталитичком центру и том приликом настаје фактор IX α . Овај фактор јесте хомодимер у коме се ланци држе дисулфидном везом Cys132-Cys289. Након другог раскидања долази до формирања каталитички активног молекула IX β . Претпоставља се да регион серин протеазе садржи каталитичку триаду His221, Asp269 и Ser365.



Слика 1.25. Активација фактора IX.

Структура каталитичког центра фактора IX није позната; познато је да протеаза која је настала активацијом фактора IX катализује раскидање пептидне везе Arg371-Phe372 у фактору X, што доводи до стварања дволанчане серин протеазе, фактора Xa. Аналоган процес одвија се и у присуству фактора VIIa који је активан на спољашњем путу коагулације крви (комплекс ткивног фактора).

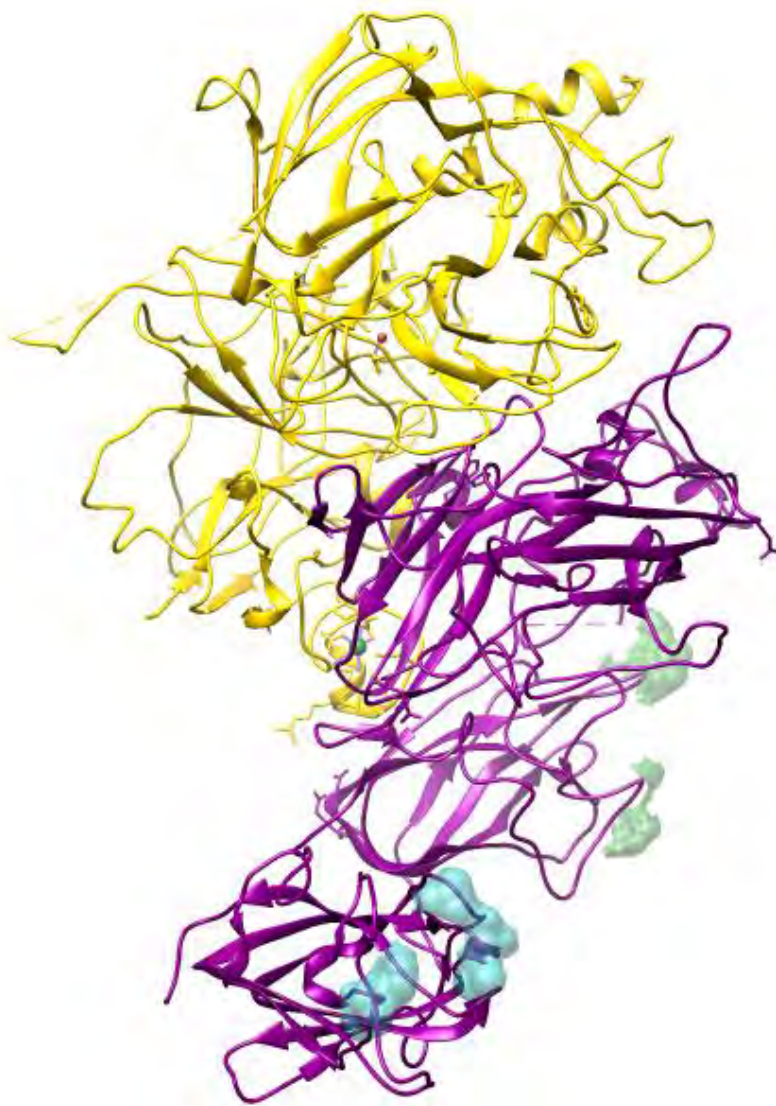
Стварање фактора Xa захтева присуство система који се назива теназа комплекс, а који се налази на површини мембране активираних тромбоцита. Комплекс се састоји од јона Ca^{2+} и фактора VIIIa, IXa и X. Треба напоменути да у свим реакцијама које укључују зимогене са Gla остатком, N-терминуси фактора коагулације су места везивања Ca^{2+} . За несметано одвијање физиолошке функције теназа комплекса, тромбоцити најпре морају бити активирани. Активација је неопходна како би анјонски фосфолипиди, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол, који се нормално налазе на унутрашњој страни плазма мембране неактивираних тромбоцита, били приступачнији.

Премда су сви фактори који учествују у активирању теназа комплекса серин-протеазе, фактор VIII то није већ као гликопротеин представља рецептор на површини тромбоцита са физиолошком улогом кофактора за факторе IXa и X. Фактор VIII се активира се минималним концентрацијама тромбина а деактивира у присуству већих количина тромбина. У његовом одсуству или приликом поремећаја у активности долази до развоја хемофилије типа A, наследног поремећаја у крварењу.

У терцијарној структури фактор VIII (Слика 1.26) састоји се од два, нековалентним интеракцијама повезана ланца: лаког ланца (енг. Light Chain, LC), који остварује интеракције са ћелијском мембраном, односно тешког ланца (енг. Heavy Chain, HC), који интерагује са фактором IXa.¹⁶ Сам фактор VIII у примарној структури садржи 2332 аминокиселине организоване у шест структурних домена: A1-A2-B-A3-C1-C2. Лаки ланац се састоји од A3-C1-C2 суб-домена, док структуру тешког ланца чине суб-домени A1-A2-B. Унутар C2 суб-домена налази се главни регион који се везује за мембрану у виду четири β -набораних конформација. Са C1 суб-домена интеракцију са мембраном остварују Gln2042-Phe2043, Leu2053, Leu2096 и Lys2092-Phe2093. Са C2 суб-домена у интеракцији са мембраном учествују следећи парови аминокиселина: Met2199-Phe2200 и Leu2251-Leu2252. Учвршћивање за мембрану додатно је омогућено и ангажовањем аминокиселина Phe2093-Lys2092 и Gln2042-

Phe2093 са C1 суб-домена. Поред два C домена, у интеракцији са мембраном учествује и A3 суб-домен са LC. Сами LC и HC ланци нековалентно су повезани јонима дво-валентних метала; најчешће су у питању јони калцијума и бакра.

Теназа комплекс настаје након раскидања пептидне везе Arg180-Val181 фактора IX и настанка електростатичког моста између Arg180 и Asp364, унутар фактора IXa. Тада активни центар фактора IXa може да оствари интеракцију са својим кофактором VIIIa.



Слика 1.26. Кристална структура фактора VIII снимљена у резолуцији од 15 Å (PDB ID: 3J2Q). Тешки ланац фактора VIII представљен је жутом бојом, лаки ланац представљен је љубичастом. Јони Ca²⁺ приказани су зеленом бојом, јони Cu²⁺ тамно црвеном. Део C1 домена који интерагује са мембраном приказан је транспарентном зеленом сфером док је одговарајући део C2 суб-домена приказан транспарентно плавом сфером.

Припрема фактора VIII за грађење теназа комплекса отпочиње још са иницирањем коагулације а њој помаже и тромбин тако што одстрањује В суб-домен и раскида пептидну везу Arg372-Ile373 између А1 и А2 суб-домена. Тако активирани фактор VIIIа представља заправо хетеродимер који се састоји од суб-домена А1 и А2 односно LC. У самом А2 суб-домену налази се центар за везивање фактора IXа. Поред фактора VIII, активирање фактора IX може се извршити и из унутрашњег пута помоћу фактора VIIа из комплекса ткивног фактора. Тренутно не постоји решена кристална структура теназа комплекса.

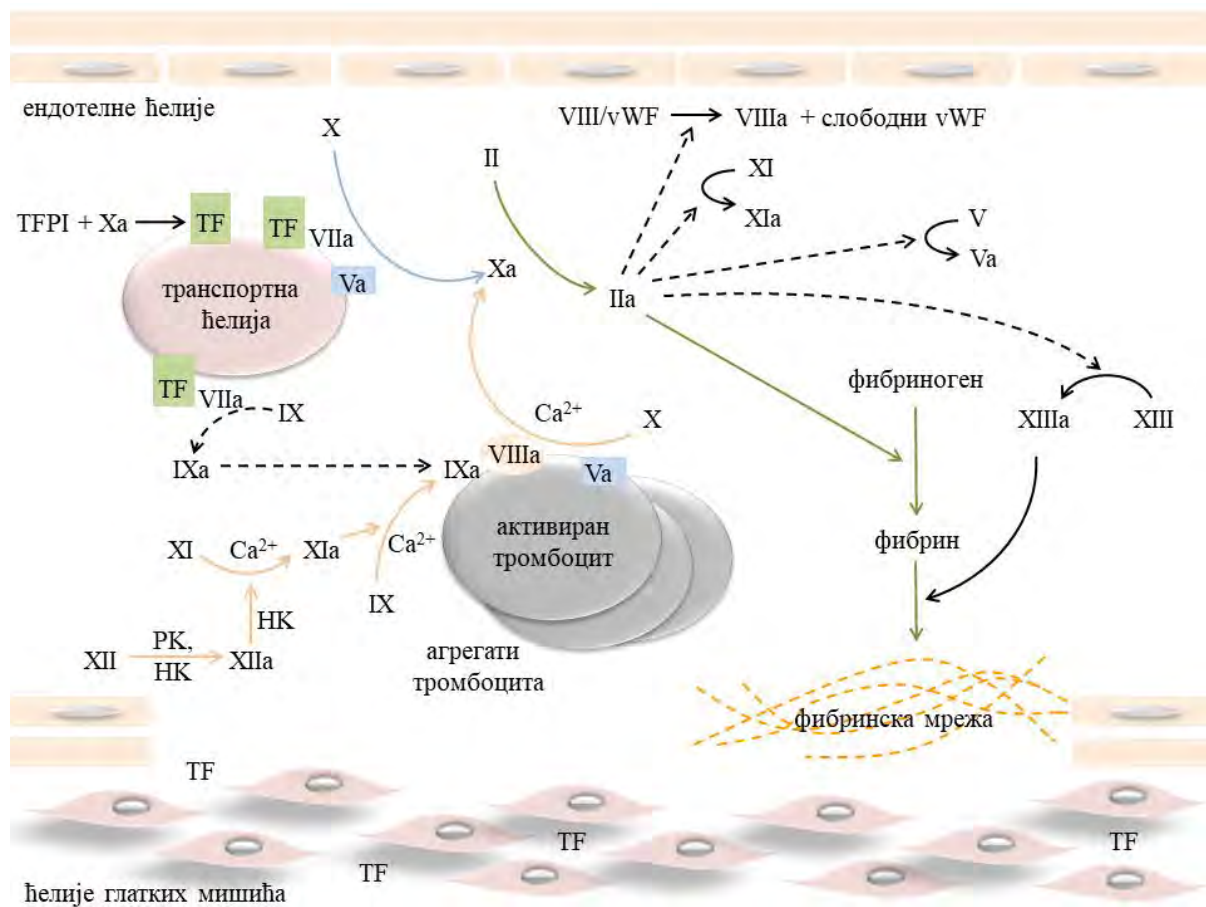
1.1.3.3. ЗАЈЕДНИЧКИ ПУТ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ

Процес коагулације крви завршава се заједничким путем (Слика 1.27). Зачетник заједничког дела коагулационе каскаде јесте фактор Ха који, како је већ претходно описано, настаје и у оквиру унутрашњег и у оквиру спољашњег пута. Док се физиологија одвијања спољашњег и унутрашњег пута своди на међусобно активирање фактора који учествују у коагулационој каскади, заједнички пут се одвија са циљем да се прекине крварење и да се награди крвни угрушак.

Фактор Ха тако укључује у коагулациону каскаду зимоген који се назива протромбин, односно фактор II. Каталитичким деловањем фактора Ха из протромбина настаје тромбин, фактор IIа, који бива ангажован у иницијацији фибриногена. Фибриноген, под утицајем тромбина, коначно ствара нерастворни фибрин, односно крвни угрушак.

Тромбин има врло специфичну улогу у коагулационој каскади.¹⁷ Иако је овај протеин један од последњих фактора коагулације, у исто време је и један од првих јер се на самом почетку коагулације, у фази активације тромбоцита, асоцира са рецепторима који се везују за G протеине (енг. G-protein-coupled receptors, GPCRs) и који се називају активирани рецептори протеаза (енг. protease activated receptors, PARs). Тромбин показује специфичност према PAR-1, PAR-3 и PAR-4. Због нарочитог значаја овог протеина у зачећу коагулације, крвне плочице су и добиле име тромбоцити. Активирањем тромбина долази и до физиолошког деловања PARs и покретања бројних сигналних процеса приказаних на Слици 1.9. Тако у сигналној каскади долази до отпуштања интерлеукина IL-1 и IL-6, интрацелуларног адхезионог протеина (енг.

intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) и васкуларног ћелијског адхезионог молекула (енг. vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1).



Слика 1.27. Коагулациона фаза хемостазе. Стрелице означене плавом бојом су укључене у спољашњи пут коагулације крви; Стрелице означене наранџастом бојом су укључене у унутрашњи пут коагулације крви; Стрелице означене зеленом бојом су укључене у заједнички пут коагулације крви. Пуне стрелице приказују примарне реакције у којима су активни наведени фактори, а испрекидане стрелице приказују споредне реакције ових фактора.

Ипак, кључну улогу у овом сегменту коагулационе каскаде има тзв. протромбиназа комплекс, конгломерат који настаје међусобном интеракцијом јона Ca^{2+} , фактора Xa и фактора Va као кофактора фактора Xa. Да би се разумело формирање протромбиназа комплекса, најпре је потребно упознати се са структурама протромбина, тромбина и фактора V. Конвенционално, први учесник коагулационе каскаде из ове триаде јесте фактор V, мада се то не сме сматрати правилом јер ова три протеина заправо чине мини циклус. Фактор V је гликопротеин који се биосинтетише у јетри, слезини и бубрезима а биолошки се налази у тромбоцитима и плазми.

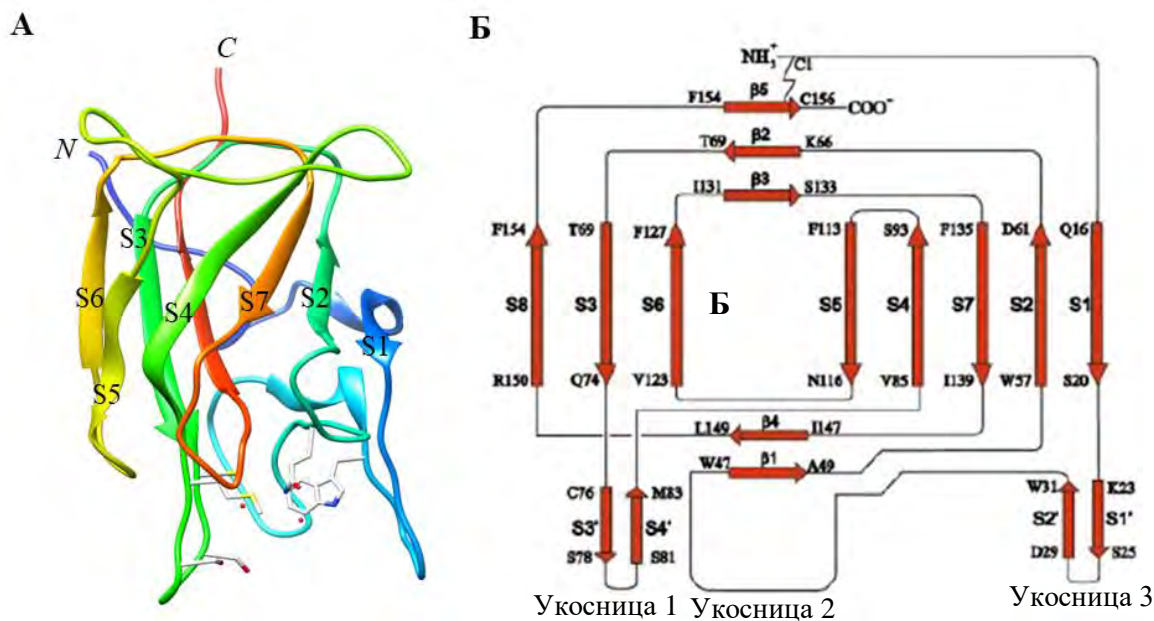
Хомологан је фактору VIII и церулоплазмину. Овај протеин, иако номинално носи име једног од фактора коагулације, то ипак није већ има улогу кофактора у протромбиназа комплексу, слично фактору VIII у теназа комплексу.

Фактор V састоји се од шест домена структурно организованих као A1-A2-B-A3-C1-C2.¹⁸ Унутар структуре постоје и суб-домени: A1-A2 јесу прекурсори тешког ланца који настаје након активације фактора V до фактора Va. Са друге стране, из сегмента A3-C1-C2 настаје лаки ланац. Формирање лаког и тешког ланца одвија се раскидањем пептидне везе унутар B домена. Структура овог кофактора врло је специфична и прилагођена је интеракцији са мембраном тромбоцита. Топологија домена означених са A је карактеристична, јер три домена заједно формирају облик троугла. Таква конформација омогућава везивање једном јону бакра који се гнезди на површини ограниченој A1-A3 доменима. C домени, а посебно C2, одговорни су за интеракцију са мембраном те имају прокоагулативни карактер. Кристална структура C2 домена фактора Va је позната и приказана је на Слици 1.28. B домен, прецизније његов C-терминус, понаша се као кофактор за активацију антикоагулативног протеина C протеином S. Важно је напоменути да фактор Va нема способност активације протеина C.

Прокоагулативна активност фактора V условљена је његовим везивањем за мембрану тромбоцита. Као што је већ напоменуто, фактор V везује се за фосфолипиде мембране преко суб-домена C2. Кристална структура C2 домена фактора Va формирана је од β -набораних конформација означених као S1-S8 (Слика 1.28A). Њих осам у антипаралелној оријентацији чине две функционалне целине: прву одликују три β -плоче S1-S3, док је друга целина формирана од преосталих β -набора S4-S8. C- и N-терминус суб-домена C2 повезани су дисулфидним мостом Cys1–Cys156. Мостове између β -набораних конформација чине три структуре насумице увијања (Ser21-Trp31, Asn39-Asn45 и Gly75-Tyr84) које спајају систем β -набораних конформација (Слика 1.28B). Заједно, ови елементи секундарне структуре формирају систем укосница.

Када дође до формирања фактор Va-мембрана тромбоцита комплекса, активирани фактор, сада у форми тешког и лаког ланца, повећава способност фактора Ха да катализује стварање α -тромбина из фактора II, односно протромбина, чак пет пута. Везан за мембрану, фактор Va поприма улогу специфичног рецептора за фактор Ха; гради се стехиометријски комплекс са високим афинитетом ($K_d = 10^{-10}$ M).

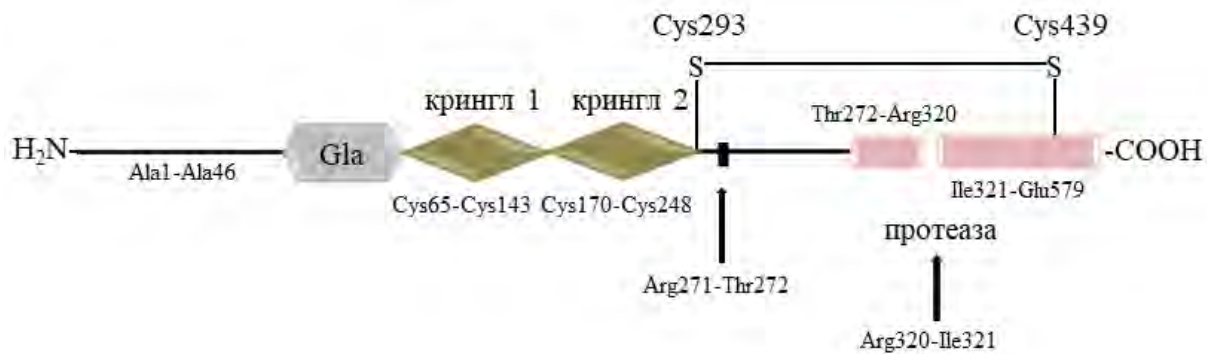
Комплекс се затим деактивира даљом трансформацијом тромбина, што представља механизам контроле конверзије протромбина у тромбин.



Слика 1.28. (А) Кристална структура фактора V снимљена у резолуцији од 1,9 Å (PDB ID: 1CZS); (Б) Топологија фактора V.¹⁸

Тромбин се биосинтезише у јетри и секретује у општу циркулацију у виду инактивног зимогена протромбина. Протромбин, односно фактор II, можда је и најважнији фактор у читавој коагулационој каскади. Овај зимоген јесте комплексан мултидоменски гликопротеин који се активира да би продуковао тромбин на месту васкуларне повреде.

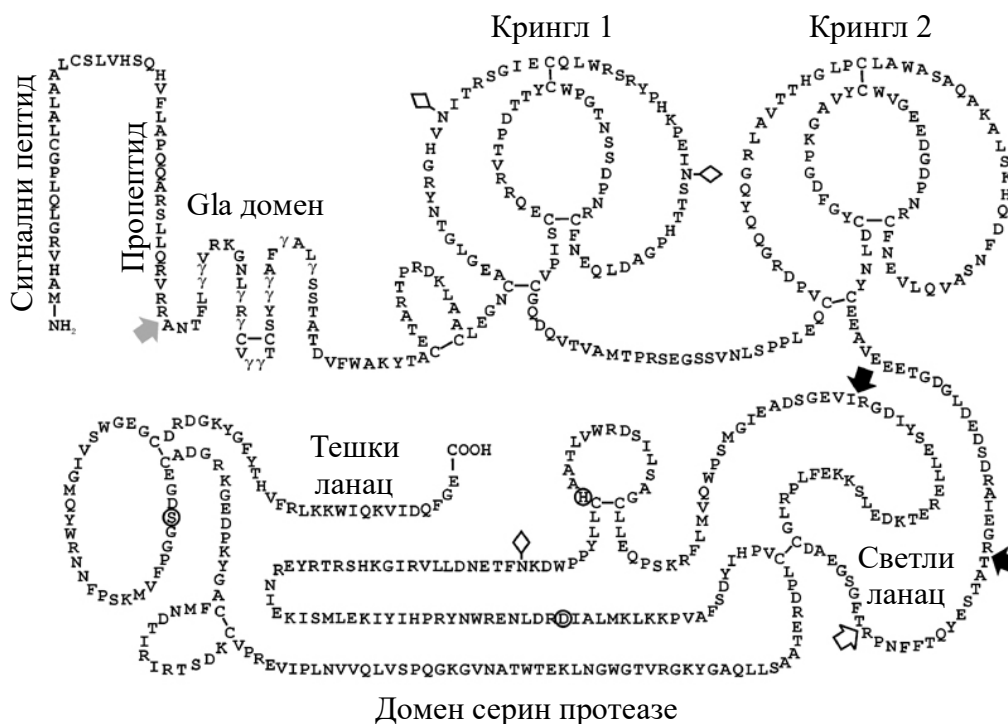
Протромбин у својој примарној структури садржи три домена: *N*-терминалне фрагменте 1 (F1, аминокиселине 1–155) и 2 (F2, аминокиселине 156–271), односно *C*-терминални протеаза домен (аминокиселине 272–579).¹⁹ Сваки од сегмената функционално се дели на под-сегменте: унутар F1 налази се 10 Gla остатака у оквиру секвенце 1-46 који омогућавају везивање протромбина за фосфолипиде мембране тромбоцита, те крингл-1 регион (аминокиселине 65–143); F2 јесте заправо крингл-2 мотив (аминокиселине 170–248); протеаза домен раздваја се на А ланац (аминокиселине 272–320) и каталитички В ланац (аминокиселине 321–579) (Слика 1.29).



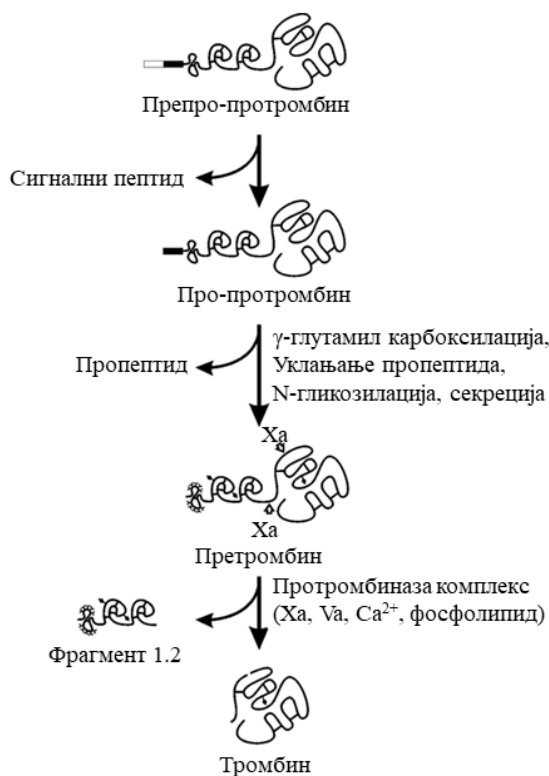
Слика 1.29. Структурни домени фактора II.

Сви под-сегменти међусобно су повезани аминокиселинским мостовима. Тако, Gla под-сегмент је повезан са крингл-1 регионом аминокиселинама 47–64, два крингл сегмента везана су међусобно мостом 144–169, док је крингл-2 са А ланцем повезан преко остатака 249–284. Занимљиво је да ниједан од крингл мотива не учествује у везивању протромбина за мембрану тромбоцита, већ се то везивање одвија као и код свих описаних фактора, преко Gla домена у присуству јона Ca^{2+} . Крингл-1 и крингл-2 зато остварују интеракцију са кофактором Va, као и аминокиселине лоциране у каталитичком В ланцу, између сегмента аутолизе и егзодела 1. Са друге стране, фактор Ха интерагује са крингл-2 доменом и аминокиселинама, близу егзодела 2 који се такође налази у В ланцу.

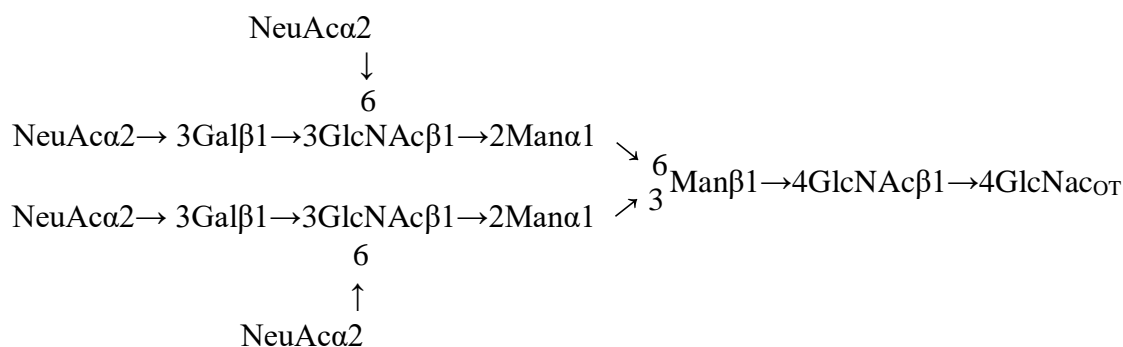
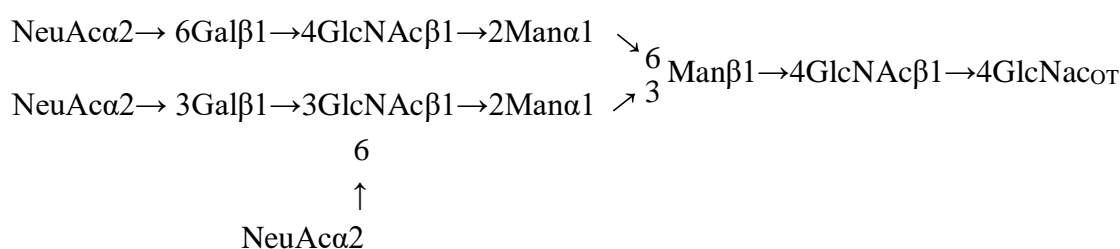
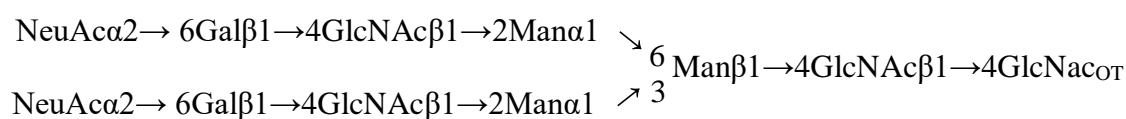
Ипак, формирању протромбина претходи препро-протромбин који мора да прође низ пост-транслаторних модификација пре финалног настанка тромбина (Слика 1.30 и Шема 1.7). Тако, најпре долази до уклањања сигналног пептида из F1 суб-региона помоћу сигналне пептидазе и транспорта новонасталог полипептида до ендоплазматичног ретикулума. Молекул који је настао, про-протромбин, тада бива модификован од стране γ -глутамил карбоксилазе, ензима који је присутан у ендоплазматичном ретикулуму, препознаје секвенцу пропептида и катализује витамин К-зависну конверзију 10 аминокиселина Glu у Gla остатке. Већ је у више наврата објашњен значај ове пост-транслаторне модификације.



Слика 1.30. Примарна структура препро-протромбина. Сиве стрелице указују на места раскидања пептида. Gla остаци обележени су са γ . Места везивања шећера обележена су дијамантима. Аминокиселине каталитичке триаде обележене су кружићима. Места протеолизе протромбина обележена су црним стрелицама. Места секундарног раскидања унутар тромбина обележена су белим стрелицама.^{vi}



Шема 1.7. Биосинтеза тромбина из препро-протромбина.^{vii}

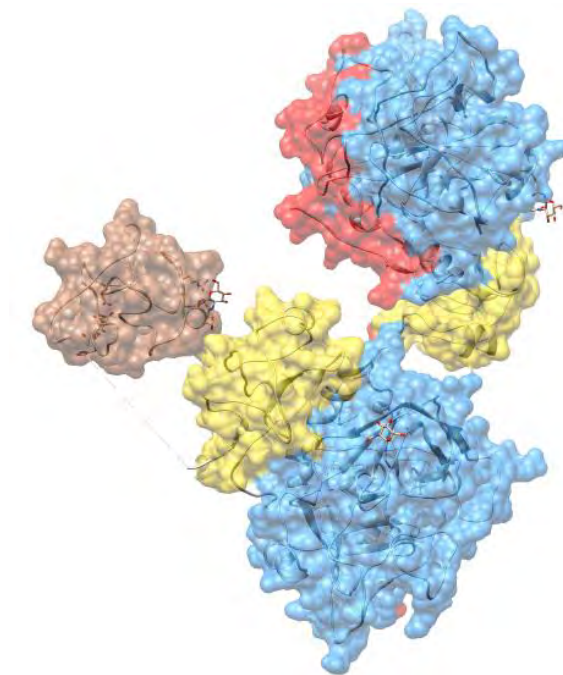
A**Б****В**

Шема 1.8. Структуре полисахарида протромбина.

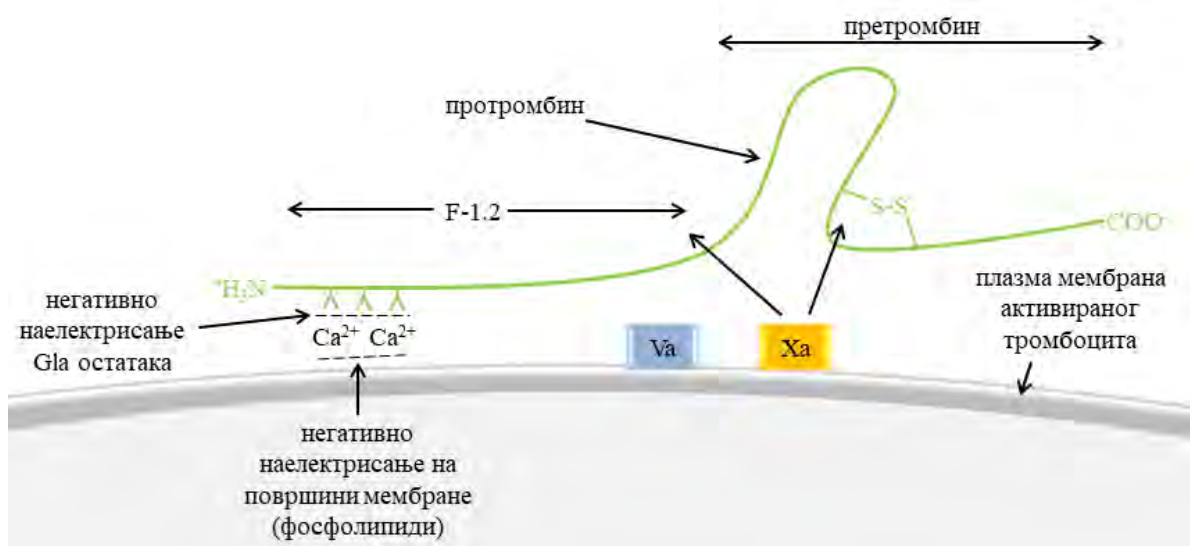
Протромбин се у свом највишем нивоу конформације (Слика 1.31), у стању равнотеже, протеже на 80 Å дужине; F1 заузима у односу на F2 угао од 36°, док је сâм F2 коаксијалан у односу на домен протеазе. Ипак, због високе флексибилности моста између крингл домена постоје многоструки аранжмани крингл 1 суб-домена у односу на остатак молекула. Стога постоји најмање две конформације које се налазе у стању равнотеже: прва у којој је растојање између крингл домена максимално и износи 108 Å, или је минимално и износи мање од 34 Å.

Нажалост, не постоји снимљена кристална структура протромбиназа комплекса. Ипак, познато је да, када се овај комплекс формира (Слика 1.32), он конвертује протромбин у тромбин раскидањем пептидних веза Arg271-Thr272 и Arg320-Ile321. Од два места раскидања пептидне везе, Arg271 се налази у мосту који повезује крингл 2 са А ланцем док се Arg320 налази у активационом домену и није приступачан за протеолизу у раствору. Сакривање Arg320-Ile321 пептидне везе представља механизам

спречавања аутоактивације протромбина и усмерава протромбиназу да најпре раскине пептидну везу Arg271-Thr272.

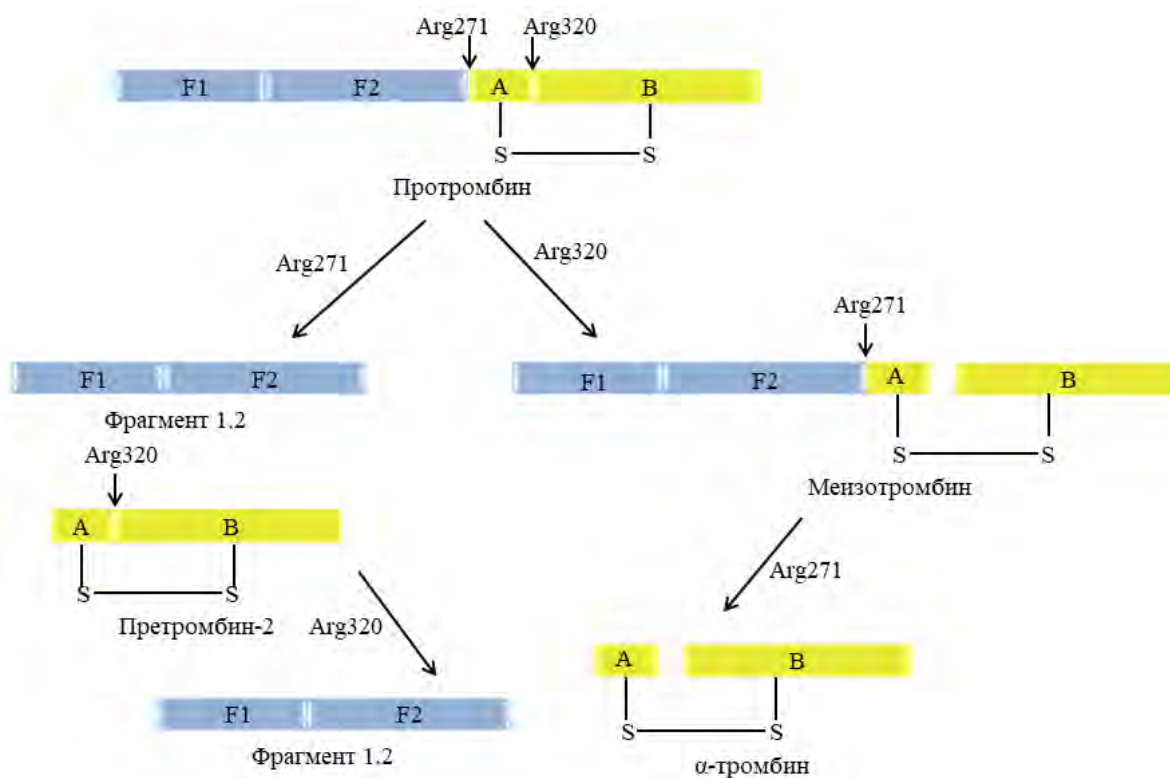


Слика 1.31. Кристална структура фактора II, без Gla домена, снимљена у резолуцији од 3,3 Å (PDB ID: 4HZH). Крингл 1 под-сегмент обележен је браон транспарентном сфером, крингл 2 жутом сфером, ланац А црвеном сфером, ланац В плавом сфером.



Слика 1.32. Формирање протромбиназа комплекса на плазма мембрани активираниог тромбоцита. Положаји цепања протромбина фактором Ха приказани су стрелицама. Део протромбина који ће формирати тромбин је означен као претромбин, док (F-1.2) означава фрагменте 1 и 2 који се такође налазе у примарној структури протромбина.

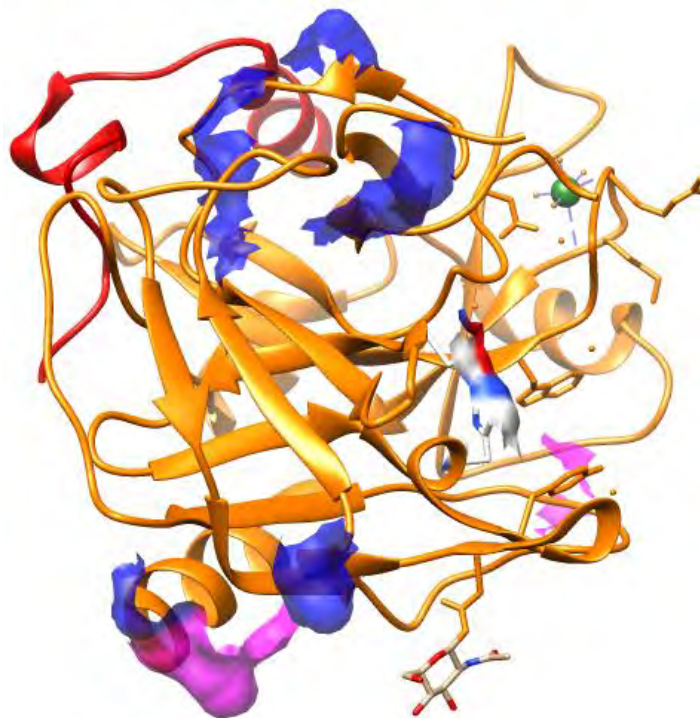
Раскидањем пептидне везе Arg271-Thr272 одвајају се од протромбина додатни фрагменти F1 и F2 и формира се инактивни прекурсор претромбин-2 (Шема 1.9). Додатно раскидање пептидне везе Arg320-Ile321 раздваја ланце А и В који ипак остају повезани преко дисулфидне везе Cys293–Cys439 и дају активни интермедијер меизотромбин. У физиолошким условима активацији протромбина претходи акумулација било меизотромбина или претромбина-2 на површини тромбоцита. Ипак, на крају процеса долази до колапса интермедијерне структуре меизотромбина и до настанка α -тромбина који егзистира само захваљујући постојању дисулфидне везе Cys293–Cys439. По завршетку процеса тромбин се отпушта са површине тромбоцита и прелази у крвоток.



Шема 1.9. Приказ процеса активације протромбина.^{viii}

Тромбин као серин-протеаза, наследник протромбина, има изразиту улогу и у прокоагулативним и у антикоагулативним процесима. У терцијарној структури протеолитички активног тромбина налазе се два ланца: ланац А који представља лаки ланац, има 49 аминокиселина и садржи једну дисулфидну везу, те ланац В, тешки ланац, који се састоји од 259 аминокиселина и три дисулфидне везе (Слика 1.33). Тромбин подлеже додатној протеолизи (Шема 1.10) на нивоу пептидне везе Arg13-

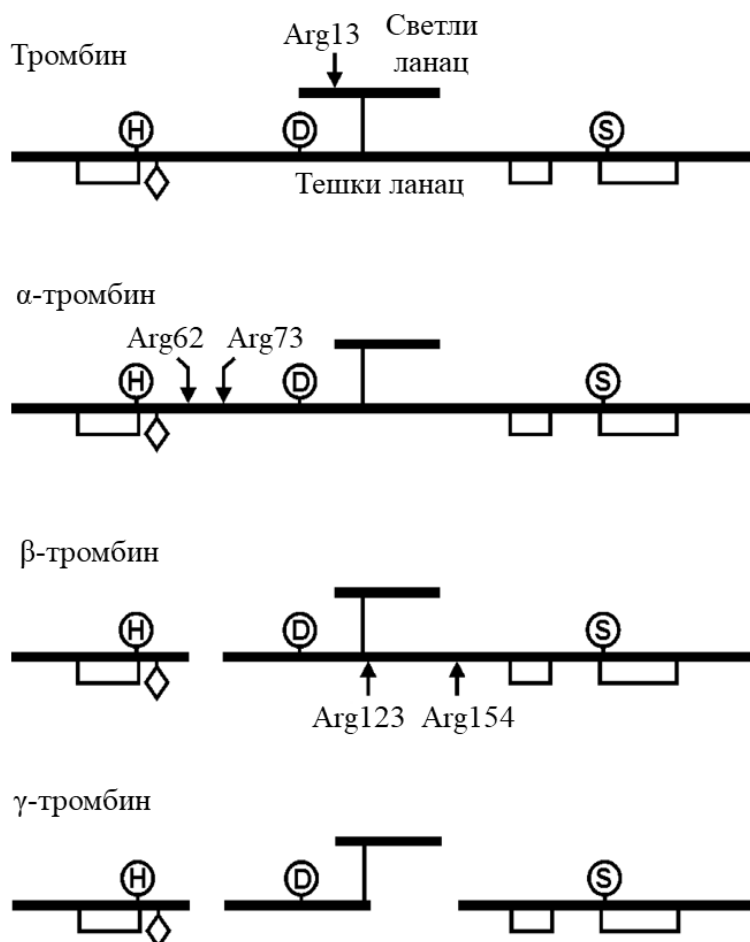
Thr14 унутар лаког ланца при чему долази до уклањања 13 аминокиселина са *N*-терминуса и настанка α -тромбина, каталитички активне форме. Даље, α -тромбин се аутолитички конвертује до β -тромбина раскидањем пептидних веза Arg62-Ile63 и Arg73-Asn74 унутар тешког ланца. Коначно, β -тромбин прелази у γ -тромбин додатним раскидањем пептидних веза Arg123-Glu124 и Lys154-Gly155.



Слика 1.33. Кристална структура тромбина у резолуцији од 2,4 Å (PDB ID: 4I7Y). Лаки ланац обележен је црвено, тешки ланац наранџасто. Егзодео I представљен је плавом транспарентном сфером, егзодео II љубичастом транспарентном сфером. Каталитичка триада унутар активног центра обележена је белом сфером. Јон натријума обележен је зеленом куглицом.

Активни центар фактора IIa садржи класичну каталитичку триаду, His57, Asp102 и Ser195, која се налази у дубоком и уском активном центру. Активни центар оивичен је са две структуре насумице увијања које се називају „увијање 60-ице” (енг. 60-loop, аминокиселине Leu59-Asn62) и „увијање аутолизе” (енг. autolysis-loop, аминокиселине Leu144-Gly150). „Увијање 60-ице” горњи је сегмент, генерално је хидрофобан и структурно ригидан. Доњи фрагмент, односно „увијање аутолизе” обзиром да се налази у γ -тромбину носи још и име „ γ -увијање”. Овај фрагмент је врло флексибилан и има улогу у селекцији супстрата унутар *C*-терминуса. Уклањање „ γ -

увијања” доводи до значајног смањења у афинитету тромбина према фибриногену, што указује да овај фрагмент препознаје макромолекуларне супstrate.



Шема 1.10. Аутолиза хуманог тромбина. Дисулфидне везе обележене су танким линијама, каталитичке аминокиселине кружићима, док су остаци угљених хидрата представљени дијамантом.

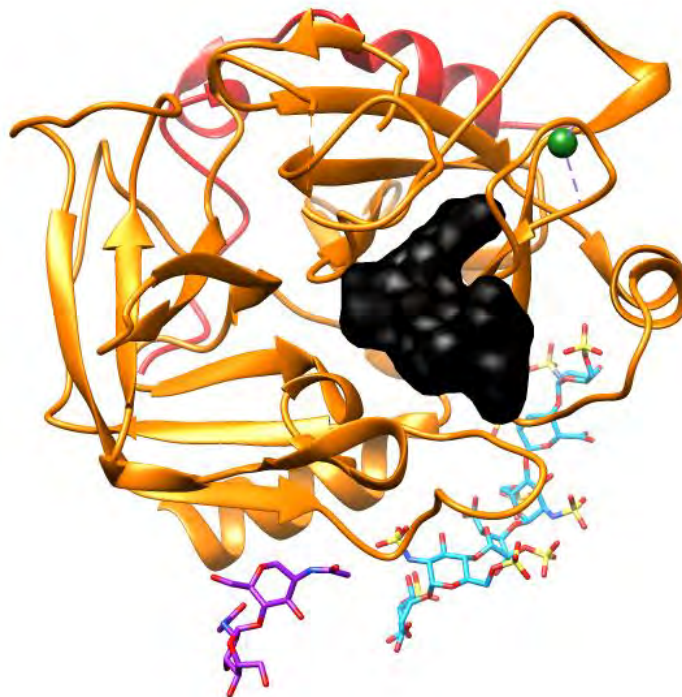
Унутар активног центра фактора IIa налазе се два региона: *N*-терминални домен који се назива „не-примарни суб-регион” (енг. non-prime subsite) или S суб-регион, односно *C*-терминални домен који се назива „примарни суб-регион” (енг. prime subsite) или S9 суб-регион. У близини S9 суб-региона налази се већ код протромбина поменути поларни егзодео I, алостерни центар односно шупљина у облику кањона на коју се настављају „увијање 34-ке” (енг. 34-loop) са аминокиселинама Phe34-Leu39 и „увијање 70-ице” (енг. 70-loop) сачињен од остатака Lys70-Glu80. Аналогно, у близини S суб-региона налази се егзодео II, тј. други алостерни центар са превасходно базним карактером аминокиселина у коме долази до везивања гликозаминогликанских супстрата, попут хепарина, па се у њему одвија антикоагулативна улога фактора IIa.

Егзодео I јесте и центар препознавања фибриногена од стране тромбина те је, према томе, и центар прокоагулативне активности фактора IIa. Егзодео I формира се од стране аминокиселина Lys21, Arg62, Arg68, Arg70, Tyr71, Arg73, Lys106 и Lys107. Важност егзодела I најбоље се огледа у томе што β - и γ -тромбин, код којих је већи део егзодела I протеолитички одстрањен, нису у могућности да врше структурне промене на нивоу фибриногена. Поред тога што је неопходан за интеракцију са фибриногеном, овај део тромбина прихвата и PAR1, односно факторе V и VIII, затим кофакторе попут тромбодулина и GPIIb α , те инхибиторе попут HСII и антикоагулативног протеина хирудина. Упркос изразитој прокоагулативној активности, понекад егзодео I делује и другачије. Наиме, када дође у контакт са тромбодулином, интегралним протеином мембране васкуларних ендотелијалних ћелија, егзодео I бива заклоњен. Као последица, тромбодулин-тромбин комплекс активира протеин C који надаље протеолитички инактивира факторе VIIa и Va и негативно регулише коагулациону каскаду.

Егзодео II налази се на површини молекула тромбина супротно оријентисан егзоделу I, познат је и као центар везивања хепарина и састоји се од аминокиселина Arg89, Arg98, Arg245, Lys248 и Lys252. Овај део тромбина најпознатији је по својим интеракцијама са сулфонованим гликозаминогликанима присутним у хепарину, кофактору инхибиције тромбина са антитромбином. У одсуству хепарина, антитромбин инхибира тромбин на умереном нивоу. Ипак, у присуству хепарина, долази до настанка терцијарног комплекса који јако олакшава инхибицију тромбина антитромбином (Слика 1.34). Антитромбин гради изразите контакте на нивоу „ γ -увијања” и посебног алостерног центра тромбина који прихвата јоне Na⁺ а који се може по аналогiji назвати „Na⁺-увијање”. Тромбин и антитромбин повезани су хепаринским мостом. Поред везивања хепарина, егзодео II учествује и у атракцији фактора V и VIII, као и у асоцијацији тромбина са GPIIb α .

Ефикасна регулација тромбина неопходна је за регулацију формирања тромба. Протеини који се називају серпинима и који припадају суперфамилији серин протеаза инхибирају каталитичку активност тромбина. Инхибиција је олакшана присуством гликозаминогликана хепарина, хепарин сулфата и дерматан сулфата. Најважнији серпини јесу већ поменути антитромбин, односно хепарин кофактор II (енг. heparin cofactor II, HСII), те протеаза нексин I (енг. protease nexin I, PNI). Антитромбин је уобичајени састојак крви и налази се у релативно високој концентрацији од 2,3 μ M,

инхибира различите серин протеазе и главни је интраваскуларни инхибитор коагулације. НСП је специфичан према тромбину и регулише каталитичку активност тромбина у екстраваскуларним ткивима. РНИ инхибира тромбин близу површине ћелије.



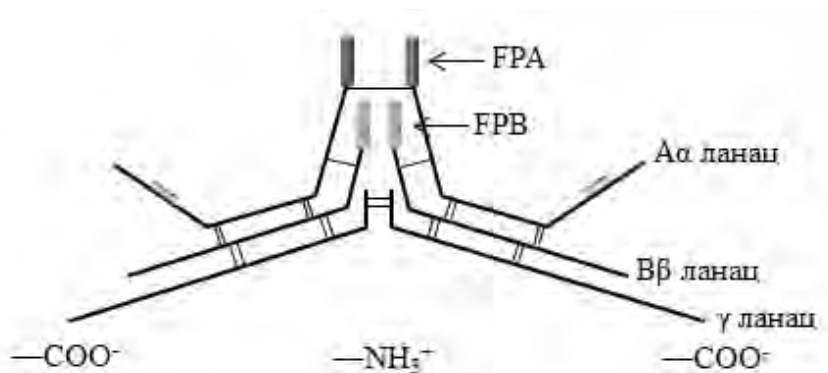
Слика 1.34. Кристална структура тромбина у комплексу са хепарином снимљена у резолуцији од 1,85 Å (PDB ID: 1XMN). Лаки ланац обележен је црвено, тешки ланац наранџасто. Молекул хепарина обележен је плавом а протромбински гликозид обележен је љубичастом бојом. Инхибитор који окупира S9 регион активног центра обележен је црном сфером, а јон натријума зеленом куглицом.

Тромбин поседује јединствену особину међу сличним серин протеазама да буде алостерно регулисан јонима натријума (Слике 1.33 и 1.34). Регион у коме се одвија ова алостерна регулација јесте „Na⁺-увијање” и налази се на површини, у близини C-терминуса тешког ланца. Јони натријума директно се координују за карбонилне групе пептидних веза аминокиселина Tyr190, Arg233 и Lys236, док координацији доприносе и Asp199, Glu229, Asp234, односно Tyr237. Везивање натријума позитивно утиче на каталитичке особине тромбина.

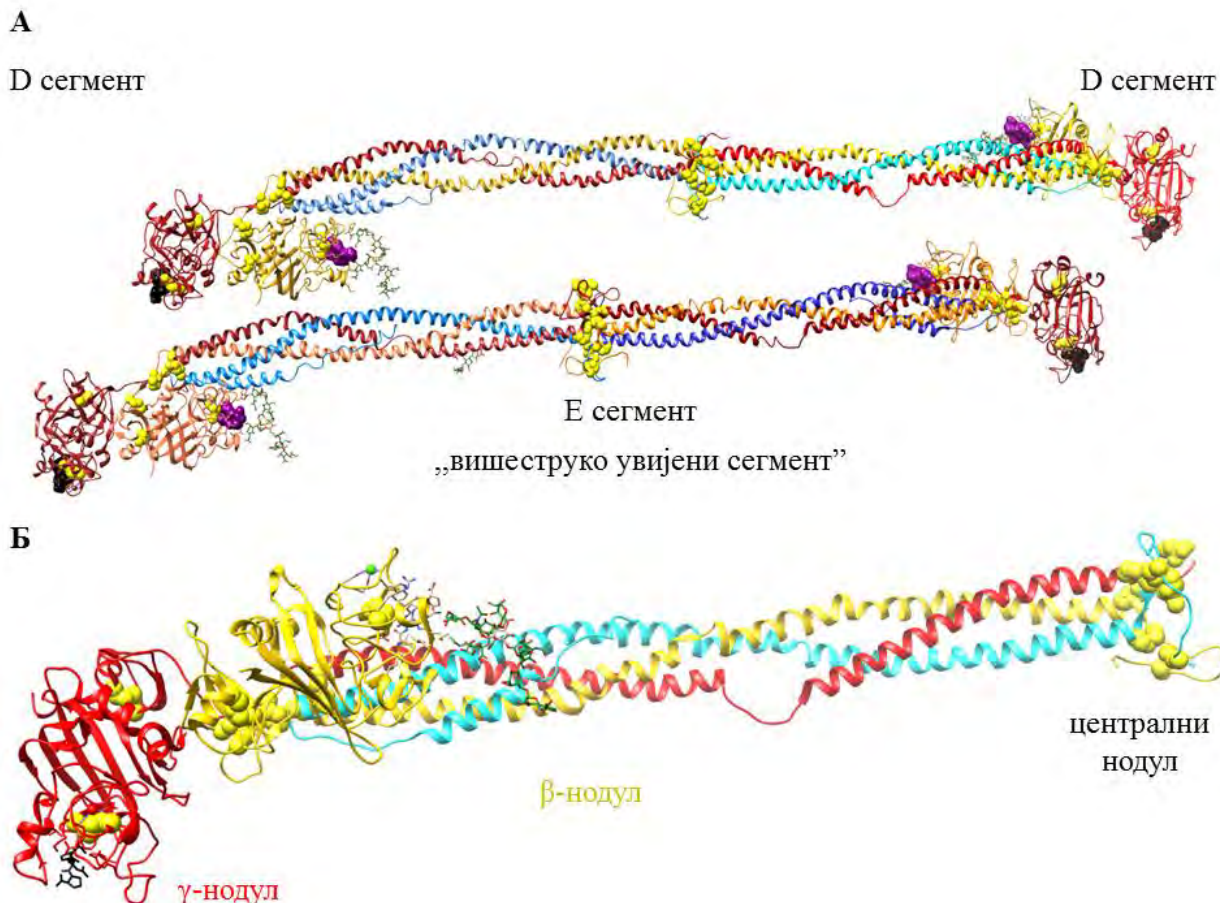
Структурна организација тромбина протеину омогућава да остварује интеракције са великим бројем супстрата и промовише хемостазу. Најпознатији супстрат тромбина је фибриноген. Фибриноген (фактор I) је мултидоменски

гликопротеин присутан у крвној плазми. Молекул фибриногена састоји се од два сета са по три полипептидна ланца који се називају $A\alpha$ -, $B\beta$ - и γ -ланцима (Слика 1.35).^{20,21} Сетови ланца међусобно су повезани са пет симетричних дисулфидних веза. Крајеви ланца називају се D доменима а спајање самих ланца врши се у централном E домену који заузима облик „вишеструко увијеног сегмента” (енг. coiled-coil segment), односно сегмента у коме долази до преплетања α -хеликса α -, β - и γ -ланца (Слика 1.36). У наведеном региону постоји систем несиметричних дисулфидних веза које граде дисулфидни прстен. Свих шест *N*-терминалних остатака ланца просторно су блиски и стабилизовани су бројним дисулфидним везама, док су *C*-терминуси просторно удаљени чинећи врло асиметричан и издужен макромолекул.

Сваки $A\alpha$ -ланец састоји се од 610 аминокиселина, $B\beta$ -ланец од 461 остатака, док у примарној структури γ -ланца постоји 411 аминокиселина. Унутар сваког од $A\alpha$ -ланца налази се *N*-терминални фибринопептид А (енг. fibrinopeptide A, FPA) који је суштински значајан јер његовим одвајањем започиње биосинтеза фибрина. Одговарајућа структура унутар B ланца назива се фибринопептид В (енг. fibrinopeptide B, FPB). Фибринопептиди А и В на *N*-терминалним крајевима носе вишак негативног наелектрисања услед присуства остатака глутаминске и аспарагинске киселине. Улога ових негативних шаржи је повећање растворљивости фибриногена у плазми и спречавање преране агрегације условљене електростатичким одбијањем између молекула фибриногена. Отпуштањем FPA и FPB смањује се растворљивост насталог фибрина. Са друге стране, ланци $B\beta$ и γ садрже комплекс у коме аспарагин гради *N*-гликозидну везу са олигосахаридима. Од уљених хидрата присутне су сијалинске киселине, затим остаци Gal, Man, *N*-ацетилглукозамина, 2-(ацетиламино)-2-деокси- α -D-Glc и други.



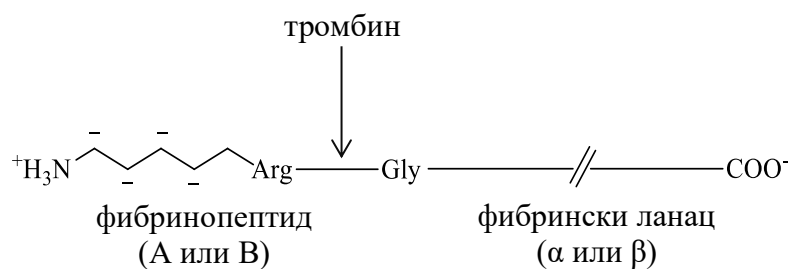
Слика 1.35. Дијаграмски приказ структуре фибриногена.



Слика 1.36. А) Кристална структура хуманог фибриногена снимљена у резолуцији од 2,9 Å (PDB ID: 3GHG). α -ланци обележени су плавом бојом, β -ланци обележени су жутом, γ -ланци обележени су црвеном бојом. Сегменти дисулфидних веза обележени су жутиим круговима. „Кноб“ А обележен је црним сферама, „Кноб“ Б обележен је љубичастим сферама. Б) Увећани приказ преплетања α -, β - и γ -ланца.

Улоге фибриногена и фибрина преклапају се током процеса коагулације крви, фибринолизе, целуларне и интеракције матрикса, инфламаторног одговора, зацељивања рана и неоплазије. Ове функције регулисане су интерактивним центрима фибрин(оген)а, неке од функција су маскиране и недоступне фибриногену а еволуирају као последица формирања фибрина или остваривања фибриноген-површина интеракција. Са аспекта ове докторске дисертације најбитнији физиолошки процеси у којима учествује фибриноген јесте продукција фибрина и његово укрштање, што за последицу има везивање за тромбин. Такође, значајна је и регулација активности фактора XIII, везивање фактора раста за крвни угрушак, као и интеракција са ћелијама тромбоцита, леукоцита, фибробласта и ендотелијума.

Као што је већ поменуто, фибрин се формира реакцијом коју катализује тромбин, одвајањем фибринопептида А од $\text{A}\alpha$ -ланца фибриногена, након хидролизе пептидне везе $\alpha\text{Arg15}-\alpha\text{Gly16}$ у молекулу $\text{A}\alpha$ -ланца фибриногена, односно након хидролизе пептидне везе $\beta\text{Arg14}-\beta\text{Gly15}$ у молекулу $\text{B}\beta$ -ланца фибриногена (Шема 1.11). На тај начин се од фибриногена одвајају фибринопептид А и фибринопептида В, и врши се иницирање полимеризације фибрина до настанка мономера фибрина. Укратко, фибрин се формира када тромбин уклони мале пептиде FPA и FPB са *N*-терминуса В и β ланца фибриногена, откривајући сетове „глава“ (енг. „knobs”) које остварују нековалентне интеракције са увек присутним „рупама“ (енг. „holes”) на суседним молекулима фибрина. Интеракцијом „глава“ - „рупа“ настају олигомери који се називају протофибрили.



Шема 1.11. Механизам дејства тромбина на фибриноген.

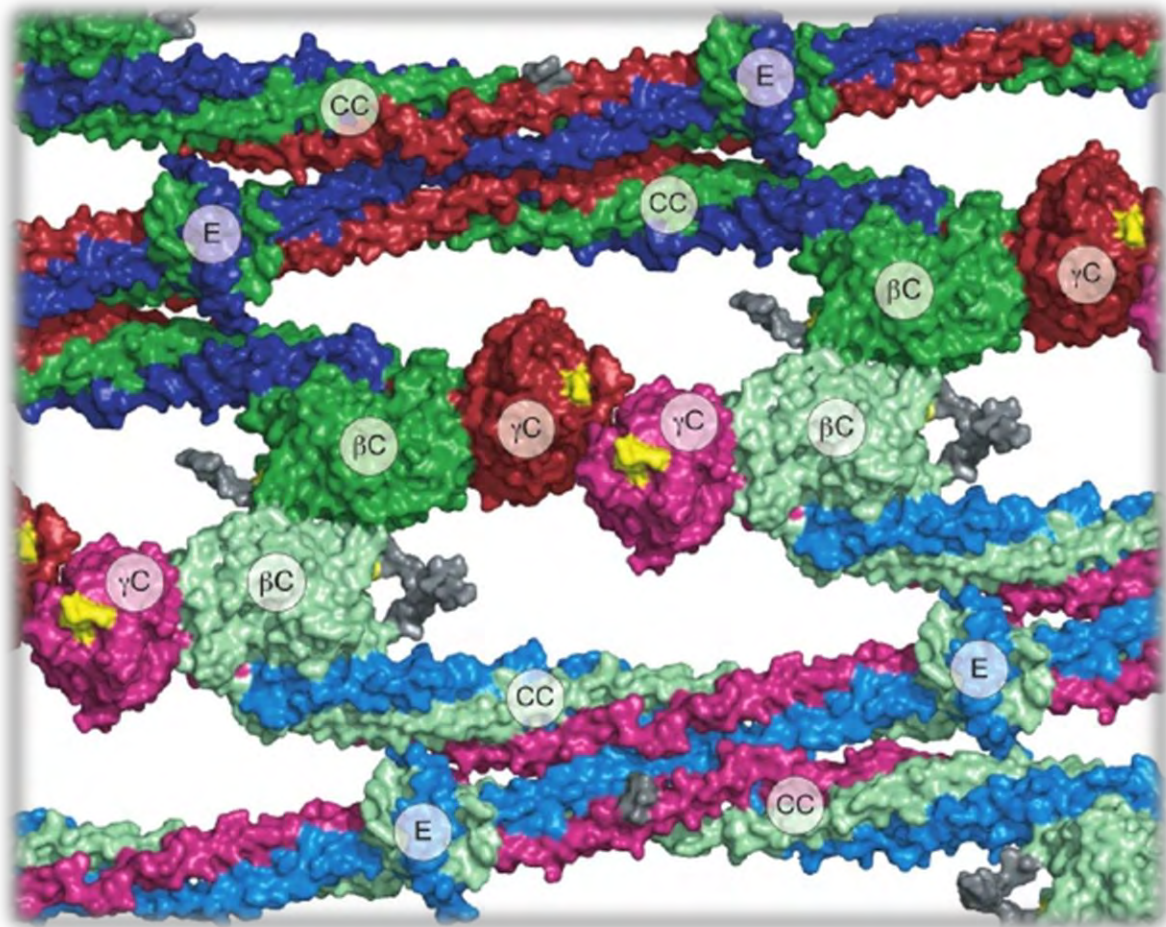
Разумевање механизма настанка коагулума ипак захтева мало детаљнији приказ структурних промена које се дешавају у структури фибриногена. Тако, приликом одвајања фибринопептида А (односно првих шеснаест аминокиселина од $\text{A}\alpha$ -ланца фибриногена) настају интермедијерне структуре које се називају протофибрили. Настанком протофибрила долази до експонирања полимеризационог места на $\text{A}\alpha$ -ланцу фибриногена које се означава са ЕА. Један део ЕА налази се на *N*-терминусу α -ланца и састоји се од остатака $\alpha\text{Gly17}-\alpha\text{Pro18}-\alpha\text{Arg19}-\alpha\text{Val20}$ (GPRV). Сваки од ЕА региона остварује интеракцију са комплементарним везивним местом унутар D домена γ -ланца суседних молекула фибриногена. Комплементарно место означава се са DA и налази се између аминокиселина $\gamma337-\gamma379$. GPRV сегмент у ЕА региону заправо представља централну „главу“ (енг. „knob”) која се умеће у „рупу“ (енг. „hole”) на инверзном γ -ланцу DA региона *C*-терминуса (γC домен). Иницијална ЕА:DA асоцијација узрокује да постоји међусобно поравнање два молекула фибрина при чему

настају нестабилни двоструко увијени фибрили. Преклапање два молекула фибриногена је у овој фази само делимично. Они надаље веома брзо прелазе у много стабилније форме: када се два двоструко увијена фибрила поставе латерално један у односу на други, настаје четвороструко увијени фибрил у процесу који се назива „билатерално повезивање” (енг. *bilateral junction*). Латерална конвергенција додатних фибрила доводи до настанка мултиувијених разгранатих структура у процесу који се назива „еквилатерално” повезивање, при чему настају нековалентно везани олигомери. Овакве структуре се називају *des-AA* фибрини.

Паралелно са претходно описаним процесом дешава се и хомолого отпуштање фибринопептида В. Тиме се открива независни полимерizacionи центар *ЕВ* који започиње са секвенцом $\beta\text{Gly15}-\beta\text{His16}-\beta\text{Arg17}-\beta\text{Pro18}$ (*GHRP*) и који остварује интеракције са комплементарним *ДВ* центром у сегменту β -ланца *Д* домена. Поменуте интеракције доприносе латералној асоцијацији јер подразумевају премештања унутар βC -региона *Д* домена, након чега настају интермолекуларни $\beta\text{C}:\beta\text{C}$ контакти. У исто време долази и до међусобне агрегације $\gamma\text{C}:\beta\text{C}$ „кнобова”. Специфичним контактима настаје *des-BB* фибрин за који се тврди да је много стабилнији од *des-AA* фибрина и да представља прави фибрински полимер, односно крвни угрушак (Слика 1.37).²¹

У структури γC домена постоји још један изузетно значајан сегмент који се назива γXL -регион и који прекрива место унакрсног умрежавања γC домена. Интермолекуларна асоцијација између два γXL -региона потпомаже правилном формирању $\gamma\text{C}:\beta\text{C}$ и $\beta\text{C}:\beta\text{C}$ мрежа и последичној трансглутаминацији коагулационог фактора XIII.

Фактор XIII је у стварању коагулума укључен захваљујући тромбину који катализује конвезрију инактивне форме фактора XIII до активне. Фактор XIII је протрансглутаминаза која поред улоге у хемостази има и функције унутар плазме и интрацелуларне течности.²²⁻²⁴ Тако, овај фактор коагулације има улогу у зацељивању рана, одржавању пропустљивости крвних судова, одржавању трудноће, ангиогенези, стабилизацији и минерализацији екстрацелуларног матрикса у костима и хрскавици, одржавању физиолошке функције срца итд.

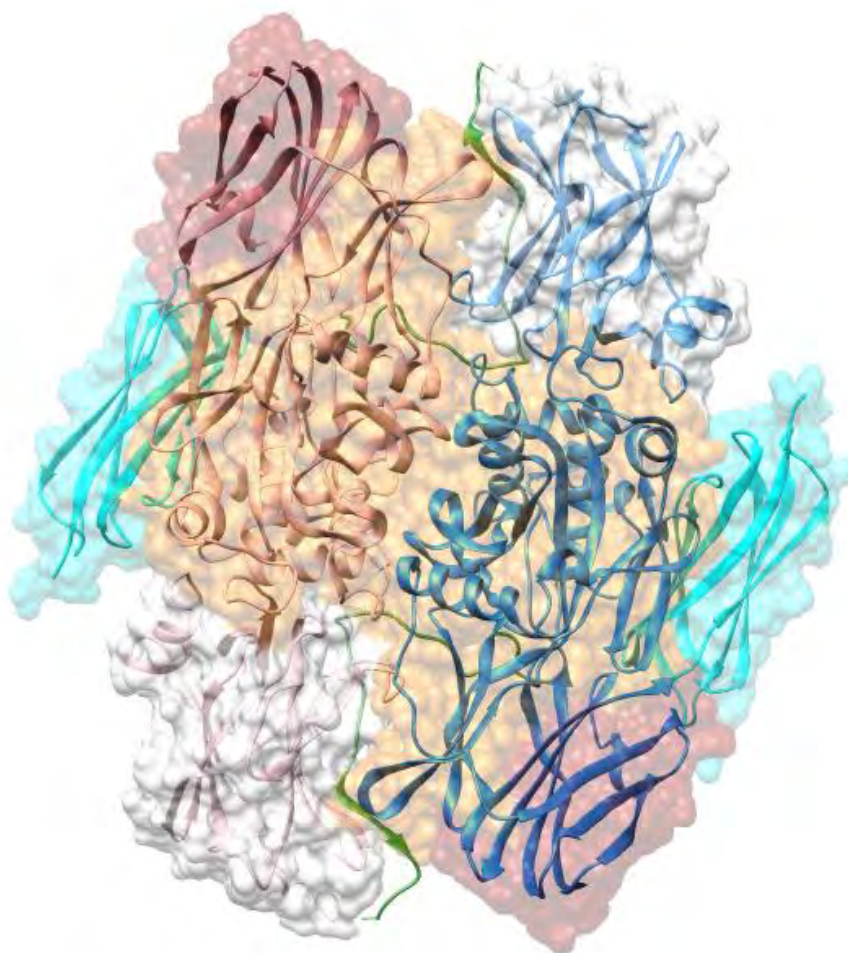


Слика 1.37. Контакти у кристалној структури хуманог фибриногена који укључују „end-to-end” интеракције γ C домена, латералне антипаралелне интеракције β C домена и антипаралелну асоцијацију „вишеструко увијеног сегмента” (CC). Кластери угљених хидрата представљени су сивом бојом, А и В „кнобови” γ C и β C „рупе” жутом бојом. α ланци су представљени зелено, β ланци плавом, γ ланци црвеном бојом. Централни домен је означен са словом Е у кругу. Тамнија и светлија нијанса основних боја означавају два повезана молекула фибриногена.²¹

У форми у којој се налази у плазми, фактор XIII је третрамер који се састоји од две субјединице А (фактор XIII-А), које учествују у самом умрежавању, те две субјединице В (фактор XIII-В) субјединице, које имају функцију носача или места везивања инхибитора. Са друге стране, у целуларној течности, фактор XIII постоји само као димер XIII-А.

Тренутно не постоји решена кристална структура целокупног комплекса фактора XIII, тако да није позната природа интеракција између суб-сегмената XIII-А и XIII-В. Ипак, снимљена је кристална структура димера фактора XIII-А (Слика 1.38). Фактор XIII-А припада фамилији трансглутаминаза (енг. transglutaminases, TGs). У кристалној

структури могу се разликовати *N*-терминални активациони пептид (енг. activation peptide, AP-FXIII), секвенца 1–37 која се раскида тромбином приликом активације, затим β -сендвич, односно секвенца 38–184, каталитички домен тј. секвенца 185–515, β -буре 1 (аминокиселине 516–628) и β -буре 2 (аминокиселине 629–731). Аминокиселина која носи пептидну везу која се раскида приликом активације је Arg37. Каталитичке аминокиселине јесу Cys314, лоцирана на AP-FXIII, те Tyr560, која се налази на β -набору β -бурета 1. Кристална структура димера фактора XIII-B није снимљена.

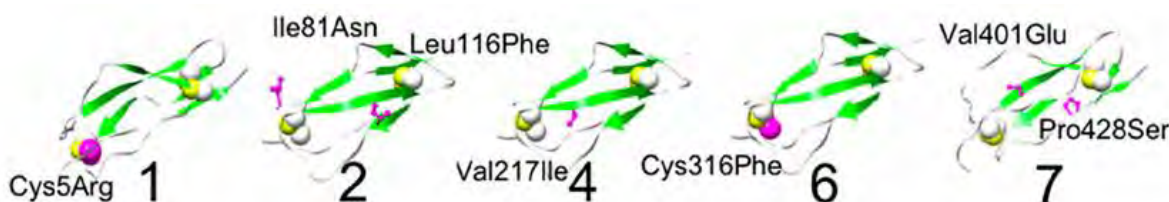


Слика 1.38. А) Кристална структура фактора XIII-A снимљена у резолуцији од 2,1 Å (PDB ID: 1F13). AP-FXIII секвенца приказана је тамно зеленом бојом. Први ланац у хомодимеру приказан је розом бојом, други је приказан плавом бојом. β -сендвич обележен је белим транспарентним сферама, каталитички домен наранџастим транспарентним сферама, β -буре 1 црвеним транспарентним сферама, β -буре 2 плавим транспарентним сферама.

У плазми, фактор XIII циркулише као A_2B_2 -тетрамер који се везује преко В субјединице за γ' -ланац фибриногена, тзв. фибриноген 2. Фибриноген 2 служи као протеин носач за циркулишући фактор XIII и као регулатор његове активности. Иако је фактор

XIII потентан катализатор унакрсног умрежавања фибрина, његова активност је пре настанка des-BB фибрина ефективно контролисана. Сам фактор XIII је до своје активације тромбином виртуелно неактиван и припада не-физиолошком кавадерин-казеин систему. Ипак, нативни фактор XIII показује и тенденцију ка умрежавању фибриногена или фибрина када се достигне физиолошка концентрација калцијума; степен умрежавања катализован фактором XIII, нарочито код фибрина може бити идентичан оном који се постиже када је умрежавање катализовано фактором XIIIa. Умрежавање фактором XIII потпомогнуто је α 2-антиплазмином (енг. α 2-antiplasmin, α 2-PI), који се ковалентно везује за фибриноген у плазми.

Са друге стране, фактор XIII-B је гликопротеин који се састоји од 10 „sushi” домена који се понављају (између сваког домена постоје две интрамолекуларне дисулфидне везе). Ови домени се у литератури још наводе и као модули комплементарних контролних протеина (енг. complement control protein modules, CCPms). Терцијарну структуру „sushi” домена чини шест β -набораних конформација стабилованих међу собом са два дисулфидна моста на крајевима навоја. У питању су јако хидробне структуре које имају заједничку организацију у виду β -2 и β -4 навоја. Тренутно постоје само хомологи модели „sushi” домена са детектованим мутацијама (Слика 1.39).²⁴

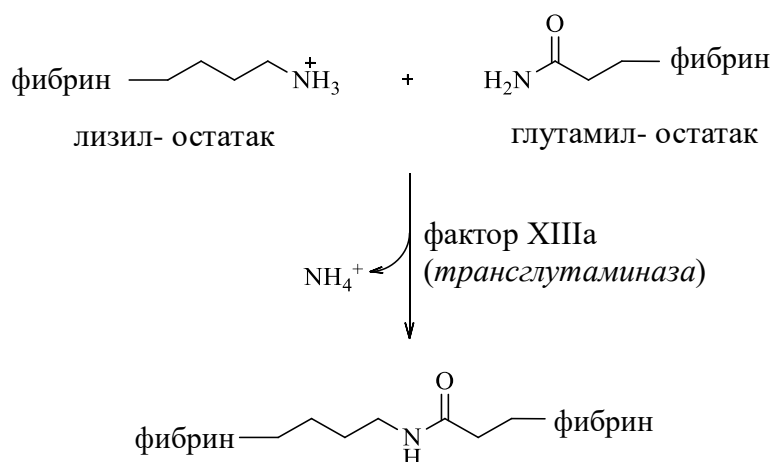


Слика 1.39. Хомологи модели пет „sushi” домена фактора XIII-B који приказују локализацију седам детектованих мутација. Бројеви испод указују на број „sushi” домена. Унутар модела, β -наборане конформације приказане су зеленом бојом при чему стрелице показују правац од N- ка C-терминусу. Остаци аминокиселина Cys које граде дисулфидне мостове приказани су van der Waals-овим сферама (сумпор жутом бојом, угљеник белом бојом). Нативне аминокиселине и њихов положај означене су љубичастом сфером, такође назначен је њихов положај у секвенци и аминокиселина мутант.²⁴

Као што је већ напоменуто, у процесу циркулације крви плазма фактор XIII везује се за γ' -ланац фибриногена преко XIII-B суб-јединице. Сама активација фактора XIII врши се тако што тромбин најпре катализује одвајање активационог пептида са

фактора XIII-A, да би потом у присуству јона Ca^{2+} дошло до дисоцијације фактора XIII-B. На крају процеса фактор XIII-A постаје трансформисан у активну трансглутаминазу, фактор XIIIa.

Умрежавање се врши тако што C-терминални регион сваког фибриногена, или фибринског γ -ланца, садржи једно место за унакрсно умрежавање на коме фактори XIII или XIIIa катализују формирање γ -димера увођењем реципрочних интермолекулских ϵ -(γ -глутамил)лизин ковалентних веза које се формирају између γLys406 , са једног γ -ланца, односно γGln398 , са другог γ -ланца (Шема 1.12). Идентичан тип ϵ -(γ -глутамил)лизин ковалентних веза формира се спорије између глутамина и лизина на A α - или α -ланцима, при чему настају α -олигомери и већи α -полимери. Унакрсно умрежавање такође постоји између α - и γ -ланаца, а такво умрежавање је карактеристично за молекуле фибриногена који се налазе у крвној плазми.

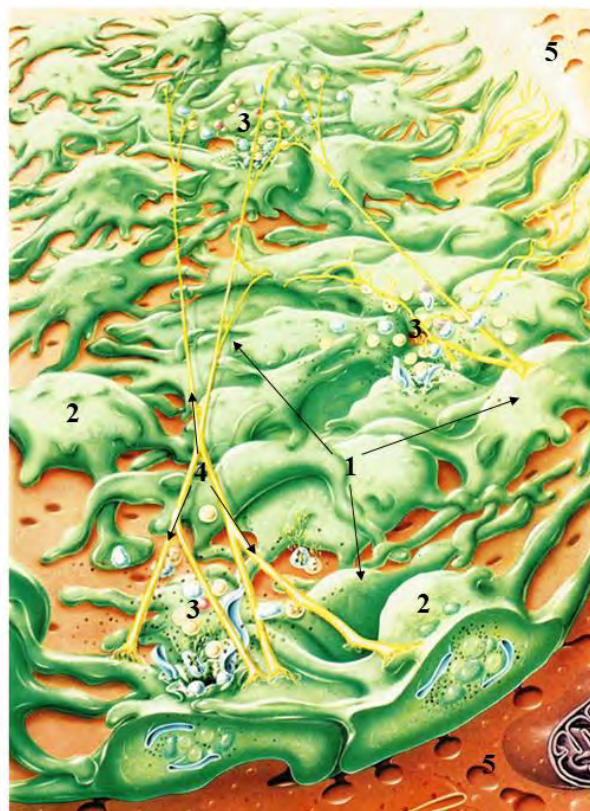


Шема 1.12. Укрштање два фибринска ланца у присуству фактора XIIIa.

Сврха умрежавања јесте да се крвни угрушак додатно стабилизује и да се спречи његова прерана фибринолиза. Стабилност угрушка даље се остварује на индиректан начин, након протеолизе тромбин-активирајућег инхибитора фибринолизе (енг. thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI), катализоване тромбином, до активне форме TAFIa. У питању је карбоксипептидаза која уклања остатке лизина са фибрина који су природно препознати од стране фибринолитичких ензима. Даље, тромбин позитивно регулише цео процес и заокружује га тиме што се сâм поново ствара након протеолитичке конверзије фактора XI до XIa у унутрашњем путу, односно фактора VIII и V као кофактора за биоформирање фактора Xa и тромбина.

Потом, награђени угрушак везује тромбоците, црвена крвна зрнца и остале компоненте да заједно формирају бели или црвени угрушак, односно тромб (Слика 1.40). Бели тромб је углавном формиран од тромбоцита и фибрина и релативно је сиромашан еритроцитима, док код црвеног тромба преовлађују еритроцити и фибринска влакна.

Поред улоге у процесу активације фибриногена, још значајнија улога тромбина јесте у процесу активације тромбоцита и фактора V и VIII који су укључени у коагулациону каскаду. Активација фактора V и VIII даље води ка активацији фактора XI и IX. Такође, тромбин активира и ослобађа фактор VIII из комплекса који гради са von Willebrand-овим фактором. Из наведеног можемо закључити да је тромбин, поред фактора X, један од најзначајнијих учесника у каскадној коагулацији крви. Стога су ови ензими веома повољне мете за инхибиторе који ће спречити процес даље коагулације крви.



Слика 1.40. Формирање фибринске мреже на месту повреде крвног суда. 1) наслаге тромбоцита на ендотелу, 2) активирани тромбоцит, 3) садржај тромбоцита ослобођен приликом активације тромбоцита, 4) мрежа фибринских влакана, 5) ендотелне ћелије оштећеног крвног суда. Преузето из *Нови аспекти патофизиологије и терапије поремећаја циркулације*, Југоремедија Зрењанин, 1980.

1.1.4. АНТИКОАГУЛАЦИЈА

1.1.4.1. РЕГУЛАЦИЈА СПОЉАШЊЕГ И УНУТРАШЊЕГ ПУТА КОАГУЛАЦИЈЕ

Физиолошки процес формирања крвног угрушка мора се у једном тренутку зауставити како не би дошло до зачепљења крвног суда. Стога наступа процес који је супротан коагулацији крви а назива се антикоагулација. У процес антикоагулације укључени су бројни инхибитори из крвотока (Шема 1.13).³

Инхибитор пута ткивног фактора (енг. tissue factor pathway inhibitor, TPFІ) реверзибилни је инхибитор фактора Ха и тромбина. Поред инхибиције фактора Ха, комплекс Ха-TPFI може даље инхибирати и комплекс ткивног фактора, који је носилац коагулације на спољашњем путу. Поред тога, активност фактора Ха и протромбина регулисана је антитромбином, па се инхибиција коагулационе каскаде може побољшати у присуству хепарина.

Тромбин је укључен у један од регулационих мехнизма који се одвија током коагулације. Заједно са тромбодулином, гликопротеином присутним на површини ендотелних ћелија, тромбин формира комплекс који активира протеин С. У комбинацији са протеином S активирани протеин С (енг. activated protein C, APC) разлаже факторе VIIIa и Va и тако ограничава њихово учешће у коагулацији крви. Тромбомодулин као рецептор здравих ендотелних ћелија везује тромбин и преко активације витамин К-зависног протеина С и његовог кофактора, протеина S, формира комплекс APC. Формирањем APC комплекса се остварује вид контролног механизма коагулације крви. Недостатак протеина С или протеина S може узроковати појаву венозне тромбозе.

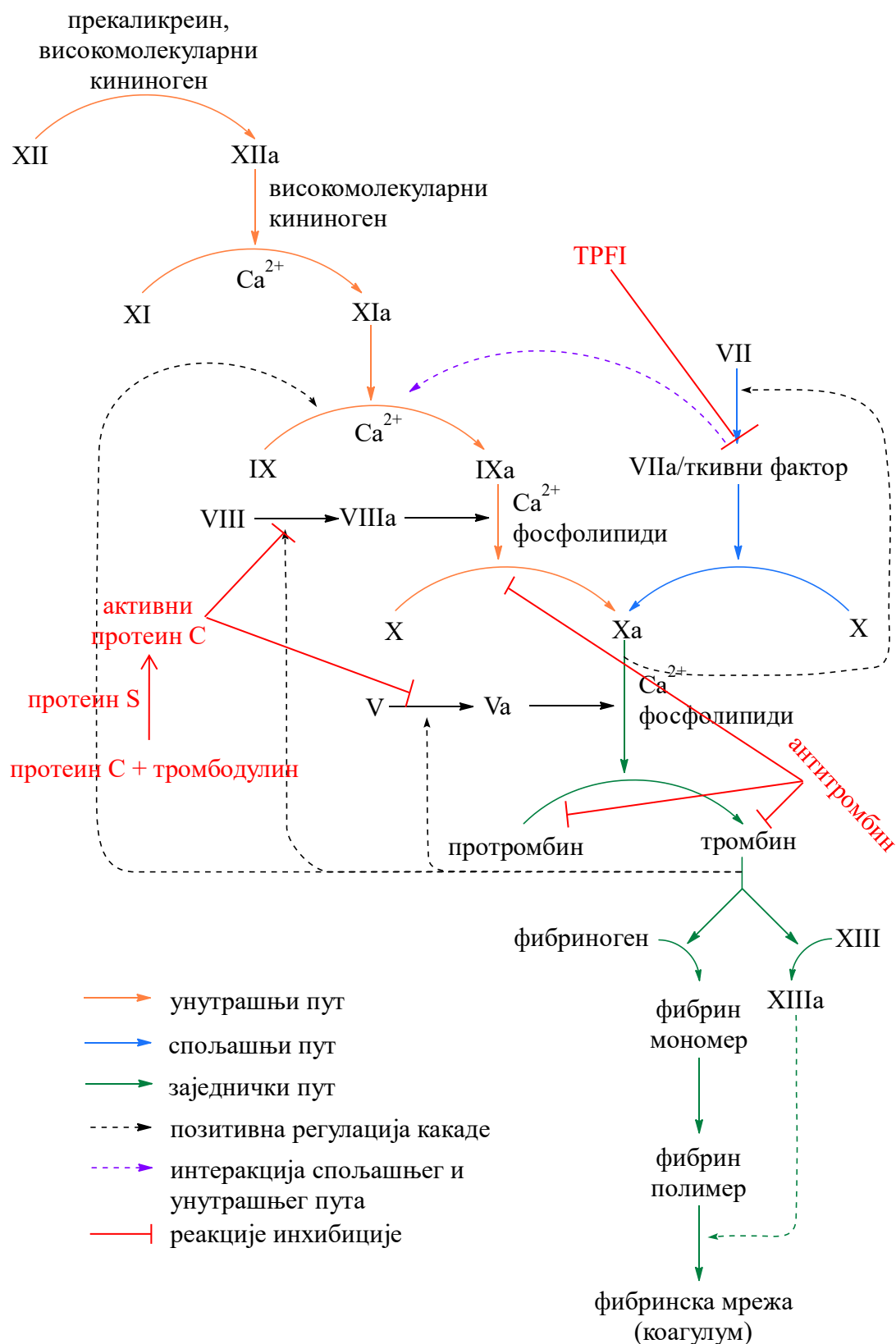
1.1.4.2. РЕГУЛАЦИЈА НИВОА ТРОМБИНА

На почетку излагања о коагулацији предочено је да се површина тромбоцита, као и здраве ендотелне ћелије, које се налазе у близини оштећеног ткива, услед негативног наелектрисања међусобно одбијају. Антитромбин и хепарин сулфат, који се налази на површини ендотелних ћелија, везују се за тромбин и неактивирани факторе коагулације те тако спречавају њихову активацију. Такође, здраве ендотелне ћелије излучују азот-моноксид и простациклине који спречавају активацију и агрегацију тромбоцита.

Једном настали тромбин укључује се у процесе хемостазе или тромбозе па се његова концентрација мора пажљиво одржавати да би се спречило даље формирање фибрина и активација тромбоцита. Одржавање физиолошке концентрације тромбина постиже се на два начина. Тромбин циркулише кроз крв док његов неактивни прекурсор протромбин подлеже утицају ензимске активације каскадним механизмом. Регулаторним (енг. feedback) механизмом се у сваком делу каскаде одржава равнотежа између активације и инхибиције фактора укључених у овај процес (Шема 1.13).

Други вид контроле активности тромбина је деактивација инхибиторима присутним у крви, антитромбинима. Четири инхибитора тромбина природно постоје у плазми. Најважнији је антитромбин III који доприноси са 75% укупне антитромбинске активности. Такође, антитромбин III је и инхибитор фактора IXa, Xa, XIa, XIIa и VIIa у комплексу са ткивним фактором. Поред антитромбина III, активност тромбина инхибирају и α_2 -макроглобулин, хепарин кофактор II и α_1 -антитрипсин.

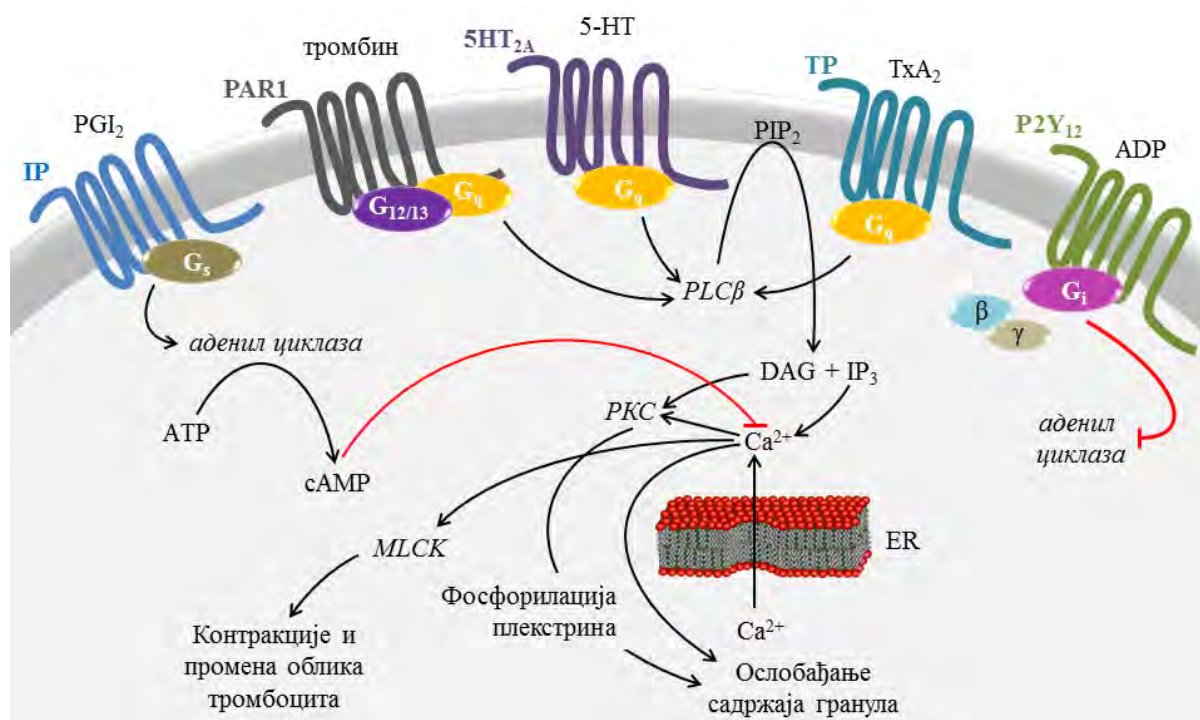
Ендогена активност антитромбина III знатно се повећава у присуству киселих протеогликана као што је хепарин. Хепарин се као кофактор везује за специфични катјонски центар антитромбина III, што доводи до конформационих промена унутар антитромбина III и олакшаног везивања антитромбина III за тромбин или остале супstrate. На овоме, као и на интеракцији хепарина са тромбином, заснива се примена хепарина као индиректног инхибитора коагулације крви у клиничкој медицини приликом лечења различитих типова тромбозе који се не могу лечити кумаринским антикоагулантима, о чему ће бити више речи у каснијем тексту. Антикоагулативна активност хепарина може се умањити у присуству катјонског полипептида као што је протамин, који се везује хепарин и тако инхибира његову интеракцију са антитромбином III. Особе са наследним недостатком антитромбина III подложне су венозној тромбози, што је доказ да антитромбин III има физиолошку функцију и да је коагулациони систем код људи врло динамичан.



Шема 1.13. Регулација процеса коагулације крви најважнијим факторима антикоагулације. Фактори антикоагулације и место њиховог утицаја приказани су црвеном бојом.

1.1.4.3. УТИЦАЈ ЕНДОТЕЛНИХ ЋЕЛИЈА НА ХЕМОСТАЗУ И ТРОМБОЗУ

Ендотелне ћелије које се налазе у зидовима крвних судова дају значајан допринос у регулацији хемостазе и тромбозе.²⁵ У овим ћелијама синтетише се простаглицин, моћни инхибитор агрегације тромбоцита, који делује супротно тромбоксану А₂. Простаглицини стимулирају активност аденил циклазе на површини мембране тромбоцита (Слика 1.41). Пораст концентрације сАМР у тромбоцитима спречава повећање концентрације интрацелуларног калцијума које је последица дејства IP₃. Како је већ предочено, IP₃ је продукт хидролизе фосфолипида (PIP₂), локализованог у мембрани тромбоцита, са улогом да омогућава ослобађање Ca²⁺ у цитосол углавном из система густих тубула тромбоцита. Инхибиција пораста концентрације Ca²⁺ утиче на смањену активацију тромбоцита.



Слика 1.41. Приказ процеса који се одвијају у тромбоцитима.

Поред тога, тромбоцити поседују ADP-азу која хидролизује ADP и спречава агрегацију тромбоцита. Додатно, у тромбоцитима се синтетишу и хепарин-сулфат, антикоагулант, као и активатори плазминогена који растварају фибрински угрушак. У Табели 1.3 приказани су молекули ендотелних ћелија и њихово дејство.

ТАБЕЛА 1.3. Молекули који се биосинтетишу у ендотелним ћелијама крвних судова и њихов утицај на процесе тромбозе и фибринолизе.

МОЛЕКУЛИ	ДЕЈСТВО
ADP-аза	Хидролизује ADP до AMP и Pi
Фактор отпуштања (азотмоноксид)	Инхибира адхезију тромбоцита тако што повећава ниво cGMP-а
Хепарин сулфат (гликозаминогликан)	Антикоагулант; са антитромбином III инхибира тромбин
Простациклин	Инхибира агрегацију тромбоцита повећањем концентрације cAMP-а
Тромбодулин	У комбинацији са тромбином активира протеин C, који даље са протеином S разлаже (деактивира) факторе Va и VIIIa
Активатор ткивног плазминогена	Активира плазминоген до плазмина, а плазмин разлаже фибрин

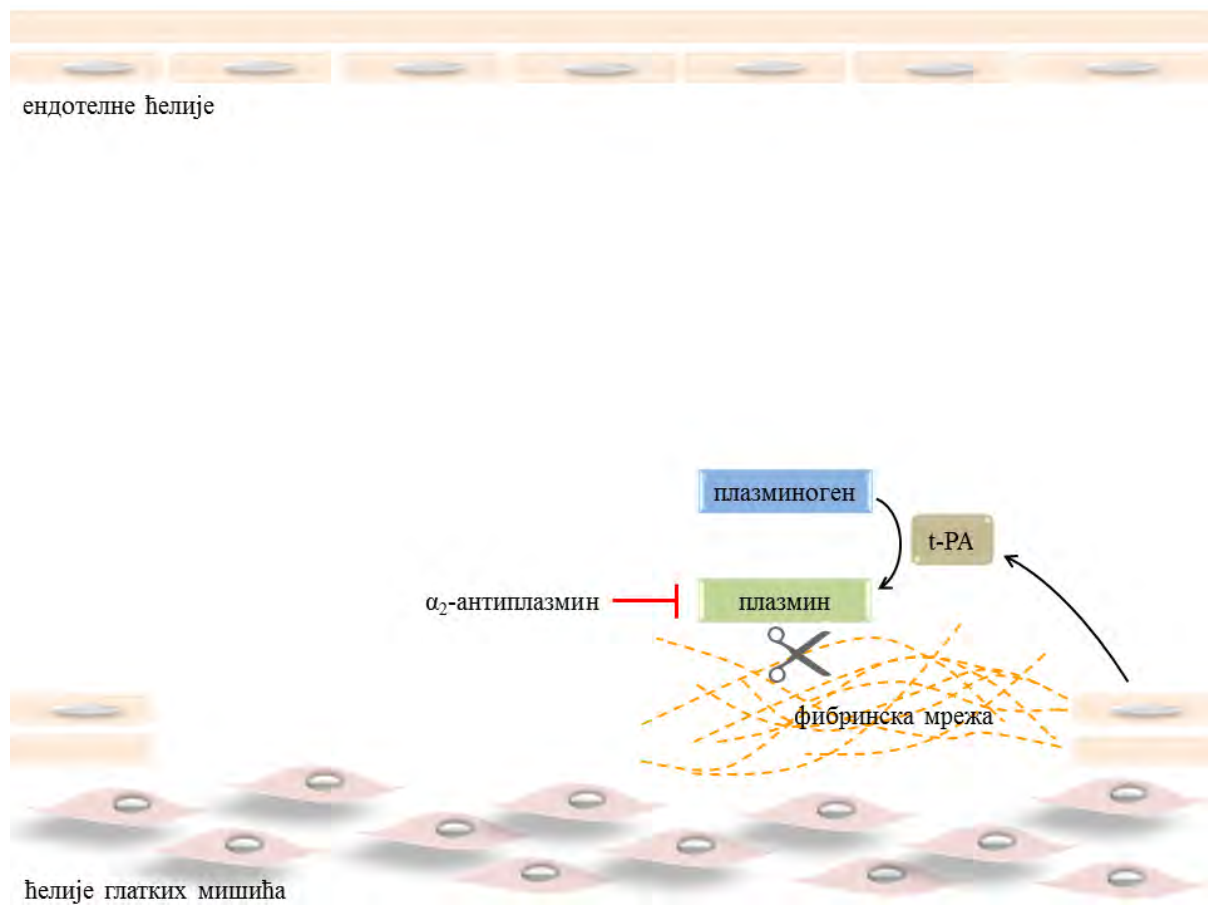
1.1.5. ФИБРИНОЛИЗА

Коагулациони систем налази се динамичкој равнотежи у којој се фибрински угрушци стално стварају и растварају.⁴ Процес растварања фибрина назива се фибринолиза (Слика 1.42). Ензим који регулише процес фибринолизе је плазмин. То је серин протеаза која се у циркулацији обично налази у облику зимогена плазминогена. Сав плазмин настао у физиолошким условима врло се брзо деактивира јако реактивним инхибитором, α_2 -антиплазмином. Плазминоген се везује за фибрин и тако постаје саставни део угрушка крви. Након тога, плазминоген се активира до плазмина избегавајући даљу деградацију α_2 -антиплазмином.

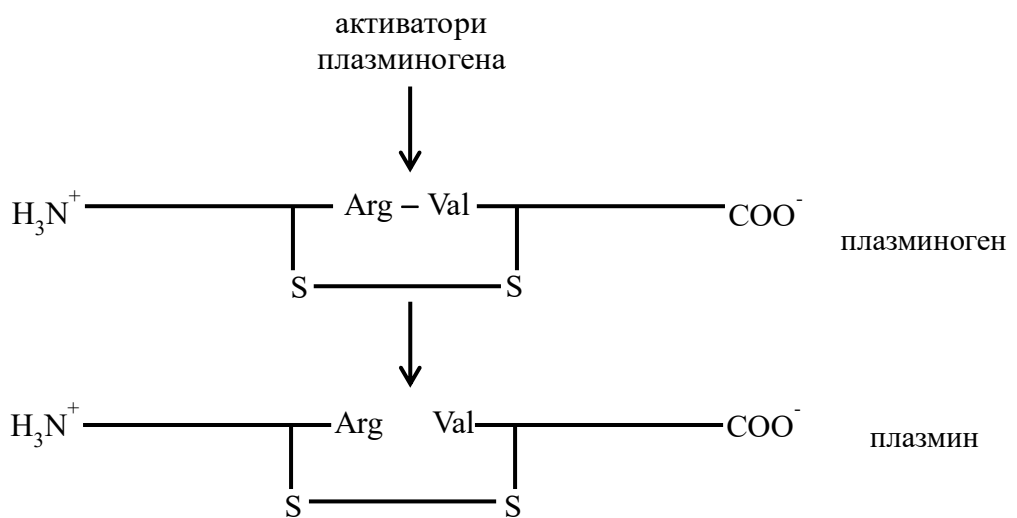
Постоје различити активатори плазминогена који се налазе у ткивима, али сви разлажу идентичну Arg-Val везу у примарној структури плазминогена да би настала дволанчана серин-протеаза, тј. плазмин (Шема 1.14).

Ткивни активатор плазминогена (енг. tissue plasminogen activator, t-PA), или алтеплаза, је серин протеаза коју ендотелне ћелије крвних судова испуштају у циркулацију након повреде или стреса и каталитички је неактиван све док се не веже за фибрин. Након везивања за фибрин, t-PA разлаже плазминоген из угрушка и преводи га у плазмин. Потом, плазмин започиње процес растварања фибрина. Ни плазмин ни активатор плазминогена не остају везани за производе деградације, већ се након

деловања отпуштају у крвоток, где постају неактивни дејством својих природних инхибитора.

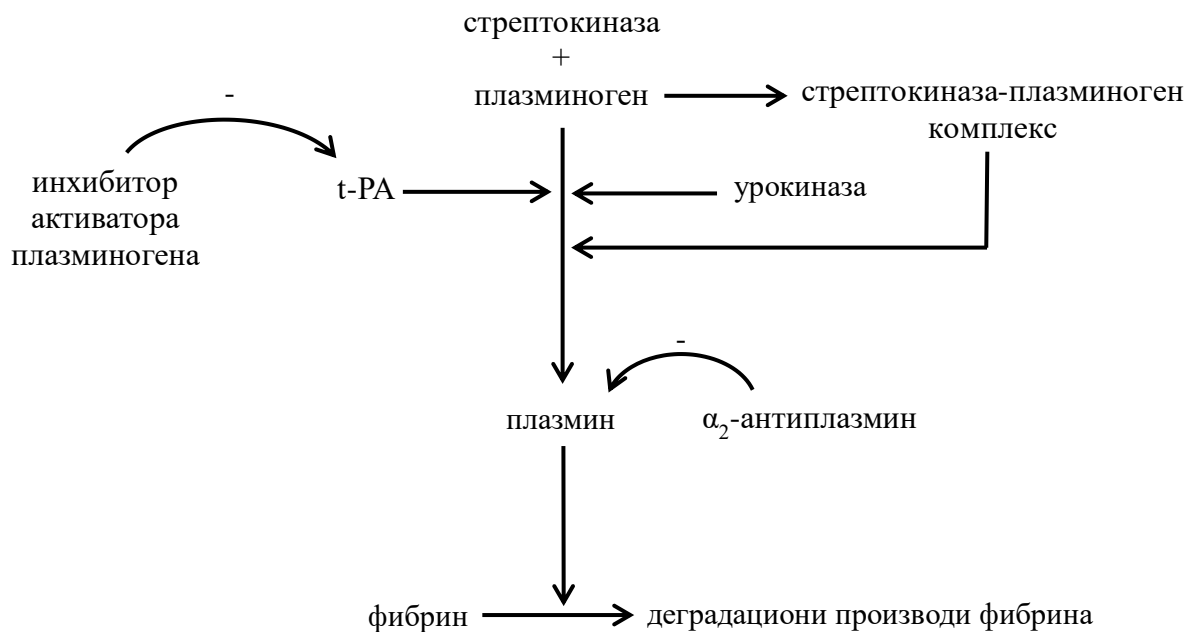


Слика 1.42. Процес фибринолизе у оштећеном крвном суду.



Шема 1.14. Шематски приказ активације плазминогена разним активаторима из крви.

Поред t-PA, плазминоген се може активирати у присуству урокиназе, чији је прекурсор проурокиназа. Урокиназа се биосинтетише у ћелијама моноцита, макрофага, фибробласта и епитела. Њена главна улога је деградација екстрацелуларног матрикса. На Шеми 1.15 приказано је како разни протеини могу утицати на процес формирања плазмينا.



Шема 1.15. Приказ позитивног утицаја стрептокиназе, ткивног активатора плазминогена (t-PA) и урокиназе, и негативног утицаја инхибитора активатора плазминогена и α₂-антиплазмина на процес активације плазминогена.

Поред тога, и модификована алтеплаза као што је нпр. стрептокиназа (добијена технологијом помоћу рекомбиноване ДНК) примењује се за „разбијање“ фибринског угрушка. Стрептокиназа гради комплекс са плазминогеном који испољава протеолитичку активност. Грађење комплекса доводи до разлагања плазминогена до плазмина и започиње се са процесом фибринолизе (Шема 1.15). Ипак, поменути агенси мање су селективни од t-PA јер активирају плазминоген у течној фази (где може доћи до деградације фибриногена из крвотока) унутар фибринског угрушка. Количина плазмина добијена терапеутским дозама стрептокиназе може бити много виша од капацитета α₂-антиплазмина из циркулације, што може довести до разградње фибриногена и фибрина, а то даље може проузроковати обилна крварења. Због своје селективности у процесу разградње фибрина, постоји интересовање за применом рекомбиноване t-PA, поготово приликом прокрчења коронарних артерија након

тромбозе. Ако се примени у раној фази терапије, пре иреверсног оштећења срчаног мишића (отприлике шест сати након настанка тромбозе), t-РА значајно смањује стопу смртности од оштећења миокарда услед коронарне тромбозе.

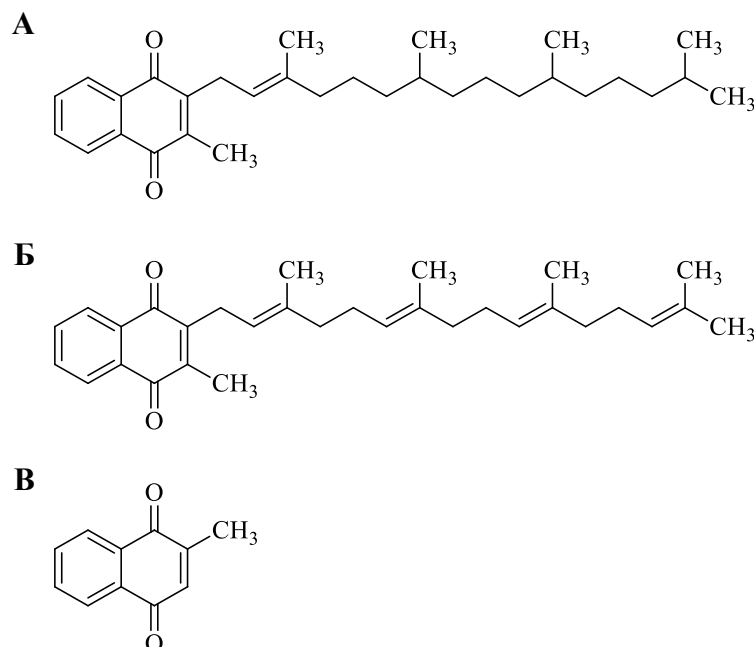
Постоји и много физиолошких поремећаја, укључујући рак и стање шока, када се повећава концентрација активатора плазминогена. Тако, активност антиплазмина, која зависи од α_1 -антитрипсина и α_2 -антиплазмина, може бити умањена при патолошким стањима попут цирозе. Пошто одређени бактеријски метаболити, као што је стрептокиназа, имају могућност активације, они могу бити одговорни за обилно крварење које се понекад јавља код бактеријских инфекција.

1.1.6. ЦИКЛУС ВИТАМИНА К У ПРОЦЕСУ КОАГУЛАЦИЈЕ КРВИ

Научни садржај ове докторске дисертације огледа се у откривању нових антагониста витамина К (енг. vitamin K antagonists, VKA) хроман-2,4-дионског и 4-хидроксикумаринског типа. Витамин К има кључну улогу у процесу коагулације крви у оквиру коагулационе каскаде, јер, кроз тзв. циклус витамина К, има физиолошку улогу коензима витамин-К зависне карбоксилазе у процесу биосинтезе γ -карбоскиглуминске киселине (Gla) из глутаминске киселине (Glu).²⁶ У складу са претходном дескрипцијом, Gla остаци омогућавају одређеним факторима коагулације (фактори II, VII, IX и X, и протеини C и S) да се вежу за фосфолипиде транспортних ћелија (фактор VII) или фосфолипиде мембране тромбоцита (фактори II, IX и X) преко калцијумових мостова. Активацијом поменутих зимогена, који се још називају и витамин К зависни протеини (енг. vitamin K dependent proteins, VKDs), сваки корак коагулационе каскаде несметано се одвија.²⁷ Антагонисти витамина К индиректно инхибирају коагулацију на нивоу фактора II, VII, IX и X те чине потентне регулаторе коагулационе каскаде. Литературни преглед антагониста витамина К биће дат у последњем сегменту увода ове докторске дисертације, а наредни редови биће посвећени самом механизму индиректног антагонизма витамина К.

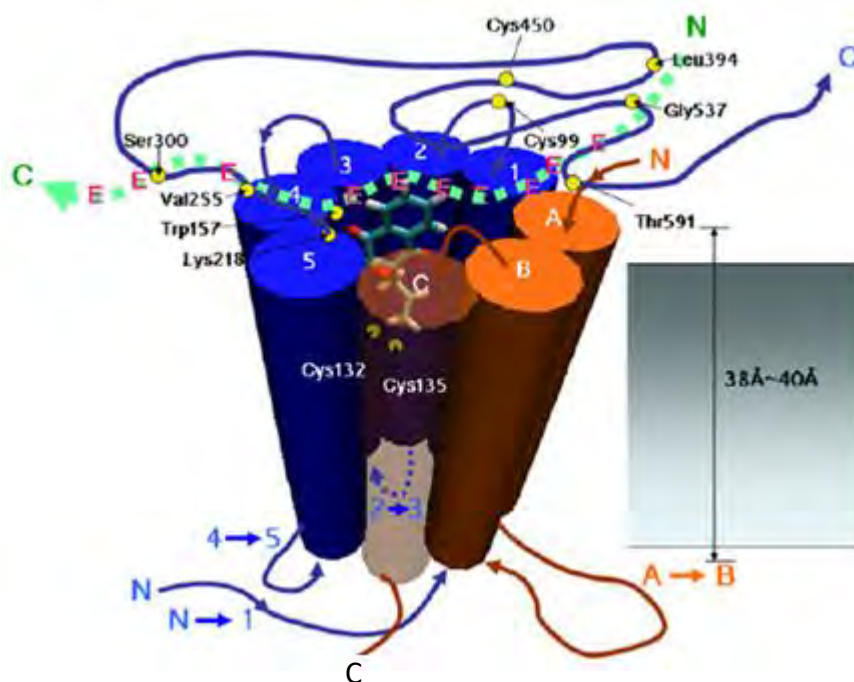
Витамин К (скраћеница К потиче од речи коагулација) заједнички је назив за групу деривата 2-метил-1,4-нафтохинона, коју чине витамин К₁ (2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинон) (Шема 1.16А), витамин К₂ (2-метил-3-полиизопреноид-1,4-нафтохинон)

(Шема 1.16Б) и витамин К₃ (синтетички менадион, 2-метилнафтален-1,4-дион) (Шема 1.16В).



Шема 1.16. Приказ структура витамина К: А) витамин К₁, Б) витамин К₂, В) витамин К₃.

Као регулатор коагулационе каскаде, витамин К је атрактивна мета за делимични антагонизам коагулације у сврху лечења физиолошких поремећаја коагулације крви попут венске тромбозе, зачепљења крвних судова и фибрилације преткомора, срчаног удара, шлога и митралне стенозе.^{28,29} Иако тренутно не постоји кристална структура витамина К у комплексу са мишјим, пацовским или хуманим протеинима чији је овај витамин коензим, експериментални докази указују да постоје најмање два трансмембранска (енг. Transmembrane, ТМ) протеина ендоплазматског ретикулума који припадају тзв. витамин К епоксид редуктаза мултипротеинском комплексу (енг. vitamin K epoxide reductase multiprotein complex, VKOR). То су витамин К-зависна карбоксилаза (енг. vitamin K-dependent carboxylase, VKC) који се још назива и γ -глутамил карбоксилаза (енг. gamma glutamyl carboxylase, GGCX), те субјединица 1 витамин К епоксид редуктаза мултипротеинског комплекса, такође позната и као VKORC1 (енг. vitamin K epoxide reductase complex subunit 1) (Слика 1.43).

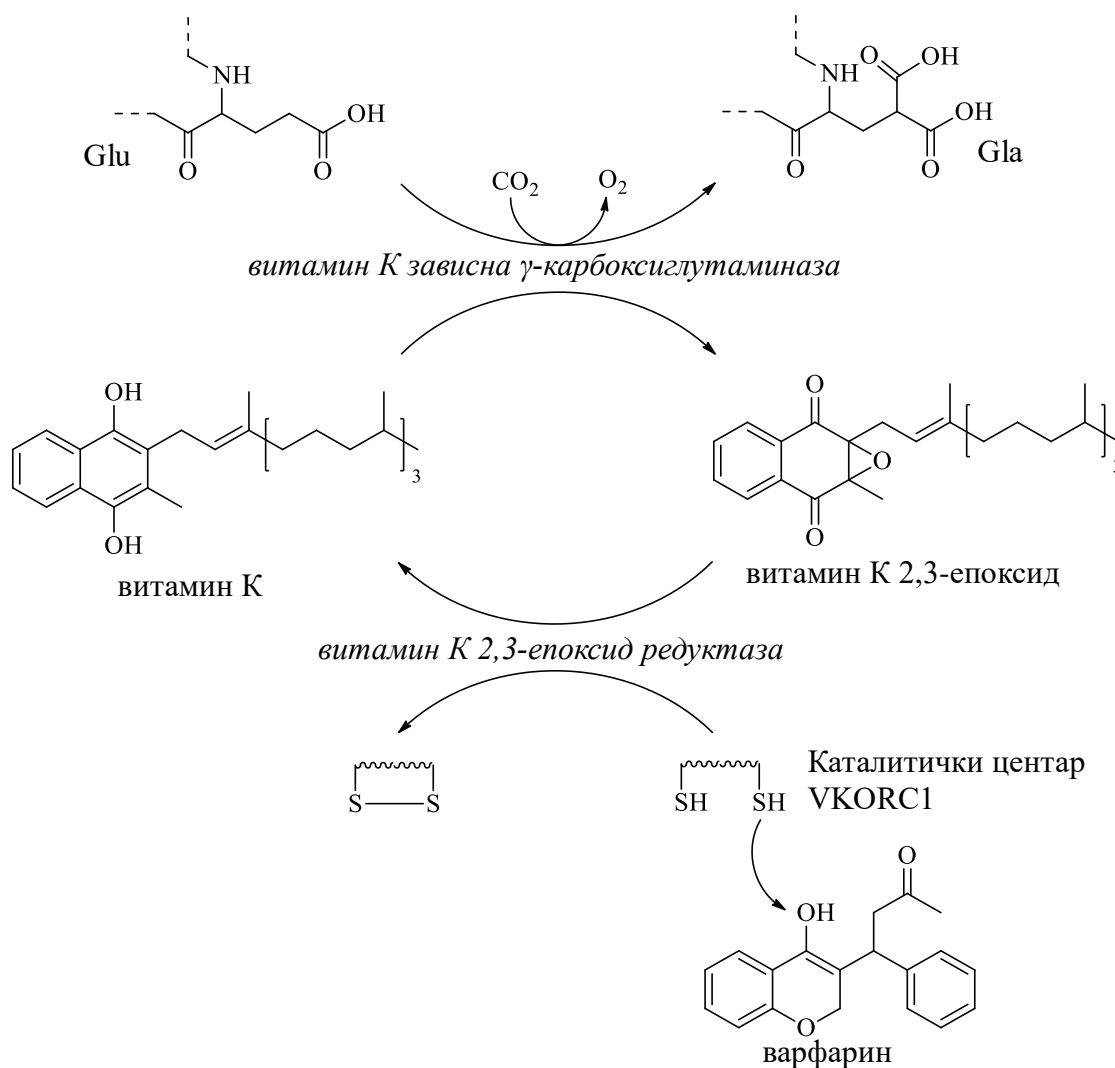


Слика 1.43. Теоријски модел хетеродимера VKOR. Трансмембрански хеликси VKC обележени су плавом бојом и ознакама 1-5, док су трансмембрански хеликси VKORC1 назначени наранџастом бојом и ознакама A-C.^{ix}

Молекулска мета антагониста витамина K, хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина, јесте управо VKORC1 (Шема 1.17). VKORC1 је трансмембрански протеин ендоплазматичног ретикулума јетре који у циклусу витамина K врши редукцију витамин K 2,3-епоксида до хидрохинонске форме витамина K, непосредно након карбоксилације фактора коагулације (Шема 1.17). Хроман-2,4-диони и 4-хидроксикумарини, чија је антикоагулативна активност и предмет ове докторске дисертације, антагонизују ову оксидо-редукциону реакцију и тиме спречавају циклус поновне карбоксилације зимогена. Поменути биоактивна једињења остварују своју активност као антагонисти VKORC1, па ће даљи текст бити посвећен овој значајној молекулској мети. Фармаколошки термин антагонист углавном се користи код рецептора као трансмембранских протеина. VKORC1 нема физиолошку улогу рецептора али јесте трансмембрански протеин, те се тако и једињења која модулирају његову активност називају антагонистима.

И поред недостатка кристалне структуре, новијим научним резултатима начињен је велики прогрес на нивоу разумевања структуре мишје, пацовске и хумане VKORC1, јер је утврђено да биосинтезу овог трансмембранског протеина ендоплазматичног ретикулума кодира истоимени ген. Оно што је познато на основу

генског мапирања и секвенционирања примарне структуре јесте да примарна структура хуманог VKC садржи 758 аминокиселина,^{30,31} док у секвенци хумане и мишије/пацовске VKORC1 постоји 163 аминокиселина.^{32,33}

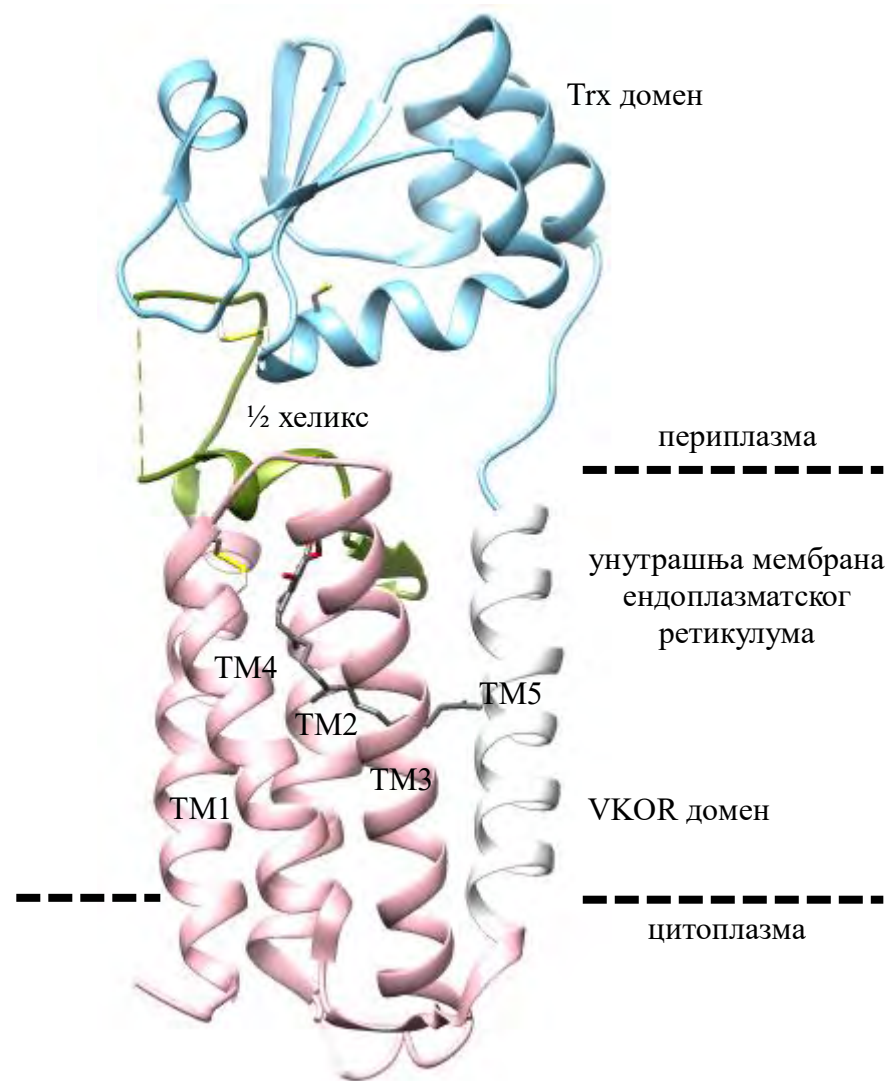


Шема 1.17. Улога VKORC1 у циклусу витамина К.

1.1.6.1. КРИСТАЛНА СТРУКТУРА *syn*VKOR – ХОМОЛОГА *h*VKORC1

Да би се разумела фармакологија антагонизма VKORC1 од стране хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина, потребно је представити сазнања која постоје о структури самог протеина а која су добијена на основу експерименталних и теоријских

модела. Прва кристална структура ензима VKOR у комплексу са својим редокс партнером убихиноном, односно коезимом Q10, снимљена је након изоловања и пурификације из бактерије *Synechococcus sp.*, те се сâм кристал назива и *synVKOR* (Слика 1.44).³⁴



Слика 1.44. Приказ кристалне структуре *SynVKOR* у комплексу са убихиноном. ТМ хеликси 1-4, који су хомолози VKOR сисара приказани су розе бојом, петља између првог и другог ТМ хеликса, која садржи 1/2-хеликс, приказана је зеленом бојом. Структура убихинона је приказана сивом бојом. PDB ID: 3KP9.

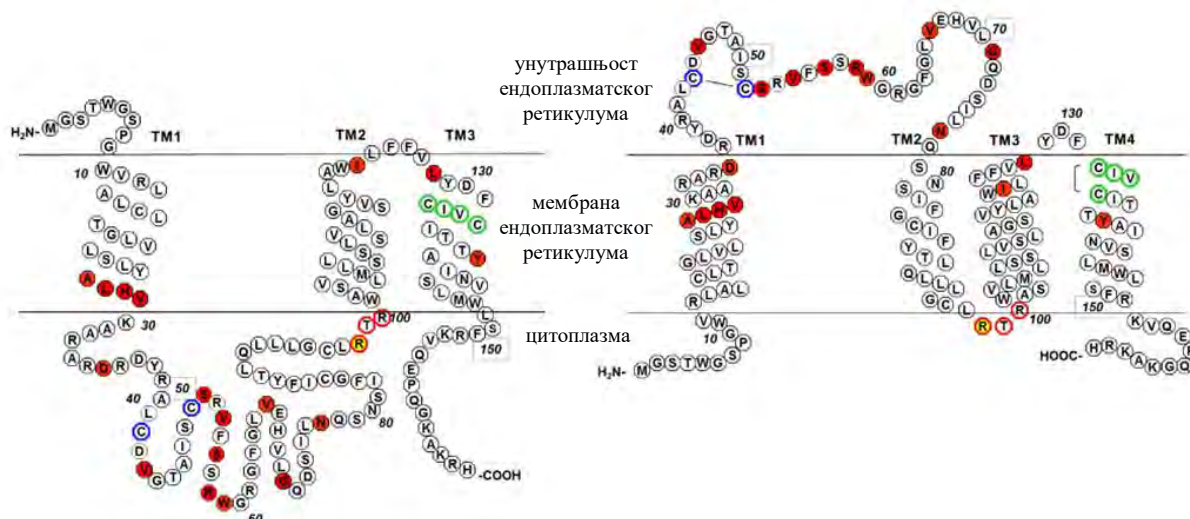
Поменути хомолог људског протеина (лат. *Homo sapiens* VKORC1, *hVKORC1*) састоји се од пет трансмембранских хеликса (енг. transmembrane helices, TMs). Првих четири хеликса формирају сноп који се простире око хинона и представљају каталитичко језгро ензима *synVKOR*. Хинонски супстрат се налази у близини

периплазматског дела мембране ендоплазматског ретикулума *synVKOR*, веома близу СХХС мотива активног центра ензима лоцираног у четвртом трансмембранском хеликсу. Између првог и другог трансмембранског хеликса формира се дуга периплазматска петља која обухвата 1/2 хеликса и два цистеина (Cys50 и Cys56), те серин/треонин остатак (Ser62Thr) који се налазе код свих VKOR хомолога.³⁵ Пети трансмембрански хеликс се налази ван снопа прва четири хеликса и преко С-терминалног сегмента повезан је са тиореодоксин (Trx) доменом. Li је са сарадницима уочио дисулфидни мост богат електронима који се формира између Cys50 из периплазматске петље VKOR домена и Cys209 из Trx домена.³⁴ Стога, нам структура *synVKOR* сугерише да се трансфер електрона врши са Trx-like домена, преко цистеина у периплазматској петљи, до СХХС мотива унутар активног центра где се даље врши редукција убихинона до његове хидрохинонске форме.³⁶

Положај активног центра јесте камен спотицања у експерименталним настојањима да се реши структура и фармакологија VKORC1. На основу експерименталних резултата, до сада је утврђено да се активни центар VKORC1 налази у трећем или четвртом трансмембранском хеликсу. Чине га аминокиселине са редним бројевима од 130 до 140: Ala130-Phe131-Cys132-Ile133-Val134-Cys135-Ile136-Thr137-Thr138-Tyr139-Ala140. Каталитички центар чине Cys132-Ile133-Val134-Cys135 односно Thr138-Tyr139-Ala140.

1.1.6.2. ХОМОЛОГИ МОДЕЛ *hVKORC1*

Обзиром на чињеницу да кристална структура људског VKORC1 још увек није снимљена, креиран је хомологи модел на основу структуре доступног *synVKOR*, да би се омогућио увид у структуру овог ензима. Неколико *in silico* алгоритама је предвидело *hVKORC1* моделе са три, четири и пет ТМ хеликса.^{33,35,37-39} Такође, на основу експерименталних података предлаже се топлогија са три или четири ТМ хеликса (Слика 1.45).⁴⁰⁻⁴²



Слика 1.45. Приказ тополошких модела *hVKORC1* са три (лево) и четири (десно) трансмембранских α -хеликса. СХХС мотив је представљен зеленом бојом, а цистеини из петље су представљени плавом бојом.^x

1.1.6.2.1. КОНЗЕРВИРАНЕ АМИНОКИСЕЛИНЕ У *hVKORC1*

Хомолози ензима *VKORC1* пронађени су код биљака, бактерија, арахеа и сисара, само не код квасаца и гљива.^{35,43,44} Сви *VKORC1* хомолози ензими поседују СХХС мотив у активном центру, који је неопходан за редукцију хинонских супстрата.^{33,35,37–39} Аминокиселине цистеини из СХХС мотива граде дисулфидни мост који се редукује да би се ензим активирао. Постоје и два додатна цистеина (Cys43 и Cys51) који могу формирати дисулфидну везу. Такође, серин на положају 57 (или треонин код неких *VKORC1* хомолога) који се налази у великој петљи *hVKORC1* јесте устаљена аминокиселина заједно са четири цистеина и серином/треонином код свих *VKOR* хомолога, и дефинишу протеине из *VKOR* фамилије.^{33,34,37,39,45} Код модела са три и четири ТМ хеликса, СХХС мотив се налази у последњем ТМ хеликсу и усмерен је ка унутрашњости ендоплазматског ретикулума. Према досадашњим сазнањима, *VKOR* потпуно губи активност када се изврши мутација на бар једном од цистеина из СХХС (Cys132 и Cys135).^{33,34,37,38} Резултати јасно указују да СХХС (односно Cys132-Pe133-Val134-Cys135) мотив представља активни центар ензима и да је неопходан за редукцију супстрата. Улога цистеина Cys43 и Cys51 није потпуно разјашњена. Сходно њиховом положају у протеину називају се цистеини из петље. Код модела са четири

ТМ хеликса, сугерише се неопходност цистеина из петље за *in vivo* активност ензима,^{42,45} док студије које подржавају модел са три хеликса предлажу супротно.^{37,41,46}

Основна разлика између два модела јесте у оријентацији *N*-терминуса, првог ТМ хеликса и велике петље (тј. насумице увијања). Код модела са 3ТМ хеликса, петља се налази у цитоплазми, док је код 4ТМ модела, петља у унутрашњости ендоплазматског ретикулума (Слика 1.45). Према 4ТМ моделу, цистеини из петље неопходни су за рад преноса електрона са редокс партнера из унутрашњости ендоплазматског ретикулума у циљу редукције цистеина из СХХС мотива. Претпостављени механизам преноса електрона неопходан је за активацију VKORC1, а такође је присутан и код бактеријског хомолога. Код *syn*VKOR, дисулфидни мост формиран између цистеина из петље редукује се периплазматским Тгх редокс партнером, природно везаним за протеинско језгро VKOR-а. Код кичмењака, Тгх редокс сегмент не постоји. Стога се сматра да протеини који садрже Тгх домен редукују цистеине из петље код кичмењака. Кандидати за партнера оксидоредуктаза су протеин дисулфид изомеразе (енг. protein disulfide isomerases, PDIs) који су или засебни глобуларни протеини лоцирани у унутрашњости ендоплазматског ретикулума или протеини типа I уграђени у мембрану ендоплазматског ретикулума са редокс активним цистеинима усмереним ка унутрашњости ендоплазматског ретикулума.^{42,47}

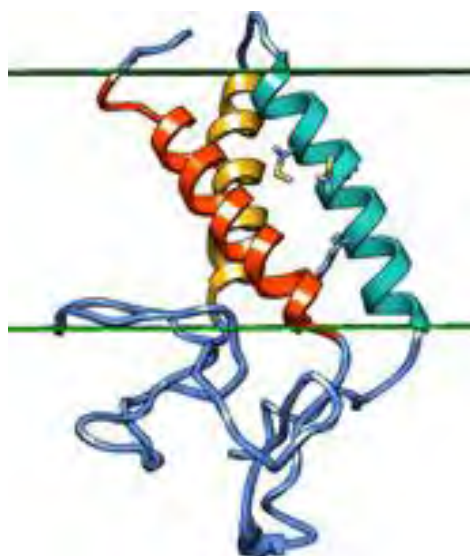
Сходно томе, пренос електрона преко цистеина из петље могућ је само код 4ТМ модела, јер је већина PDI ензима лоцирана у унутрашњости ендоплазматског ретикулума. Међутим, код 3ТМ модела PDIs не могу редуковати цистеине из петље ако се петља налази у цитоплазми. У таквом случају цистеини из петље не могу бити неопходни за активност VKOR, па се пренос електрона вероватно одвија директном редукцијом СХХС мотива. Закључак је да положај цистеина из петље у унутрашњости ендоплазматског ретикулума не мора бити неопходан услов за активност *h*VKORC1 ако се ензим састоји од 3ТМ хеликса.

1.1.6.2.2. ТОПОЛОШКИ МОДЕЛ VKORC1 СА ТРИ ТРАНСМЕМБРАНСКА α -ХЕЛИКСА

Унутар тополошког модела са три трансмембранска α -хеликса, велика петља повезује први и други хеликс. Петља се простире кроз цитоплазму и садржи пар цистеина, тзв. цистеине из петље. *C*-терминус се налази у цитоплазми, а *N*-терминус

залази у унутрашњост ендоплазматског ретикулума (Слика 1.45 лево). ЗТМ модел добијен је помоћу неколико *in silico* тополошких алгоритама за предвиђање топологије протеина а потврђен је и експерименталним подацима добијеним применом FFP (fluorescence protease protection) теста.^{41,48} Помоћу овог теста, *C*- и *N*-терминуси VKORC1 означени су протеином који флуоресцира зеленом бојом (енг. green fluorescent protein, GFP) и закључено је да се налазе са супротних страна мембране ендоплазматичног ретикулума: *N*-терминус залази у унутрашњост ендоплазматичног ретикулума док се *C*-терминус налази у цитоплазми.⁴¹

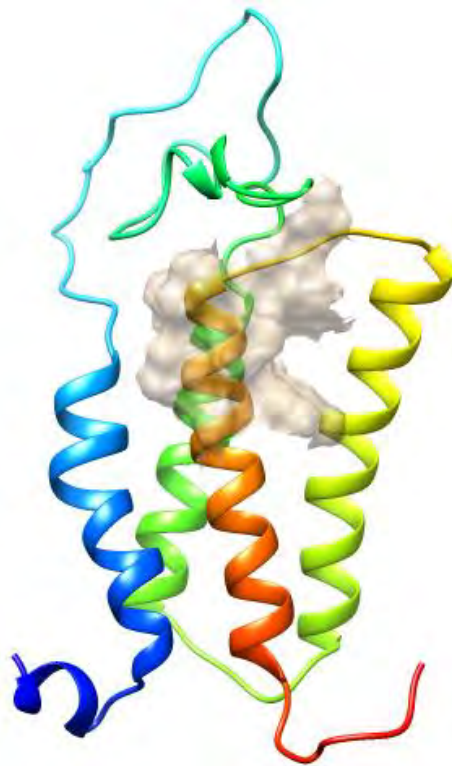
Tie и Stafford дошли су до закључка да трансмембрански хеликси обухватају следеће аминокиселине: први остатке 10-29, други аминокиселине 101-123 и трећи мономере 127-149. *N*-терминус чини првих 9 аминокиселина, велика петља која спаја први и други хеликс простире се кроз цитоплазму (око 69 аминокиселина), док мања петља која спаја други и трећи хеликс улази у унутрашњост ендоплазматског ретикулума (око 7 аминокиселина) (Слика 1.46).⁴⁸ *C*-терминус обухвата око 16 аминокиселина. Код ЗТМ модела СХХС мотив се налази у трећем трансмембранском хеликсу у хидрофобном окружењу, окренут ка унутрашњости ендоплазматског ретикулума. Према претходним сазнањима, витамин К зависна карбоксилаза испољава своју активност у унутрашњости ендоплазматског ретикулума па је непосредна близина СХХС мотива повољна за редукцију епоксида насталог након реакције карбоксилације.



Слика 1.46. Приказ предложене структуре ЗТМ модела хумане VKORC1.⁴⁸

1.1.6.2.3. ТОПОЛОШКИ МОДЕЛ VKORC1 СА ЧЕТИРИ ТРАНСМЕМБРАНСКА α -ХЕЛИКСА

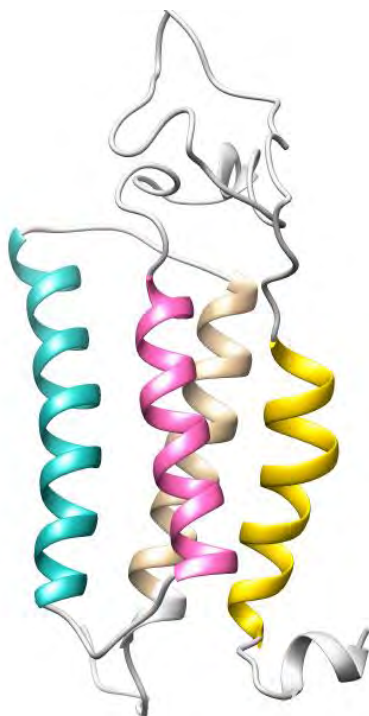
Унутар 4ТМ модела *hVKORC1* (Слика 1.45 десно, Слика 1.47) велика петља, као и код 3ТМ модела, са паром цистеина спаја први и други ТМ хеликс, али се код предложеног модела петља налази у унутрашњости ендоплазматског ретикулума. Оба термина су лоцирана у цитоплазми (Слика 1.45 десно). СХХС мотив налази се у четвртом ТМ хеликсу, усмерен ка унутрашњости ендоплазматског ретикулума, еквивалентно положају код 3ТМ модела. Кристална структура бактеријског *synVKOR* ензима сугерише 4ТМ топологију ензима *hVKORC1*. Сноп четири хеликса у мембрани ендоплазматског ретикулума код бактеријског *synVKOR* хомолог је *hVKORC1* са ~24% поклапања примарној структури.³⁴ Wajih је са сарадницима дошао до сазнања да група ензима PDIs гради комплекс са VKORC1.⁴⁷ Ово је први зачајнији доказ да PDIs могу бити физиолошки редокс партнери *hVKORC1*.



Слика 1.47. Приказ хомологог 4ТМ модела хумане VKORC1. ТМ1 обележен је плавом бојом, ТМ2 зеленом бојом, ТМ3 жутом бојом, ТМ4 наранџастом бојом. Каталитичке аминокиселине означене су беж транспарентном сфером.

1.1.6.3. ХОМОЛОГИ МОДЕЛ *r*VKORC1

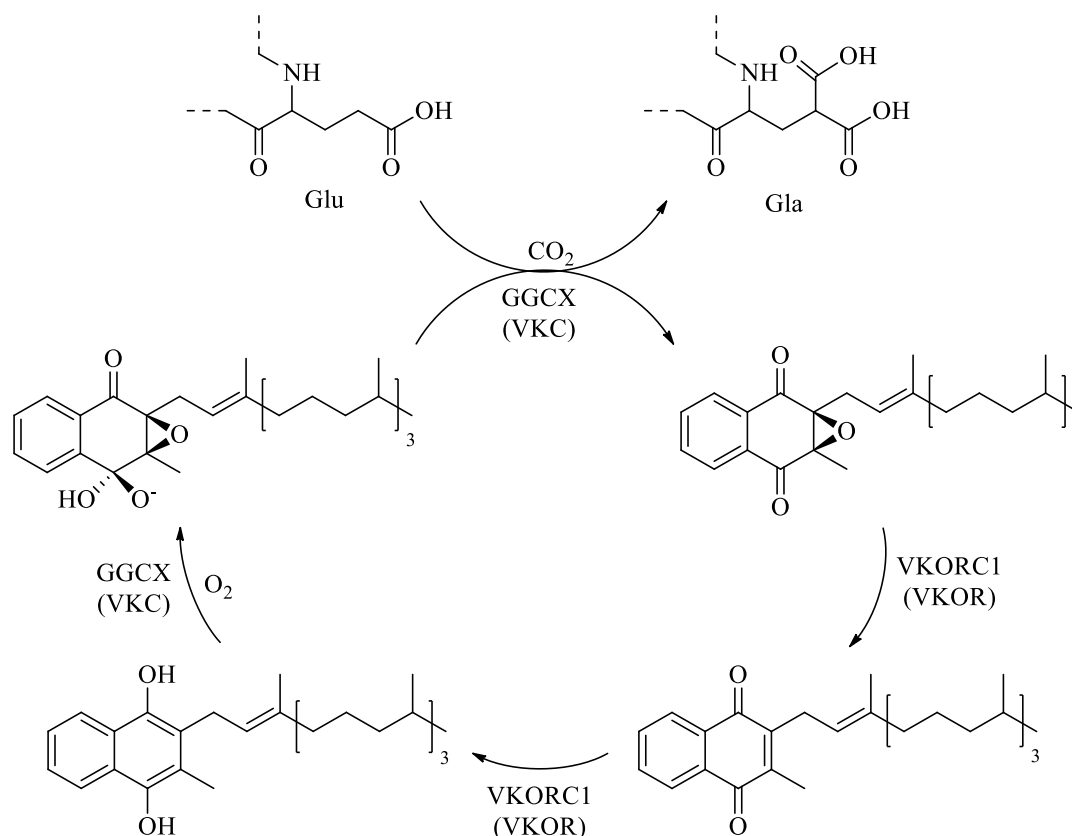
По морфолошким, физиолошким и фармаколошким особинама најсличнији модел организми хуманом јесу мишји (лат. *Mus musculus*) и пацовски (лат. *Rattus norvegicus*). Очекивано, услед велике сличности у примарној структури људског и пацовског VKORC1, сви потенцијални антикоагуланти прелиминарно се могу испитивати на пацовима. Обзиром да кристална структура пацовског протеина још увек није доступна, креиран је хомологи модел *Rattus norvegicus* VKORC1 (*r*VKORC1).⁴⁹ Као и за креирање хуманог хомологог модела и овде је коришћен бактеријски хомолог врсте *Synechococcus sp* (PDB ID: 3KP9 ланац А). Секвенца *r*VKORC1 преузета је са Swiss-Prot/Uniprot базе података (UniProt ID: Q6TEK4).⁵⁰ Добијени хомологи модел садржи четири трансмембранска α -хеликса, где први обухвата аминокиселинске остатке 11-31, други 81-97, трећи 101-123 и четврти 127-149. По структури (Слика 1.48), *r*VKORC1 готово је идентичан претходно описаном хомологом моделу *h*VKORC1. Хомологи модел *r*VKORC1 коришћен је у експерименталном делу ове докторске дисертације за потребе дефинисања неких фармаколошких аспеката тестираних хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина.



Слика 1.48. Приказ хомологог 4ТМ модела *r*VKORC1. ТМ1 обележен је зеленом бојом, ТМ2 беж бојом, ТМ3 жутом бојом, ТМ4 љубичастом бојом.

1.1.6.4. МЕХАНИЗАМ РЕДУКЦИЈЕ ВИТАМИНА К VKOR КОМПЛЕКСОМ

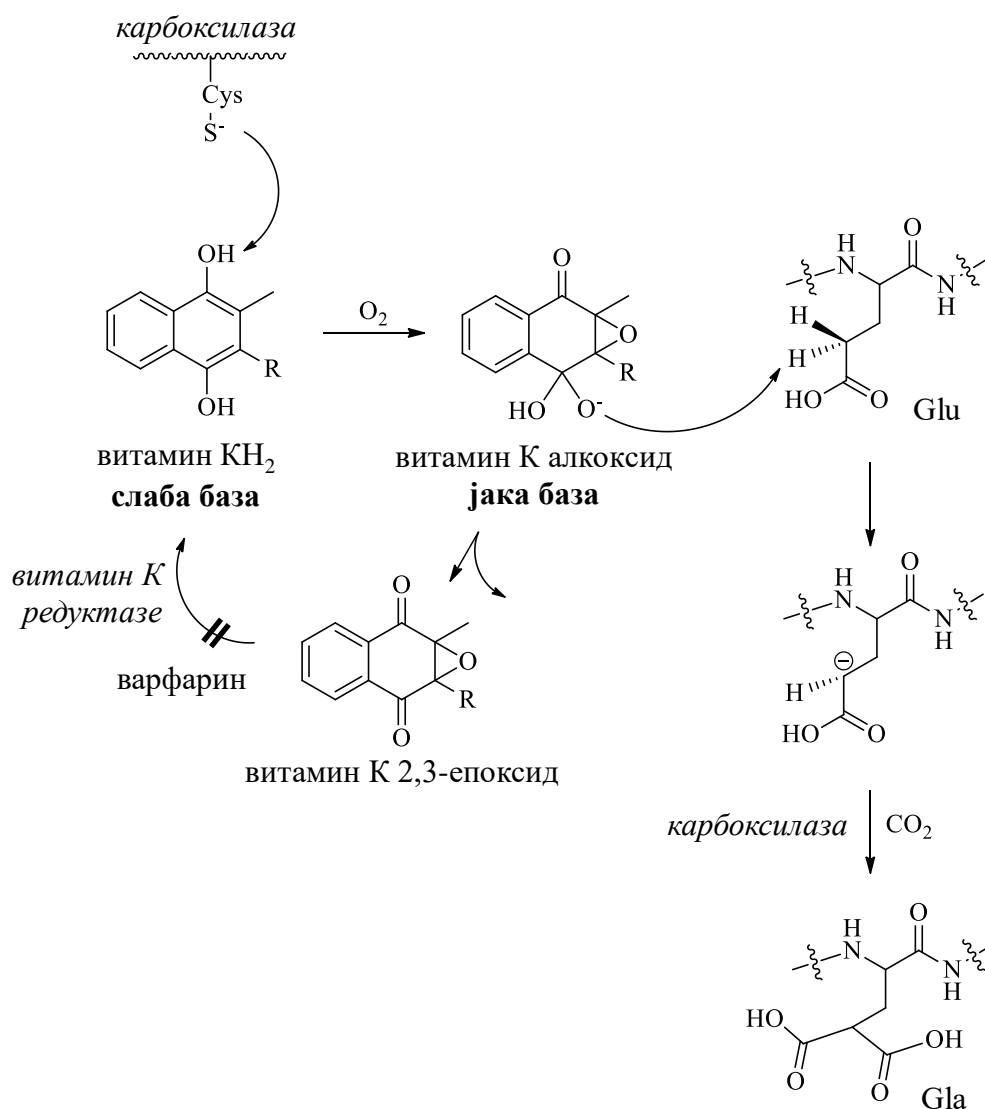
Како постоје изразите недоумице у структури VKOR комплекса јер га је због трансмембранске природе експериментално тешко изоловати, тако је и механизам регулације комплетног циклуса витамина К VKOR комплексом такође предмет интензивне дебате (Шема 1.18).



Шема 1.18. Циклус витамина К.

Dowd (Шема 1.19) је предложио да VKC катализује оксидацију хидрохинонског облика витамина К (KH₂) до алкоксида као активiranог облика.⁵¹⁻⁵³ По Dowd-у, хидрохинонски облик витамина К најпре трпи нуклеофилни напад цистеина из активног центра VKC, док у исто време долази до оксидације *p*-положаја молекулским кисеоником. Највероватније је у питању радикалски механизам оксидације, при чему се након хомолитичког раскидања ковалентне везе молекула кисеоника један од атома везује у *p*-положај, док се преостали атом везује у *m*-положај. Тиме је створен услов за затварање епоксида и настанак алкоксидне форме витамина К. Награђени алкоксид врши нуклеофилни напад на протон са R-остатка глутаминске киселине при чему

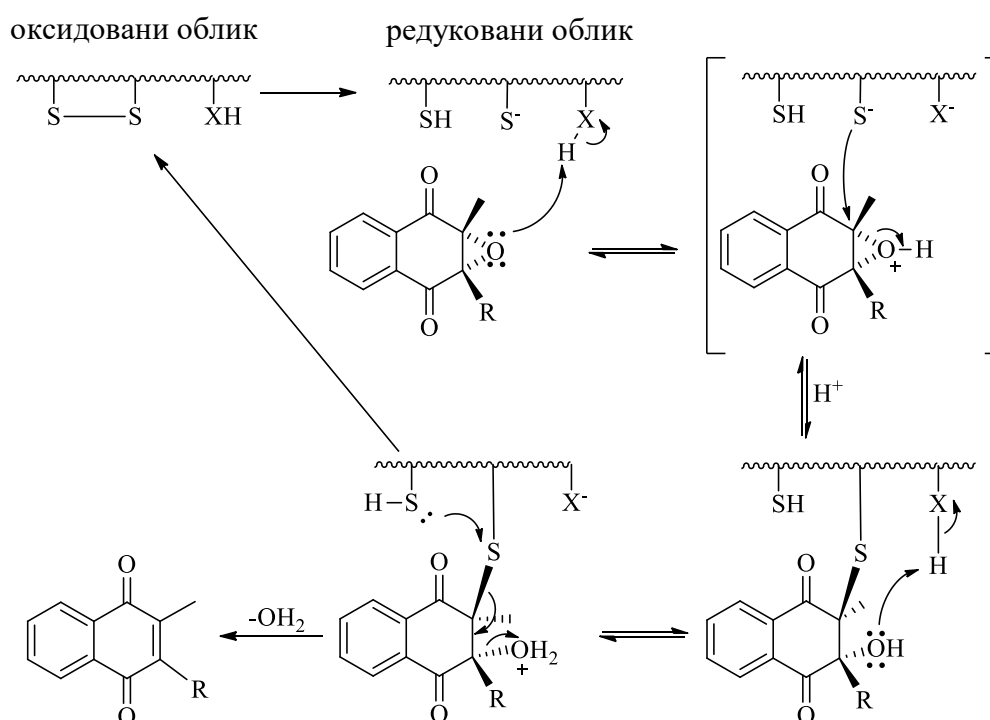
настаје хидроксилни анјон. Адирањем на протон из медијума, хидроксилни анјон се одваја од алкоксида витамина К те настаје витамин К 2,3-епоксид. Симултано, формира се карбанјон на нивоу аминокиселине који реагује са угљен-диоксидом као коензимом карбоксилазе и настаје Gla.



Шема 1.19. Механизам настанка витамин К 2,3-епоксида по Dowd-у.

Механизам превођења витамин К 2,3-епоксида до витамина К у присуству ензима VKORC1 предложио је Silverman 1981 (Шема 1.20).⁵⁴ По аутору, оксидована дисулфидна веза активног центра VKORC1 редукује се тиолом да би се рецептор активирао. Епоксид се везује за редукован облик VKORC1 и епоксидни кисеоник врши нуклеофилни напад на електрофилну аминокиселину која се налази у суседству Cys132 и Cys135, при чему долази до киселог цепања епоксидног прстена. Надаље, једна од

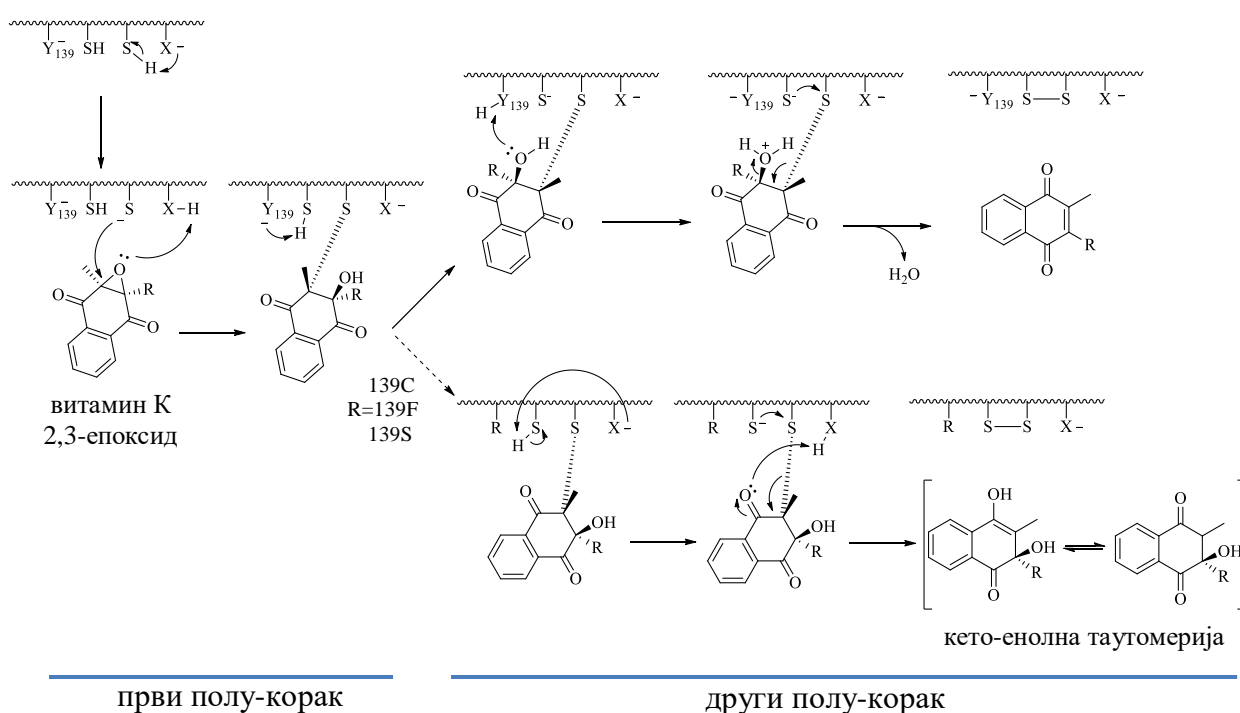
сулфхидрилних група активног центра врши нуклеофилни напад на C2 угљеник епоксида формирајући β -хидрокси сулфидни производ. Потом, протонована β -хидроксилна група врши нови нуклеофилни напад на претходно репротоновану електрофилну аминокиселину и формира се лако одлазећа група у виду молекула воде. Реакцију потпомаже друга сулфхидрилна група активног центра. У следећем кораку издваја се витамин К у хинонском облику, а цистеини из активног центра подлежу оксидацији и граде дисулфидну везу. Предложени механизам је значајан јер је базиран на постојању CXXC мотива, иако у време када је настао тачна примарна структура VKORC1, и његова топологија, нису биле познате.



Шема 1.20. Предложени механизам редукције витамин К 2,3-епоксида катализован VKORC1 по Silverman-у.

Са сазнањима о примарној структури и могућој топологији, Silverman-ов механизам ревидиран је квантно-механичким студијама. Теоријски модел указује на то да је активни центар VKORC1 сачињен од два цистеина, односно од Cys132 и Cys135 унутар CXXC мотива. Сам механизам може да се одвија у два полу-корака (Шема 1.21). Први полу-корак подразумева формирање ковалентне везе између каталитичких аминокиселина Cys132 или Cys135 и витамин К 2,3-епоксида. Иницијални корак

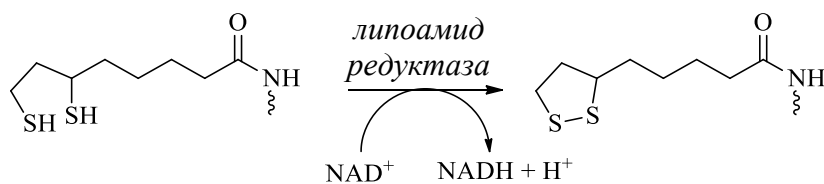
потпуно је аналоган Silverman-овом предлогу, с тим што улогу донора протона за раскидање епоксида преузима аминокиселина Thr138, иако то није децидно назначено у механизму. Други полу-корак дозвољава дехидратацију супстрата и ослобађање производа реакције. Реакциони корак подразумева учешће другог Cys и води до формирања дисулфидног моста између два Cys. Настанак хидроксилне групе на положају 3, односно β-хидроксилне групе, нарочито је интересантно јер демонстрира кључну улогу аминокиселине Tyr139 у механизму: у првом полу-кораку негативно наелектрисана аминокиселина преузима протон са вициналног Cys, у другом полу-кораку настала енолна група Tyr139 може бити укључена у протоновање хидроксилне групе на положају C3. Приликом мутације Tyr139, протон са аминокиселине Cys преузима Thr138 која потом врши редукцију хинонске форме витамина К. Ово су кључна разматрања која овај квантно-механички модел разликују од Silverman-овог. Недостатак модела јесте да не предвиђа која од аминокиселина, Cys132 или Cys135, формира ковалентну везу са витамин К 2,3-епоксидом у првом полу-кораку реакције.



Шема 1.21. Квантно-механичка модификација предложеног механизма редукције витамина К 2,3-епоксида катализованог VKORC1 по Silverman-у.

Занимљиво је и питање активације самог VKORC1, односно раскидање дисулфидне везе између каталитичких аминокиселина Cys132 и Cys135. Експериментални резултати указују на то да када се дисулфидна веза у ензиму

раскине, реакција постаје енергетски повољнија. Thijssen и сарадници су дошли до закључка да се ова веза раскида у присуству NADH-зависне липоамид редуктазе која је присутна у микрозомима.⁵⁵ Ензим је одговоран за пренос еквивалената редукције са NADH на VKORC1 посредством редукованог липоамида. Липоамид је функционална форма 6,8-дитиооктанске киселине у којој је карбоксилна група везана за протеин (или неки други амин) путем амидне везе (Шема 1.22).

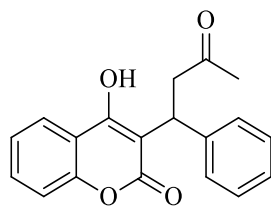


Шема 1.22. Приказ преноса протона са липоамида на NAD^+ у присуству липоамид редуктазе.

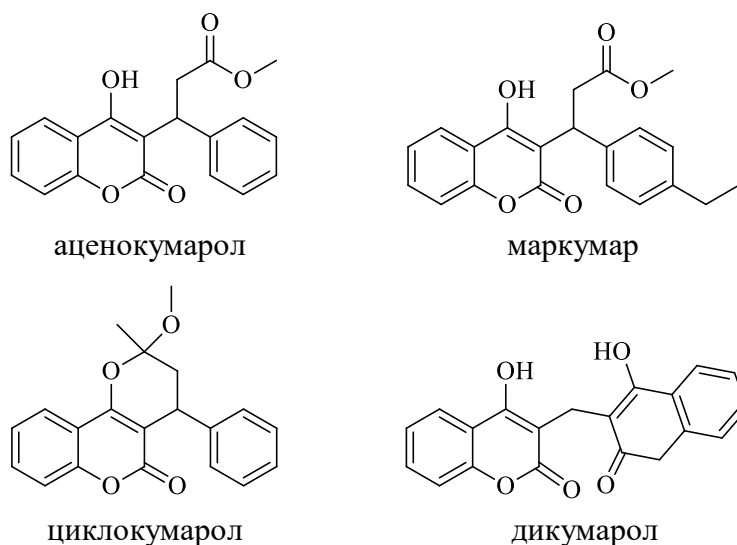
1.1.6.5. МЕХАНИЗАМ ИНХИБИЦИЈЕ VKORC1 КУМАРИНИМА

Клинички антагонисти VKORC1 јесу кумарини, од којих је најпознатији варфарин (Фарин®, Шема 1.23) који се примењује још од 1954. године. Поред варфарина, клинички антикоагуланти јесу и аценокумарол, циклокумарол, дикумарол, маркумар, фенокумрон (Шема 1.24).

Као што је већ наведено, кумарини антикоагулативну активност испољавају антагонизмом VKORC1, спречавајући редукцију епоксидног облика витамина К до хидрохинонског (Шема 1.17). Транспортни систем кумаринских деривата до активног центра VKORC1 јесте серумски албумин. Минимални структурни захтеви неопходни да би се неко једињење разматрало као кумарински антикоагулант јесу хидроксилна група на положају С4 те неполарни остатак у положају С3.⁵⁶ У структури варфарина ови захтеви задовољени су присуством језгра 4-хидроксикумарина, док је положај С3 супституисан 2-фенилпентан-2-он групом, уз велики допринос бензеновог прстена у липофилности. Као клинички антикоагулант, варфарин се користи у хуманој медицини у превенцији тромбозе и емболизма (абнормалне формације и миграције крвног угрушка).



Шема 1.23. Структура варфарина.

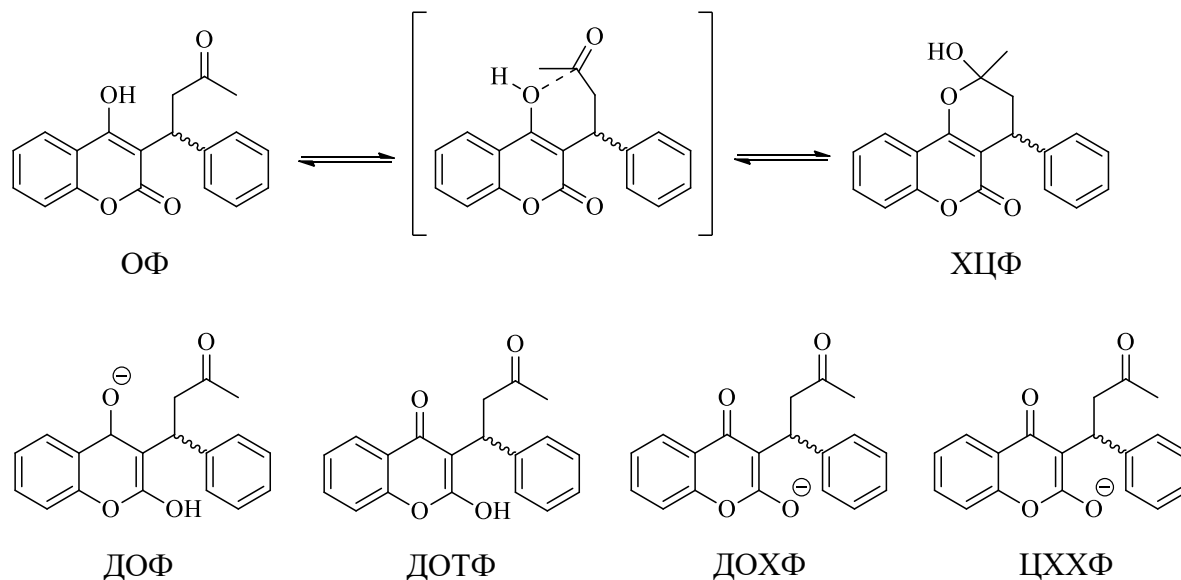


Шема 1.24. Структуре синтетичких антикоагуланата хемијски сличних варфарину који се користе у клиничкој пракси.

Обзиром да не постоји кристална структура варфарина у комплексу са VKORC1, његова биоактивна конформација није позната и остаје непознаница у ком облику варфарин испољава антикоагулативну активност. Сматра се да се варфарин трансформише у депротоновану отворену форму, попут форме хроман-2,4-диона, јер је у наведеном облику варфарин структурно веома сличан витамин К 2,3-епоксиду чији је антагонист. Формирање хроман-2,4-диона представља кључан моменат продужења процеса коагулације крви.

У кристалној структури, варфарин је у облику цикличног хемикетала, форми у којој не остварује интеракције са својом молекулском метом (Шема 1.25, ХЦФ). У воденом раствору ХЦФ настаје унтармолекулском циклизацијом отворене форме (Шема 1.25, ОФ). Из отворене форме, у зависности од рН вредности раствора, могу настати и депротонована отворена форма (Шема 1.25, ДОФ), депротонована отворена таутомерна форма (Шема 1.25, ДОТФ), депротонована отворена хроменска форма

(Шема 1.25, ДОХФ) и циклична хроменска хемикетална форма (Шема 1.25).⁵⁷ Данас је уврежено мишљење да варфарин у својој депротонованој форми делује као антагонист витамин К 2,3-епоксида.



Шема 1.25. Кристална структура варфарина и таутомерни облици у воденом раствору. Скраћенице: ОФ – отворена форма; ХЦФ – хемикетална циклична форма; ДОФ – депротонована отворена форма; ДОТФ – депротонована отворена таутомерна форма; ДОХФ – депротонована отворена хроменска форма; ЦХХФ – циклична хроменска хемикетална форма.

Механизам везивања варфарина за VKORC1 још увек није разјашњен. Полемише се о томе да ли се VKORC1 из редуковане, сулфхидрилне форме преводи у оксидовану, дисулфидну форму, те да ли се варфарин током антагонизма редукције витамин К 2,3-епоксида до витамина К везује за ензим иреверсно или реверсно?

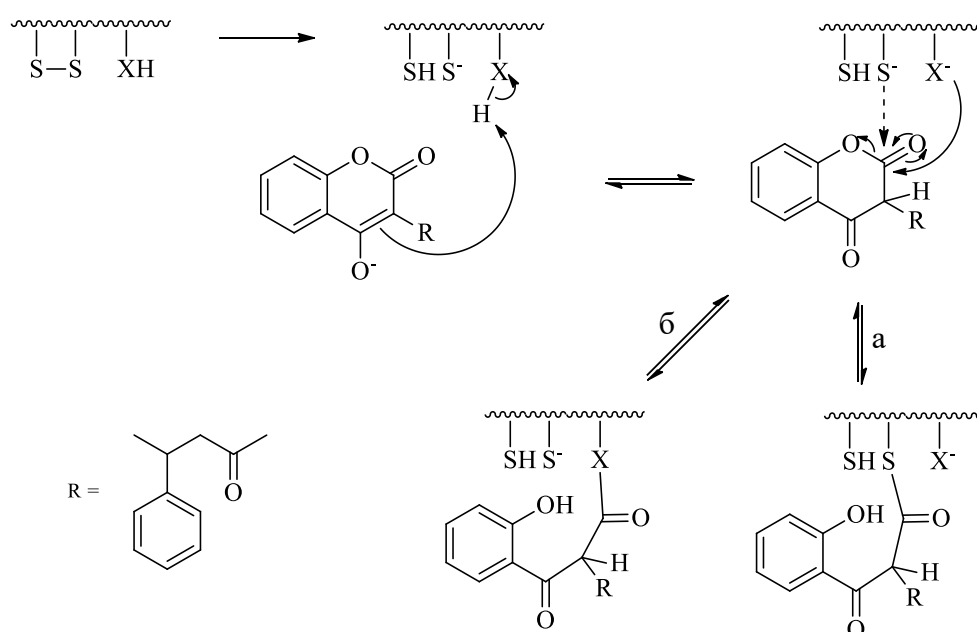
Активни облик VKORC1 потврђен је различитим експерименталним резултатима. Тако, у *in vitro* условима оксидован облик ензима редукује се дитиотреитолом (енг. dithiothreitol, DTT),⁵⁸ док се у живим системима овај процес одвија у присуству микрозомалне NADH⁺-зависне липоамид редуктазе (Шема 1.45).⁵⁵ Када се ензим преинкубира DTT-ом, а потом дода варфарин, умањује се антагонистичко дејство варфарина.⁵⁹ Експериментални подаци указују да варфарин радије антагонира оксидовану него редуковану форму VKORC1.^{59,60} Антагонизам VKORC1 варфарином одвија се брже када је ензим прво изложен варфарину, па DTT-у.⁵⁹ Редукована липоамид редуктаза стимулише активност VKORC1 у *in vivo* условима на сличан начин као и DTT.⁶¹ Иако се витамин К 2,3-епоксид или варфарин везују за оксидован облик VKORC1, ензим се мора редуковати како би се активирао пре

реакције са епоксидом или антикоагулантом.⁶² Само након активације ензима се може иницирати антикоагулација варфарином и сличним једињењима.

1.1.6.5.1. КОВАЛЕНТНИ МЕХАНИЗАМ ИНХИБИЦИЈЕ VKORC1 ВАРФАРИНОМ

Досадашња сазнања указују да варфарин не може формирати епоксид као што је то случај код витамина К. Стога не постоји могућност да се инхибиција одвија ковалентним механизмом као што је предложено за процес редукције витамин К 2,3-епоксида.^{58,63} Пошто варфарин остварује веома стабилне интеракције са VKORC1, сматрало се да је антагонизам иреверзибилан процес.⁶⁴ У прилог иреверсној инхибицији, Silverman је са сарадницима предложио да депротонована форма варфарина остварује интеракцију са редуктованим обликом VKORC1.⁶⁰

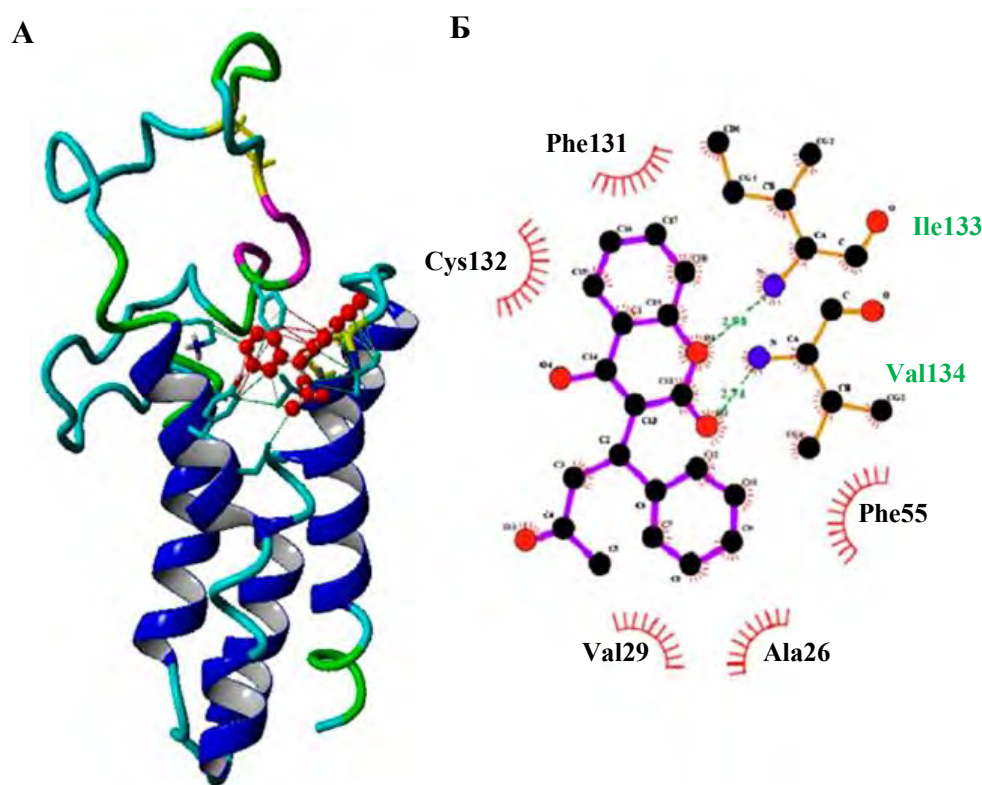
Ковалентни механизам предложили су Silverman и сарадници (Шема 1.26).⁶⁰ Према иреверсном механизму, рецептор се најпре редукује, потом аминокиселине из активног центра протонују варфарин (као што је случај и код витамин К 2,3-епоксида), те настаје нестабилни таутомер хроман-2,4-дионске структуре. Интермедијер је преко лактонског карбонила подложен нуклеофилном нападу, при чему се врши иреверсно ациловање активног центра VKORC1 варфарином, на нивоу цистеина (пут а) или суседног нуклеофила (пут б).



Шема 1.26. Предложени механизам ковалентне инхибиције VKORC1 варфарином.

1.1.6.5.2. РЕВЕРЗИБИЛНИ МЕХАНИЗАМ ИНХИБИЦИЈЕ VKORC1 ВАРФАРИНОМ

Супротно Silverman-овом закључку, недавно је потврђено да је оксидована форма VKORC1 мета за варфарин.^{65,66} Потом је предложено да се процес инхибиције ензима не одвија ковалентним механизмом. Нажалост, аутори нису предложили механизам реверсне инхибиције VKORC1 варфарином.



Слика 1.49. (А) Молекулско доковање депротоване отворене форме варфарина на хомологом моделу хумане VKORC1; (Б) Интеракциони дијаграм (*R*)-варфарина са активним центром VKORC1.^{xi}

1.2. БИОСИНТЕЗА ХРОМАН-2,4-ДИОНА У БИЉКАМА

Хроман-2,4-диони припадају под-класи хромона у оквиру природних ароматичних једињења, јер садрже две кето групе на положајима С4 и С2. О биосинтези хроман-2,4-диона може се разговарати кроз пут шикимске киселине и биосинтезе кумарина односно 4-хидроксикумарина, као директних прекурсора хроман-2,4-диона. Кумарини се биосинтетишу у вишим биљкама из фамилија *Umbelliferae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* и *Rutaceae*, а 4-хидроксикумарни у слаткој детелини (врсте *Melilotus*, *Leguminosae/Fabaceae*) када наступи процес ферментације биљке.^{67,68}

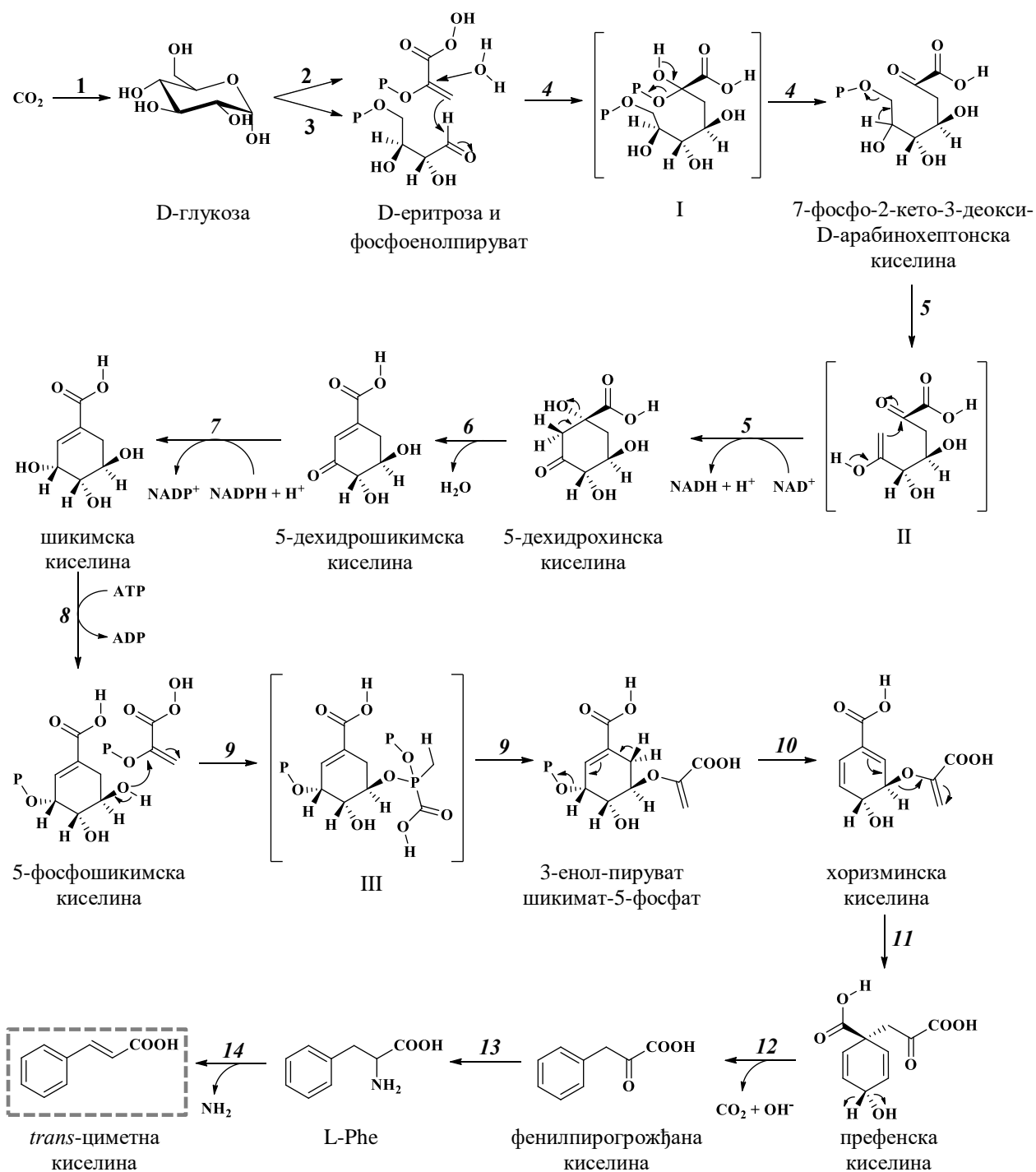
Полазни корак у биосинтези шикимске киселине у биљкама јесте укључивање угљен диоксида у процес фотосинтезе и формирање глукозе (Шема 1.27, корак 1). Потом глукоза може подлећи гликолизи, при чему настаје фосфоенолпируват, и укључити се у пентозно фосфатни шант дајући D-еритрозу. Ови производи се у присуству ензима фосфо-2-кето-деоксихептонат-алдолазе кондензују у 7-фосфо-2-кето-3-деокси-D-арабино-хептонску киселину (Шема 1.27, корак 4), која затим подлеже циклизацији и оксидацији, што резултује издвајањем 5-дехидрохинске киселине (Шема 1.27, кораци 5 и 6). Даља дехидратација и редукција ове киселине у присуству NADPH резултује биосинтезом шикимске киселине (Шема 1.27, кораци 7 и 8). Потом следе фосфорилација, кондензација са једним молекулом фосфоенолпирувата и елиминација ортофосфата, а као производ се издваја хоризминска киселина (Шема 1.27, кораци 9, 10, 11, 12). Премештањем бочног ланца са положаја С3 на положај С1 настаје префенска киселина (Шема 1.27, корак 13). У наредним корацима префенска киселина подлеже декарбоксилацији и дехидратацији која је катализована префенат-дехидратазом, затим трансминацији и деаминацији (Шема 1.27, кораци 14, 15 и 16). Као крајњи производ издваја се *trans*-циметна киселина. Оксидација *trans*-циметне киселине до *trans-o*-кумаринске киселине, која се формира у присуству ензима циметат хидроксилазе и СУТР450, последњи је заједнички корак у биосинтези кумарина и 4-хидроксикумарина (Шема 1.28). У даљем процесу, свако једињење има засебни пут за добијање крајњег производа, кумарина, односно 4-хидроксикумарина (Шема 1.28).

Приликом биосинтезе кумарина, кључни кораци су изомеризација *trans-o*-кумаринске киселине, при чему настаје *cis*-изомер, те лактонизација која резултује формирањем кумаринског језгра (Шема 1.28).

Биосинтеза 4-хидроксикумарина у биљкама одвија се на неколико начина (Шема 1.28). Тако, *trans-o*-кумаринска киселина може се директно активирати уз помоћ ацетил коензима А и превести у *trans-o*-кумароил (главни пут), или посредно, преко мелилотске киселине спровођењем најпре редукције праћене оксидацијом у присуству NADH (споредни пут). Добијени производ, *trans-o*-кумароил коензим А, подлеже оксидацији у присуству *trans-o*-кумароил коензим А хидроксилазе и 3-хидроксимелиотоил коензим А дехидрогеназе где настаје 3-оксо-мелиотоил-КоА. Даљом енолизацијом и интрамолекулском лактонизацијом издваја се крајњи производ, 4-хидроксикумарин.

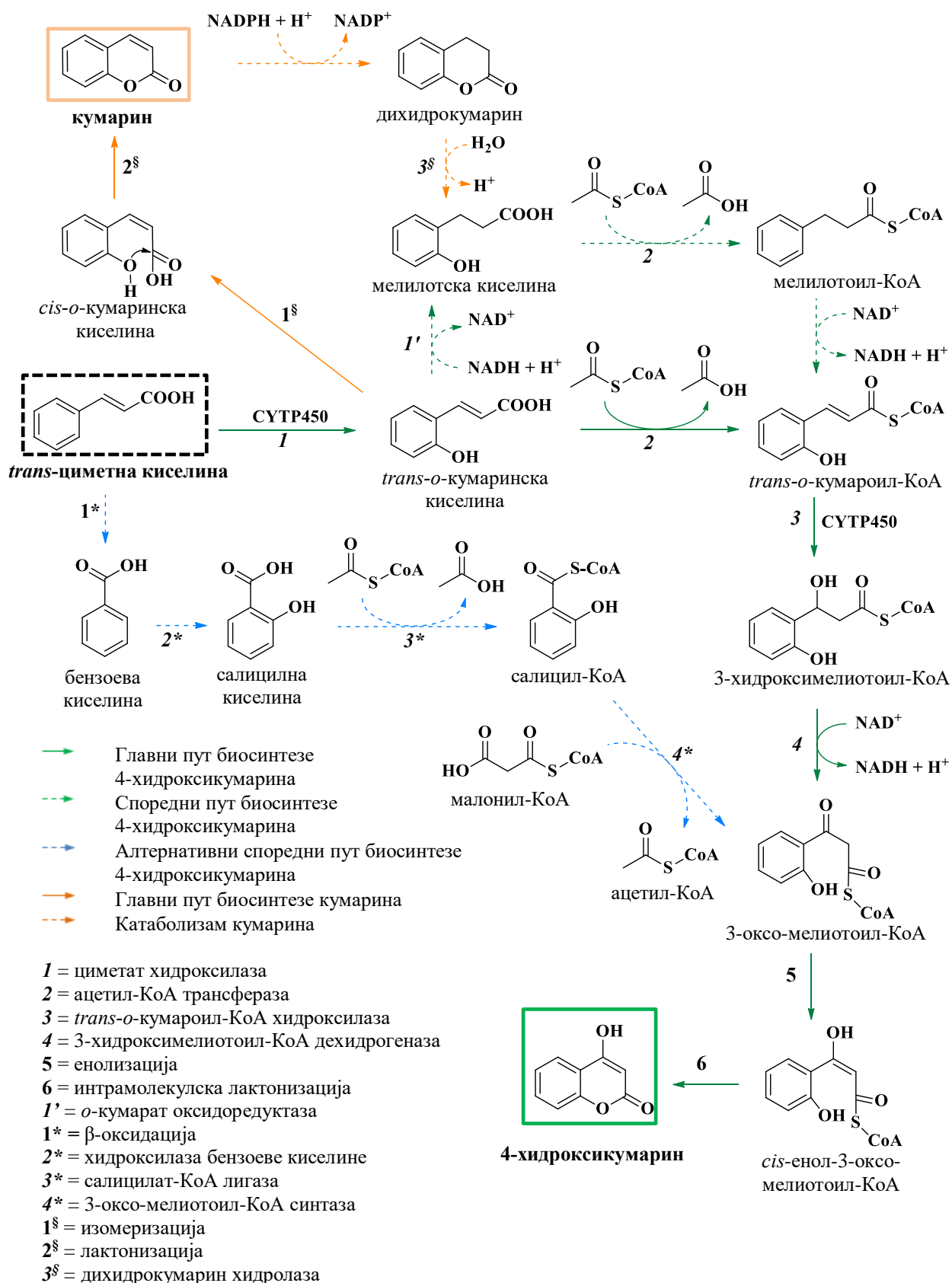
Споредни пут биосинтезе обухвата редукцију кумарина у присуству NADPH, а потом и увођење хидроксилне групе у *o*-положају. Добијени производ је мелилотска киселина, која се у главни пут биосинтезе укључује преко *trans-o*-кумароил коензима А. Стога се мелилотска киселина активира у присуству ацетил коензим А трансферазе, која олакшава пренос једног молекула ацетил коензима А на мелилотску киселину. Следећи корак је оксидација мелилотоил коензима А у присуству NAD⁺-а што води настанку *trans*-изомера *o*-кумароил коензима А.

Алтернативни пут биосинтезе одвија се преко *trans*-циметне киселине која може подлећи β-оксидацији, а затим и хидроксилацији што доводи до формирања салицилне киселине. Награђена киселина се активира ацетил коензимом А, а након тога и малонил коензимом А у циљу продужења бочног ланца и синтезе 3-оксо-мелиотоил коензима А. Награђени производ потом подлеже реакцијама енолизације и лактонизације молекула на потпуно исти начин као и код главног и споредног пута биосинтезе.



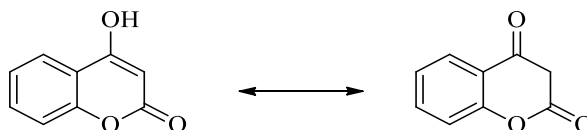
- | | |
|--|---|
| 1 = фотосинтеза | 8 = шикимат-киназа |
| 2 = гликолиза | 9 = 5-енолпирувилшикимат-5-фосфат-синтаза |
| 3 = пентозо-фосфатни шант | 10 = хоризмат-синтаза |
| 4 = фосфо-2-кето-деоксихептонат-алдолаза | 11 = хоризмат-мутаза |
| 5 = 5-дехидрокинат-синтаза | 12 = префенат-дехидратаза |
| 6 = 5-дехидрокинат-дехидратаза | 13 = трансминаза |
| 7 = шикимат-дехидрогеназа | 14 = аминијачна лијаза |

Шема 1.27. Биосинтеза *trans*-циметне киселине из угљен-диоксида и глюкозе.



Шема 1.28. Биосинтеза кумарина и 4-хидроксикумарина из *trans*-циметне киселине.

Прекурсори хроман-2,4-диона, 4-хидроксикумарини се кето-енолном таутомеризацијом хидроксилне групе на положају 4 лако преводе у хроман-2,4-дионе (Шема 1.29).

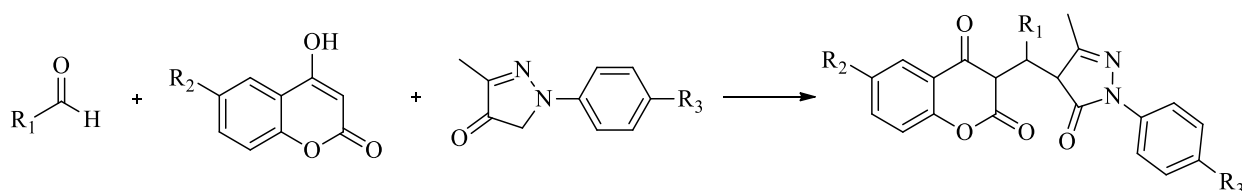


Шема 1.29. Кето-енолна таутомерија 4-хидроксикумарина.

1.2.1. ХЕМИЈСКА СИНТЕЗА И АКТИВНОСТИ ХРОМАН-2,4-ДИОНА

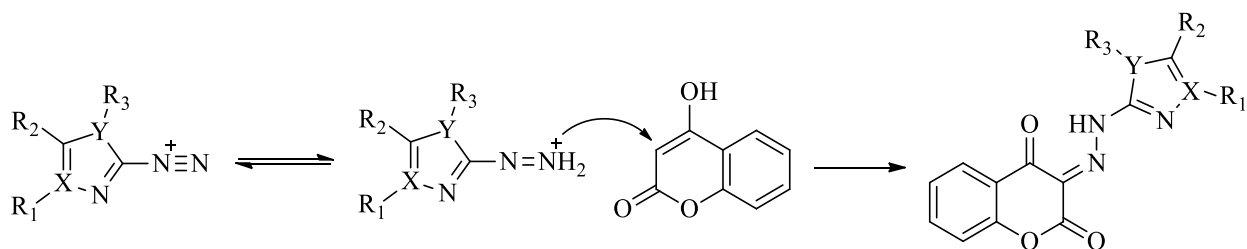
Хроман-2,4-диони до сада нису испитивани као антикоагуланти, па у литератури нема забележених реакција њихове синтезе у том смислу. Међутим, деривати хроман-2,4-диона испољавају антиканцерогене и антибактеријске особине и понашају се као као инхибитори ацетилхолинестеразе и моноамино оксидазе В.

Антиканцерогени агенси, 3-супституисани деривати хроман-2,4-диона, могу се синтетисати у ултразвучном купатилу из ароматичних алдехида, 4-хидроксикумарина и деривата пиразолоне (Шема 1.30).⁶⁹



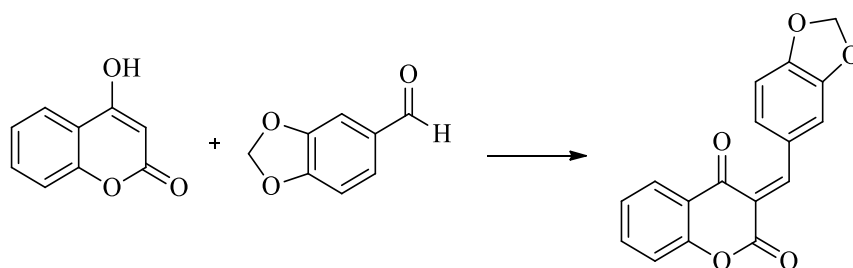
Шема 1.30. Општи приказ хемијске синтезе 3-супституисаних деривата хроман-2,4-диона. R_1 може бити група са супституисаним бензеновим прстеном или фураном, R_2 могу бити атоми H, Cl и F, а R_3 атоми H, Cl, F и метил група.

Такође, 3-супституисани хидразинилиденски деривати хроман-2,4-диона испољавају антиканцерогену активност. Синтетишу се тако што се 4-хидроксикумарини растворени у 10%-тном раствору NaOH третирају солима хетероцикличних амина (Шема 1.31).⁷⁰



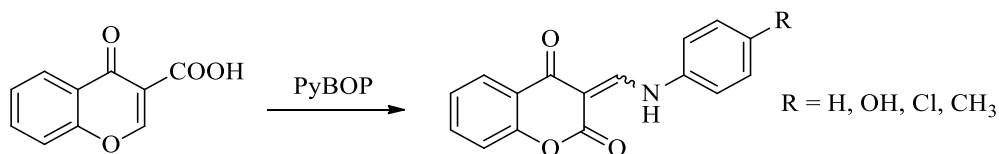
Шема 1.31. Синтеза хидразинилиденских деривата хроман-2,4-диона. Супституенти могу бити следеће групе: R₁- H, CH₃; R₂- H, CH₃, *tert*-Bu, Br; R₃- H, X- N, O, C; Y- NH, C, S.

Антибактеријски агенси, 3-арилиден хромен-2,4-дионски деривати, синтетишу се тако што се 4-хидроксикумарин кондензује са ароматичним алдехидима (пропионал) и рефлукује 1,5 h у врућем етанолу уз додатак неколико капи пиперидина (Шема 1.32).⁷¹



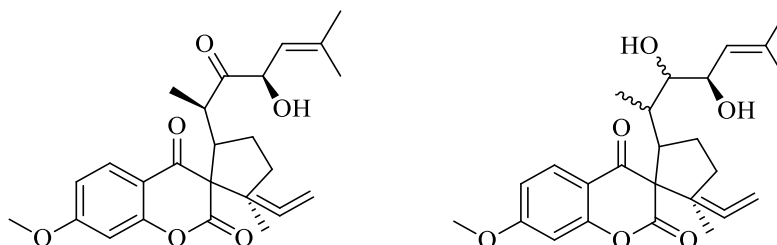
Шема 1.32. Синтеза хроман-2,4-дионских деривата из 4-хидроксикумарина и ароматичних алдехида.

Инхибитори моноамино оксидазе В са хроман-2,4-дионским језгром се могу синтетисати из хромон-3-карбоксилне киселине и фосфонијумове соли (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфонијум хексафлуорофосфата (енг. (benzotriazol-1-yl)oxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate, PyBOP).⁷²



Шема 1.33. Синтеза деривата хроман-2,4-диона из хромон-3-карбоксилне киселине и фосфонијумове соли PyBOP.

Деривати хроман-2,4-диона, изоловани из смоле биљне врсте *Dorema ammoniacum* D, показали су се као добри инхибитори ацетилхолинестеразе (Шема 1.34).⁷³

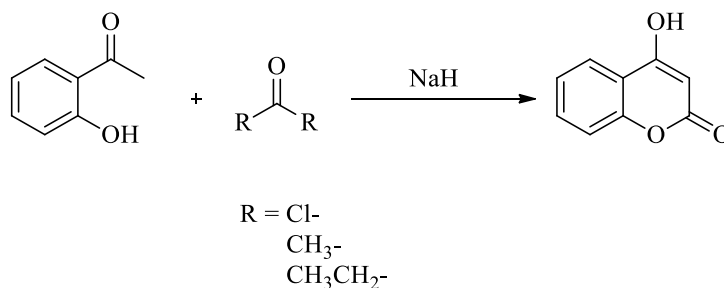


Шема 1.34. Хроман-2,4-дионски деривати као инхибитори ацетилхолинестеразе.

1.2.2. ХЕМИЈСКА СИНТЕЗА 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА

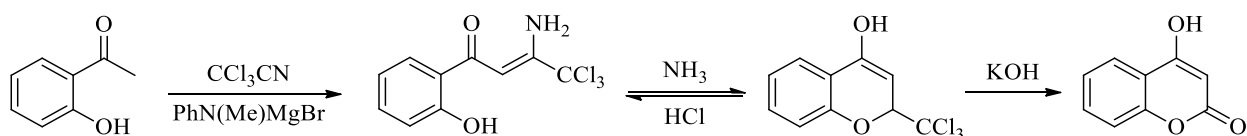
Како се хемијска синтеза хроман-2,4-диона углавном заснива на 4-хидроксикумаринима као полазним супстанцама, тако ће у тексту бити описани и поступци њихове синтезе. У литератури је забележен велики број метода по којима су синтетисани 4-хидроксикумарини.⁷⁴ Експерименти се углавном заснивају на хидроксиацетофенону или фенолу као полазним једињењима за даљу синтезу.

ПРИМЕНА 2-ХИДРОКСИАЦЕТОФЕНОНА У СИНТЕЗИ 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА. 2-хидроксиацетофенон може се третирати ацилујућим агенсима попут фосгена, диметилкарбоната или диетилкарбоната у присуству стехиометријске количине натријум хидрида у анхидрованом толуену или ксилену (Шема 1.35).



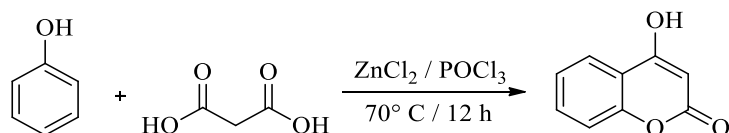
Шема 1.35. Синтеза 4-хидроксикумарина помоћу 2-хидроксиацетофенона и ацилирајућих агенаса.

Поред тога, 2-хидроксиацетофенон може се кондензовати са трихлороацетонитрилом у присуству *N*-метиланилиномагнезијум бромида при чему настаје (*Z*)-3-амино-4,4,4-трихлоро-1-(2-хидроксифенил)бут-2-ен-1-он, који се након третмана концентрованом хлороводоничном киселином конвертује у 2-(трихлорометил)хромон. Базно катализованом хидролизом добијеног једињења формира се 4-хидроксикумарин (Шема 1.36).



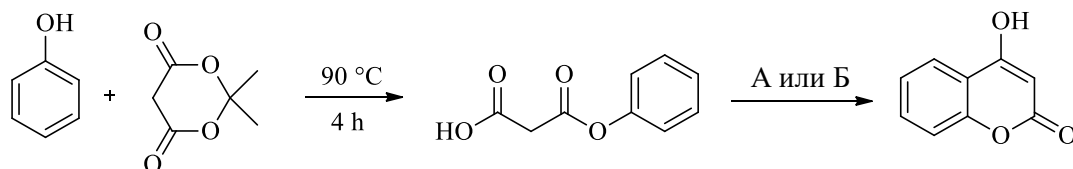
Шема 1.36. Синтеза 4-хидроксикумарина кондензацијом 2-хидроксиацетофенона и трихлороацетонитрила.

ПРИМЕНА ФЕНОЛА У СИНТЕЗИ 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА. Реакција се заснива на загревању фенола са малонском киселином у фосфор оксихлориду са дупло већом количином анхидрованог цинк хлорида (Шема 1.37).



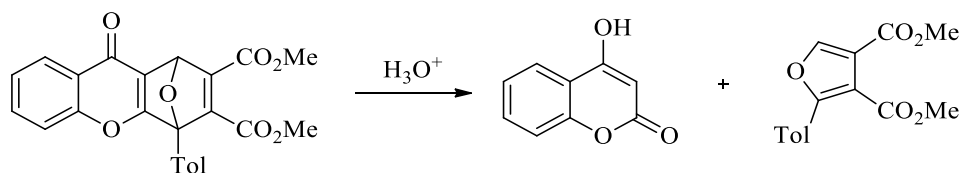
Шема 1.37. Синтеза 4-хидроксикумарина помоћу фенола и малонске киселине.

Фенол се може третирати и Мелдрумовом киселином у систему без присуства растварача на температури од 90°C, при чему се најпре формира 3-оксо-3-феноксипропионска киселина, а затим третманом Eaton-овим реагенсом или полифосфорном киселином настаје 4-хидроксикумарин (Шема 1.38).



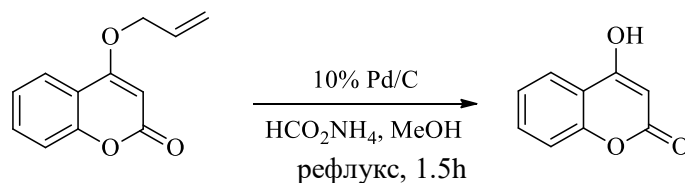
Шема 1.38. Приказ синтезе 4-хидроксикумарина деловањем Мелдрумове киселине на фенол. А: Eaton-ов реагенс, 70°C, 1 h; Б: 116% раствор полифосфорне киселине, 120°C, 15 h.

СИНТЕЗА 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА ХИДРОЛИТИЧКОМ РЕТРО DIELS-ALDER-ОВОМ РЕАКЦИЈОМ. Daia и сарадници пронашли су нов начин за синтезу 4-хидроксикумарина, кисело-катализованом хидролитичком Diels-Alder-овом реакцијом 7-оксабицикло [2.2.1]хептадиена, а као споредни производи добијају деривати фурана (Шема 1.39).



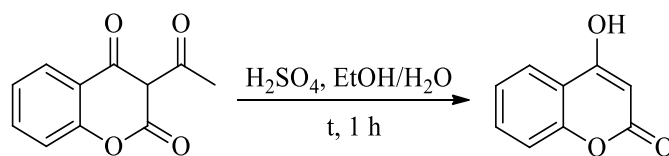
Шема 1.39. Синтеза 4-хидроксикумарина кисело-катализованом хидролитичком Diels-Alder-овом реакцијом.

ПРИМЕНА РЕАКЦИЈЕ РАСКИДАЊА 4-АЛИЛ КУМАРИНИЛ ЕТРА ЗА СИНТЕЗУ 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА. Ganguly је са сарадницима описао методу којом се 4-хидроксикумарини могу синтетисати из алил кумаринил етра, у присуству каталитичких количина паладијума на активном угљу у метанолу, и у комбинацији са амонијум молибдатом (Шема 1.40).



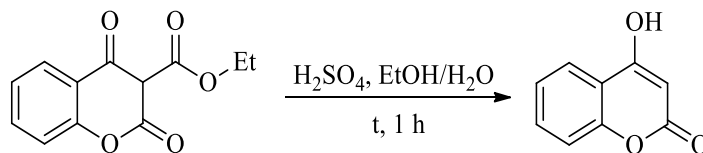
Шема 1.40. Синтеза 4-хидроксикумарина из алил кумаринил етра.

ДЕАЦЕТИЛОВАЊЕ 3-АЦЕТИЛ-4-ХИДРОКСИКУМАРИНА. 3-ацетил-4-хидроксикумарини могу бити подвргнути кисело катализованој реакцији деацетиловања и да се притом награди 4-хидроксикумарин у веома високом приносу (90%) (Шема 1.61).



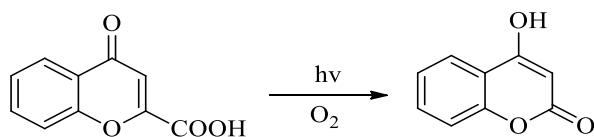
Шема 1.41. Примена реакције деацетиловања у синтези 4-хидроксикумарина.

ДОБИЈАЊЕ 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА ХИДРОЛИЗОМ И ДЕКАРБОКСИЛАЦИЈОМ 3-КАРБЕТОКСИ-4-ХИДРОКСИКУМАРИНА. На сличан начин, применом кисело катализоване хидролизе и декарбоксилације на 3-карбетокси-4-хидроксикумарину, се може добити 4-хидроксикумаринско језгро (Шема 1.42).



Шема 1.42. Примена кисело катализоване хидролизе и декарбоксилације у синтези 4-хидроксикумарина.

ФОТООКСИГЕНАЦИЈА ХРОМОН-2-КАРБОКСИЛНЕ КИСЕЛИНЕ. Још један једноставан начин да се синтетише 4-хидроксикумарин приказали су Kawata и сарадници. Реакција се заснива на фотооксигенацији хромон-2-карбоксилне киселине у етанолском раствору и праћена је декарбоксилацијом и адицијом молекула кисеоника (Шема 1.43).



Шема 1.43. Синтеза 4-хидроксикумарина применом реакције фотооксигенације.

Уводни део рукописа предочио је најзначајније сегменте коагулационе каскаде и механизме антикоагулативне активности антагониста витамина К. Надовезујући се на биосинтетски и експериментални приступ, поглавља Експериментални део и Резултати и дискусија употпуњују научна сазнања о синтези хромон-2,4-диона и 4-хидроксикумарина као антагониста витамина К, те дају свој допринос у разумевању фармакологије антагонизма коагулационе каскаде.

2

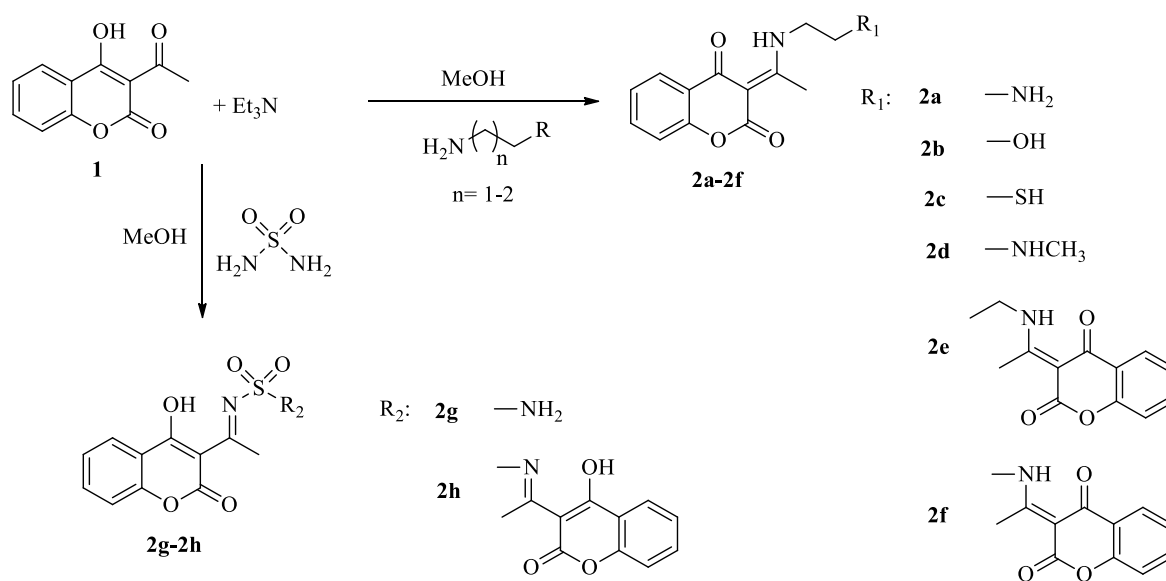
ЕКСПЕ

РИММЕНТАЛНИ
ДЕО

ЛНИ

2.1. ПРОТОКОЛИ СИНТЕЗЕ ДЕРИВАТА 2a-h

Синтеза нових деривата хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина, структурних аналога хинонских форми витамина К и потенцијалних конкуритивних антагониста витамин К 2,3-епоксид редуктазе субјединице 1 (VKORC1), извршена је применом конвенционалних експерименталних протокола (деривати **2a-f**), односно протокола који су подразумевали одвијање реакција у медијуму микроталасног зрачења (**2g-h**) (Шема 2.1).⁷⁵



Шема 2.1. Преглед општег поступка хемијске синтезе деривата **2a-h**.

Помоћу конвенционалне методе извршена је синтеза деривата 3-(1-аминоетилиден)хроман-2,4-диона, **2a-f**. Синтеза је извршена у базној средини, услед присуства триетиламина Et₃N, кондензацијом полазног једињења 3-ацетил-4-хидроксикумарина (1) са одговарајућим аминима (Шема 2.1). Сви кондензати добијени су у високом приносу. Реакцијом између еквимоларних количина реактанта добијени су деривати **2a-d** са једним хроман-2,4-хинонским прстеном. Мора се напоменути да синтеза деривата **2b** није извршена први пут за потребе израде ове докторске дисертације. Оригинални поступак синтезе овог једињења допринео је дефинисању његове кристалне структуре и приносу једињења од 76%.^{76,77} Процедуром која је предочена принос једињења **2b** значајно је повећан до чак 97%, чиме је оправдана публикација нове синтетичке процедуре. Додатком двоструке количине Et₃N извршена

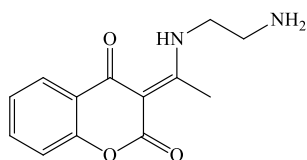
је кондензација два хроман-2,4-хинонска језгра преко одговарајућих аминских мостова и извршена синтеза деривата **2e** и **2f**. Основна предност конвенционалне синтетичке методе јесте добијање високих приноса и једноставност процедуре којом се у једном кораку добијају једињења структурно слична витамин К 2,3-епоксиду.

Реакцијом у атмосфери микроталасног зрачења и присуству сулфамида, синтетисани су деривати 4-хидрокси-хромен-2*H*-она, **2g** и **2h** (Шема 2.1). Додатком еквимоларних количина реагенаса, формиран је моносупституисани сулфамидни дериват **2g**, док је додавање два еквивалента сулфамида резултовало синтезом кондензата **2h**, који у својој структури садржи два молекула 4-хидроксикумарина повезани сулфамидним мостом. Добијање нових деривата 4-хидроксикумарина, структурно различитих од хроман-2,4-диона, не представља недостатак коришћених експерименталних протокола, већ на изванредан начин и предност. Наиме, у наведеним реакционим условима *in situ* су добијени деривати који *in vivo* могу лако подлећи реакцији таутомеризације и постати компетитивни антагонисти хинонских форми витамина К.⁴⁹

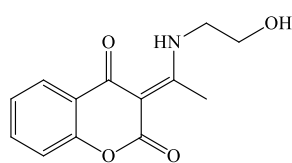
Сви реагенси и растварачи који су коришћени за синтезу били су аналитичке чистоће и директно су аплицирани. Тачке топљења синтетисаних деривата мерене су на Kofler hot-stage уређају (C. Reicher, Vienna, Austria) и приказане су без корекције. Реакције у микроталасној атмосфери извођене су на MICROSYNTH микроталасном синтетичком систему, произвођача Milestone Inc. 25 Controls Dr. Shelton, CT 06484, САД. Микроталаси су добијени применом магнетрона, при фреквенцији од 2450 MHz, са излазном енергијом у опсегу од 100 до 500 W. Чистоћа синтетисаних деривата је проверена рутинском TLC анализом на Merck Kieselgel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ и Merck Kieselgel G плочицама. Мрље су визуелизоване постављањем плочица у каду засићену парама јода. Чистоћа деривата додатно је проверена гасно-масеном хроматографијом. Микроанализе угљеника, водоника, азота и сумпора извршене су на уређају Carlo Erba 1106 (Carlo Erba, Милано, Италија). IR спектри (Прилог 1) снимани су на Perkin–Elmer спектрофотометрима, моделима 137 и 337, у cm⁻¹ јединицама (Perkin Elmer, Beaconsfield, УК). NMR спектри су снимани на Varian Gemini 200 спектрофотометру (¹H на 200 MHz; ¹³C на 50 MHz; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) у растварачу DMSO-у и TMS-у (SiMe₄), као интернационалном стандарду. Хемијска померања приказана су у ppm јединицама (скраћенице: s-синглет, d-дублет, t-триплет, q-квартет, ABq-AB квартет, m-мултиплет). Гасно-масене анализе изведене су на Agilent 6890N/5975B гасном хроматограму.

2.1.1. ОПШТА ПРОЦЕДУРА ЗА ПРИПРЕМУ ДЕРИВАТА 2a-h

2.1.1.1. КОНВЕНЦИОНАЛНА СИНТЕЗА ДЕРИВАТА 2a-f

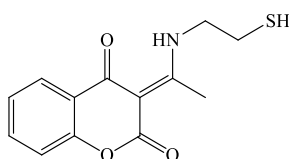


Синтеза (E)-3-(1-(2-аминоетиламино)етилиден)хроман-2,4-диона (2a). Смеси етилендиамин хидрохлорида (0,326 g, 2,45 mmol) и Et₃N (0,248 g, 2,45 mmol) претходно раствореној у 50 mL метанола постепено је додаван 3-ацетил-4-хидроксикумарин (1) (0,5 g, 2,45 mmol). Синтеза 3-ацетил-4-хидроксикумарина претходно је описана другде.⁷⁸ Реакциони раствор мешан је магнетном мешалицом 30 минута на собној температури. По завршетку реакције, реакциона смеша је упарена под сниженим притиском на трећину запремине. Након концентровања раствора дошло је до издвајања талоба на дну реакционог балона. Сталожено једињење **2a** профилирано је и прекристалисано у метанолу. Добијени су бели кристали у приносу од 94%, т.т. 163,5–164,0°C; IR (KBr, cm⁻¹): ν(OH) 3420, ν(NH) 3250-2100, ν(=CH) 3012, ν(CH) 2920 и 2801, ν(C=O) 1699, ν(C=C)_{ар} 1610, 1571, 1486 и 1466 (Прилог 1, Слика 1); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, δppm): 13,92 (br s 1H, NH), 7,97-7,24 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-H-8), 3,72 (br s, 2H, NH₂), 3,65 (t, 2H, CH₂-C, ³J = 9.4 Hz), 2,79 (t, CH₂, CH₂-C, ³J = 9.4 Hz), 2,77 (s, 3H, CH₃-C) (Прилог 1, Слика 2); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO, δppm): 179.54, 175.89, 162.17, 153.12, 133.96, 125.82, 123.69, 120.51, 116.30, 96.17, 18.89, 49.67, 43.79 (Прилог 1, Слика 3); MS: m/z 246 (M⁺), 247 (M⁺+1), 216, 204, 187, 175, 147, 121, 92, 67. Израчунато за C₁₃H₁₄N₂O₃: C, 63.40; H, 5.73; N, 11.38; нађено: C, 61.56; H, 5.48; N, 11.02.

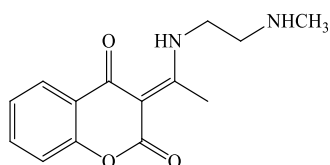


Синтеза (E)-3-(1-(2-хидроксиетиламино)етилиден)хроман-2,4-диона (2b). Смеси 2-аминоетанол (0.149 g, 2.45 mmol) и Et₃N (0,248 g, 2,45 mmol) претходно раствореној у 50 mL метанола, постепено је додаван 3-ацетил-4-хидроксикумарин (1) (0,5 g, 2,45 mmol) и реакциона смеша је рефлугована 2 сата. Растварач је упарен под сниженим притиском на трећину запремине након чега је смеша остављена 24 сата на температури од 5°C. У раствору су се стајањем издвојили бели кристали **2b** који су од раствора одвојени филтрацијом и потом прекристалисани у метанолу. Принос 97%, т.т. 157.2–159.4°C; IR (KBr, cm⁻¹): ν(OH) 3412, ν(=CH) 3050, ν(CH) 2948 и 2894, ν(C=O) 1661, ν(C=C)_{ар} 1615, 1592, 1573 и 1487 (Прилог 1, Слика 4); ¹H NMR (200 MHz,

DMSO-d₆, δppm): 14.62 (br s 1H, NH), 8.05–7.18 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-H-8), 3.99 (t, 2H, CH₂-O, ³J = 8.4 Hz), 3.73 (t, 2H, CH₂-C, ³J = 7.9 Hz), 2.77 (s, 3H, CH₃-C), 2.19 (br s, 1H, OH) (Прилог 1, Слика 5); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO, δppm): 181.3, 177.05, 153.72, 152.21, 133.79, 126.04, 123.55, 120.63, 116.57, 97.38, 60.53, 46.18, 29.67 (Прилог 1, Слика 6); MS: m/z 281 (M⁺), 247, 216, 204, 187, 175, 147, 121, 92, 67. Израчунато за C₁₃H₁₃NO₄: C, 63.15; H, 5.30; N, 5.67; нађено: C, 62.78; H, 5.10; N, 5.87.

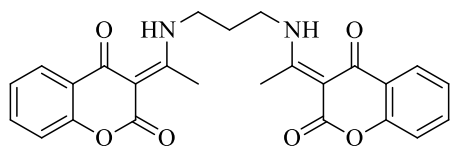


Синтеза (E)-3-(1-(2-маркаптоетиламино)етилиден)хроман-2,4-диона (2c). Смеси 2-меркаптоетаноламин хидрохлорида (0,189 g, 2,45 mmol) и Et₃N (0,248 g, 2,45 mmol) претходно раствореној у 50 mL метанола, постепено је додаван 3-ацетил-4-хидроксикумарин (1) (0,5 g, 2,45 mmol) и реакциона смеша је рефлугована 2 сата. Након 30 минута од почетка рефлугована примећено је формирање белог талога. Растварач је упарен под сниженим притиском на трећину запремине након чега је смеша остављена 24 сата на температури од 5°C. У раствору су се стајањем издвојили бели кристали **2c** који су од раствора одвојени филтрацијом и потом прекристалисани у метанолу. Принос 86%, т.т. 172–174°C; IR (KBr, cm⁻¹): ν_(NH) 3414, ν_(=CH) 3051 и 3015, ν_(CH) 2973 и 2782, ν_(=SH) 2530, ν_(C=O) 1688, ν_{(C=C)_{ар}} 1607, 1573 и 1483 (Прилог 1, Слика 7); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 14.53 (br s 1H, NH), 8.07–7.14 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-H-8), 3.74 (m, 2H, CH₂-C, ³J = 8.1 Hz) 2.85 (m, 2H, CH₂-C), 2.78 (s, 3H, CH₃-C), 1.67 (br s, 1H, SH) (Прилог 1, Слика 8); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO, δ ppm): 181.64, 176.77, 153.73, 153.71, 133.9, 126.08, 123.58, 120.40, 116.56, 97.43, 42.76, 36.79, 23.83 (Прилог 1, Слика 9); MS: m/z 265 (M⁺²), 263 (M⁺¹), 248, 230, 216, 204, 203, 187, 175, 147, 121, 92, 67. Израчунато за C₁₃H₁₃NO₃S: C, 59.30; H, 4.98; N, 5.32; нађено: C, 59.21; H, 5.07; N, 5.35.



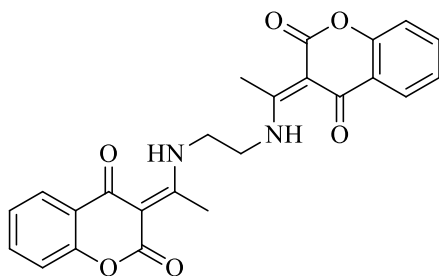
Синтеза (E)-3-(1-(2-(метиламино)етиламино)етилиден)хроман-2,4-диона (2d). Конвекционална процедура је минимално коригована приликом синтезе деривата **2d**. Почетни реагенс 3-ацетил-4-хидроксикумарин (1) (0,5 g, 2,45 mmol) је најпре растворен у 25 mL претходно загрејаног раствора метанола. Раствор је потом охлађен до собне температуре, након чега је додато 10 mL раствора N'-метилетан-1,2-диамина (0,182 g, 2,45 mmol), претходно раствореног у хладном метанолу. Смеша је рефлугована 10 минута све док се почетна боја кумарина није

изгубила. Растварач је упарен под сниженим притиском на трећину запремине након чега је смеша остављена 24 сата на температури од 5°C. У раствору су се стајањем издвојили жути кристали **2d** који су одвојени филтрацијом и потом прекристалисани у метанолу. Принос 82%, т.т. 180–182°C; IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{(\text{NH})}$ 3412 и 3308, $\nu_{(\text{=CH})}$ 3051 и 3017, $\nu_{(\text{CH})}$ 2924 и 2851, $\nu_{(\text{C=O})}$ 1694, $\nu_{(\text{C=C})_{\text{ар}}}$ 1612, 1571, 1487 (Прилог 1, Слика 10); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 13.79 (br s 1H, NH), 7.95–7.25 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-H-8), 4.02 (br s, 1H, NH-CH₃) 3.04 (s, 3H, CH₃-N) 2.97 (t, 2H, CH₂-C, ³J = 8.9 Hz), 2.69 (t, 2H, CH₂-C, ³J = 8.9 Hz), 2.71 (s, 3H, CH₃-C), 1.67 (br s, 1H, SH) (Прилог 1, Слика 11); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO, δ ppm): 178.26, 175.92, 162.17, 153.13, 133.96, 125.82, 123.69, 120.51, 116.30, 96.17, 51.92, 42.9, 39.5, 23.12 (Прилог 1, Слика 12); MS: m/z 260 (M⁺), 218, 217, 202, 187, 176, 172, 147, 121, 92, 67. Израчунато за C₁₄H₁₆N₂O₃: C, 64.60; H, 6.20; N, 10.76; нађено: C, 64.66; H, 6.11; N, 11.16.



Синтеза (3E,3'E)-3,3'-(1,1'-(пропан-1,3-диилбис (азанедирил))бис(етан-1-ил-илиден))дихроман-2,4-диона (2e). Смеси 1,3-диаминопропан хидрохлорида (0,182 g, 2,45 mmol) и Et₃N (0,496 g, 4,50

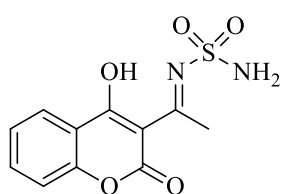
mmol) претходно раствореној у 50 mL метанола, постепено је додаван 3-ацетил-4-хидроксикумарин (0,5 g, 2,45 mmol). Реакциона смеша рефлугована је 30 минута. Добијени су бели кристали **2e** који су одвојени филтрацијом и потом прекристалисани у метанолу. Принос 41%, т.т.: 243–246°C; IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{(\text{OH})}$ 3420, $\nu_{(\text{NH})}$ 3139, $\nu_{(\text{=CH})}$ 3049, $\nu_{(\text{CH})}$ 2922 и 2852, $\nu_{(\text{C=O})}$ 1698, $\nu_{(\text{C=C})_{\text{ар}}}$ 1609, 1571 и 1486, $\nu_{(\text{C=C})}$ 1466 (Прилог 1, Слика 13); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 11.08 (br s, 1H, NH), 8.28–7.48 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-H-8), 3.23 (t, 2H, CH₂-C, ³J_{HH} = 9.4 Hz), 3.08 (t, CH₂, CH₂-C, ³J_{HH} = 9.4 Hz), 1.51 (s, 3H, CH₃-C) (Прилог 1, Слика 14); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO, δ ppm): 183.06, 176.82, 163.60, 154.23, 133.60, 126.26, 124.56, 121.72, 118.40, 100.30, 41.24, 28.55, 18.26 (Прилог 1, Слика 15); MS: m/z 446 (M⁺), 447 (M⁺+1), 448 (M⁺+2); Израчунато за C₂₅H₂₂N₂O₆: C, 67.26; H, 4.97; N, 6.27; нађено: C, 67.56; H, 4.33; N, 6.97.}}



Синтеза (3E,3'E)-3,3'-(1,1'-(етан-1,2-диилбис (азанедиил))бис(етан-1-ил-1-илиден))дихроман-2,4 диона (**2f**). Смеси етилендиамин хидрохлорида (0.326 g, 2.45 mmol) и Et₃N (0.496 g, 4.50 mmol) претходно раствороној у 50 mL метанола, постепено је додаван 3-ацетил-4-хидрокси-

кумарин (0,5 g, 2,45 mmol). Реакциона смеша рефлуктована је 30 минута. Добијени су бели кристали **2f** који су одвојени филтрацијом и потом прекристалисани у метанолу. Принос 47%, т.т. 238–241°C; IR (KBr, cm⁻¹): ν(OH) 3414, ν(NH) 3133, ν(=CH) 3050 и 3015, ν(CH) 2922 и 2869, ν(C=O) 1708, ν(C=C)_{ар} 1608, 1572, 1485, ν(C=C) 1467 (Прилог 1, Слика 16); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆ δ ppm): 11.08 (br s, 1H, NH), 8.21–7.39 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-H-8), 3.27 (m, 2H, CH₂-C, ³J_{NH} = 9.4 Hz), 3.11 (s, 3H, CH₃-C) (Прилог 1, Слика 17); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO, δ ppm): 183.06, 175.82, 163.60, 154.23, 133.60, 126.26, 124.56, 121.72, 118.40, 100.30, 43.99, 18.26 (Прилог 1, Слика 18); MS: m/z 432 (M⁺), 433 (M⁺+1), 434 (M⁺+2); Израчунато за C₂₄H₂₀N₂O₆: C, 66.66; H, 4.66; N, 6.48; нађено: C, 66.87; H, 4.31; N, 6.52.

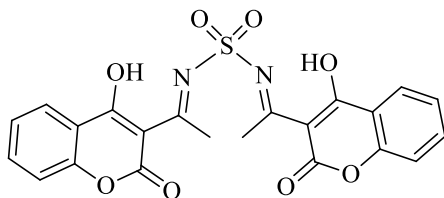
2.1.1.2. СИНТЕЗА ДЕРИВАТА 2g-h У МЕДИЈУМУ МИКРОТАЛАСНОГ ЗРАЧЕЊА



Синтеза N-[(1E)-1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етили ден]аминосулфонамида (**2g**). Почетном реагенсу 3-ацетил-4-хидроксихромен-2-ону (1) (0,5 g, 2,45 mmol) раствореном у 50 mL метанола додата је еквимоларна количина сулфамида.

Након додатка реагенса смеша је загревана 10 минута у медијуму микроталасног зрачења. Након хлађења, растварач је уклоњен под вакумом, добијени жути кристали **2g** процеђени су и прекристалисани у метанолу. Принос: 76%, т.т. 189–191°C; IR (KBr, cm⁻¹): ν(OH) 3423, ν(NH) 3132, ν(=CH) 3054 и 3018, ν(CH) 2928, 2856, ν(C=O) 1699, 1674, ν(C=C)_{ар} 1611, 1579 и 1484, ν(C=C) 1466, 1386, 1131, 698 (Прилог 1, Слика 19); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆ δ ppm): 13.86 (br s, 1H, OH), 7.87–6.96 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-H-8), 4.32 (br s, 2H, S-NH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃-C) (Прилог 1, Слика 20); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO, δ ppm): 174.68, 173.42, 161.64, 153.37, 132.23, 124.69, 123.84, 116.46, 115.77, 100.65, 17.86 (Прилог 1, Слика 21); MS: m/z 282 (M⁺), 283 (M⁺+1), 284 (M⁺+2);

Израчунато за $C_{11}H_{10}N_2O_5S$, 46.81; H, 3.57; N, 9.92; S, 11.36; нађено: C, 46.32; H, 3.46; N, 9.94; S, 11.42.



Синтеза 4-хидрокси-3-[(1E)-1-({[(1E)-1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден]сулфамиол}имино)етил]-2H-хромен-2-он (2h). Почетном реагенсу 3-ацетил-4-хидроксихромен-2-ону (1) (0,5 g, 2,45 mmol) претходно раствореном у 50

mL метанола додата су два еквивалента сулфамида. Смеша је загревана 10 минута у медијуму микроталасног зрачења. Након хлађења, растварач је уклоњен под вакуумом и добијени су жути кристали **2h** који су процеђени и прекристалисани у метанолу. Принос: 44%, т.т.: 276–277°C; IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{(OH)}$ 3428, $\nu_{(=CH)}$ 3052 и 3016, $\nu_{(CH)}$ 2929 и 2848, $\nu_{(C=O)}$ 1694, 1678, $\nu_{(C=C)ар}$ 1613, 1574 и 1482, $\nu_{(C=C)}$ 1459, 1382, 1146 (Прилог 1, Слика 22); 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 δ ppm): 14.48 (br s, 1H, OH), 7.73–6.96 (m, 4H, C-H-5, C-H-6, C-H-7, C-A-H-8), 2.97 (s, 3H, CH_3 -C) (Прилог 1, Слика 23); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO, δ ppm): 175.90, 173.42, 161.64, 153.37, 132.23, 124.69, 123.84, 115.77, 116.46, 100.65, 17.86 (Прилог 1, Слика 24); MS: m/z 452 (M^+), 453 (M^++1), 454 (M^++2); Израчунато за $C_{23}H_{20}N_2O_6S$: C, 61.05; H, 4.46; N, 6.19; S, 7.05; нађено: C, 61.32; H, 4.39; N, 6.17; S, 6.99.

2.2. ПРОТОКОЛИ *IN VITRO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ПРОЦЕНЕ МОГУЋНОСТИ ИЗАЗИВАЊА УНУТРАШЊЕГ КРВАРЕЊА ДЕРИВАТА 2a-h

2.2.1. ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН

Иницијални експеримент којим је одређен афинитет везивања деривата **2a-h** за серумски албумин изведен је у циљу процене безбедности апликације нових антикоагуланата пре саме апликације *in vivo*. Наиме, на основу добијених вредности константи асоцијације (K_A), константи дисоцијације (K_d) или броја везивних места (n) могуће је дефинисати да ли ће тестирани деривати изазвати унутрашње крварење након интраперитонеалне или оралне апликације на модел организму. Највећа забринутост када се развија нови антикоагулант, нарочито кумаринског или хроманског типа, јесте да ли ће активност бити праћена нежељеним ефектима попут изазивања унутрашњег крварења. Тако, са порастом константе асоцијације смањује се слободна концентрација антикоагуланта у плазми, чиме се смањује и ризик од унутрашњег крварења узрокованог антикоагулантом.⁷⁹ Са друге стране, ниска вредност константе дисоцијације албумин-антикоагулант комплекса указује на јаче везивање антикоагуланта, на ниску концентрацију слободног антикоагуланта и смањену вероватноћу индукованог унутрашњег крварења.⁷⁹

2.2.1.1. СНИМАЊЕ АПСОРПЦИОНИХ СПЕКТАРА ДЕРИВАТА 2a-h И ОДРЕЂИВАЊЕ ТАЧАКА НУЛТОГ ПРЕЛАЗА И НЕЗАВИСНЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ

Обимне спектрофотометријске студије изведене су не би ли се одредила кинетика везивања испитиваних деривата за албумин.⁸⁰ За потребе експерименталног рада изабран је хумани серумски албумин због високог степена поклапања примарних структура са серумским албумином пацова, односно доступности хуманог серумског албумина као биохемијског реагенса. Примарне структуре серумског албумина *Homo sapiens* (унос: P02768) и *Rattus norvegicus* (унос: P02770) преузете су са UniProtKB базе података и њихово упоређивање извршено је поравнањем секвенци помоћу CLUSTAL W софтвера (Слика 2.1).^{50,81}

```

sp|P02768|ALBU_HUMAN MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOCPF
sp|P02770|ALBU_RAT MKWVTFLLLLFISGSAFSRGVFRREAHKSEIAHRFKDLGEQHFGLVLIIFAQYLVKCPY
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCOKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
sp|P02770|ALBU_RAT EEHVKLVQEVTEFAKTCVADENAENCOKSIHTLFGDKLCAIPKLRDNYGELADCCAKQEP
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN ERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLLKYLIEIARRHPYFYAPELLF
sp|P02770|ALBU_RAT ERNECFLQHKDDNPNLPPFQRPEAEAMCTSFQENPTSLFLGHYLHEVARRHPYFYAPELLF
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN FAKRYKAAFTCCQAAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAV
sp|P02770|ALBU_RAT YAEKYNEVLTCCTESDKAACLTPLKLDVAVKEKALVAAVRQRMKCSSMQRFGERAFKAWAV
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN ARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTCCCHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKPK
sp|P02770|ALBU_RAT ARMSQRFPNAEFAEITKLATDVTKINKCCCHGDLLECADRAELAKYMCENQATISSKPK
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN ECCEKPLLEKSHCAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
sp|P02770|ALBU_RAT ACCDKPVLQKSQLAEIEHDNIPADLPSIAADFVEDKVKNYAEAKDVFLGTFLYEYSR
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN RHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFPKPLVEEPPNLIKQNCLEFE
sp|P02770|ALBU_RAT RHPDYSVLLLRRLAKKYEATLEKCCAEEDPPACYGTVLAEFQPLVEEPPNLIKQNCLEFE
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN QLGEYKFNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCEADYLSVV
sp|P02770|ALBU_RAT KLGEYGFQNAVLRVYTKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEAQRPCVEDYLSAI
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKFEAETFTFHSDICTL
sp|P02770|ALBU_RAT LNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCSGSLVERRPCFSALVDETYVPKFEAETFTFHSDICTL
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN SEKERQIKKQALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAGKIKLV
sp|P02770|ALBU_RAT PDKEKQIKKQALAEVLKHKPKATEDQLKVMGDFAQFVDKCKAADKDNCFATEGNLV
*****

sp|P02768|ALBU_HUMAN AASQAALGL
sp|P02770|ALBU_RAT ARSKEALA-
*****

```

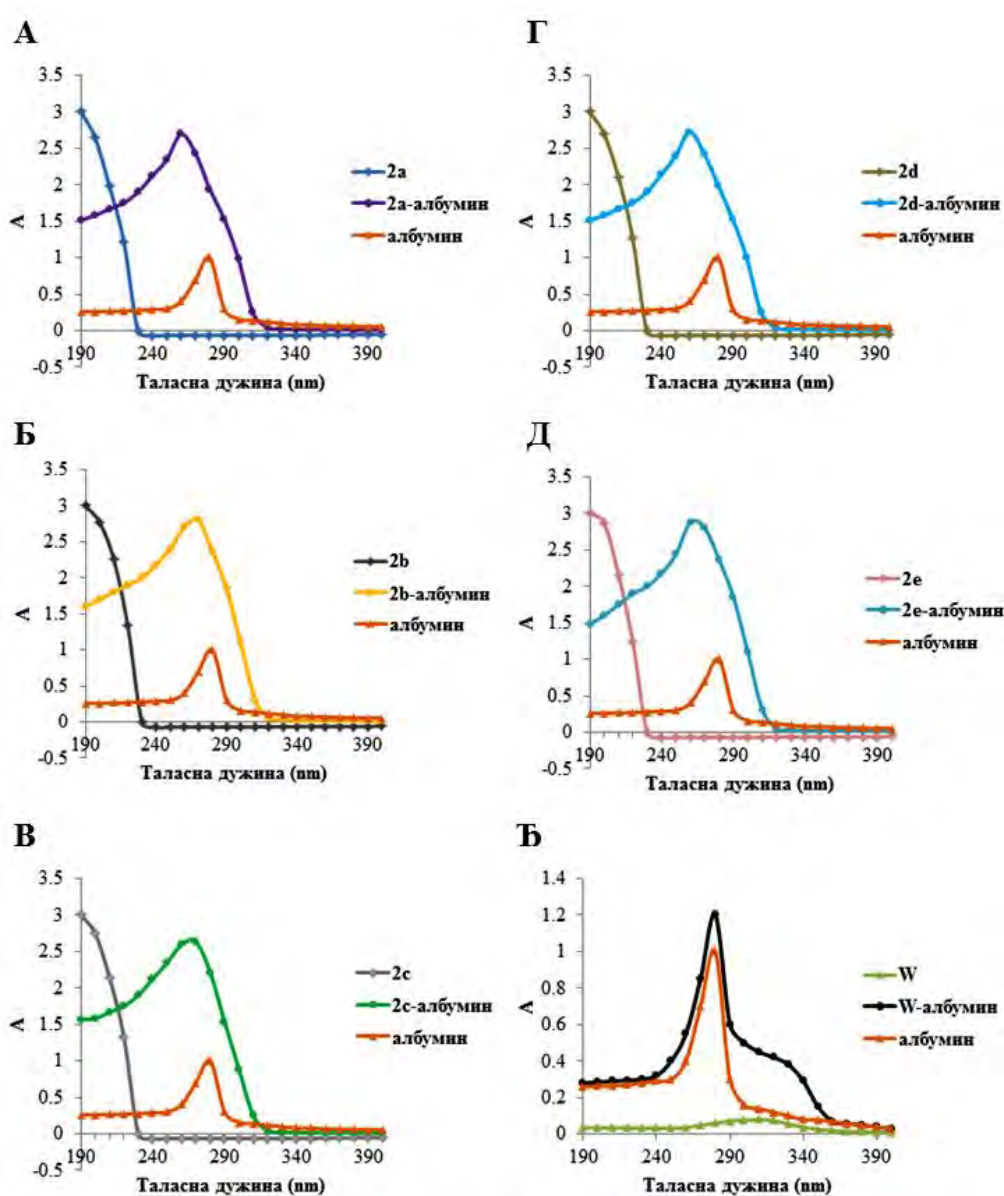
Слика 2.1. Упоредивање секвенци серумског албумина *Homo sapiens* (унос: P02768) и *Rattus norvegicus* (унос: P02770) преузетих са UniProtKB базе података.

Упоредном анализом примарних структура серумског албумина два модел организма, закључено је да проценат идентичности између секвенци износи 73.36% (Слика 2.1), а да идентичност у ПД домену, са којим интеракцију остварује варфарин (енг. warfarin, W) износи 100%. Потврдом хомологије извршена је валидација хуманог транспортног система и оправдано његово коришћење у експерименталним протоколима ове дисертације као супституента за пацовски албумин. Такође, хумани серумски албумин изабран је и због доступности његове кристалне структуре у комплексу са варфарином на Brookhaven Protein Data Bank, која је касније искоришћења за експеримент молекулског доковања у циљу дефинисања биоактивних конформација испитиваних деривата у везивном месту серумског албумина.

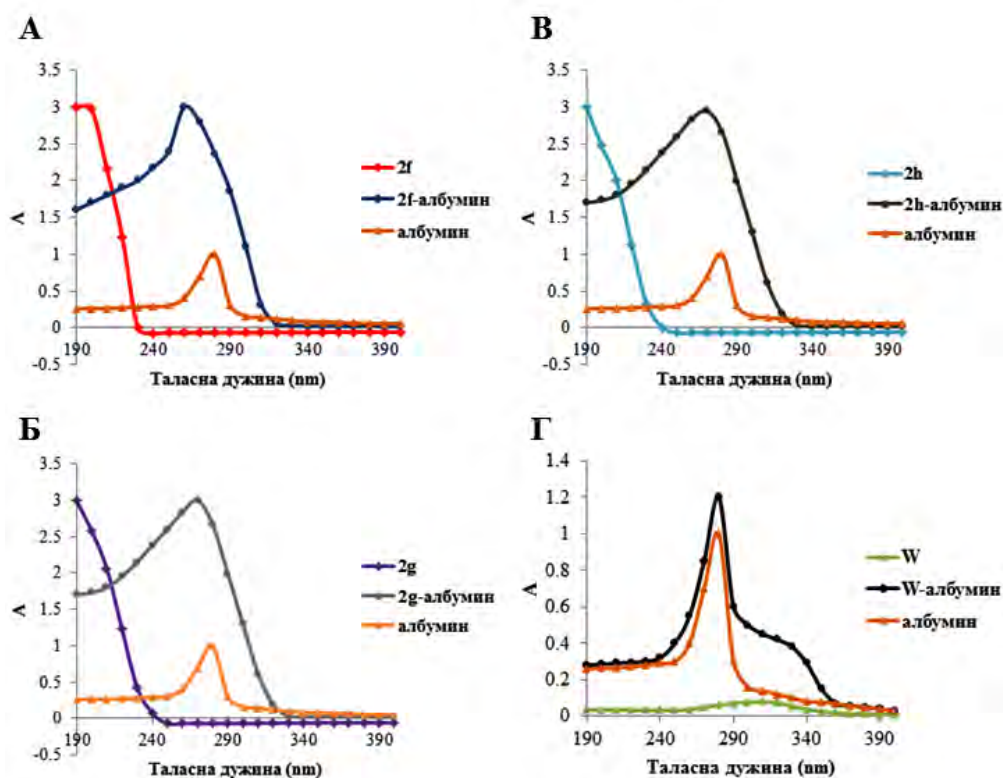
Први поступак у дефинисању кинетике интеракција деривата **2a-h** са хуманим серумским албумином било је одређивање таласне дужине на којој једињења показују максимум апсорпције, обзиром на чињеницу да апсорпциони максимуми синтетисаних деривата до сада нису забележени у литератури. Апсорпциони спектри снимани су на Dynamica HALO DB-20 UV-Vis спектрофотометру, у кварцним киветама ширине 1 cm. Апсорпционе промене бележене су на сваких 20 s на таласним дужинама од 190 до

1100 nm. Спектри чистих једињења **2a-h** забележени су на рН 7,4 разблаживањем одговарајућих фракција у кварцној кивети запремине 3 cm³, да би се добила крајња концентрација од 20 mg/L. Специфицирана концентрација одговара концентрацији од 20 mg/kg телесне тежине као концентрацији планираној за оралну апликацију на одраслим мужјацима пацова соја Wistar.

Пошто је утврђено да деривати не апсорбују на таласним дужинама вишим од 500 nm, експеримент је поновљен скенирањем опсега таласних дужина од 190 до 500 nm. На крају је опсег сужен на област од 190 до 240 nm, јер су пикови апсорпционих максимума забележени у овој области (Слике 2.2 и 2.3).



Слика 2.2. UV-Vis апсорпциони спектри деривата **2a** (А), **2b** (Б), **2c** (В), **2d** (Г), **2e** (Д) и варфарина (Ѕ) растворених у фосфатном пуферу при рН 7,4 у концентрацији 20 mg/L.



Слика 2.3. UV-Vis апсорпциони спектри деривата **2f** (А), **2g** (Б), **2h** (В) и варфарина (Г) растворених у фосфатном пуферу при рН 7,4 у концентрацији 20 mg/L.

Из добијених спектралних података израчунат је други извод, методом по Savitzky–Golay-у, који је даље коришћен за одређивање тачке нултог прелаза λ_{ZCP} (енг. zero-crossing point) чистих деривата **2a-h** (Слике 2.2 и 2.3). Тачка нултог прелаза се дефинише као таласна дужина, независна од концентрације, на којој је први или други извод једнак нули.

Након тога је аликвоту од 1,5 mL сваког деривата концентрације 20 mg/L додата иста запремина раствора албумина у фосфатном пуферу (рН 7,4) концентрације 35 g/L, што одговара нормалној физиолошкој концентрацији албумина, у циљу одређивања тачке независне концентрације λ_{CICP} (енг. concentration-invariant crossing point). Тачка независне концентрације представља таласну дужину која је независна од промене концентрације, на којој максимално апсорбује настали комплекс испитиваних једињења и албумина, и чији је први или други извод једнак нули. На крају су конструисане калибрационе криве деривата **2a-h** у присуству албумина помоћу тачке независне концентрације. Деривати су комплексирани раствором албумина концентрације 35 g/L у концентрационом опсегу од 40 до 0,5 mg/L дајући линеарну зависност.

2.2.1.2. ОДРЕЂИВАЊЕ ИНТЕНЗИТЕТА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЈЕ ХУМАНОГ СЕРУМСКОГ АЛБУМИНА ПО КОМПЛЕКСИРАЊУ СА ДЕРИВАТИМА 2a-h

Додатне анализе комплекса деривата **2a-h** са албумином спроведене су да би се боље разумела кинетика интеракција између албумина и испитиваних једињења. Обзиром да једињења **2a-h** слабо флуоресцирају при физиолошким рН вредностима,⁸² за потребе извођења експеримента искоришћене су емисионе способности триптофана, аминокиселине укључене у изградњу албумина.⁸⁰

Једињења су растворена у фосфатном пуферу (рН 7,4) и додата раствору албумина, концентрације 35 g/L у фосфатном пуферу (рН 7,4) где је опсег концентрација испитиваних једињења износио 1–40 mg/L. Експеримент је изведен на Cary Eclipse флуоресцентном спектрофотометру (Varian Inc., Victoria, Australia). Добијени резултати у виду броја интерактивних положаја на којима се врши везивање и вредности константе асоцијације након везивања једињења за албумин допринели су разумевању фармакокинетице испитиваних деривата. Комплексирање серумског албумина дериватима **2a-h** испитивано је помоћу Hill-ове и Scatchard-ове теорије. Комплетно извођење једначине (2.1) (Hill-ова анализа) и једначине (2.2) (Scatchard-ова анализа) је описано је у литератури.⁸³ Hill-ова анализа се базира на следећој једначини:

$$\log \theta = n \log K_A + n \log [D] \quad (2.1)$$

где θ представља степен везивања једињења за слободан протеин, n је број везивних места на албумину на којима се одвија комплексирање једињења, док K_A представља константу асоцијације насталог комплекса. Једначина (2.2) описује представља Scatchard-ову анализу, где је B фракционо засићење протеина са једињењем које је комплексирано, а n представља број независних везивних места у протеину.

$$\frac{B}{[D]} = n K_A - K_A B \quad (2.2)$$

Неки лекови попут аспирина могу заменити варфарин у активном центру хуманог серумског албумина ако се вежу за субдомен ПА, те на тај начин умањити ефикасност лечења тромбозе.⁸⁴ Стога је испитиван утицај аспирина на процес комплексирања једињења **2a-h** и варфарина са албумином. За потребе оваквог

експеримента припремљене су смеше испитиваних деривата и аспирина у односу 1:1 и помешане са раствором албумина. Комплексирање је извршено на тај начин што је аликвот од 1 mL раствора албумина (35 g/L) у фосфатном пуферу на рН 7,4 засићен са 1 mL смеше једињење-аспирин, растворене у фосфатном пуферу (рН 7,4), да би се добио концентрациони опсег од 1–40 mg/L.

2.2.1.3. ОДРЕЂИВАЊЕ ПРОЦЕНТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h ПО КОМПЛЕКСИРАЊУ СА ХУМАНИМ СЕРУМСКИМ АЛБУМИНОМ

2.2.1.3.1. ПРИПРЕМА ХУМАНОГ СЕРУМСКОГ АЛБУМИНА, ДЕРИВАТА 2a-h И ВАРФАРИНА ЗА HPLC АНАЛИЗУ

Да би се одредио проценат везивања испитиваних деривата и варфарина за хумани серумски албумин, припремљена је серија стандарних раствора сваког једињења, у осам различитих концентрација.⁸⁵ Тако, аликвоту од 1 mL раствора албумина додато је по 1 mL раствора деривата **2a-h** и варфарина у концентрацијама 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 и 40 mg/L. Након мешања, узорци су пренети у претходно загрејане Amicon Centrifree кертрице за филтрирање. По 10 µL од сваког узорка одпипетирано је за потребе одређивања укупне концентрације једињења (слободног и везаног). Ультрафилтрати слободних једињења добијени су пречишћавањем узорака помоћу Amicon Centrifree филтера, на температури од +37°C, око 30 минута пре центрифугирања. Центрифугирање је такође вршено на +37°C, 10 минута на 1640×g по методи Borgå и Borgå, са добијеним запреминама филтрата од 0,25-0,33 mL.⁸⁶

2.2.1.3.2. ПОСТУПАК HPLC АНАЛИЗЕ РЕЗУЛТАТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h И ВАРФАРИНА ЗА ХУМАНИ СЕРУМСКИ АЛБУМИН

Концентрације не-везаних (слободних) једињења и укупне концентрације једињења у раствору одређене су HPLC анализом. Варфарин и деривати **2a-h** квантификовани су применом модификоване методе коју су описали Wong и сарадници, где мобилну фазу чини смеша 25 mmol/L Tris-HCl пуфера и ацетонитрила у односу 65:35, при рН 7, са јон-спарујућим агенсом DMOA који је додат смеси

пуфер/ацетонитрил до коначне концентрације од 10 mmol/L.⁸⁷ Сепарација је извршена на PurospherStar RP-18e колони, димензија 55 × 4 mm, са честицама величине 3 μm.

2.2.1.3.3. ОБРАДА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h И ВАРФАРИНА ЗА ХУМАНИ СЕРУМСКИ АЛБУМИН

Фракције слободних деривата израчунате су HPLC анализом из односа концентрације ултрафилтрата (слободног деривата) и укупне концентрације деривата. Концентрације деривата одређене су Scatchard-овом анализом и конструкцијом одговарајућих дијаграма, где је на x-оси представљен параметар r (број молекула једињења везаних за молекул албумина), а на y-оси однос r/x (број молекула једињења везаних за молекул албумина/концентрација слободног једињења).⁸⁸ Корелација између вредности r и x добијена је након линеарне парцијалне регресионе анализе најмањих квадрата, где је израчунат број положаја на којима се врши везивање за албумин (n_1 и n_2), односно вредности константи дисоцијација (K_{d1} и K_{d2}) за висок (n_1 и K_{d1}) или низак (n_2 и K_{d2}) афинитет везивања. Специфичне области везивања израчунате су из односа реципрочних вредности параметара r и x према Lineweaver–Burk-у.⁸⁹ Резултати су представљени у виду средњих вредности (\pm SDs), након три до пет различитих експерименталних мерења. Обрада резултата је вршена у програму Microsoft Office Excel 2007, а статистичка анализа помоћу Wilcoxon-овог теста.

2.3. ПРОТОКОЛИ *IN SILICO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ПРОЦЕНЕ МОГУЋНОСТИ ИЗАЗИВАЊА УНУТРАШЊЕГ КРВАРЕЊА ДЕРИВАТА **2a-h**

2.3.1. ПРИПРЕМА КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА ХУМАНОГ СЕРУМСКОГ АЛБУМИНА У КОМПЛЕКСУ СА (*R*)-ВАРФАРИНОМ

Како би се утврдило да ли се испитивани деривати, током транспорта до молекулске мете VKORC1, комплексирају са хуманим серумским албумином на сличан начин варфарину, коришћена је метода молекулског доковања. Поред увида у биоактивну конформацију деривата у активном центру хуманог серумског албумина, један од резултата молекулског доковања јесте и предвиђање афинитета везивања у виду константе која такође може да укаже да ли ће потенцијални антикоагулант по администрацији *in vivo* изазвати унутрашње крварење или не. Према доступним подацима са Protein Data Bank, три кристалне структуре (PDB кодови: 1H9Z, 1HA2 и 2VND) описују везивање (*R*)-варфарина, физиолошки активнијег облика, за хумани серумски албумин, те су оне искоришћене за валидацију методе молекулског доковања.^{90,91}

Пре процеса доковања извршена је одговарајућа припрема кристалних структура. Преузете кристалне структуре биле су некомплетне у смислу постојања атома водоника и наелектрисања, па је извршено њихово унапређивање. Наведене кристалне структуре хуманог серумског албумина учитане су помоћу UCSF Chimera софтвера.⁹² Структуре су унапређене додавањем водоника помоћу leap модула Amber 12 пакета, након чега је извршена одговарајућа протонација сваког аминокиселинског остатка на рН 7,4 помоћу Antechamber модула.⁹³ Солватација је извршена SOLVATEОСТ командом при чему је сваки од ензима смештен у просторну решетку димензија 10^3 Å и окружен TIP3 моделом молекула воде. Системи су потом неутралисани додатком Na^+ или Cl^- јона, и извршена је минимизација енергије применом Sander модула Amber пакета у 1000 корака, при чему је сваки наредни конформер имао мању енергију у односу на претходни (енг. steepest-descent energy minimization). Други корак у минимизацији система извршен је у 4000 корака, при чему су парови конформера који садрже највећу и најмању енергију симултано минимизирани док не добију исту енергију (енг. conjugate-gradient energy minimization). Минимизиране су све функционалне групе које су биле на међусобном растојању већем од 5 Å. Обзиром да су преузете кристалне структуре идентичне у секвенци,

комплекси су поравњани помоћу MatchMaker модула програма UCSF Chimera и додељене су им идентичне релативне координате у односу на комплекс са кодом 1H9Z. Овај комплекс изабран је као темплат јер је његова кристална структура решена у највишој резолуцији од 2,50 Å. Поравњани комплекси коришћени су као почетни комплекси за екстракцију лиганда.

2.3.2. ДЕФИНИСАЊЕ ПРАВИЛА ЗА МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ

Кристалне структуре (*R*)-варфарина у комплексу са хуманим серумским албумином репродуковане су помоћу три различита програма за молекулско доковање, AutoDock, AutoDock Vina, и DOCK6, што је довело до праве карактеризације активног центра ензима.⁹⁴⁻⁹⁶ Комплетна процедура репродукције експерименталне конформације варфарина извршена је кроз четири нивоа тежине:

1. Поновно доковање експерименталне конформације (енг. *Experimental Conformation Re-Docking, ECRD*): процедура при којој су експерименталне конформације (EC) лиганда флексибилно поново доковане у активном центру нативног протеина. Овом методом се процењује могућност сваког од програма за доковање да репродукује експерименталну конформацију варфарина.

2. Поновно доковање насумичне конформације (енг. *Randomized Conformation Re-Docking, RCRD*): процедура је слична претходној, са том разликом да је активни центар нативног ензима виртуелно окупиран са конформацијом лиганда добијеном насумичном конформационом анализом експерименталне конформације и минимизацијом њене енергије у циљу добијања локалног минимума, при чему долази до промене Cartesian-ских координата молекула и промене његове експерименталне геометрије. Почетним *x*, *y* и *z* координатама лиганда из кристалне структуре рандомизацијом се додељују вредности 0.000, 0.000, 0.000; молекул се репозиционира у односу на активни центар, минимизира и поново докује у истом. Овом методом се препознаје могућност програма да из насумичне конформације доковањем репродукује експерименталну конформацију лиганда.

3. Унакрсно доковање експерименталне конформације (енг. *Experimental Conformation Cross-Docking, ECCD*): процедура је слична поновном доковању експерименталне конформације, са том разликом што се лиганд докује у свим доступним протеинима осим у нативном. Овом процедуром врши се процена

способности програма да пронађе биоактивну конформацију лиганда у протеинима који су по примарној структури идентични нативном протеину, али услед присуства различитих супстрата или инхибитора и последичног индукованог прилагођавања супстрата могу имати незнатне или значајне разлике у вишим нивоима конформације, попут секундарне, терцијарне и кватернерне структуре, у смислу конформације аминокиселина из активних центара. На тај начин се квантификује флексибилност самог протеина који служи као мета при доковању.

4. Унакрсно доковање насумичне конформације (енг. *Randomized Conformation Cross-Docking, RCCD*): слично методи унакрсног доковања експерименталне конформације, с том разликом што је насумична конформација коришћена као почетна конформација и докована у свим расположивим активним центрима осим у нативном. Ово је најтежи ниво процене јер се од програма захтева да докује било који молекул у њему наизглед непознатом окружењу. Резултат се сматра најважнијом способношћу програма за доковање јер представља мерило капацитета програма да предвиди биоактивну конформацију лиганда чија је експериментална конформација непозната.

Тачност доковања (енг. *docking accuracy, DA*) директна је функција способности програма да пронађе правилан начин везивања активног молекула. Способност доковања квантификује се RMSD (енг. *Root Mean Squares Deviation*) вредношћу израженом у Å, односно проценом растојања тешких атома између експерименталне структуре инхибитора и структуре добијене доковањем.

Тачност доковања може се применити за тестирање способности алгорита доковања да предвиди конформацију лиганда која је најприближнија експериментално добијеној и може се израчунати из наведене једначине (2.3):

$$x_A = f_{\text{rmsd} \leq a} + 0.5 (f_{\text{rmsd} \leq b} - f_{\text{rmsd} \leq a}) \quad (2.3)$$

где је x_A тачност доковања, $f_{\text{rmsd} \leq a}$ представља број докованих лиганда са RMSD вредностима мањим од 2, а $f_{\text{rmsd} \leq b}$ представља број докованих лиганда са RMSD вредностима мањим од 3. Према прихваћеном стандарду, правилно доковане конформације су оне са RMSD вредностима мањим од 2 на свим тешким атомима лиганда. Структуре са RMSD вредностима већим од 3 Å се сматрају неправилно докованим или погрешно докованим. Структуре са RMSD вредностима између 2 и 3 се сматрају делимично докованим.

Програм за доковање који је репродуковао кристалне структуре варфарина са најмањом грешком, односно највећом тачношћу, изабран је даље за доковање испитиваних деривата.

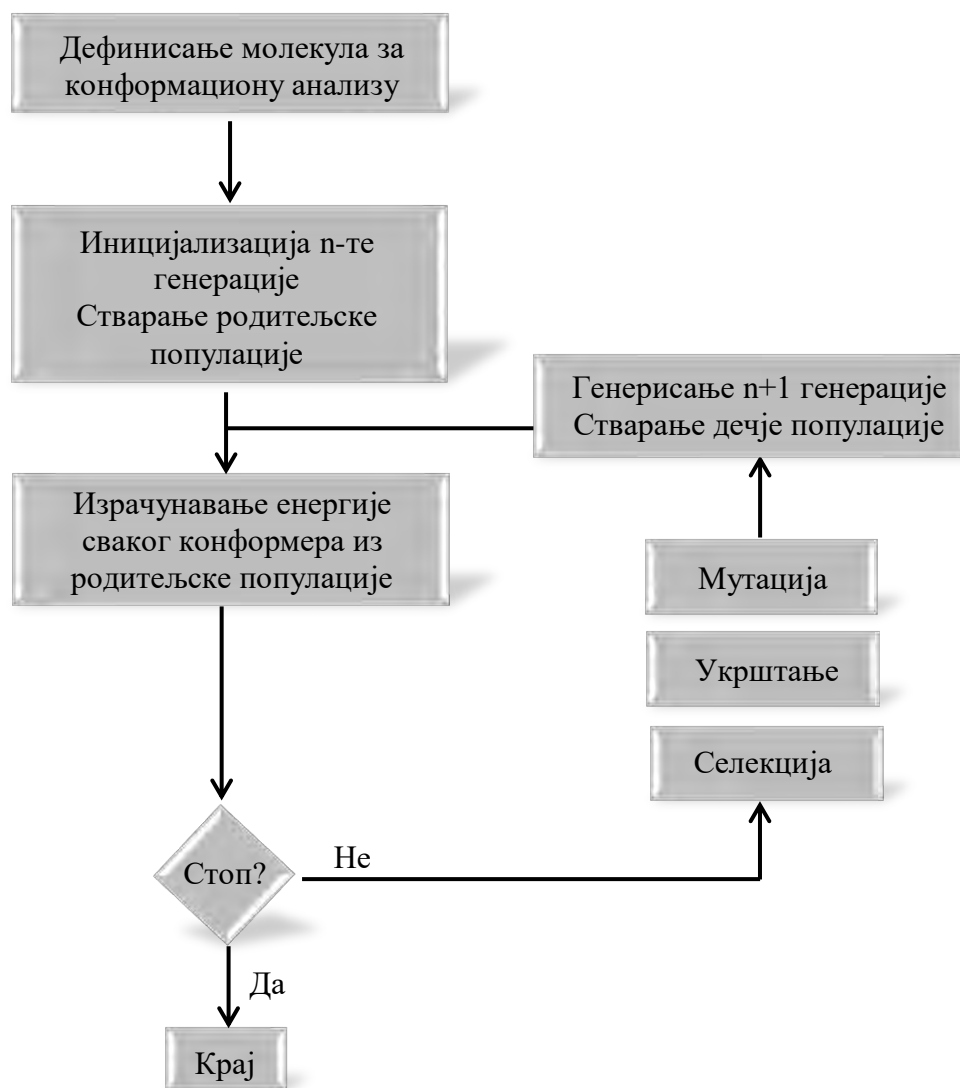
2.3.2.1. ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTODOCK ПРОГРАМА

AutoDock је први програм који је коришћен за репродукцију кристалних структура варфарина у комплексу са албумином. Ригидни центар и ротаирајуће везе лиганда подешене су помоћу AutoDockTools модула. Затим су из 3-D структура протеина уклоњени неполярни атоми водоника, док су Gasteiger-ова наелектрисања и параметри растварача подешени аутоматски. Доковање је извршено помоћу програма AutoDock 4.2.⁹⁴ Димензије просторне решетке која окружује активни центар ензима су дефинисане помоћу модула *pdbbox* на вредности $60 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$, са растојањем од $0,375 \text{ \AA}$ између тачака просторне решетке, док су вредности координата активног центра износиле $x = 44,897$, $y = 10,205$, $z = 29,028$. Конформације лиганада унутар активног центра протеина генерисане су коришћењем Lamarckian-овог генетског алгорита.

Генетски и еволуциони алгоритми базирају се на концепту биолошке еволуције. Доковање појединачног молекула се одвија на начин да се најпре изврши генерисање насумичних конформера који се називају родитељска популација а аналогни су фенотипу у генетици. Сваком од конформера из родитељске популације одреди се енергија. Аналогија са генетиком се огледа у томе што се на нивоу преноса генетског материјала са родитеља на децу најбољи гени преносе у следећу генерацију. Тако, доковани конформер са најнижом енергијом (локални минимум) узима се као почетни из кога ће се генерисати нови сет конформера са још нижом енергијом у циљу проналаска глобалног минимума, односно биоактивне конформације. Конформер са најнижом енергијом се дакле подвргава даљој оптимизацији помоћу три генетска механизма: селекцијом, укрштањем и мутацијом (Шема 2.2).

Конформационе промене које се на овај начин добијају аналогне су генотипу. Сваки параметар (торзиони угао, дужина везе...) који може да се промени током оптимизације конформације једног молекула (промене у генотипу) аналоган је хромозому. Процес оптимизације молекула може да се понавља докле год је то могуће, јер обично корисник задаје критеријуме када је оптимизација завршена (Шема 2.2).

Током саме оптимизације могу да настану стабилне конформације које испуњавају задате услове, али оне могу да буду замењене другим, још стабилнијим, у процесу укрштања или мутације. Резултат оптимизације је сет нових конформера једног молекула, који се назива дечја популација.

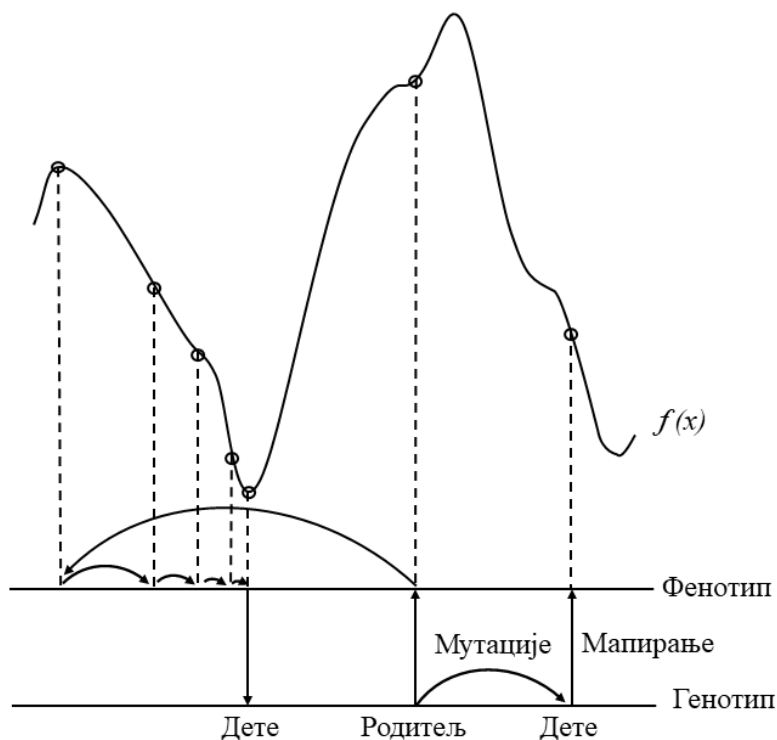


Шема 2.2. Конформациона анализа генетским алгоритмом.

Сам алгоритам конструисан је да функционише на следећи начин (Слика 2.4):

- У почетку се креира сет насумичних структура инхибитора (фенотипови). Фенотипови заправо одговарају координатама атома у молекулу инхибитора;
- Структурне промене сваке конформације посматрају се као генотипови
- Конформационе промене унутар сваке од структура се третирају као мутације у генима

- У процесу доковања програм имитира генетске трансформације и тако покушава да лоцира глобални минимум. Могуће генетске трансформације су следеће:
 - Унакрсна рекомбинација гена у једној тачки $ABCD + abcd \rightarrow Abcd + aBCD$
 - Унакрсна рекомбинација гена у две тачке $ABCD + abcd \rightarrow AbCD + aBcd$
 - Униформна рекомбинација гена $ABCD + abcd \rightarrow AbCd + aBcD$
 - Аритметичка рекомбинација гена $ABCD + abcd \rightarrow [\alpha ABCD + (1 - \alpha) abcd] + [(1 - \alpha) ABCD + \alpha abcd]$, где је $0 < \alpha < 1$
 - Мутација: $A \rightarrow A'$
- За сваки од добијених конформера (један конформер одговара једној генетичкој промени) мери се енергија.



Слика 2.4. Енергетски дијаграм Ламаркиановог алгоритма.

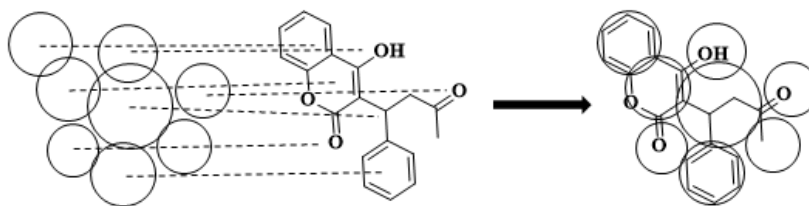
Глобална оптимизација програмом AutoDock 4.2 започиње са популацијом од 200 насумично изабраних јединки, максималном проценом енергије од $1,0 \times 10^6$ и са максимално 27 000 генерација. Извршено је укупно 100 конформационих претрага са толеранцијом RMS вредности од $0,5 \text{ \AA}$.

2.3.2.2. ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTODOCK VINA ПРОГРАМА

Програм AutoDock Vina такође је примењен да изврши репродукцију кристалних структура (*R*)-варфарина. AutoDock Vina користи стохастичку глобалну оптимизацију за генерисање скоринг функције, па по томе представља новију генерацију у односу на програм AutoDock4.2.⁹⁵ Димензије просторне решетке која окружује активни центар ензима су дефинисане помоћу модула *vinaconf* на вредности 58 Å x 52 Å x 46 Å, са растојањем од 0,375 Å између тачака поља и координатама активног центра $x = 44,967$, $y = 10,176$, $z = 28,776$. Симулације доковања изведене су на начин да разлика у енергијама конформација не буде већа од 10 kcal/mol, анализом 100 различитих локалних минимума за сваку конформацију резултат доковања, уз опцију да се сви локални минимуми енергетски забележе. Резултат је садржао 20 различитих конформација за сваки рецептор.

2.3.2.3. ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА DOCK6 ПРОГРАМА

Последњи програм помоћу којег је извршена репродукција кристалних структура варфарина био је DOCK6.⁹⁶ Током симулације доковања, протеин је посматран као ригидан, док су инхибитори сматрани флексибилним и подвргнути су минимизацији енергије. Приступна површина целог протеина на којој је могуће извршити молекулско доковање израчуната је помоћу DMS програма, користећи сфере радијуса од 1,4 Å.⁹⁷ Негативна слика површине је генерисана као скуп преклапајућих сфера помоћу SPHGEN модула.⁹⁸⁻²⁸ Негативна слика састоји се од серије сфера које се преклапају и које варирају у радијусу, а генерисане су тако да представљају van der Waals-ове полупречнике атома на површини протеина. Свака сфера додирује протеин у тачно две тачке (Слика 2.5).



Слика 2.5. Генерисање биоактивне конформације варфарина помоћу DOCK6 алгоритма.

Сфере се позиционирају на начин да њихов центар буде на атомима и да дистанце између атома одговарају растојањима између центара две сфере. Парови атома и лиганда користе се за креирање трансляционо-ротационе матрице која омогућава да конформација лиганда буде оријентисана унутар активног центра молекулским преклапањем. Притом се води рачуна да не буде неких неприхватљивих интеракција. Сфере које окружују лиганд, а самим тим и карактеришу активни центар, сачуване су помоћу програма *sphere selector*. Ове сфере послужиле су за усмеравање лиганда ка активном центру.^{99,100} Стерне и електростатичке интеракције између варфарина и албумина израчунате су помоћу програма *GRID*, при чему су оне мерене на растојању од 0,3 Å.^{101,102}

2.3.3. МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h НА ХУМАНОМ СЕРУМСКОМ АЛБУМИНУ

За потребе молекулског доковања креирани су рачунарски модели деривата **2a-h** помоћу модула *MarwinSketch*, за академску заједницу бесплатног програма *MarwinSuite*. Конформације које су се користиле за доковање генерисане су након молекулско-механичке оптимизације деривата помоћу *MMFF94* поља сила. Програм који је репродуковао кристалне структуре са највећом тачношћу примењен је за доковање деривата **2a-h** у активном центру хуманог серумског албумина, према подешавањима описаним за *AutoDock*, *AutoDock Vina* и *DOCK6*.

2.4. ПРОТОКОЛИ *IN SILICO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ПРОЦЕНЕ ТОКСИЧНОСТИ АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА **2a-h** НА РАЗЛИЧИТИМ МОДЕЛ ОРГАНИЗМИМА

Када се разматра да ли ће неко новосинтетисано једињење испољити значајну активност или је његова активност, афинитет и селективност већ потврђена, поставља се питање како ће се такво једињење понашати у организму. Стога је пожељно на почетку експеримента испитати ADMETox (апсорпција, дистрибуција, метаболизам, екскреција, токсикологија) карактеристике сваког потенцијално биоактивног једињења и редуковати проблеме који могу настати у даљем раду. Притом се разматра да ли биоактивно једињење може постати кандидат за лек, у зависности од њихове растворљивости у води и других карактеристика које лек мора да поседује.¹⁰³ Чак и са повољним ADMETox карактеристикама, пре него што се једињење подвргне клиничким испитивањима, потребне су детаљне процене *in vivo* генотоксичне активности.¹⁰⁴ Методологија дефинисања генотоксичне активности или анти-генотоксичности биће представљена у даљем тексту.

За дефинисање ADMETox особина деривата **2a-h**, процењена је ресорпција једињења у цревима, њихова растворљивост у води, способност продирања деривата из крви у мозак, инхибиција ензима Цитохром Р450 2D6, потенцијална хепатотоксичност (токсичност на нивоу ћелија јетре), везивање за протеине плазме, партициони коефицијент (AlogP) те област поларне површине (енг. polar surface area). Све анализе су извршене помоћу софтвера Discovery Studio.¹⁰⁵

2.5. ПРОТОКОЛИ *IN VIVO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ДЕФИНИСАЊА АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА **2a-h**

2.5.1. ТРЕТМАН ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ЖИВОТИЊА ПРЕ ПРОЦЕНЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА **2a-h**

Након извршене синтезе деривата **2a-h** као антагониста витамина К, са циљем антагонизма фактора коагулације II, VII, IX и X, односно протеина C и S, те потоње процене безбедности њихове апликације на модел организмима *in vitro*, дефинисана је антикоагулативна активност деривата *in vivo*. Поштујући чињеницу да је једини меродаван резултат антикоагулативне активности онај добијен након *in vivo* администрације антикоагуланата, антикоагулативна активност деривата **2a-h** дефинисана је након интраперитонеалне и оралне апликације на лабораторијским пацовима. Експеримент је изведен на мужјацима албино лабораторијских пацова из соја Wistar, старости 2,5 месеци, масе 220-250 g. Животиње су чуване у адекватним условима на $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и 50% влажности ваздуха, у интервалима светлости и мрака дугим по 12 сати. Примењена је нормална исхрана животиња, комерцијално доступном храном *ad libitum*. Животиње су узгајане по протоколима одобреним од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама, Института за биолошка истраживања у Београду, публикованим од стране Националног Института за здравље САД (публикација број 85/23, ревидирана 1986. године).

2.5.2. ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНА АПЛИКАЦИЈА ДЕРИВАТА **2a-h** НА ЛАБОРАТОРИЈСКИМ ПАЦОВИМА WISTAR СОЈА

Деривати **2a-h** растворени у 0,9% раствору NaCl, у три различите концентрације 0,5, 1 и 2 mg/kg телесне масе пацова, аплицирани су интраперитонеално (*i.p.*, енг. *intraperitoneally*) на лабораторијским животињама.¹⁰⁶ Интраперитонеална апликација изабрана је за први корак процене антикоагулативне активности *in vivo*, јер оваквом администрацијом антикоагулант директно преко порталне вене јетре (лат. *vena portae hepatis*) улази у крвоток у максималној примењеној дози и испуњава максимални ефекат. За позитивну контролу припремљен је раствор варфарина у 0,9% NaCl, док је као негативна контрола коришћен 0,9% раствор NaCl. Сви раствори деривата и контрола аплицирани су интраперитонеално на по пет животиња. Животиње су

третиране седам дана узастопно, једном дозом дневно. Осмог дана вршено је жртвовање животиња, прикупљени су плазма, серум и јетра за даљу анализу.

2.5.3. ОРАЛНА АПЛИКАЦИЈА ДЕРИВАТА ХРОМАН-2,4-ДИОНА

Деривати који су испољили најбољи физиолошки одговор у односу на примењену дозу (енг. dose response), растворени су у дестилованој води у концентрацији од 20 mg/kg телесне тежине пацова и администрирани на експерименталним животињама орално (лат. *per os*).¹⁰⁶ Орална администрација сматра се референтним начином администрације, јер се антикоагуланти који се примењују у клиничкој пракси узимају орално. Ипак, недостатак оваквог вида апликације на лабораторијским животињама јесте што животиња узима антикоагулант у течном а не у инкапсулираном стању, те је непознаница колика је дневна потреба животиње за течношћу и колико је заправо антикоагуланата ушло у крвоток животиње кроз дневни унос воде. Позитивна контрола у хематолошким тестовима била је еквивалентна концентрацији варфарина раствореног у дестилованој води, док је негативна контрола била дестилована вода. Једињења и контроле аплицирани су орално на по пет животиња. Животиње су третиране седам дана и добијале су по једну дозу дневно. Осмог дана вршено је жртвовање животиња, прикупљени су плазма, серум, јетра, бубрези и косна срж за даљу анализу.

2.5.4. ПРИПРЕМАЊЕ УЗОРАКА КРВНЕ ПЛАЗМЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ХЕМАТОЛОШКИХ МАРКЕРА

Крвна плазма припремљена је методом по Quick-у.¹⁰⁷ Један запремински део раствора натријум-цитрата масене концентрације 0,11 mol/L пажљиво је помешан са девет запреминских делова крви, да би се избегло формирање пене. Раствор је моментално центрифугиран на собној температури, 15 минута на 1500 x g. По завршетку центрифугирања, плазма је одвојена пипетом и пренета у епендорфе, а затим подвргнута дубоком замрзавању на -80°C у течном азоту.

2.5.5. ПОСТУПАК ОДРЕЂИВАЊА ПРОТРОМБИНСКОГ ВРЕМЕНА ПО QUICK-У

Хематолошки параметри плазме одређени су на MYTHIC 22-Orphee хематолошком анализатору. Протромбинско време (енг. prothrombin time, PT) је

одређено методом по Quick-у и резултати су представљени у секундама.¹⁰⁷ Нормално протромбинско време износи 11 до 14 секунди.

Аликвот од 100 μL плазме пацова која је садржала тестирани хромански или кумарински дериват, позитивну или негативну контролу, одмерен је и пренет у пластичну чашу фибринтајмера. Плазма је инкубирана у преинкубационом блоку, у интервалу од 1 минута на 37°C. По инкубацији, плазма је пренета у мерни део где је аутоматски, по додавању 200 μL тромбокиназе у виду реагенса Thromborel®S (Dade Behring, Siemens AG, Munich, Germany), укључен је хронометар и мерено време настанка фибринског конца.¹⁰⁷

Код експеримента где су животиње третиране дериватима орално, резултати су представљени и у виду INR (енг. International Normalized Ratio) вредности. INR вредност представља однос протромбинског времена пацијента и нормалне вредности протромбинског времена. Добија се из формуле (2.1):

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT}_{\text{узорка}}}{\text{PT}_{\text{референтно}}} \right)^{\text{ISI}} \quad (2.1)$$

где је $\text{PT}_{\text{узорка}}$ вредност протромбинског времена за испитиване деривате и контроле, $\text{PT}_{\text{референтно}}$ средња вредност протромбинског времена референтних узорака, а ISI интернационални индекс сензитивности (енг. International Sensitivity Index) који је дефинисан за сваки реагенс понаособ. Због тога је INR вредност која омогућава прилагођавање разлика између реагенаса и омогућава међусобно упоређивање различитих резултата. Нормални опсег за INR је 0,8-1,2, док повишена терапеутска антикоагулација одговара INR опсегу од 2-3 и прати се након примене антикоагуланта.

2.6. ПРОТОКОЛИ *IN VIVO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА БИОХЕМИЈСКИХ МАРКЕРА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

2.6.1. ПРИПРЕМАЊЕ УЗОРАКА СЕРУМА

Крвни серум пацова припремљен је методом по Quick-у.¹⁰⁷ Након жртвовања животиња, узорци крви прикупљени су и моментално центрифугирани на собној температури, 15 минута на 4000 x g. Након центрифугирања, супернатанти су одвојени, серум је подвргнут дубоком замрзавању течним азотом и чуван на температури -80°C до следеће употребе.

2.6.2. ПОСТУПЦИ ОДРЕЂИВАЊА БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗ СЕРУМА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

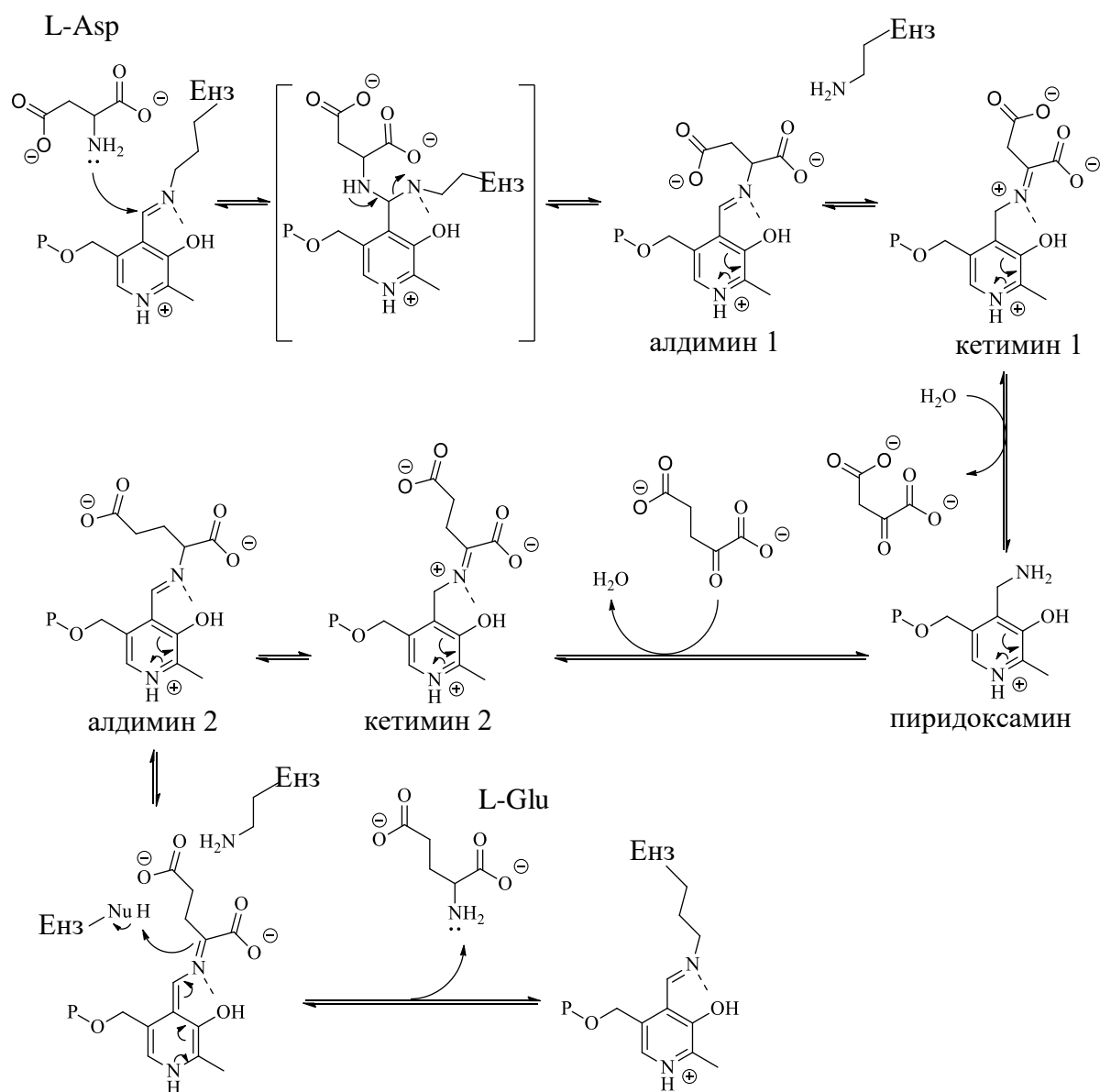
У серуму пацова, интраперитонеално третираних растворима контрола и једињења, одређене су каталитичке активности ензима аспартат трансминазе (AST), аланин трансминазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP) и γ -глутамил трансферазе (γ -GT), односно укупне количине билирубина и протеина. Каталитичке активности ензима и концентрације маркера одређене су клиничким протоколима Интернационалне Федерације за Клиничку Хемију (енг. International Federation of Clinical Chemistry, IFCC). Сва кинетичка и колориметријска мерења су извршена на Dynamica HALO DB-20 UV-Vis спектрофотометру.

2.6.3. ПОСТУПЦИ ОДРЕЂИВАЊА БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ИЗ СЕРУМА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

У крвном серуму пацова, орално третираних растворима контрола и једињења, одређене су каталитичке активности ензима аспартат трансминазе (AST), аланин трансминазе (ALT) и алкалне фосфатазе (ALP). Каталитичке активности одређене су UV-Vis кинетичким методама. Сва кинетичка и колориметријска мерења су извршена на Dynamica HALO DB-20 UV-Vis спектрофотометру.

2.6.3.1. ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ AST

Каталитичка активност аспартат трансминазе (енг. aspartate transaminase, AST) одређена је на основу реакције трансминације аспартата (Шема 2.3) и редукције насталог оксалацетата до малата (Шема 2.4).¹⁰⁸ Процес представља класичну реакцију трансминације и одвија се уз присуство коензима пиридоксал фосфата. Каталитичка активност аспартат аминотрансферазе заснива се на биохемијском процесу малатног шатла који се одвија приликом глуконеогенезе, односно биосинтезе глукозе из пирувата у аеробним условима.¹ Такође, малатни шатл се делимично одвија и на нивоу циклуса трикарбонских киселина.



Шема 2.3. Механизам трансминације аспартата катализован аспартат трансминазом.

Каталитичка активност аспартат трансминазе јесте клинички тест за одређивање нормалне функције хепатоцита јетре. Повишене вредности каталитичке активности указују на стеатозност јетре (депоновање масних киселина у хепатоцитима) и на благу некрозу јетре.

Основни реагенси за одређивање каталитичке активности AST припремљени су мешањем следећих реагенаса:

Реагенс 1 (пуфер/ензим реагенс):

Tris/HCl пуфер 100 mmol/L (pH = 7,8),

L-Asp 330 mmol/L,

малат дехидрогеназа ≥ 1000 U/L.

Реагенс 2 (супстрат):

α -кетоглутарат 78 mmol/L,

NADH 1,1 mmol/L.

Узорак за анализу:

крвни серум.

Слепа проба:

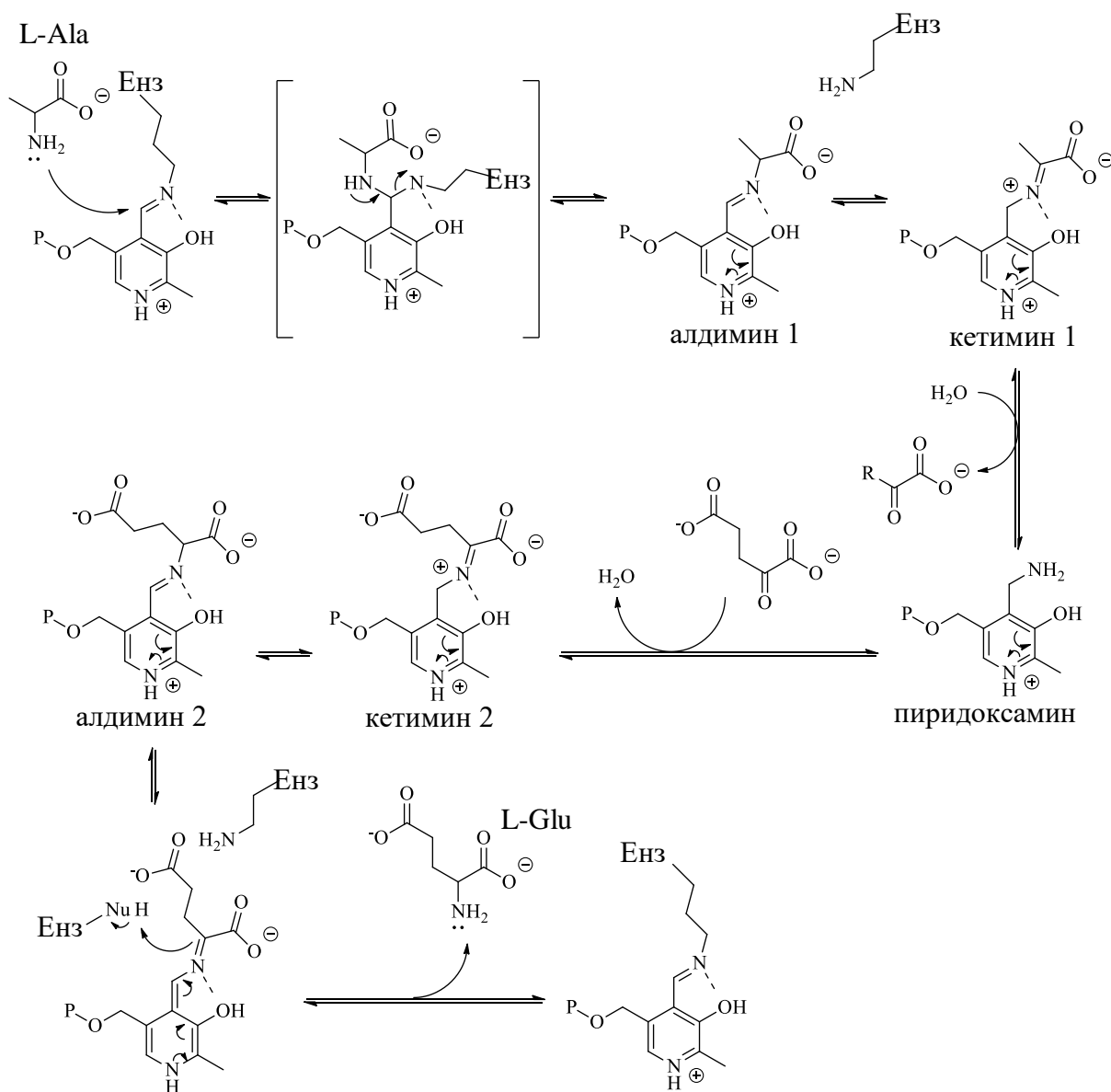
дестилована вода.

У претходно термостатирану кивету на 37°C одмерено је 200 μ L реагенса 1 и 20 μ L реагенса 2. Раствор је помешан и инкубиран 25 секунди. Након тога је додато 25 μ L серума који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу, смеша је добро промешана, кивета је смештена у спекрофотометар и инкубирана 50 секунди. По истеку наведеног времена, очитана је апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца је поново очитана након 30, 60, 90, 120 и 150 секунди. Након бележења апсорбанци израчуната је разлика између узастопних мерења и одређена просечна разлика у апсорбанцама по минути ($\Delta A/\text{мин}$). Каталитичка активност AST рачуната је по формули (2.2):

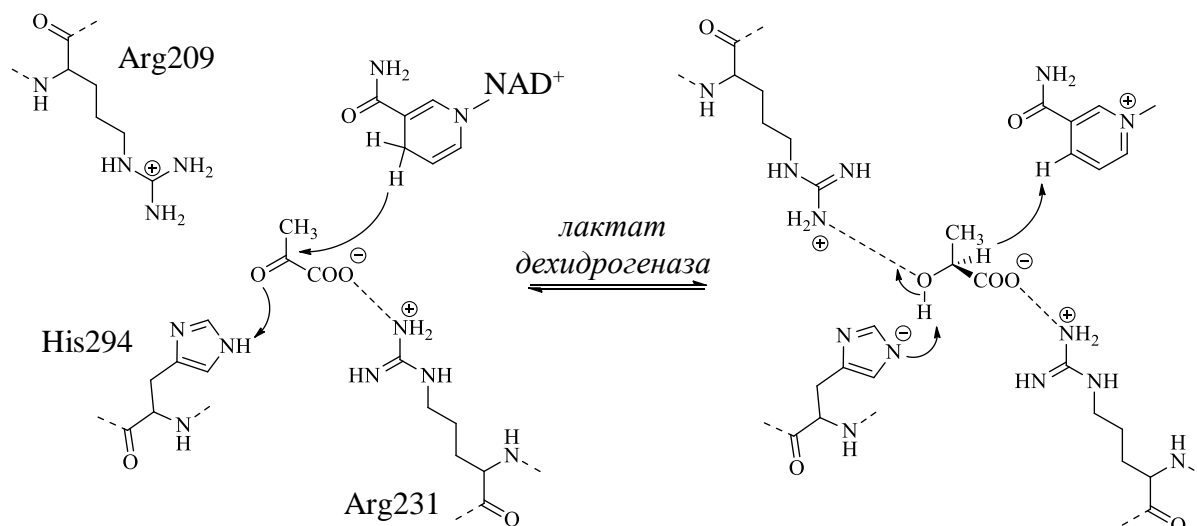
$$\text{Активност (U/L)} = \Delta A/\text{мин} \times 1746 \quad (2.2)$$

2.6.3.2. ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ ALT

Каталитичка активност аланин трансминазе (енг. alanine transaminase, ALT) мерена је на основу реакције трансминације L-аланина (Шема 2.5) и редукције насталог пирувата до лактата (Шема 2.6).¹⁰⁹ Реакција трансминације Ala одвија се унутар Соггу-јевог циклуса глукозе, док редукција пирувата до малата и обрнуто представља последњу реакцију гликолизе, односно прву реакцију гликонеогенезе.



Шема 2.5. Механизам трансминације аланина катализован аланин трансминазом.



Шема 2.6. Механизам редукције пирувата катализован лактат дехидрогеназом.

Основни реагенси за одређивање каталитичке активности ALT припремљени су мешањем следећих реагенаса:

Реагенс 1 (пуфер/ензим реагенс):

Tris/HCl пуфер 125 mmol/L (pH 7,5),

L-Ala 680 mmol/L,

лактат дехидрогеназа ≥ 2000 U/L.

Реагенс 2 (супстрат):

α -кетоглутарат 90 mmol/L,

NADH 0,9 mmol/L.

Узорак за анализу:

крвни серум.

Слепа проба:

дестилована вода.

У претходно термостатирану кивету на 37°C одмерено је 200 μ L реагенса 1 и 20 μ L реагенса 2. Раствор је помешан и инкубиран 25 секунди. Након тога је додато 25 μ L узорка који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу, смеша је добро промешана, кивета је смештена у спекрофотометар и инкубирана 50 секунди. По истеку наведеног времена очитана је апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца је поново

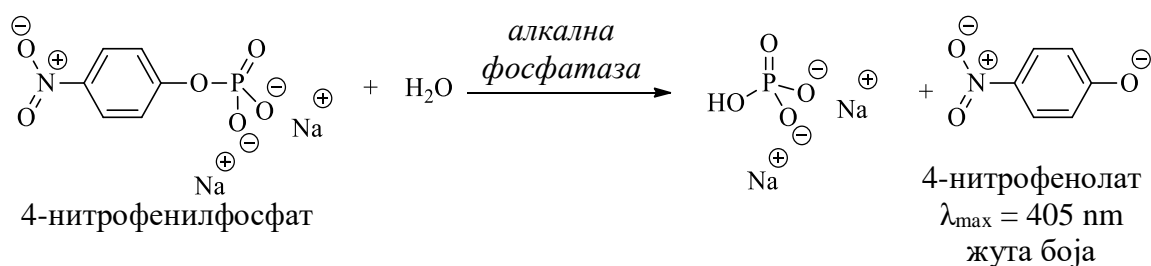
очитана након 30, 60, 90, 120 и 150 секунди. Након тога, израчуната је разлика између узастопних мерења и бележена просечна разлика у апсорбанцама по минути ($\Delta A/\text{мин}$).

Каталитичка активност ALP рачуната је по формули (2.3):

$$\text{Активност (U/L)} = \Delta A/\text{мин} \times 1746 \quad (2.3)$$

2.6.3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ ALP

Каталитичка активност алкалне фосфатазе (енг. alkaline phosphatase, ALP) мерена је на основу реакције хидролитичке дефосфорилације *p*-нитрофенилфосфата (Шема 2.7).¹¹⁰



Шема 2.7. Дефосфорилација *p*-нитрофенилфосфата катализована алкалном фосфатазом.

Основни реагенси за одређивање каталитичке активности ALP-а припремљени су мешањем следећих реагенаса:

Реагенс 1:

диетаноламин пуфер 1,25 mol/L (pH 10,2),

магнезијум хлорид 0,625 mmol/L.

Реагенс 2 (супстрат):

4-нитрофенилфосфат (енг. 4-nitrophenylphosphate, 4-NPP) 50 mmol/L.

Узорак за анализу:

крвни серум.

Слепа проба:

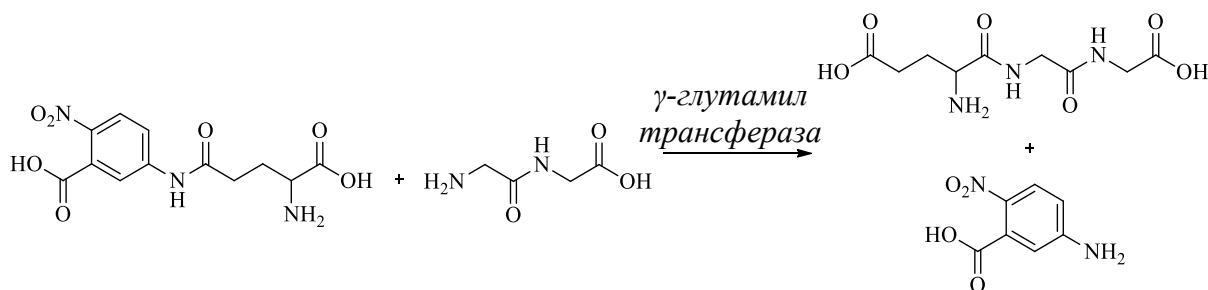
дестилована вода.

У претходно термостатирану кивету на 37°C одмерено је 250 μL реагенса 1 и 60 μL реагенса 2. Раствор је помешан и инкубиран 25 секунди. Након тога је додато 25 μL узорка који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу, смеша је добро промешана, кивета је смештена у спекрофотометар и инкубирана 50 секунди. По истеку наведеног времена очитана је апсорбанца на 405 nm. Апсорбанца је поново очитана након 15, 60 и 75 секунди. Након тога израчуната је разлика између узастопних мерења и бележена просечна разлика у апсорбанцама по минути ($\Delta A/\text{мин}$). Каталитичка активност ALP рачуната је по формули (2.4):

$$\text{Активност (U/L)} = \Delta A/\text{мин} \times 3397 \quad (2.4)$$

2.6.3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ γ -GT

Серумска γ -глутамил трансфераза (енг. gamma-glutamyl transferase, γ -GT) катализује реакцију кондензације глицил-глицина и L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида при чему настају L- γ -глутамил-глицилглицин и 5-амино-2-нитробензоат (Шема 2.8), чија се концентрација мери спектрофотометријски на 405 nm.¹¹¹



Шема 2.8. Реакција кондензације глицил-глицина и L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида катализована γ -глутамил трансферазом.

Основни реагенси за одређивање каталитичке активности γ -GT припремљени су мешањем следећих реагенаса:

Реагенс 1:

глицил-глицин 138 mmol/L,

Tris/HCl пуфер 133 mmol/L (pH 8,25).

Реагенс 2 (супстрат):

L-γ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид 23 mmol/L.

Узорак за анализу:

крвни серум.

Слепа проба:

дестилована вода.

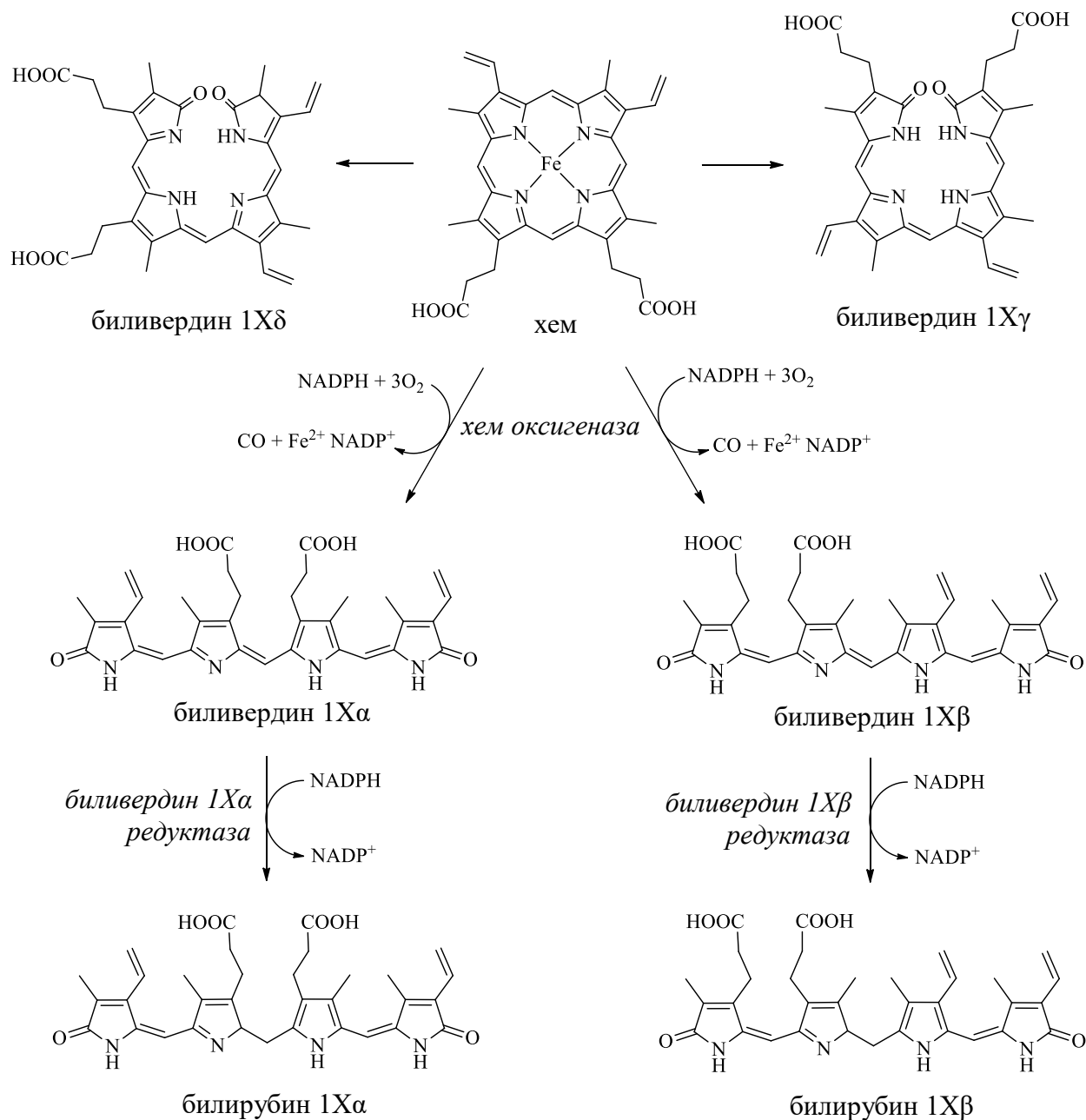
У претходно термостатирану кивету на 37°C одмерено је 200 μL реагенса 1 и 50 μL реагенса 2. Раствор је помешан и инкубиран 25 секунди. Након тога додато је 12,5 μL серума који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу, смеша је добро промешана, кивета је смештена у спекрофотометар и инкубирана 50 секунди. По истеку наведеног времена очитана је апсорбанца на 405 nm. Апсорбанца је поново очитана након 1, 2 и 3 минута. Након тога је израчуната разлика између узастопних мерења и бележена просечна разлика у апсорбанцама по минути (ΔA/мин). Каталитичка активност γ-GT рачуната је по формули (2.5):

$$\text{Активност (U/L)} = \Delta A/\text{мин} \times 2211 \quad (2.5)$$

2.6.3.5. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ УКУПНОГ БИЛИРУБИНА

Билирубин је жучни пигмент, настао разградњом еритроцитног хема каталитичким деловањем хем оксигеназе (Шема 2.9). Деградација се одвија у слезини. Иницијални производи катаболизма хема јесу биливердини, зелени пигменти жучи. Њиховом редукцијом настају билирубини, жути браон-жути пигменти жучи који фецесу дају карактеристичну боју. Након биосинтезе у јетри, билирубини се излучују у крв. Неконјуговани или индиректни билирубин (у води нерастворан билирубин-I) нормално циркулише у крви везан за албумине. Таквог га ћелије јетре преузимају и конјугују у билирубин-II или директни билирубин (билирубин диглукуронид), у води растворан пигмент који се излучује путем жучи. У цревима се укупни билирубин редукује помоћу бактерија цревне флоре у мезобилирубиноген и уробилирубиноген. Део уробилирубиногена се ресорбује у крв а остатак се излучује путем урина или фецеса. Око 80% билирубина настаје разградњом хемоглобина из еритроцита (након

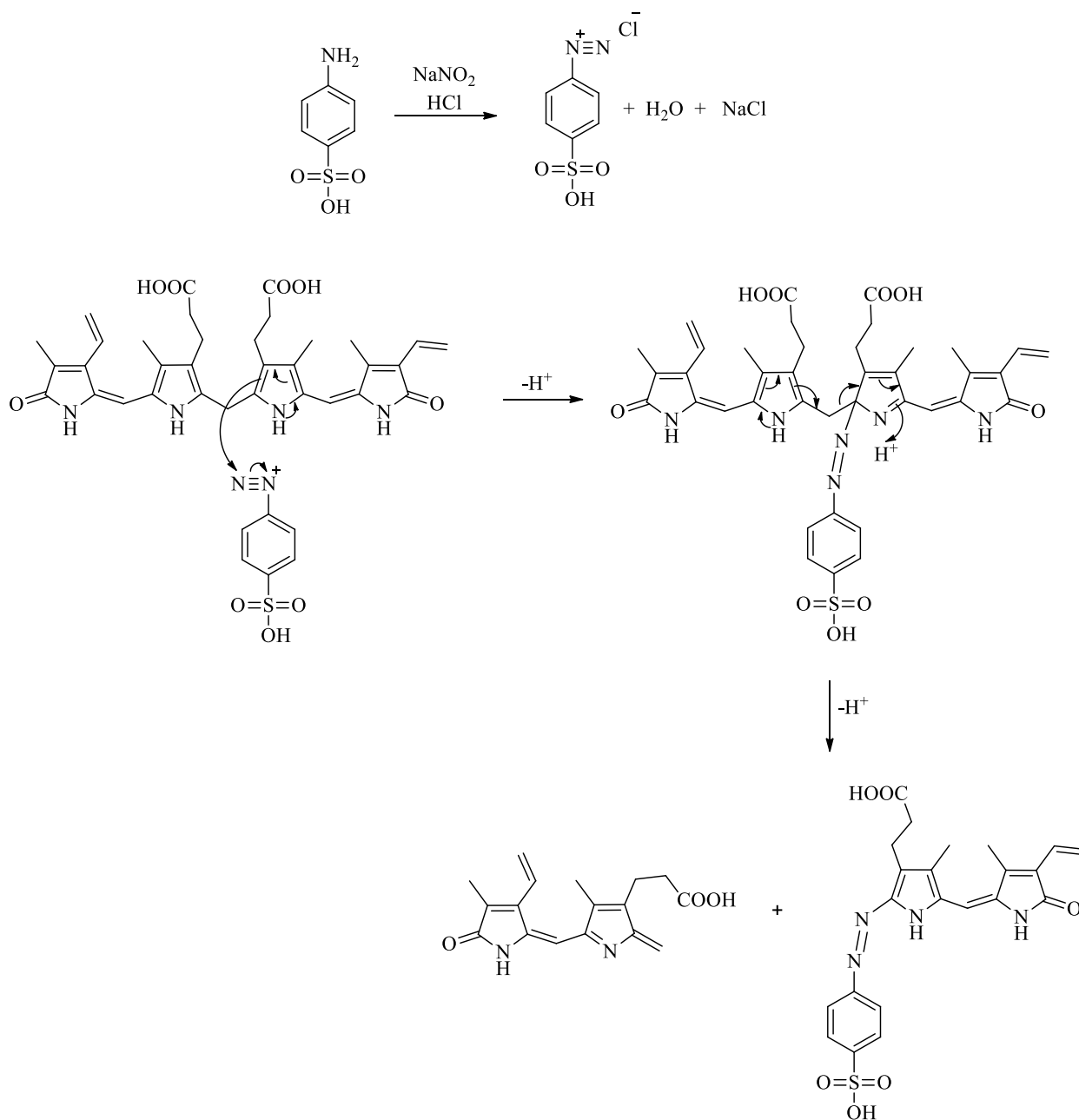
120 дана живота еритроцита у крви) у ретикулоендотелном систему (RES). Преосталих 20% дневно створеног билирубина настаје из претходника еритроцита у коштаног сржи (неефикасна еритроцитопоеза) и других хем протеина (миоглобин, цитохром, каталаза).



Шема 2.9. Катаболизам хема.

Концентрација билирубина у крвном серуму одређује се из реакције билирубина са диазо-једињењима (Шема 2.10). Диазо-једињење настаје из сулфанилне киселине и натријум нитрита. У присуству цетримиди (убрзава реакцију) конјуговани и

неконјуговани билирубин реагује са диазотизованом сулфанилном киселином и настаје азобилирубин. Пораст апсорбанце на 550 nm пропорционалан је концентрацији билирубина.¹¹²



Шема 2.10. Реакција грађења комплекса билирубин-диазо једињења.

Основни реагенси коришћени за одређивање количине укупног серумског билирубина су:

Реагенс 1:

сулфанилна киселина 29 mmol/L,

хлороводонична киселина 67 mmol/L
цетримид.

Реагенс 2:

натријум-нитрит 5,8 mmol/L.

Стандард:

стандардни раствор билирубина 17 $\mu\text{mol/L}$.

Узорак за анализу:

крвни серум.

Слепа проба:

дестилована вода.

У претходно термостатирану кивету на 37°C одмерено је 160 μL реагенса 1 и 20 μL стандарда. Раствор је промешан и након 5 минута инкубације очитана је апсорбанца на 550 nm (A_1). Затим је додато 40 μL реагенса 2, раствор је добро промешан и након 5 минута инкубације очитана је апсорбанца (A_2). Исти поступак је поновљен и за узорке серума, само је уместо стандардног раствора билирубина, одмерена иста запремина серума који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу, те су очитане апсорбанце A_1 и A_2 . Након очитавања апсорбанци, израчуната је разлика између A_2 и A_1 стандарда и узорка серума. Укупни билирубин одређен је према формули (2.6):

$$\frac{(A_2 - A_1)_{\text{узорка}}}{(A_2 - A_1)_{\text{стандарда}}} \times n \quad (2.6)$$

где је n концентрација стандардног раствора билирубина, 17 $\mu\text{mol/L}$.

2.7. ПРОТОКОЛИ *IN VIVO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА АНТИОКСИДАТИВНОГ СТАТУСА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

2.7.1. ПРИПРЕМА ХОМОГЕНАТА ЈЕТРЕ НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

Узорци јетре (0,5 g) хомогенизовани су у авану са 4,5 mL фосфатног пуфера (50 mM, pH 7,4). Тако је добијен 10% (w/v) хомогенат јетре, који је затим центрифугиран на 4000 x g, 15 минута на 4°C. Супернатант хомогената јетре одвојен је и коришћен за одређивање каталитичке активности каталазе, и концентрација тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци,¹¹³ редукованог глутатиона и укупних протеина, према упутствима произвођача реагенаса за спектрофотометријска мерења ових параметара.¹¹⁴⁻⁴⁵ Сва мерења вршена су на Dynamica HALO DB-20 UV-Vis спектрофотометру.

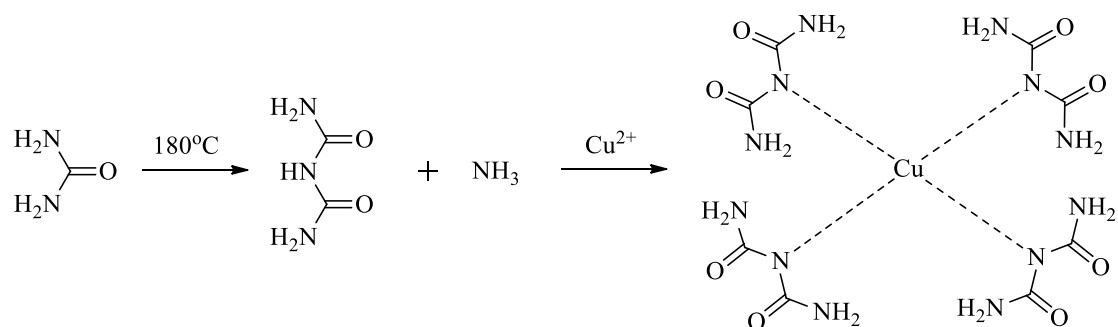
2.7.2. ПРИПРЕМА ХОМОГЕНАТА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

Узорци ткива јетре и бубрега (0,5 g) хомогенизовани су у авану са 4,5 mL фосфатног пуфера (50 mM, pH 7,4). Добијени 10%-тни (w/v) хомогенати јетре и бубрега затим су центрифугирани на 4000 x g, 15 минута на 4°C. Супернатанти хомогената јетре и бубрега одвојени су, и коришћени за одређивање каталитичких активности каталазе и супероксид дисмутазе, затим концентрација тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци, редукованог глутатиона и укупних протеина колориметријским методама.¹¹³⁻¹¹⁷ Сва мерења су вршена на Dynamica HALO DB-20 UV-Vis спектрофотометру.

2.7.2.1. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ УКУПНИХ ПРОТЕИНА

Метода се заснива на грађењу биуретског комплекса протеина са јонима бакра, при чему настаје комплекс интензивно љубичасте боје.¹¹⁷ Једињења са најмање две пептидне везе реагују са бакар(II)-јонима у алкалној средини и граде обојени комплекс

(Шема 2.11). Најједноставније једињење које даје ову реакцију је биурет, који се добија загревањем урее.



Шема 2.11. Механизам биуретске реакције.

Основни реагенси коришћени за одређивање концентрације укупних протеина у серуму су:

Биуретски реагенс:

K,Na-тартарат 21 mmol/L,

NaOH 490 mmol/L,

CuSO₄ 6 mmol/L,

KI 6 mmol/L.

Стандард:

хумани албумин 6 g/dL.

Узорак за анализу:

крвни серум.

Слепа проба:

дестилована вода и биуретски реагенс.

Раствор за анализу припремљен је мешањем 300 μ L биуретског реагенса и 3 μ L серума који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу. Стандардни раствор припремљен је мешањем 300 μ L биуретског реагенса и 3 μ L раствора стандарда. Слепа проба припремљена је мешањем 300 μ L биуретског реагенса и 3 μ L дестиловане воде. По припремању, раствори су инкубирани 11 минута и 30 секунди на температури 37°C. Затим је мерена апсорбанца узорка серума ($A_{\text{узорка}}$) и стандарда

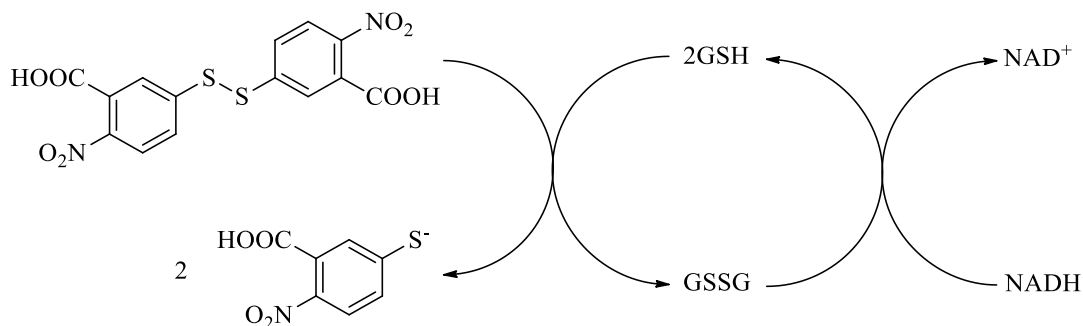
($A_{\text{стандарда}}$) према слепој проби на 546 nm. Укупна количина протеина рачуната се према формули (2.7):

$$C_{\text{протеина}} = \frac{A_{\text{узорка}}}{A_{\text{стандарда}}} \times C_{\text{стандарда}} \quad (2.7)$$

где је $C_{\text{стандарда}}$ концентрација стандардног раствора албумина 6 g/dL.

2.7.2.2. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ GSH

Концентрација редукованог глутатиона (GSH) у хомогенатима одређена је методом по Ellman-у.¹¹⁶ Одређивање се заснива на способности глутатиона да редукује реагенс DTNB (5,5'-дитиобис-(2-нитробензојеву киселину)), при чему настаје 1 mol 2-нитро-5-меркаптобензојеве киселине (NTB) по молу редукованог глутатиона и глутатион дисулфид (GSSG), као оксидована форма. GSH се регенерише из GSSG помоћу глутатион редуктазе, па поново може реаговати са DTNB градећи 2-нитро-5-меркаптобензојеву киселину, што повећава осетљивост методе. Реакција GSH са DTNB је приказана на Шеми 2.12.



Шема 2.12. Оксидо-редукциона реакција глутатиона.

Пошто је 2-нитро-5-меркаптобензојеву киселина жуте боје, то се концентрација GSH у испитиваној анализи може одредити колориметријски мерењем апсорбанце на 412 nm.

Основни реагенси коришћени за одређивање концентрације редукованог глутатиона у хомогенатима јетре и бубрега пацова су:

Реагенс 1:

K_2HPO_4 пуфер (0,2 М у 2 mM EDTA).

Реагенс 2:

раствор DTNB (5,5'-дитиобис-(2-нитробензоева киселина)).

Узорак за анализу:

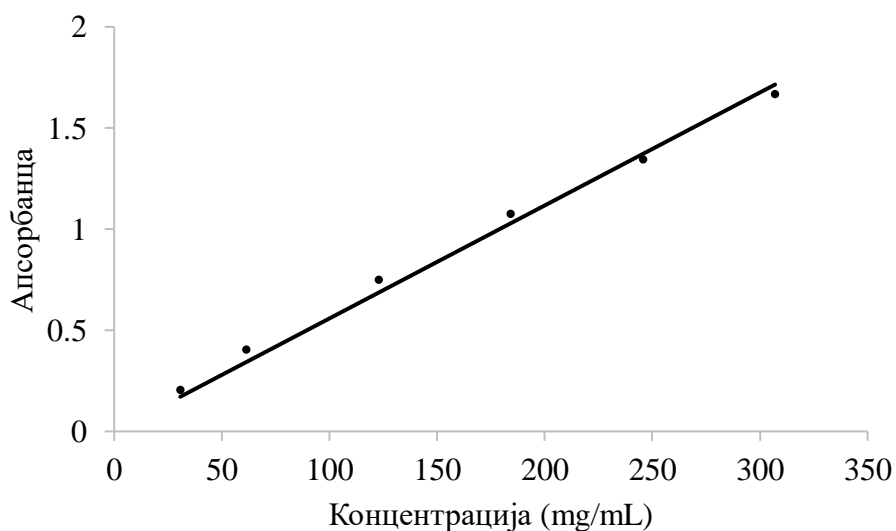
хомогенат јетре или бубрега пацова.

Слепа проба:

дестилована вода.

У киветама је одмерено 0,1 mL хомогената који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу, 1,8 mL реагенса 1 и 0,04 mL реагенса 2. Смеша је инкубирана 25 минута на собној температури (25°C), у одсуству светлости. По истеку времена мерена је апсорбанца жутог комплекса на 412 nm.

Концентрација GSH прочитана је са стандардне праве која је конструисана коришћењем воденог раствора глутатиона као стандарда (Слика 2.6). Припремљен је концентровани стандардни раствор GSH, концентрације 300 mg/mL, који је даље разблаживан дестилованом водом до концентрације 30 mg/mL.



Слика 2.6. Стандардна права редукованог глутатиона.

Концентрацију GSH у хомогенатима потребно је изразити у mg GSH по 1 g протеина. Концентрација GSH у mg/L хомогената добија се из формуле (2.8):

$$\text{GSH mg/L} = C_{\text{GSH}} \times \frac{V_{\text{ук}}}{V_{\text{уз}}} \times 1000 \quad (2.8)$$

где је C_{GSH} концентрација GSH очитана са стандардне праве изражена у mg/mL; $V_{\text{ук}}$ укупна запремина (0,97 mL); $V_{\text{уз}}$ запремина узорка (0,05 mL).

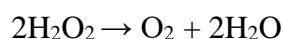
Концентрација GSH у хомогенатима изражена у mg GSH по 1 g протеина, израчуната је из формуле (2.9):

$$\text{GSH} \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ протеина} = \frac{\text{GSH mg/L}}{C_{\text{протеина}} \text{ g/L}} \quad (2.9)$$

где је GSH mg/L концентрација GSH изражена у милиграмима по литру хомогената; $C_{\text{протеина}}$ g/L концентрација протеина изражена у грамима по литру хомогената.

2.7.2.3. ОДРЕЂИВАЊЕ КАТАЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ САТ

Каталаза (енг. catalase, CAT) је ензим који представља део антиоксидативне заштите организма јер разлаже токсични водоник-пероксид на молекул кисеоника и воду:



Каталитичка активност каталазе одређена је на основу способности ензима да разгради водоник пероксид. Методу примењену у овом експерименту је описао Góth.¹¹⁴

Основни реагенси коришћени за одређивање концентрације каталазе у хомогенатима јетре и бубрега пацова су:

Реагенс 1:

Na,K-фосфатни пуфер, 60 mM, pH 7,4.

Реагенс 2:

Раствор H_2O_2 (65 μM у 60 mM Na,K-фосфатном пуферу, pH 7,4).

Реагенс 3:

Раствор амонијум молибдата ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O), 32,4 mM.

Узорак за анализу:

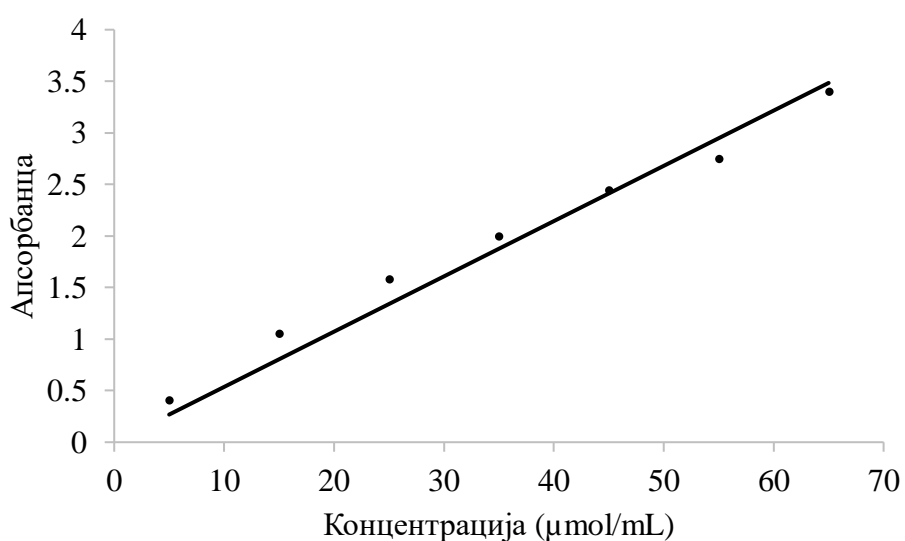
хомогенат јетре или бубрега пацова.

Слепа проба:

дестилована вода.

За потребе одређивања каталитичке активности каталазе одмерено је 0,2 mL узорка хомогената, који је садржао једињење, варфарин или негативну контролу, те 1,0 mL реагенса 2. Добијени раствор инкубиран је на 37°C у интервалу од 60 секунди. Ензимска реакција заустављена је додатком 1,0 mL раствора амонијум молибдата ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O) и апсорбанца насталог жутог комплекса молибдата и водоник пероксида мерена на 405 nm у односу на слепу пробу.

Каталитичка активност каталазе израчуната је из количине неизреаговалог водоник пероксида чија је концентрација добијена читавањем са стандардне праве. Стандардна права зависности апсорбанце од концентрације водоник пероксида добија се читавањем апсорбанци узорака различитих концентрација водоник пероксида (0 - 65 μmol/mL H₂O₂) у реакцији са амонијум молибдатом на 405 nm (Слика 2.7).



Слика 2.7. Стандардна права за каталазу.

Каталитичка активност каталазе изражена у U/L хомогената добијена је из формуле (2.10):

$$\text{CAT} \frac{\text{U}}{\text{L}} = (65 - C_{\text{H}_2\text{O}_2}) \times \frac{V_{\text{ук}}}{V_{\text{уз}}} \times 1000 \quad (2.10)$$

где је $C_{\text{H}_2\text{O}_2}$ концентрација H_2O_2 очитана са стандардне праве изражена у $\mu\text{mol/mL}$; $V_{\text{ук}}$ укупна запремина (2,2 mL); $V_{\text{уз}}$ запремина узорка (0,2 mL).

Каталитичка активност каталазе изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 mg протеина у хомогенату добијена је из формуле (2.11):

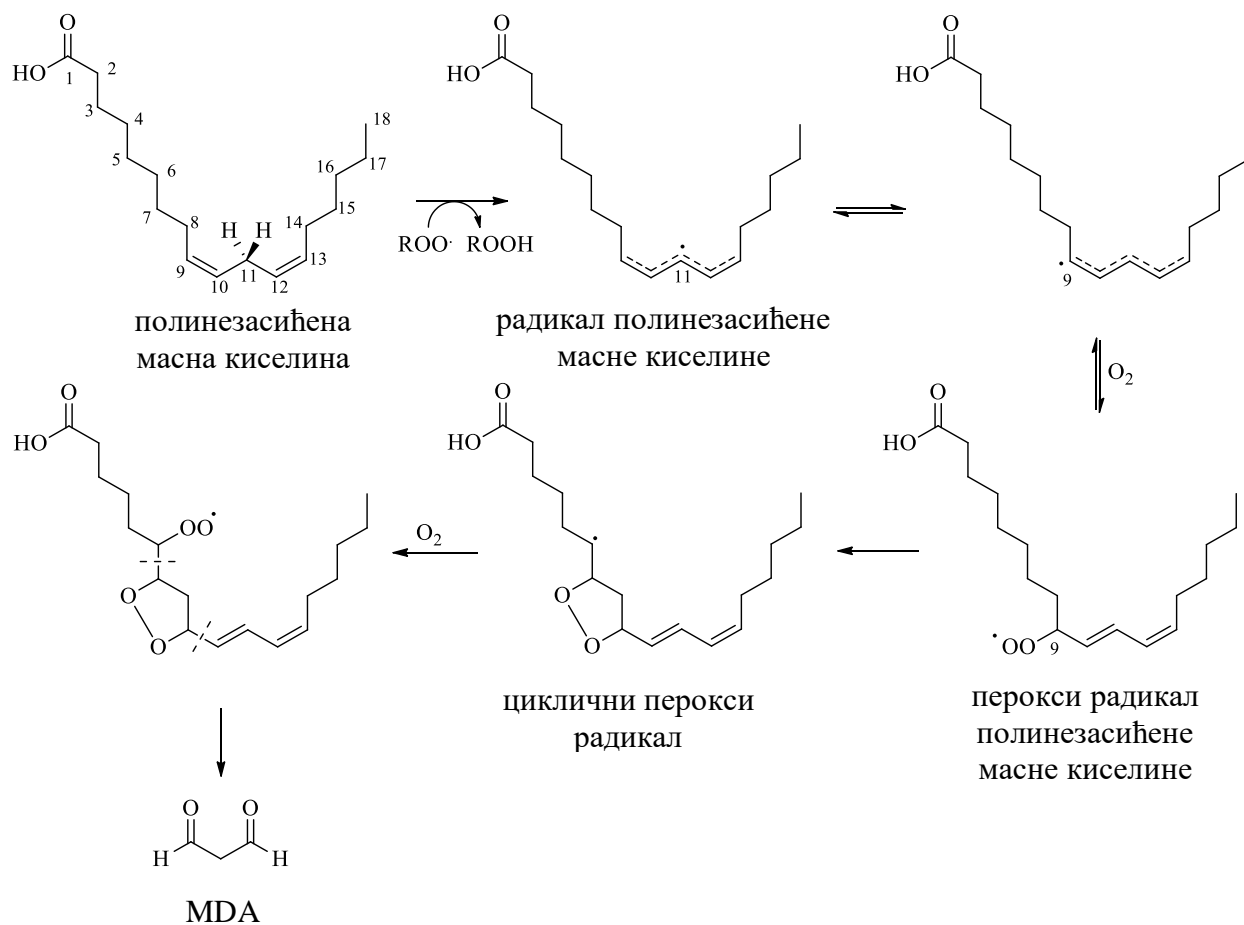
$$\text{CAT} \frac{\text{U}}{\text{mg протеина}} = \frac{\text{CAT} \frac{\text{U}}{\text{L}}}{C_{\text{протеина}} \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \quad (2.11)$$

где је CAT U/L каталитичка активност каталазе изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 литру хомогената; $C_{\text{протеина}}$ mg/L концентрација протеина изражена у милиграмима по литру хомогената.

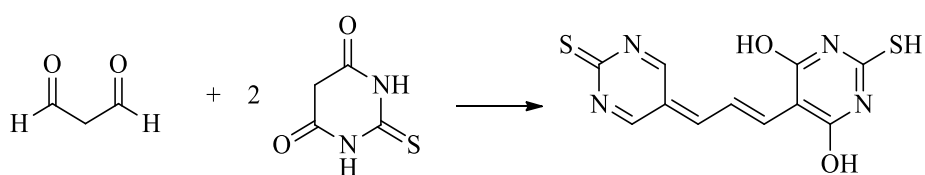
2.7.2.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ TBARS

Реактивне кисеоничне врсте деградирају полинезасићене вишемасне киселине, при чему настаје малондиалдехид (енг. malondialdehyde, MDA) као крајњи производ липидне пероксидације (Шема 2.13).¹¹³

Овај реактивни алдехид један је од многих електрофилних врста које узрокују оксидативни стрес у ћелијама и са протеинима формира ковалентне адукте. У комплексу са тиобарбитурном киселином, MDA се користи се као биомаркер за мерење нивоа оксидативног стреса у организму. Садржај малондиалдехида у супернатантима хомогената одређен је методом коју су описали Ohkawa и сарадници, коришћењем 1,1,3,3-тетраетоксипропана као стандарда за калибрациону криву (Слика 2.8). Концентрација MDA у хомогенату одређује се у еквивалентима тиобарбитурна киселина-реагујуће супстанце (TBARS), спектрофотометријским тестом који се заснива на апсорпционом максимуму комплекса малондиалдехида и осталих TBARS са тиобарбитурном киселином на 535 nm. Принцип ове методе се заснива на реакцији приказаној на Шеми 2.14.



Шема 2.13. Приказ процеса деградације полинезасићене масне киселине и настанка малондиалдехида.



Шема 2.14. Грађење комплекса малондиалдехида и тиобарбитурне киселине.

Реагенси коришћени за ову методу су:

Реагенс 1:

натријум додецил сулфат (SDS), 8,1%.

Реагенс 2:

сирћетна киселина (CH₃COOH), 20%, pH 3,5.

Реагенс 3:

натријум хидроксид (NaOH), 0,05 M.

Реагенс 4:

тиобарбитурна киселина (ТВА), 0,8% у 0,05 M NaOH

Узорак за анализу:

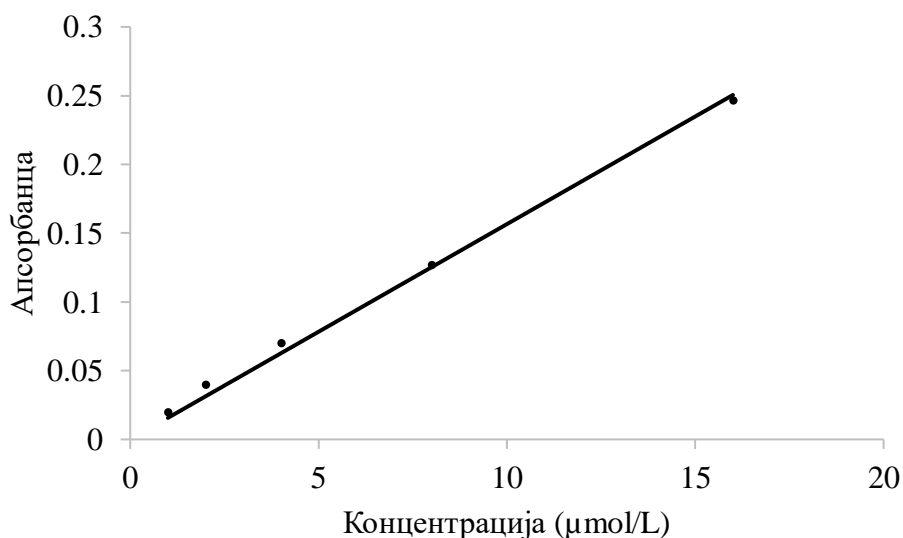
хомогенат јетре или бубрега пацова.

Слепа проба:

дестилована вода.

У епрувету је одмерено 0,1 mL супернатанта хомогената, 0,2 mL реагенса 1, 1,5 mL реагенса 2 и 1,5 mL реагенса 4. Смеша је потом загревана у кључалом воденом купатилу (95°C) у трајању од 60 минута. По истеку наведеног времена, вршено је центрифугирање смеше, 10 минута на 4000 обртаја/минути и мерена је апсорбанца насталог ружичастог комплекса на 535 nm.

За израчунавање концентрације TBARS коришћена је стандардна права која је конструисана употребом стандарда 1,1,3,3-тетраетоксипропана (MDA) концентрације од 1-16 $\mu\text{mol/L}$ (Слика 2.8).



Слика 2.8. Стандардна права за малондиалдехид.

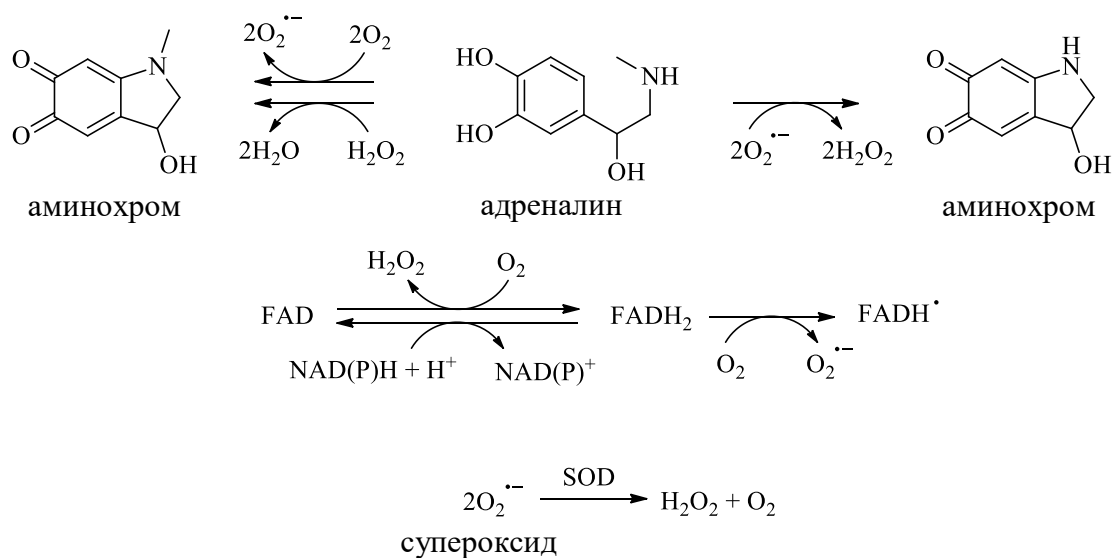
Концентрација малондиалдехида у хомогенатима је изражена у nmol малондиалдехида по 1 mg протеина, и добијена је из формуле (2.12):

$$\text{TBARs (MDA } \frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \text{ протеина)} = \frac{\text{MDA } \frac{\text{nmol}}{\text{L}}}{C_{\text{протеина}} \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \quad (2.12)$$

где је MDA nmol/L концентрација малондиалдехида очитана са стандардне праве; $C_{\text{протеина}}$ mg/L концентрација протеина изражена у милиграмима по литру хомогената.

2.7.2.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ SOD

Активност ензима супероксид дисмутазе (енг. superoxide dismutase, SOD) у хомогенатима јетре и бубрега одређена је по методи коју су описали Misra и Fridovich.¹¹⁵ Метода се заснива на способности ензима да неутралише супероксид радикал након оксидације адреналина (Шема 2.15):



Шема 2.15. Приказ реакције неутрализације супероксида ензимом SOD.

Реагенси коришћени за одређивање каталитичке активности супероксид дисмутазе:

Реагенс 1:

хлороводонична киселина (HCl), 0,02 M.

Реагенс 2:

NaHCO₃-Na₂CO₃ пуфер, 0,05 M, pH 10,2 до 10,25 са 1,00 x 10⁻⁴ M EDTA.

Реагенс 3:

адреналин, 0,01 M ($M_r = 183,2 \text{ g/mol}$) у 0,02 M HCl.

Одређивање V_0 . У кивету од 3 mL одмерено је 925 μL реагенса 2 и 50 μL пуфера који је коришћен за прављење хомогената (фосфатни пуфер, pH 7,4), реагенси су измешани и раствор је коришћен за подешавање нуле на спектрофотометру. Затим је додато 25 μL реагенса 3, систем је хомогенизован мешањем и започето је са бележењем апсорбанце на 485 nm, у временским интервалима од 10 секунди, у периоду од 6 минута. Након мерења, конструисана је крива зависности апсорбанце од времена и одређен нагиб ($\Delta A/\text{мин}$) на линеарном делу криве, који обухвата опсег од $0,025 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$. Ова вредност представља V_0 . У случају да добијене вредности излазе из овог опсега, раствор епинефрина се разблажује да би се добиле вредности у овом опсегу. Понављање одређивања V_0 док се не добију репродуктивни резултати. Одступања од добијених вредности при узастопним мерењима не би требало да буде веће од 5 %.

Одређивање V_{SOD} . У кивету од 3 mL одмерено је 925 μL реагенса 2 и 50 μL хомогената, раствор је помешан и подешена је нула на спектрофотометру. Затим је додато 25 μL реагенса 3, систем је хомогенизован мешањем и започето је са бележењем апсорбанце на 485 nm у временским интервалима од 10 секунди у периоду од 6 минута. За израчунавање $\Delta A/\text{мин}$ је узет исти временски интервал који је коришћен за израчунавање $\Delta A/\text{мин}$ код одређивања V_0 . Израчуната вредност $\Delta A/\text{мин}$ представља V_{SOD} . Сваки узорак мерен је у три независна експеримента, при чему су прихваћена одступања при мерењима у опсегу 5-10%.

Релативна јединица активности SOD дефинисана је као активност која доводи до 50 % инхибиције аутооксидације адреналина под одређеним условима. Изабрана је концентрација адреналина која ће у контроли дати промену апсорбанције у минути од 0,025. При томе се полази од концентрације адреналина 0,01 M, а затим се он разблажује све док се не постигне $\Delta A/\text{мин}$ од 0,025. Изабрана је промена апсорбанције у минути од 0,025 јер је утврђено да SOD тада постиже највиши проценат инхибиције аутооксидације адреналина.

Активност SOD у релативним јединицама израчунава се из формуле (2.13):

$$\text{SOD} \frac{U}{\text{mL}} = \frac{V_0 - V_{\text{SOD}}}{V_0} \quad (2.13)$$

Активност SOD у 1 L узорка добија се из формуле (2.14):

$$\text{SOD} \frac{\text{U}}{\text{L}} = \text{SOD} \frac{\text{U}}{\text{mL}} \times \frac{V_{\text{ук}}}{V_{\text{уз}}} \times 1000 \quad (2.14)$$

где је $V_{\text{ук}}$ укупна запремина (1,00 mL); $V_{\text{уз}}$ запремина узорка (0,05 mL).

Каталитичка активност SOD изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 mg протеина у хомогенату добија се из формуле (2.15):

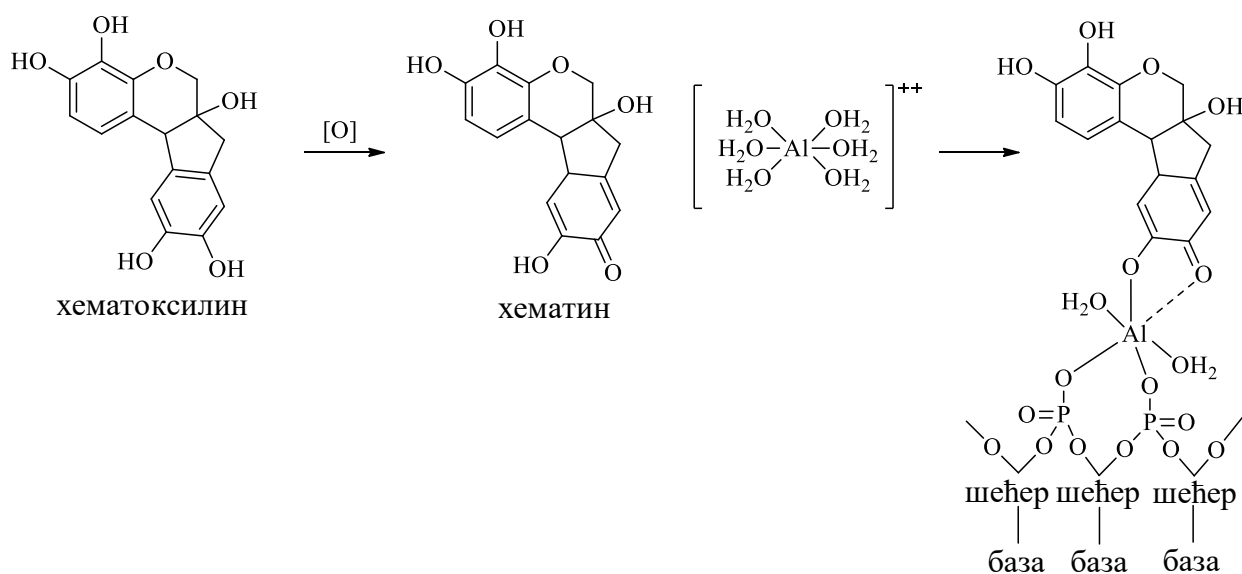
$$\text{SOD} \frac{\text{U}}{\text{mg}} \text{ протеина} = \frac{\text{SOD} \frac{\text{U}}{\text{L}}}{C_{\text{протеина}} \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \quad (2.15)$$

где је SOD U/L каталитичка активност SOD изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 L хомогената; $C_{\text{протеина}}$ mg/L концентрација протеина изражена у милиграмима по 1 L хомогената.

2.8. ПРОТОКОЛИ *IN VIVO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ДЕФИНИСАЊА МОРФОЛОШКИХ ПРОМЕНА НА ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА **2a-h**

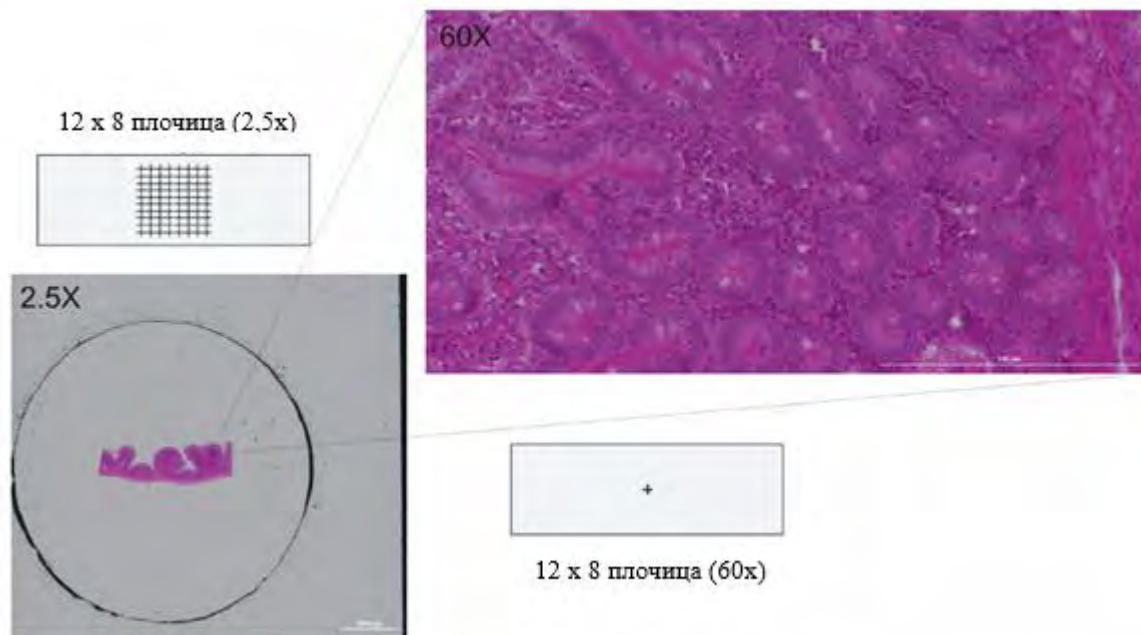
2.8.1. ХИСТОПАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ

Након жртвовања животиња, ткиво јетре и бубрега брзо је одстрањено и постављено у раствор фиксатива (10%-тни формалин растворен у фосфатном пуферу). Након 24-творо часовне конзервације, ткиво је пренето у растопљени парафин и обликовано у калупима. Парафинисани калупи сечени су на микротому дебљине 5 μm . Добијени пресеци ткива затим су бојени хематолошким бојама хематолоксилином и еозином и посматрани под микроскопом. Сматра се да обојење ткива потиче од комплекса који боја ствара са хексаакваалуминијумум(II) комплексом, $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ и једним од ланаца двоструке спирале ДНК из једра ћелије која се фотографише (Шема 2.16).



Шема 2.15. Биохемијска основа обојења ткива за хистопатолошке анализе.

Фотографисање сваког слајда вршено је са увећањем од 40 до 100 пута, по принципу који је наведен на Слици 2.7. Приликом фотографисања плочица са ткивима вођено је рачуна да се фотографише сваки сегмент плочице, те да се репрезентативни фотомикрографи прикажу и тумаче као резултати хистопатолошке анализе.



Слика. 2.9. Методологија снимања фотомикрографа хистопатолошких узорака.

2.8.2. СТАТИСТИЧКЕ АНАЛИЗЕ

Статистичке анализе података спроведене су применом 1-way ANOVA анализе. Варијанца хомогености и дистрибуција података одређена је помоћу Levene и Kolmogorov–Smirnov теста. Када варијанце нису биле хомогене, контроле и третиране групе поређене су помоћу T3 Dunnett-овог или Bonferroni-јевог теста. Статистичке анализе изведене су помоћу SPSS статистичког софтверског пакета, верзија 13.0 за Windows оперативни систем.¹¹⁸ Резултати су сматрани статистички значајним за $p < 0,05$.

2.9. ПРОТОКОЛИ *IN SILICO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА МЕХАНИЗАМА АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА **2a-h** *IN VIVO*

2.9.1. ХОМОЛОГО МОДЕЛОВАЊЕ *rVKORC1*

За потребе сагледавања интеракција потенцијалних оралних антикоагуланата коришћен је хомологи модел витамин К 2,3-епоксид редуктазе субјединице 1 (*VKORC1*) пацова.⁴⁹ Хомолого моделовање јесте компјутациона метода формирања тродимензионалне структуре протеина на основу познате примарне, секундарне, терцијарне и кватернерне структуре протеина из хомологе серије.¹¹⁹ Техника се користи када не постоји већ публикована кристална структура молекуларне мете од интереса у протеинској бази података (RCSB Protein Data Bank, PDB, <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Хомолого моделовање протеина одвија се у неколико фаза: одабир темплата и иницијално поређење секвенци темплата и протеина који се моделује, исправљање грешака у секвенци, формирање пептидног низа, моделовање структура насумице увијања, моделовање R остатака аминокиселина, оптимизација хомологог модела и његова валидација.

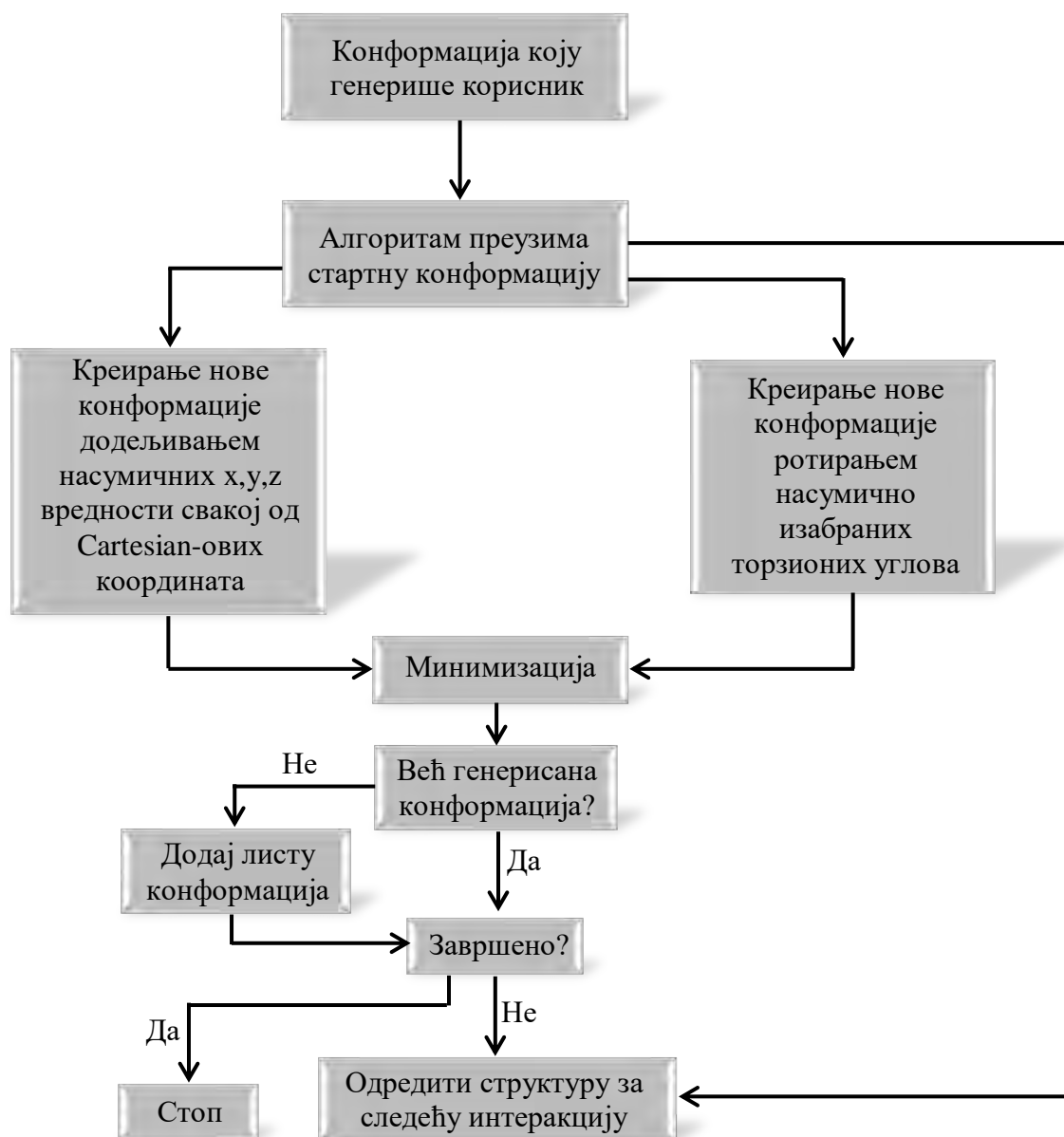
Пацовска *VKORC1* јесте трансмембрански протеин, до сада није изолован и није снимљена његова кристалографска структура. Због тога је за потребе хомологог моделовања као структурни темплат искоришћен његов бактеријски хомолог.

Секвенца *Rattus norvegicus VKORC1 (rVKORC1)* преузета је са Swiss-Prot/Uniprot базе података (UniProt ID: Q6TEK4).⁵⁰ Као структура хомолога узета је терцијарна структура витамин К епоксид-редуктазе *Synechococcus sp.* резолуције 3,60 Å (PDB ID: 3KP9 chain A), пронађена помоћу PSIBLAST претраживача.³⁴ Упоредивањем секвенци модела и темплата установљен је висок проценат индентичности у примарној структури од 55,48%. Упоредивање секвенци модела и темплата извршено је помоћу CLUSTALW 1,83 софтвера.⁸¹ Хомолого моделовање *rVKORC1* извршено је помоћу Swiss-Model веб-сервера (<https://swissmodel.expasy.org/>), користећи аутоматску компаративну методу у моду за поравнање структура.¹²⁰ Валидација модела извршена је помоћу софтвера PROCHECK, при чему је установљено да је вредност G-фактора већа од -0,5, што сугерише да је моделовање било успешно.¹²¹

Трансмембранска структура *rVKORC1* изграђена је додавањем ћелијске мембране помоћу програма VegaZZ, која се састојала од 128 молекула 1,2-

димиристоил-*Sn*-3-фосфорилхолина (DMPC), 11 атома хлора и 3655 молекула воде.¹²² Структура трансмембранског протеина је након формирања подвргнута Monte Carlo методи молекулске динамике да би била доведена у стање равнотеже, односно минимума енергије.

Monte Carlo је метода која симулира динамично понашање комплекса и генерише конформације насумичним променама у структури макромолекула, при чему се израчунава и упоређује енергија новогенерисаног конформера са претходним. Уколико је новонастали конформер јединствене минималне енергије, он се прихвата као глобални минимум. Уколико постоји конформер са нижом енергијом, новонастали конформер се одбацује и претрага се наставља (Шема 2.17).



Шема 2.16. Алгоритам конформационе анализе *Monte Carlo* методом.

Молекулска динамика изведена је помоћу софтвера NAMD имплементираног у Vega ZZ користећи CHARMM22 PROT поље сила, специјализовано за протеине.¹²³ Систему су додата Gasteiger-ова наелектрисувања и атоми водоника помоћу psfgen пакета. Почетни систем је релаксиран у 10 000 корака да би се уклониле неповољне стерне и електростатичке интеракције. Након минимизације енергије система, извршена је молекулска динамика у 10 000 корака у трајању од 720 ps и временском интервалу сваког корака од 2 fs, на 310 K. Температура је контролисана помоћу Langevin-ове динамике са фактором одбацивања 5 ps⁻¹. Термодинамичка својства генерисаног протеина, температура и енергија, праћене су током симулације до постизања константне вредности. Након динамике, структура трансмембранског протеина је подвргнута минимизацији енергије у 100 000 корака.

2.9.2. МОЛЕКУЛСКА ОПТИМИЗАЦИЈА ТЕСТИРАНИХ ЈЕДИЊЕЊА

Молекулске оптимизације спроведене су да би се предвиделе биоактивне конформације испитиваних деривата **2a-h** у раствору, непосредно пре интеракције са *r*-VKORC1. За потребе молекулског доковања креирани су рачунарски модели деривата **2a-h** помоћу модула MarwinSketch, за академску заједницу бесплатног програма MarwinSuite (ChemAxon, Budapest, Hungary, 2012, <http://www.chemaxon.com>). Конформације које су се користиле за доковање генерисане су након молекулско-механичке оптимизације деривата помоћу MMFF94 поља сила а затим учитане у графички кориснички интерфејс програма Maestro 9.0, у оквиру софтверског решења MacroModel 9.5.¹²⁴ Конформације су добијене применом молекулске динамике по методи симулираног хлађења (енг. Simulated Annealing, SA) имплементираног у MacroModel-у.¹²⁵

Метода симулираног хлађења јесте метода оптимизације геометрије молекула базирана на Metropolis MonteCarlo алгоритму. Концепт анализе базиран је на физичко-хемијским процесима који се дешавају када дође до замрзавања течности или рекристализације метала у процесу хлађења. Процес симулираног хлађења започиње од иницијалног стања које се налази на високој температури и подразумева претурбације, односно насумично кретање молекула. Како се температура смањује, долази до формирања новог стања које је вероватније. Тако, свака структура енергетски је минимизирана да би се добила најстабилнија конформација (локални

енергетски минимум). Интензитети не-везивних van der Waals-ових интеракција мерени су до 8 Å, док су електростатичке интеракције мерене до растојања од 20 Å. Почетним структурама додељене су насумичне брзине на свим атомима при температури од 310 К. Затим су изведене још три симулације молекулске динамике. Прва је изведена у еквилибрационом времену од 10 ps са трајањем временских корака (енг. time-step) од 1,5 fs, при константној температури 310 К. У следећој симулацији, молекули су охлађени на 150 К, док је молекулска динамика изведена у симулационом времену од 20 ps, са истим трајањем временског корака и временском константом од 5 ps. Смањивање временске константе за пола, апроксимативно представља полу-време еквилибрације молекула, што је довело до постепеног хлађења молекула у другом кораку. Последњим кораком молекулске динамике молекули су охлађени на 50 К у симулационом времену од 20 ps. На крају је извршена енергетска минимизација у 250 корака применом методе конјугованог градијента. Сви процеси минимизације и молекулске динамике извршени су имплицитном солватацијом у симулираним воденим растворима помоћу GB/SA рутине и OPLS2005 поља сила. Сви лиганди засебно су испитани и разматрана су права протонациона стања при рН 7,4. Протонација молекула извршена је помоћу Protonation Major Microspecies алата, MarvinSketch програма.

2.9.3. СТУДИЈЕ МОЛЕКУЛСКОГ ДОКОВАЊА И ЕНЕРГЕТСКА МИНИМИЗАЦИЈА ЛИГАНД-ЕНЗИМ КОМПЛЕКСА

Структура rVKORC1 припремљена је за молекулско доковање на следећи начин. Атоми водоника додати су применом leap модула Amber софтверског пакета имплементираног у UCSF Chimera софтверу.^{92,93} Нелектрисање аминокиселина подешено је на рН 7,4, т.ј. за аминокиселине лизин, аргинин, аспарагинску и глутаминску киселину претпостављено је да су у јонском облику. Параметри формалног нелектрисања израчунати су помоћу Antechamber модула Amber пакета.⁹³ Потом је протеин учитан у графички кориснички интерфејс програма Auto-DockTools. Са протеина су уклоњени неполарни атоми водоника, а додата су Gasteiger-ова наелектрисања и параметри растварача воде. Ригидне и ротабилне везе лиганада (тестираних деривата) такође су дефинисане. Молекулско доковање извршено је помоћу генетског алгоритма имплементираног у AutoDock 4.2.⁹⁴ Димензије

координатне решетке су подешене на $16 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$, са растојањем између тачака решетке од $0,375 \text{ \AA}$, и координатама активног центра $x = 31,456$, $y = 65,386$ и $z = 13,274$, у који улазе аминокиселине: Thr138, Tyr139 и Ala140. Претраживање конформација лиганда у активном центру је извршено помоћу Lamarckian генетског алгоритма. Глобална оптимизација је почела са популацијом од 200 насумично изабраних јединки, максималном проценом енергије од $1,0 \times 10^6$ и максимално 27 000 генерација. Извршено је укупно 100 конформационих претрага са толеранцијом RMS вредности од $0,5 \text{ \AA}$. На крају, молекулско-механички приступ је примењен у анализи резултата молекулског доковања.

2.9.4. ПОРАВНАЊЕ БИОАКТИВНИХ КОНФОРМАЦИЈА ДЕРИВАТА 2a-h

Рецептор-антагонист комплекси добијени након завршеног молекулског доковања учитани су у графички кориснички интерфејс софтвера MacroModel и минимизирани у 10 000 корака до градијента од $0,01 \text{ kcal/\AA mol}$. Током минимизације коришћено је AMBER поље сила, специјализовано за протеине, уз континуалну солватацију у води, GB/SA солватационим моделом. Обзиром на чињеницу да комплекс садржи велики број атома, извршена је селекција оних атома који се налазе на растојању од 5 \AA од каталитичког центра, укључујући и атоме инхибитора. Селектовани атоми подвргнути су поновној минимизацији у циљу постизања што боље оријентације лиганда у активном центру, која укључује формирање водоничних веза и van der Waals-ове интеракције.

У циљу редуковања геометријских неправилности добијених лиганд-*r*VKORC1 комплекса, сви комплекси су поравњани према комплексу **2f**-*r*VKORC1. Поменути комплекс узет је за шаблон, јер је једињење **2f** показало најбољу активност. Поравнање добијених комплекса према структури рецептора извршено је помоћу модула MatchMaker имплементираних у програм UCSF Chimera.

2.9.5. 3-D QSAR СТУДИЈЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h

2.9.5.1. ГЕНЕРИСАЊЕ ПОЉА МОЛЕКУСКИХ ИНТЕРАКЦИЈА CoMFA И CoMSIA МЕТОДОЛОГИЈОМ

Тродимезионална квантитативна зависност између структуре и активности молекула (енг. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships, 3-D QSAR), укључује анализу квантитативне зависности између биолошке активности сета једињења и њихових тродимензионалних молекулских дескриптора, користећи статистичке корелационе технике. 3-D QSAR студија јесте термин који обухвата широк спектар QSAR метода које корелирају макроскопске особине молекулске мете са молекулским дескрипторима изведених из просторних (тродимензионалних) репрезентација молекулских структура.

Премиса сваке 3-D QSAR студије, без обзира на њен тип, јесте да сваки молекул укључен у 3-D QSAR студију остварује интеракцију са ензимом/рецептором на сличан начин. Стога је за извођење 3-D QSAR студија неопходан велики број молекула који имају потенцијално сличан механизам дејства, најмање петнаест, па навише... Такође, врло је пожељно да ти молекули имају што разноликију структуру, како би се кроз 3-D QSAR студију покрио читав спектар функционалних група и из модела извукао рационалан закључак на који начин функционалне групе утичу на активност. Невезано за тип методологије, сваки 3-D QSAR експеримент се састоји од следећих корака:

- Дефинисање биолошке активности; селекција молекулске мете
- Селекција једињења
- Димензионалност молекула
- Биоактивне конформације
- Поравнање молекула
- Израчунавање вредности молекулских дескриптора/поља молекулских интеракција
- Генерисање иницијалних модела хеометријским методама
- Пречишћавање модела
- Генерисање реалних модела
- Интерпретација резултата
- Предвиђање активности

Дефинисање биолошке активности, селекција једињења и димензионалност молекула извршене су у претходном делу експерименталног рада. За потребе генерисања 3-D QSAR студија, биолошке активности које описују антикоагулативну активност деривата **2a-h** конвертоване су у pEC_{50} ($-\log EC_{50}$) вредности. Једињења **2a-h** формирала су тренинг сет. Иако је број једињења у експерименталном делу био мали, 3-D QSAR студије су ипак извршене како би пружиле увид у механизам антикоагулативне активности испитиваних деривата.

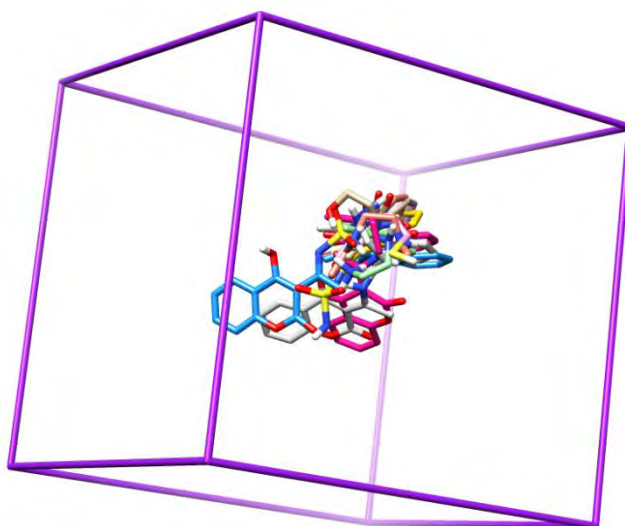
Поравнање молекула је један од најзначајнијих корака у генерисању 3-D QSAR модела и од врсте поравнања директно зависи квалитет изведених 3-D QSAR студија. Сходно томе, а са циљем да би се генерисали што реалнији модели, поравнање молекула тренинг сета извршено је на основу структуре активног центра молекулске мете. Другим речима, биоактивне конформације испитиваних деривата генерисане су након молекулског доковања једињења у активном центру VKORC1 пацова, након чега су сви настали комплекси антикоагуланта и рецептора поравњани на основу структуре самог рецептора. Поравнање је извршено на основу Biopolymer/Fit monomers модула имплементираног у Sybyl-X Tripos софтвер (Sybyl version X1.1 (2010) Tripos Associates Inc, St. Louis (MO)). Након поравнања, свим молекулима тренинг сета додељене су идентичне геометрије.

Да би се разумело како и зашто се генеришу 3-D QSAR студије, најпре се мора разумети како долази до интеракција између биомолекула и молекулске мете у активном центру исте. Наиме, активни центар ензима или рецептора коме прилази биомолекул неће одмах препознати атоме и везе у молекулу лиганда. Са веће удаљености, макромолекул ће „осетити” електростатички потенцијал биомолекула. Како се дистанца између лиганда и макромолекула смањује, макромолекул ће се сусрести са релативно конзистентним и ригидним молекулом лиганда, при чему долази до колизије између распоређеног наелектрисања лиганда и површине доступне растварачу макромолекула. Другим речима, макромолекул ће најпре „видети” облик лиганда и „проценити” да ли је такав облик одговарајући облику његовог активног центра.

Уколико постоји захтевана компатибилност, процес везивања лиганда за активни центар махом се своди на остваривање нековалентних интеракција између биомолекула и молекулске мете. Другим речима, тек када ензим/рецептор препозна облик инхибитора/антагониста, он ће препознати и функционалне групе унутар

инхибитора/антагониста. Ипак, пенетрација лиганда у активни центар не се одвија лако, јер се макромолекул опире да се насилно подвргне индукованом прилагођавању конформације активног центра. Генерално је правило да се интеракција између биомолекула и молекулске мете остварује када генерисана енергија везивања превазилази енергију репулзивних van der Waals-ових сила које дочекују лиганд у активном центру.

Једна од метода којом се истражују енергетске интеракције између биомолекула и молекулске мете јесте генерисање поља молекулских интеракција (енг. Molecular Interaction Fields, MIFs) која описују варијације у енергијама интеракције између биомолекула и активног центра унутар тродимензионалне просторне решетке, смештене око биомолекула и активног центра (Слика 2.10).



Слика 2.10. Тродимензионална просторна решетка антагониста *r*VKORC1.

Просторна решетка се генерише из поравњаних структура инхибитора/антагониста, обично тако да границе решетке буду на удаљености од 10 Å од последњег атома највећег инхибитора/антагониста у тренинг сету. То је довољна величина решетке, јер се релевантне биомолекул-протеин интеракције ретко остварују на удаљености већој од 6 Å. По важности у интеракцијама, најпре се издвајају хидрофобне интеракције које су и најјаче, али се њихов допринос своди на стабилизацију инхибитора/антагониста у активном центру. Са аспекта активности, далеко су значајније водоничне везе и електростатичке интеракције и са њима добија смисао величине просторне решетке. Наиме, водоничне везе између биомолекула и

аминокиселине чије је растојање између 1,5 и 2,5 Å сматрају се јаким водоничним везама, готово са ковалентним карактером; водоничне везе са растојањем између 2,5 и 3,2 Å су умерене; водоничне везе са растојањем између 3,2 и 4 Å су слабе, готово електростатичког карактера. Све везе са растојањем већим од 4 Å су електростатичке и њихова јачина опада са растојањем.

Када се формира одговарајућа просторна решетка, потребно је израчунати вредности енергија између биомолекула и молекулске мете. Да би се енергије израчунале, потребна су два припремна корака. Први је да се просторна решетка подели на мање решетке, при чему је почетно растојање између тачака које деле просторну решетку, чворова (енг. nodes), 1 Å. Други корак јесте израчунавање вредности парцијалних наелектрисања биомолекула. По испуњењу услова, за сваки од поравњаних молекула врши се генерисање поља стерних и електростатичких интеракција на свим тачкама просторне решетке, мерењем вредности енергија интеракција између функционалне групе биомолекула и пробе.

Проба је атом који симулира стерне и електронске особине неке аминокиселине. Суштина избора пробног атома своди се на то да опише што већи број биомолекул-протеин интеракција. Свака проба има своје наелектрисање, за израчунавање електростатичких интеракција, односно van der Waals-ов радијус за генерисање стерних интеракција, те испуњава све услове за израчунавање енергија интеракција са функционалном групом биомолекула. Како се, заправо, те енергије израчунавају? Применом једноставних и основних хемијских закона који описују електростатичке и стерне интеракције. Суштина 3-D QSAR приступа заправо и јесте враћање на основне хемијске законе, а компјутери израчунавају енергије MIF на основу коришћења тих основних закона. 3-D QSAR методологија је експериментална метода која израчунава вредности реалних енергија у биомолекул-протеин комплексу.

Смисао формирања тродимензионалне просторне решетке јесте да помоћу компјутерске графике може да представи вредности енергија у тродимензионалном простору око молекула. Другим речима, вредности енергија које описују интеракције молекула представљају се у виду мапа, тј. 3-D изоенергетских контура, на екрану монитора. Изоконтуре које представљају вредности позитивних енергија описују регион биомолекула који ће бити одбијен од стране активног центра протеина. Са

друге стране, негативне вредности енергија указују на регионе чије је везивање за протеин енергетски фаворизовано.

Физичко-хемијске карактеристике пробе, попут наелектрисања или van der Waals-овог радијуса, потичу из Tripos поља сила. Електростатичке интеракције између биомолекула и пробе/аминокиселине, односно електростатичке интеракције унутар поља молекулских интеракција, израчунавају се помоћу класичног Coulomb-овог закона (јед. 2.4, Слика 2.11):

$$E_c = \sum_{i=1}^n \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \quad (2.4)$$

где је E_c енергија Coulomb-ових интеракција, q_i парцијално наелектрисање i -тог атома (функционалне групе) биомолекула, q_j наелектрисање пробног атома (аминокиселине), D диелектрична константа, r_{ij} растојање између i -тог атома (функционалне групе) и j -те тачке унутар просторне решетке на којој се налази пробни атом. Вредност диелектричне константе и q_j пробног атома преузимамо директно из поља сила, док вредност q_i узимамо из фајла молекула. Растојање између пробе и молекула унутар Sybyl Tripos софтвера традиционално је 1 Å.

Стерне интеракције мере се помоћу Lennard-Jones-овог потенцијала (јед. 2.5), где је E_{vdw} израчуната вредност van der Waals-ових енергија, r_{ij} растојање између i -тог атома (функционалне групе) и j -те тачке унутар просторне решетке на којој се налази пробни атом; A_{ij} и C_{ij} константе које зависе од van der Waals-ових радијуса атома између којих се мери вредност van der Waals-ових енергија атома функционалне групе молекула, са једне стране, и пробног атома, са друге. Израз r^{-12} представља израз репулзије и описује Pauli-јеву репулзију на кратким растојањима због преклапања електронских орбитала. Са друге стране, израз r^{-6} представља привлачне силе дугог домета и описује van der Waals-ове или дисперзионе силе.

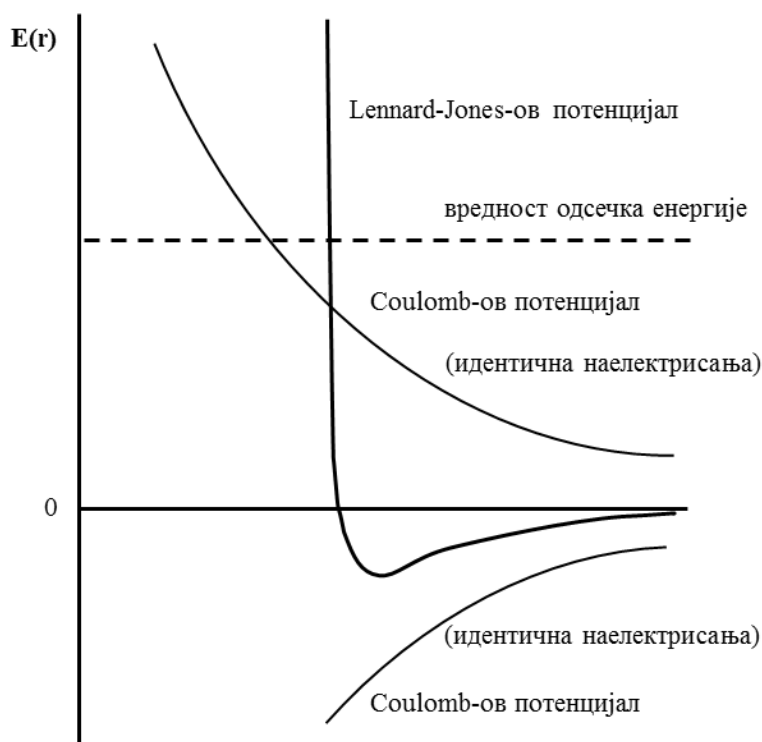
$$E_{vdw} = \sum_{i=1}^n (A_{ij} r_{ij}^{-12} - C_{ij} r_{ij}^{-6}) \quad (2.5)$$

За потребе рачунања енергија MIF, врши се систематско померање пробе кроз тачке просторне решетке. На свакој од тачака просторне решетке енергија интеракције

између пробе и атома функционалне групе рачуна се следећом емпиријском функцијом (јед. 2.6):

$$E_{tot} = E_{vdw} + E_C + E_{HB} \quad (2.6)$$

где E_{tot} представља укупну енергију, E_{vdw} енергију van der Waals-ових интеракција, E_C енергију Coulomb-ових интеракција, а E_{HB} енергију водоничних веза. Свака израчуната укупна вредност енергије на једној тачки просторне решетке представља се као тродимензионална матрица, где скуп свих вредности укупних енергија јесу колекција тродимензионалних матрица које заједно чине поље молекулских интеракција.



Слика 2.11. Lennard-Jones-ове и Coulomb-ове криве потенцијалне енергије које описују интеракцију између пробе и биомолекула.

Најпознатија метода за израчунавање поља молекулских интеракција, односно мултидимензионе матрице која садржи вредности енергија стерних, електростатичких, водоничних, хидрофобних или било којих других интеракција, на основу којих настаје 3-D QSAR модел, јесте метода упоредне анализе поља молекулских интеракција одн. CoMFA. Упоредна анализа поља молекулских интеракција (енг. Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) је 3-D QSAR метода која користи статистичке корелационе

технике за анализу квантитативне зависности између биолошке активности сета једињења са предефинисаним поравнањем (додељивањем идентичних релативних координата сваком молекулу тренинг сета) и њихових тродимензионалних стерних и електронских особина. Друге особине попут хидрофобности и могућност грађења водоничних веза такође су укључене у анализу.

CoMFA се наравно базира на томе да најпре ваља познавати парцијална атомска наелектрисања биоктивног молекула, обзиром на чињеницу да њих најпре молекулска мета и препознаје. Наелектрисања се рачунају из геометрија поравњаних молекула. Из поравнања молекула директно произилазе и енергије интеракција са пробом, када се тренинг сет унесе у просторну решетку. Флексибилне функционале групе и конформациона различитост у случају неадекватног поравнања могу да доведу до нереално високих или ниских вредности енергија које модел види као шум. Поравнање на основу структуре активног центра је у предности у односу на поравнање у односу на структуре самих лиганда јер енергетски шум може значајно смањити ризик од претерано добре корелације између активности и вредности енергија. Чак и при адекватном поравнању, прибегава се тзв. претретману енергија, где се нереално високе или ниске енергије одбацију. CoMFA методологија се у основи базира на поравнању по структури лиганда и не поседује адекватне алгоритме претретмана, па услед ових значајних недостатака увек треба поставити питање валидности модела.

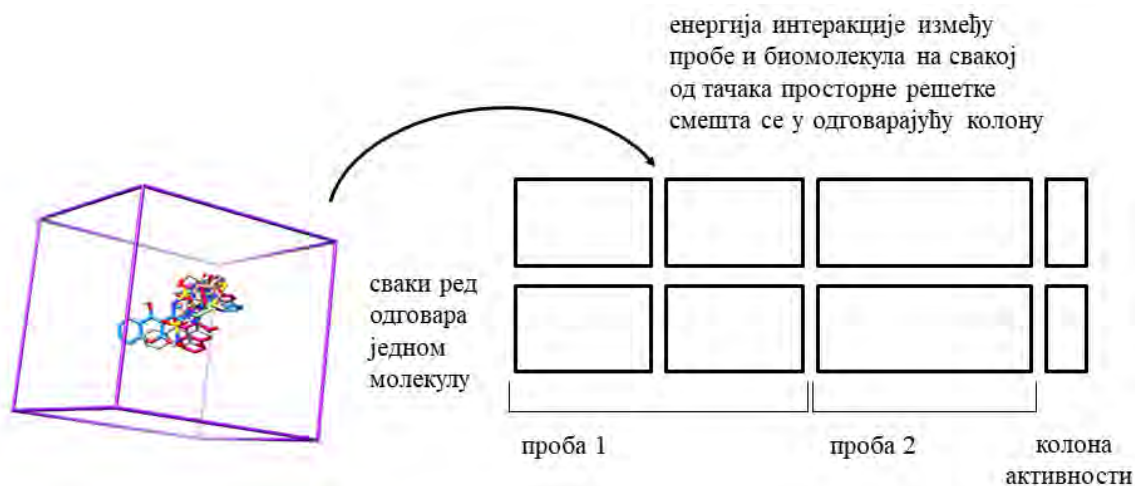
По поравнању, тренинг сет се позиционира у центар просторне решетке (Слика 3.22). Алгоритам је такав да се води рачуна да растојање између границе решетке и атома тренинг сета буде најмање неколико Å. Типична CoMFA просторна решетка је 3 до 4 Å већа од површине преклопљених молекула. Ипак, обзиром на чињеницу да су електростатичке/Coulomb-ове интеракције дугог домета, често је неопходна већа просторна решетка; границе решетке требало би да буду на удаљености од 6 до 10 Å од последњег атома највећег инхибитора/антагониста у тренинг сету. Величина CoMFA просторне решетке још један је од великих недостатака методе. Међутим, и таква величина решетке одговара домету стерних/van der Waals-ових интеракција.

Кључно питање у CoMFA методологији јесте како подесити растојање између тачака унутар просторне решетке по којима ће се кретати проба? Стандардно растојање тачака просторне решетке у CoMFA методологији је 2 Å. Растојање је инверсно пропорционално ригорозности калкулација. Другим речима, што је растојање између

пробе и биомолекула веће, тачност израчунавања енергија интеракција је мања. Растојање између тачака просторне решетке бира се тако да се направе тачке пресека у тродимензионалној просторној решетки. Иако код CoMFA методологије мануелно није могуће променити фиксну вредност растојања од 2 Å, практично сам алгоритам доноси варијабилност у растојању од 0,5 до свих 4 Å, те се на основу величине решетке и растојања међу тачкама исте креира неколико хиљада тачака унутар просторне решетке. Растојање од 2 Å може се чинити као велико ако се узме у обзир да је разлика између атрактивних и репулзивних van der Waals-ових интеракција свега неколико десетих делова Å. Ипак растојање између тачака решетке у CoMFA условљено је тиме што захтевана процесорска снага рачунара, која се користи за израчунавање MIF, експоненцијално расте са смањењем растојања. И то је један од великих недостатака CoMFA методологије.

У CoMFA анализи, колекција структурно поравњаних молекула представља се у енергетским пољима проистеклим из интеракција са пробом, на различитим тачкама просторне решетке. Вредности енергија унутар поља упоређују се међу молекулима тренинг сета, и заједничке (блиске) вредности екстрахују се одговарајућим хемоинформатичким алгоритмима. Због тога се метода и назива *Упоредна анализа поља молекулских интеракција*. Енергије интеракција израчунавају се помоћу проба из Tiptos поља сила. По аутоматском подешавању, пробни атоми су sp^3 хибридизовани атоми угљеника са ефективним радијусом од 1,53 Å и наелектрисањем + 1,0, помоћу којег се рачунају стерне интеракције, односно H^+ проба којом се рачунају електростатичке интеракције и интеракције водоничних веза, јер је протон истовремено и дозор и акцептор водоничне везе. Могуће је користити и молекул воде као пробу или липофилну пробу. Како је већ назначено, проба током интеракције са биомолекулом мења своје место, односно креће се по свакој од тачака просторне решетке.

Израчунате енергије смештају се у матрицу поља молекулских интеракција. Сваки ред у матрици одговара једном молекулу, док свака колона одговара вредности енергије интеракција измерене на одређеној тачки просторне решетке. Уколико постоји L тачака унутар мреже (енг. lattice points) и P проба, онда постоји $L \times P$ колона. Финална колона која се додаје одговара вредностима активности молекула (Слика 2.12).



Слика 2.12. Антагонисти VKORC1 смештен у CoMFA просторну решетку и израчунавање поља молекулских интеракција.

Када се успоставе интеракције између биомолекула и пробе, могуће је дефинисати општу CoMFA једначину која успоставља корелацију између врсте пробног атома и броја тачака просторне решетке (јед. 2.7):

$$\text{Активност} = C + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^P c(i,j) s(i,j) \quad (2.7)$$

где су P пробни атоми, N број тачака унутар просторне решетке, C је константа, коефицијент $c(i,j)$ одговара позиционирању пробе j на тачки просторне решетке i , коефицијент $s(i,j)$ јесте вредност енергије која се добија по позиционирању пробе.

По дефинисању пробе, стандардна 6-12 Lennard-Jones функција користи се за рачунање вредности стерних енергија, док се електростатичке интеракције рачунају на основу Coulomb-овог закона. Нагиб Lennard-Jones-ових потенцијала је веома стрм и налази се у близини van der Waals-ове површине биомолекула. Због тога се вредност потенцијалне енергије на тачкама решетке у близини биомолекула значајно мења. Овај феномен имплицира да и тривијална промена у структури биомолекула попут мењања позиције молекула у просторној решетки или конформациона промена функционалне групе може довести до великих разлика у вредностима стерних енергија. Надаље, Lennard-Jones-ови и Coulomb-ови потенцијали показују сингуларитет (изузетно и неприхватљиво велике вредности) на тачкама просторне решетке које одговарају

позицијама атома биомолекула. Да би се превазишли сви ови проблеми у CoMFA, у анализама се узимају вредности стерних и електростатичких енергија унутар границе од ± 30 kcal/mol.

Метода која је покушала да исправи неке недостатке CoMFA јесте *Упоредна анализа индикатора сличности молекула* (енг. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis, CoMSIA). Метода се комерцијално дистрибуира уз CoMFA унутар SYBYL-X/Certara софтвера. У CoMSIA методологији индикатори сличности молекула израчунавају се из модификованих SEAL поља сличности која као дескрипторе симултано користе стерне, електростатичке, хидрофобне, и енергије стварања водоничних веза. Индикатори сличности процењују се индиректно упоређивањем сличности сваког од молекула у тренинг сету са пробним атомом као за CoMFA анализу. За рачунање сличности на свакој од тачака просторне решетке узима се у обзир заједничко растојање између пробног атома и атома биомолекула. Молекулске особине из растојања рачунају се помоћу Gaussian-ове функције. Пошто су Gaussian-ове функције глатке и не тако стрме као Coulomb-ови и Lennard-Jones-ови потенцијали, не постоји потреба за дефинисањем максималних и минималних вредности енергија. Gaussian-ове функције имају тенденцију да продукују вредности енергија са разумним опсегом, чак и у случају преклапајућих атома.

Сходно објашњеним принципима, генерисање CoMFA и CoMSIA модела антикоагулативне активности деривата **2a-h** започето је учитавањем претходно поравњаних лигананда у програму Sybyl-X. CoMFA дескриптори сачињени од стерних и електростатичких поља израчунати су на свакој од тачака просторне решетке чије је међусобно растојање 2 Å. Поља молекулских интеракција простирала су се до растојања од 4 Å, у све три димензије. Потенцијали van der Waals-ових и Coulomb-ових интеракција, који представљају стерна и електростатичка поља, израчунати су помоћу Tripos поља сила. У CoMFA методи, sp^3 хибридизовани атом угљеника коришћен је као пробни атом, на основу кога су израчунате јачине стерних и електростатичких поља. Вредности енергија стерних и електростатичких поља ограничене су на максималне вредности од 30 kcal/mol. Стерни, електростатички, хидрофобни и потенцијали поља донора и акцептора водоничних веза у CoMSIA методи израчунати су на свакој од тачака просторне мреже на растојању од 2 Å. Пробни угљеников атом са наелектисањем +1 имао је радијус од 1 Å и поседовао је хидрофобне и особине грађења

водоничних веза +1. Фактор опадања свих мерених величина по тачки просторне мреже за обе методе био је 0,3.

2.9.5.2. АНАЛИЗА ПРИНЦИПИЈЕЛНИХ КОМПОНЕНТИ

Анализа принципијелних (главних) компоненти (енг. Principal Component Analysis, PCA) јесте техника тзв. машинског учења (енг. machine learning) којом се елимишу оне вредности енергија унутар поља молекулских интеракција, које не доприносе активности, а самим тим и генерисању 3-D QSAR модела. Једна је од најзначајнијих метода тзв. мултиваријантне статистичке анализе. Мултиваријантна статистичка анализа (енг. Multivariate statistical analysis) јесте сет статистичких метода које се користе за анализу матрица које садрже биолошке или хемијске информације помоћу регресионе анализе или технике препознавања образаца.

Елиминација непотребних вредности енергија врши се тражењем корелације између вредности самих енергија поља молекулских интеракција као независних варијабли. Корелација се генерише у циљу откривања латентних варијабли, односно скривених вредности енергија унутар MIF, које ће касније пружити основу за успостављање корелације са биолошком активношћу. Другим речима, PCA тражи образце који повезују латентне варијабле са вредностима енергија унутар мултидимензионалне матрице поља молекулских интеракција. Препознавање образаца (енг. Pattern Recognition) је идентификација образаца унутар велике количине података.

По проналажењу образаца, латентне вредности енергија се манифестују као линеарне комбинације вредности енергија MIF унутар мултидимензионалне матрице, а све са циљем повећања варијансе система. Такве комбинације називају се принципијелне (главне) компоненте. Ако се примени на вредности енергија унутар поља молекулских интеракција, варијанса представља просечно квадратно одступање од просечне вредности енергија (јед. 2.8). Интегралну компоненту варијанце чини квадратна вредност разлике између стварне вредности једне од енергија MIF и средње вредности свих енергија MIF; PCA се заправо заснива на квадратној вредности такве разлике, уз услов да је та разлика што мања. У даљем тексту ова зависност ће бити подробније објашњена.

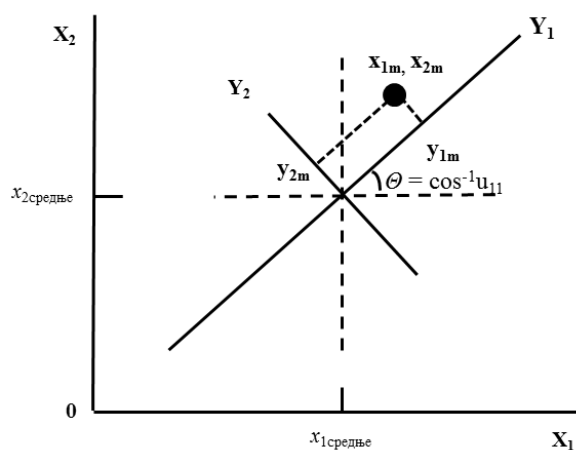
$$s^2 = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n} \quad (2.8)$$

Ако се вредности енергија MIF које креирају принципијелну компоненту сматрају под-системом унутар поља молекулских интеракција, онда латентне варијабле као принципијелне компоненте представљају главне енергетске особине тог под-система. Грубо речено, принципијелне компоненте јесу заправо вредности енергије поља молекулских интеракција које репрезентују већину енергија унутар MIF. PCA открива нови сет вредности које имају неке специјалне особине, а то су да највећи део варијанце енергија поља молекулских интеракција може бити објашњен са малим бројем принципијелних компоненти. Поставља се питање како се успоставља линеарна зависност између латентне варијабле и варијабли унутар принципијелне компоненте?

PCA анализа је математичка метода пројекције која омогућава апроксимацију почетне мултидимензионе матрице X, која садржи све вредности енергија MIF, у један дводимензионални простор. Ова изузетно компликована математичка поставка заправо то и није ако се илуструје графички. На једном једноставном под-систему кога чине две енергије x_1 и x_2 из поља молекулских интеракција, односно матрице X, важи да су почетне вредности овог локалног дводимензионалног координативног система (0, 0); абсцису формира енергија x_1 , ординату енергија x_2 . Ове две енергије заједно формирају координатни систем, где средину сваке од оса чини средња вредност енергија x_1 и x_2 . Анализа принципијелних компоненти може се схватити као ротирање оса оваквог координатног система до нових оса које су нормалне (ортогоналне) у односу на оригиналне и које се називају принципијелне осе. Смер принципијелних оса координира са смером максималне варијације енергија које су забележене у оригиналном координатном систему.

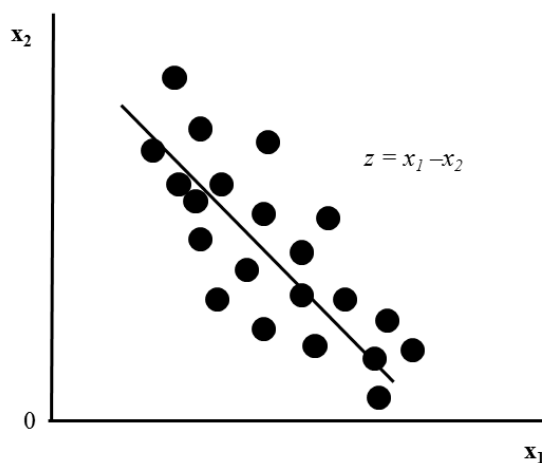
Иницијална анализа извршава се пројекцијом вредности енергија на принципијелну осу. Тако, вредност енергије y_{1m} пројекција је вредности енергија x_1 и x_2 , на принципијелну осу O1, уз поштовање одредбе да пројекција енергија може да се изврши ако постоји минимална разлика између вредности енергија x_1 и x_2 у односу на средње вредности тих енергија. Другим речима, пројекција се врши ако постоји највећи могући допринос варијанси. Стога је принципијелна оса смер пројекције максималне варијације пројектованих вредности оригиналних енергија. Аналогно, вредност енергије y_{2m} је пројекција вредности енергија x_1 и x_2 на принципијелну осу O2, која је ортогонална (нормална) на осу O1. Вредности енергија y_{1m} и y_{2m} представљају

результате анализе принципијелних компоненти за пројекцију $X_1 = (x_1, x_2)^T$. Са графика се даље може видети да је вредност угла који формирају енергија x_1 и принципијелна оса $O1$ једнака θ , те да косинус угла θ даје прву компоненту u_{11} ајгенвектора (енг. eigenvector) који одговара принципијелној оси $O1$. Ајгенвектор представља количину варијанце израчунате преко фактора θ .



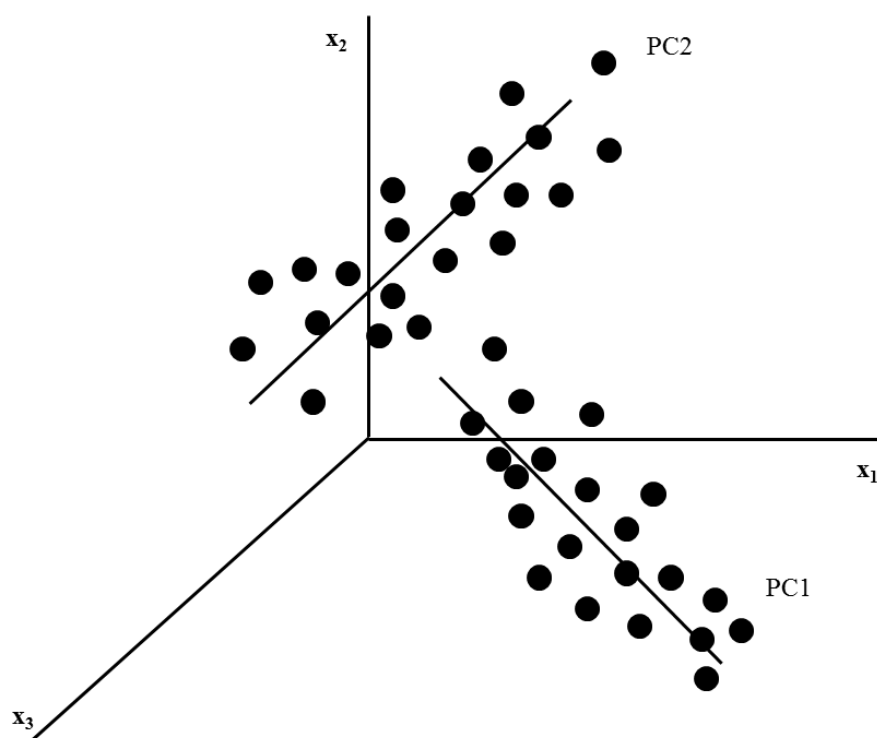
Слика 2.13. Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија на принципијелне осе.

У реалним условима, односно унутар поља молекулских интеракција, x_1 и x_2 представљају векторе енергија блиских вредности. Између енергија које чине векторе x_1 и x_2 обично постоји висок ниво корелације (Слика 2.14). Варијанса између ових вектора може да се објасни увођењем једног новог вектора z који је линеарна комбинација вектора x_1 и x_2 (односно $pc = x_1$ и x_2). Таква нова варијабла pc назива се принципијелна компонента.



Слика 2.14. Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија на прву принципијелну осу.

Ако се овом координатном систему дода и трећи вектор из матрице X , x_3 , формира се исечак просторне решетке MIF, који представља простирање енергија у три димензије. На сличан начин претходно описаном, врши се пројекција енергија из вектора на принципијелне осе. У таквом координатном систему добија се наредна принципијелна компонента која мора бити потпуно независна (без корелације) у односу на претходну, а самим тим и нормална (ортогонална) у односу на прву принципијелну компоненту. Наредна (трећа, четврта, n -та...) принципијелна компонента описује варијансу коју није могла да опише претходна, а све са циљем смањивања димензионалности система.



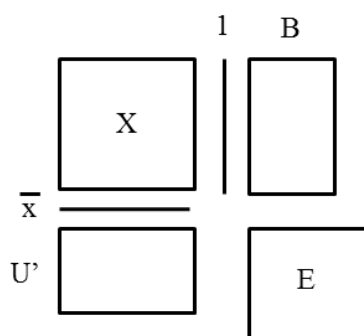
Слика 2.15. Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија на две принципијелне компоненте.

Димензионалност (енг. Dimensionality) сета података (вредности енергија поља молекулских интеракција) представља број варијабли (принципијелних компоненти) којим се описује свака зависност (објекат) унутар система. По разумевању природе принципијелних компоненти, може се представити математички модел помоћу кога се оне израчунавају. Тако, X матрица молекулских дескриптора (вредности енергија MIF) може да се представи као $N \times I$ матрица, где је N број молекула тренинг сета а I број дескриптора. Средња вредност енергија X матрице, \bar{x} , израчунава се из укупно i

енергија. Током РСА, мултидимензионална матрица X разлаже се на две мање матрице B и U (Слика 2.16, јед. 2.9):

$$X = 1\bar{x} + BU' + E \quad (2.9)$$

где је са 1 означен вектор колоне матрице у коме сви елементи имају јединичну вредност, \bar{x} представља вектор реда матрице, где је сваки од елемената средња вредност сваке од енергија MIF, B матрица јесте такозвана матрица погодака (енг. scores matrix) и представља позицију једињења тренинг сета у новом координатном систему које чине принципијелне компоненте. Са друге стране, U матрица јесте тзв. матрица оптерећења (енг. loadings matrix) чије колоне описују како су нове осе, тј. принципијелне компоненте, генерисане из старих. Улога матрица B и U је да екстрахују све есенцијалне информације из матрице X .



Слика 2.16. Декомпозиција оригиналне матрице поља молекулских интеракција.

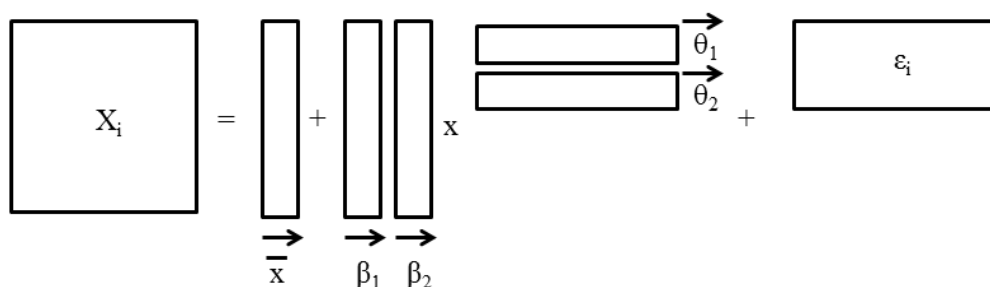
Поступак екстракције података помоћу РСА своди се на раздвајање тоталне варијансе података унутар матрице X . Шта то заправо значи? Унутар матрице B чувају се квадратне вредности разлика у енергијама између i -те енергије x_i и средње вредности \bar{x} , тј. елемент варијансе $(x_i - \bar{x})^2$. У матрици U се, са друге стране, чувају коефицијенти који описују како се x_i вредности пројектују у односу \bar{x} на такозвану принципијелну осу. Матрица E представља насумични део који описује не-систематичну варијацију.

Преведено на мало компликованији језик математике, матрица B колекционира вредности доминантних енергија унутар матрице X , односно податке који варирају само у вредностима i ; вредности енергија који варирају унутар матрице означавају се са β_i и називају се погоци (енг. scores). Са друге стране, помоћу матрице U дефинишу се обрасци који описују како су вредности енергија x_i међусобно повезане и

комплементарне у матрици В. Параметри који описују међусобну повезаност означени су са θ_i и називају се фактори или оптерећења (енг. loadings), те они чине основу за генерисање принципијелних компоненти. Остаци енергија представљају матрицу Е, односно матрицу остатака који нису објашњени главним моделом. Математичко представљање модела приказано је кроз једначину:

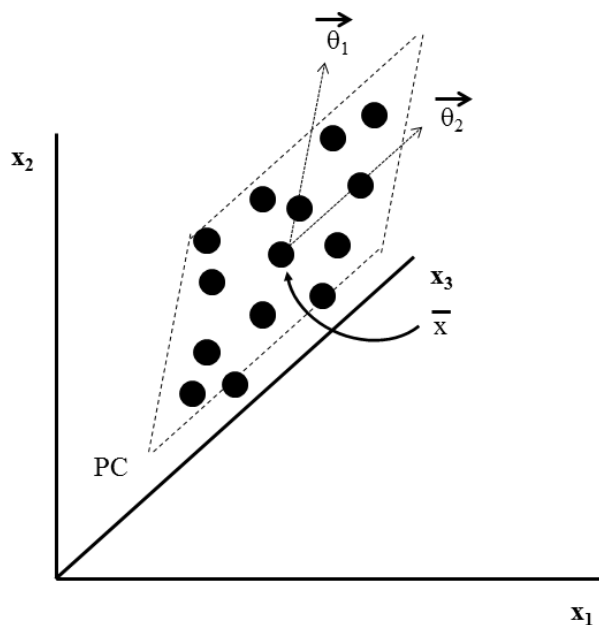
$$x_i = \bar{x} + \sum_{i=1}^n \beta_i \theta_i + \varepsilon_i \quad (2.10)$$

У смислу генерисања приципијелних компоненти, производ коефицијената погодака β_i и оптерећења θ_i једнак је броју принципијелних компоненти и довољан је за описивање модела. Алтернативно графичко представљање докомпозиције матрице X које укључује оптерећења и факторе представљено је на Слици 2.17.



Слика 2.17. Декомпозиција оригиналне матрице поља молекулских интеракција.

У тродимензионалном систему поља молекулских интеракција, коефицијенти θ_i , односно оптерећења, одређују смер простирања резултујућег вектора, који пролази кроз средње вредности енергија \bar{x} , у односу на координатне осе. Резултујући вектор јесте приципијелна оса за три вектора енергије, а пројекције енергија око осе са вредношћу која је минимална у односу на средње вредности јесу латентне, односно условно скривене, вредности енергија (Слика 2.18). Вредности енергија које се пројектују до латентних вредности, поштујући услов повећања варијансе, чине приципијелну компоненту 1, PC1. Стандардна девијација резидуалног вектора ε_i јесте ортогонална дистанца између вредности енергија и равни прве приципијелне осе, и указује на смер формирања следеће приципијелне компоненте. Другим речима, PC2 формирају енергије које нису могле да се изразе преко латентних варијабли унутар PC1. Принципијелна компонента 3 формира се ортогонално у односу на PC2, PC4 ортогонално у односу на PC3, и тако даље.



Слика 2.18. Идеализован приказ пројекције вредности вектора енергија на принципијелне осе.

Последично, РСА смањује димензионалност матрице X у циљу екстракције стварног и што мањег броја варијабли x које касније доприносе активности. Циљ анализе је да се узме x_i варијабли (x_1, x_2, \dots, x_i) и да се пронађе комбинација истих, да би се израчунале нове варијабле (принципијелне компоненте PC_1, PC_2, \dots, PC_i) које међусобно нису у корелацији и које ће описивати варијације података. Да би се формирала једна принципијелна компонента, тежи се да разлика између x_i и \bar{x} буде што мања. Циљ је да се што већи део варијација оригиналних података адекватно опише у једној главној принципијелној компоненти, јер са повећањем броја x_i варијабли укупни збир елемената варијансе $(x_i - \bar{x})^2$, односно сама варијанца унутар принципијелне компоненте постаје већа, што је и циљ анализе. Непостојање корелације унутар прве принципијелне компоненте значи да x_i вредности које не припадају тој принципијелној компоненти постају конституенти друге „димензије“ података, односно да припадају следећој, ортогоналној принципијелној компоненти. Циљ РСА анализе је да опише укупну варијансу система са свега неколико главних компоненти.

Варијансе података поређане су по опадајућем реду: $s^2(PC1) \geq s^2(PC2) \geq \dots \geq s^2(PC_p)$. Прва оса, односно прва принципијелна компонента ($PC1$), описује максимум варијације унутар целог поља молекулских интеракција сета података; она представља правац највеће варијансе. Друга принципијелна компонента, која је ортогонална и линеарно независна у односу на $PC1$, описује максимум преостале варијансе, $PC3$ као

ортогонална описује преосталу варијансу у односу на PC2, и тако даље (Слика 2.15). Свака наредна принципијелна компонента мора бити ортогонална у односу на претходну да би да описала варијанцу која је претходно није описана нижом принципијелном компонентом.

Анализа почиње са подацима x варијабли и i јединица посматрања. Прва главна компонента је тада линеарна комбинација оригиналних варијабли x_1, x_2, \dots, x_i (јед. 2.11 до 2.13):

$$PC1 = c_{11} x_1 + c_{12} x_2 + \dots + c_{1i} x_i \quad (2.11)$$

$$PC2 = c_{21} x_1 + c_{22} x_2 + \dots + c_{2i} x_i \quad (2.12)$$

...

$$PCn = c_{n1} x_1 + c_{n2} x_2 + c_{ni} x_i = \sum_{i=1}^n c_{ni} x_i \quad (2.13)$$

где су PC_n n -та принципијелна компонента, c_{ni} коефицијент дескриптора x , i број дескриптора. Додатни услов је да изведене варијабле PC1 и PC2, односно претходна и наредна принципијелна компонента имају корелацију нула. У једначини, коефицијенти c представљају ајгенвекторе, и неопходно је да буде задовољен услов (јед. 2.14 до 2.16):

$$c_{11}^2 + c_{12}^2 + \dots + c_{1i}^2 = 1 \quad (2.14)$$

$$c_{21}^2 + c_{22}^2 + \dots + c_{2i}^2 = 1 \quad (2.15)$$

...

$$c_{n1}^2 + c_{n2}^2 + \dots + c_{ni}^2 = 1 \quad (2.16)$$

Варијанца изведене променљиве PC_n , $s^2(PC_n)$, је због постављеног услова максимална. Наведени услов је постављен, јер би без њега $s^2(PC_n)$ могла да се повећава једноставним повећавањем било које од вредности c_{ni} .

Како разумети шта су то ајгенвектори принципијелних компоненти? Саме принципијелне компоненте су израчунате из матрице варијанце-коваријанце; ако се X матрица поља молекулских интеракција представи као $N \times I$ матрица, где је N број молекула тренинг сета а I број дескриптора, онда матрица варијанце-коваријанце $N \times N$ постаје XX^T матрица, односно производ оригиналне и транспоноване матрице. Ајгенвектори овакве матрице јесу коефицијенти c_{ni} принципијелних компоненти и они формирају симетричну матрицу (јед. 2.17):

$$C = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & \dots & c_{1i} \\ c_{21} & c_{22} & \dots & \dots & c_{2i} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ c_{n1} & c_{n2} & \dots & \dots & c_{ni} \end{bmatrix} \quad (2.17)$$

У матрици C ајгенвектора дијагонални елементи c_{ni} представљају варијансу оригиналних вредности енергија MIF x_i , односно ајгенвредности матрице C . Ајгенвредност која се обележава са λ_i јесте варијанса главне компоненте PC_i , односно $\lambda_i = s^2(PC_i)$ и представља мерило колико се вредности енергија поља молекулских интеракција разликују од средњих вредности енергија. Из овакве дефиниције варијанце следи да прва принципијелна компонента објашњава максимум варијанце и одговара највећој ајгенвредности; друга принципијелна компонента одговара другој највећој ајгенвредности итд. Свака ајгенвредност индицира пропорцију варијансе која је објашњена сваком принципијелном компонентом. Постоји m ајгенвредности, од којих су неке нула. Из ајгенвредности се израчунава тотална фракција варијанси у систему (јед. 2.18)

$$f = \sum_{i=1}^m \lambda_m / \sum \lambda_m \quad (2.18)$$

Важна особина ајгенвредности је да је њихов збир једнак збиру елемената на дијагонали матрице (јед. 2.19):

$$\lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_i = c_{11} + c_{22} + \dots + c_{ni} \quad (2.19)$$

Из ове једначине произилази да је сума варијанси оригиналних варијабли једнака суми варијанси изведених варијабли. То значи да главне компоненте обухватају све варијације оригиналних података, што је и смисао анализе принципијелних компоненти. Да нека од оригиналних варијабли не би имала прејак утицај на главне компоненте и стварала пристрасност резултата, врши се њихово кодирање, тако да имају аритметичку средину нула и варијанцу једнаку јединици. Другим речима, израчунавају се стандардизоване вредности из оригиналних података. Матрица C тада има следећи облик (јед. 2.20):

$$C = \begin{bmatrix} 1 & c_{12} & \dots & \dots & c_{1i} \\ c_{21} & 1 & \dots & \dots & c_{2i} \\ \dots & \dots & 1 & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & 1 & \dots \\ c_{n1} & c_{n2} & \dots & \dots & 1 \end{bmatrix} \quad (2.20)$$

У овој матрици је $c_{in}=c_{ni}$. Другим речима, анализа главних компоненти је изведена на корелационој матрици. У том случају, сума дијагоналних елемената, тиме и сума ајгенвектора, једнака је броју оригиналних варијабли (i). Елементи ван дијагонале јесу коваријанса оригиналних вредности енергија. Алгоритам којим се анализа изводи:

1. Врши се стандардизација оригиналних података тако да оригиналне варијабле имају аритметичку средину једнаку нули и варијансу једнаку јединици.
2. Израчунава се матрица коваријанси C .
3. Израчунавају се ајгенвредности $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$ и одговарајући ајгенвектори c_1, c_2, \dots, c_i . Главна компонента је тако исказана преко коефицијента c и варијансе λ_i .
4. Компоненте које се у моделу односе на малу пропорцију варијација података се елиминишу. На пример, ако прве две компоненте објашњавају 95% варијансе, онда се све остале елиминишу. Тада су прве две компоненте заправо главне компоненте.

Иако није уобичајено, принципијелне компоненте могу се понекад искористити да би се преко њих израчунала корелација са биолошком активношћу Y . У том случају, релација активности може да се изрази на следећи начин (јед. 2.21):

$$Y = a_1PC_1 + a_2PC_2 + a_3PC_3 + \dots \quad (2.21)$$

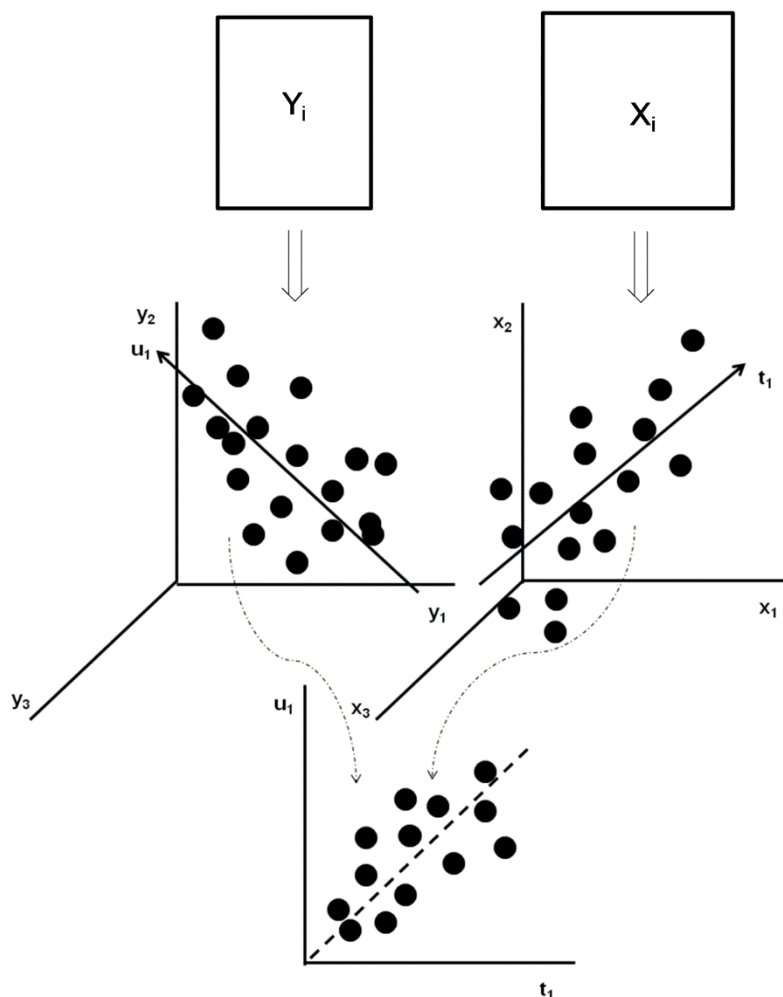
Ипак, традиционално се вредности енергија поља молекулских интеракција, које се пројектују унутар оптималне принципијелне компоненте, подвргавају методи пројекције латентних структура, у циљу успостављања тродимензионалне корелације између енергија поља молекулских интеракција и активности, односно генерисања 3-D QSAR модела.

2.9.5.3. ПРОЈЕКЦИЈЕ ЛАТЕНТНИХ СТРУКТУРА

Пројекција латентних структура (енг. Projection of Latent Structures или Partial Least Squares, PLS) јесте метода која из поља молекулских интеракција генерише 3-D QSAR модел. Пројекција латентних структура робустна је мултиваријантна метода регресионе анализе, која пројекцијом сумира мноштво колинеарних варијабли. Експеримент се конципира на тај начин да PLS анализа екстрахује из оптималне принципијелне компоненте поља молекулских интеракција управо оне вредности енергија које најбоље предвиђају активност молекула тренинг сета.

Без обзира на ограничења, пре свега унутар CoMFA методологије, PLS је статистичка метода која, када се примењује у молекулском моделирању и компјутационој хемији, доприноси израчунавању квантитативне зависности између енергија поља молекулских интеракција (X блок варијабли) и биолошке активности молекула тренинг сета (Y блок варијабли). За разлику од PCA, PLS не објашњава само варијацију енергија поља молекулских интеракција, већ и варијацију биолошке активности. Успостављањем квантитативне корелације између блокова варијабли, могуће је екстраховати сет вредности енергија MIF (генерисати нови блок енергија унутар поља молекулских интеракција), помоћу којег ће се предвидети биолошка активност молекула тренинг сета. Процедура је таква да PLS анализа врши селекцију вредности енергија поља молекулских интеракција складиштених у најоптималнијој принципијелној компоненти која чини X блок варијабли и укључује их у линеарну регресиону анализу облика $y = ax + b$ којом се исказује биолошка активност. Сет селектованих варијабли се, очекивано и аналогно са PCA, назива PLS компонента. Као и код сваке линеарне регресионе анализе, циљ је добити коефицијенте које повезују независне варијабле (X блок) са зависним варијаблама (Y блок) те је лако разумети да је срж 3-D QSAR методологије заправо PLS анализа, односно генерисање тзв. *PLS-коефицијената* који и успостављају корелацију између вредности енергија које описују биомолекул-молекулска мета интеракције и саме биолошке активности која проистиче из такве интеракције.

Иако математички врло компликовани, принципи који стоје иза PLS анализе једноставни су и лаки за разумевање ако се представе графички (Слика 2.19).



Слика 2.19. Прва компонента мултиваријантног PLS модела састоји се од две линије, једна у X-простору (t_1) и једна у Y-простору (u_1). Свака линија даје добру апроксимацију вредности енергија MIF и биолошке активности, али такође доприноси максималној интеркорелацији. Латентне варијабле које су добијене пројекцијом вредности енергија и биолошке активности могу се изразити у дводимензионалном простору. Уколико постоји корелација између x и y вредности, корелација би требала да буде око нагиба праве.

Метода се, слично PCA, своди на пројекцију два тродимензионална простора, односно вредности биолошке активности и енергија поља молекулских интеракција, у нови дводимензионални простор који ће најбоље исказати корелацију између активности и енергија MIF. Наиме, два блока варијабли математички су изражена помоћу две матрице X и Y . Матрице се формирају на основу тога што унутар X блока, односно оптималне принципијелне компоненте, постоји I вредности енергија MIF, док унутар Y блока постоји J вредности биолошке активности, по једна активност за свако од једињења тренинг сета. Број експеримената који се могу извршити PLS анализом

унутар X и Y матрица једнак је броју једињења тренинг сета N . Према томе, X блок јесте $N \times I$ матрица док је Y блок $N \times J$ матрица.

Укупно I вредности енергија у X матрици креираће I -димензионални X простор, док ће, аналогно претходном, J вредности биолошке активности формирати J -димензионални Y простор. Суштина PLS анализе јесте да из I -димензионалних и J -димензионалних простора екстрахује рој од N тачака у сваком од простора. Тај скуп нових варијабли пројектује се унутар новог дводимензионалног простора који представља корелацију између I -димензионалних и J -димензионалних простора. Другим речима, алгоритам је такав да PLS анализа симултано врши моделирање варијансе вредности биолошке активности унутар Y простора, те моделирање варијансе вредности енергија MIF у X простору са циљем да пронађе N вредности (кофицијената) које међусобно повезују варијације у Y и X просторима (Слика 2.19).

Процес моделирања варијансе идентичан је оном у PCA, што значи да су пре PLS анализе вредности енергија и биолошких активности обично центриране око својих средњих вредности и скалиране. Простор који сумира N вредности назива се PLS компонента. Процес моделирања такође подразумева и пројекцију N коефицијената у PLS компоненте. Пројекције се врше тако што се најпре унутар Y блока изврши PLS анализа којом се сумира варијанца биолошке активности око нове осе u_1 , да би се потом унутар X блока извршила PLS анализа којом се сумира варијанца енергија поља молекулских интеракција око нове осе t_1 (Слика 2.19). Две новоформиране осе креирају нови дводимензионални простор и, сходно томе, у њега преносе варијансу биолошке активности и енергија MIF из оптималне PC. По преносу варијансе, циљ је формирати нову осу, тј. PLS компоненту (рој од N вредности коефицијената корелације), такву да описује како варијансе око u_1 и t_1 оса тако и међусобну повезаност оса. Свака новоформирана PLS компонента n мора бити таква да PLS резултати унутар Y блока, означени са u_n , морају да буду у максималној корелацији са резултатима за X блок, означеним са t_n (Слика 2.19).

Када се линеарна регресиона зависност између биолошке активности и енергија MIF из оптималне PC успостави, PLS модел проналази A нових, латентних („скривених”) варијабли које се називају X -погоди (енг. X -scores) и који су заправо изражени са t_{ia} ($a = 1, 2, \dots, A$). Ови погоди су линеарне комбинације оригиналних вредности енергија x_i поља молекулских интеракција унутар оптималне приципијелне

компоненте, при чему се коефицијенти који описују корелацију између пројектованих вредности t_{ia} унутар PLS компоненти и вредности x_i називају коефицијенти значајности или тежински коефицијенти (енг. weights), w_{ia}^* ($a = 1, 2, \dots, A$) (јед. 2.22).

$$t_{ia} = \sum_k w_{ia}^* x_{ia} \quad (2.22)$$

У математичком смислу, латентне варијабле јесу линеарне комбинације вредности енергија при чему коефицијент корелације јесте тежински коефицијент (јед. 2.23 до 2.25).

$$t_1 = w_{11} x_1 + w_{12} x_2 + \dots + w_{1i} x_i \quad (2.23)$$

$$t_2 = w_{21} x_1 + w_{22} x_2 + \dots + w_{2i} x_i \quad (2.24)$$

...

$$t_i = w_{n1} x_1 + w_{n2} x_2 + w_{ni} x_i = \sum_{i=1}^n w_{ni} x_i \quad (2.25)$$

Укупан број латентних варијабли који се може генерисати увек је мањи од броја x варијабли. Као и код PCA, латентне варијабле ортогоналне су једна на другу. Ипак, када се рачунају латентне варијабле, PLS анализа узима у обзир не само варијансу x варијабли већ и то како варијанса утиче на вредности у варијабли.

Прва латентна варијабла t_1 линеарна је комбинација x вредности које дају добро објашњење варијансе у x -простору, слично PCA. Помножена са коефицијентом a_1 , латентна варијабла даје добру апроксимацију варијацији у вредности. Стога би график израчунатих у вредности у односу на $a_1 t_1$ требало да представља праву линију. Коефицијент a_1 заправо представља неколико различитих коефицијената који множе латентну варијаблу. Порекло и значај свих тих коефицијената спознаће се након математичког представљања PLS анализе у тексту који следи. Разлике између експерименталних и предвиђених вредности биолошке активности називају се остаци и представљају варијанцу која није објашњена моделом.

По предвиђању биолошке активности, формира се друга латентна варијабла, ортогонална на прву. Она објашњава више варијансе унутар x димензије и омогућава

побољшање предвиђања биолошке активности па би корелација између y вредности и $a_1t_1 + a_2t_2$ требала да показује још бољу корелацију. Предвиђање активности се даље побољшава трећом латентном варијаблом и тако даље.

Предвиђање биолошке активности тренинг сета PLS моделом, као што је приказано на Слици 2.19, може се објаснити на следећи начин: свака енергија x_i унутар X матрице пројектује се у прву PLS компоненту да би се добио погодак t_{1i} . Из корелације, која се назива унутрашња релација, добија се одговарајући погодак u_{1i} из Y блока који је такође конституент PLS компоненте. Овај погодак у Y простору представља предвиђену y_i вредност биолошке активности. Када се предвиђена вредност добије, она се упоређује са својом експерименталном вредности из Y матрице. Оваквом пројекцијом постигнут је и циљ 3-D QSAR студије, а то је да се предвиди биолошка активност неког од једињења тренинг сета.

Чак и када се генерише прва PLS компонента, постоји могућност додатне систематске варијације унутар Y простора која се мора објаснити следећом PLS компонентом, слично као код PCA. Анализом се у тренутку обухвата по једна димензија, све до потпуног објашњења систематске варијанце вредности биолошке активности унутар Y простора. Квалитет модела може се одредити тзв. унакрсном корелацијом.

Сада када је објашњен смисао PLS анализе, ваља објаснити и како се она математички изводи. Пре старта анализе, подаци се, као што је већ назначено, центрирају и скалирају у X и Y матрице. Скалирање се обично врши до јединичне варијансе. PLS модел дефинисан је декомпозицијом X и Y матрица на нове матрице погодака (енг. scores matrices) и матрице оптерећења (енг. loadings matrices). Матрице се могу факторисати на следећи начин (једначине 2.26 до 2.30):

$$Y = TC' + F \quad (2.26)$$

$$Y = UC' + G \quad (2.27)$$

$$X = TP' + E \quad (2.28)$$

$$U = TD + H \text{ (унутрашња релација)} \quad (2.29)$$

$$W^* = W(P'W)^{-1} \quad (2.30)$$

У оваквој декомпозицији, матрице U и T су матрице вектора погодака (енг. score vectors), C' и P' су транспоноване матрице вектора оптерећења (енг. loading vectors), F и E су матрице остатака. Унутрашња релација која описује корелацију између Y простора и X простора дата је помоћу дијагоналне матрице D . Елементи дијагонале $\{d_{ii}\}$ коефицијенти су корелације за линеарну зависност између u_i и t_i . Матрица H је матрица остатака из такве корелације. Матрица W , односно матрица тежинских коефицијената, креира се током израчунавања PLS алгоритмом и користи се за рачунање T , P , U и C матрица. Сходно претходној дефиницији, вектори колоне (w_1, w_2, \dots, w_a), унутар W матрице, називају се вектори тежинских коефицијената и садрже PLS тежинске коефицијенте који описују допринос сваке од енергија поља молекулских интеракција x на опис систематске варијације унутар Y простора. Тако на пример $w_1 = [w_{11}w_{12} \dots w_{1a}]$ показује допринос енергија $x_1 - x_{1i}$ унутар прве PLS компоненте. Вектори тежинских коефицијената ортогонални су једни у односу на друге и нормализовани на јединичну вредност. Из ортогоналне природе тежинских коефицијената следи да и PLS компоненте морају бити ортогоналне једна у односу на другу.

На који начин се PLS анализа манифестује на једну 3-D QSAR студију? Помоћу X -погодака (t_{ia}) предвиђа се биолошка активност молекула тренинг сета. За мноштво вредности биолошких активности помоћу овакве Y -матрице креира се јединствен модел као линеарна комбинација X -погодака t_{ia} (јед. 2.31, 2.32):

$$y = a_1c_1t_1 + a_2c_2t_2 + \dots + a_ic_it_i \quad (2.31)$$

односно:

$$y_{im} = \sum a_{c_{ma}}t_{ia} + f_{im} \quad (2.32)$$

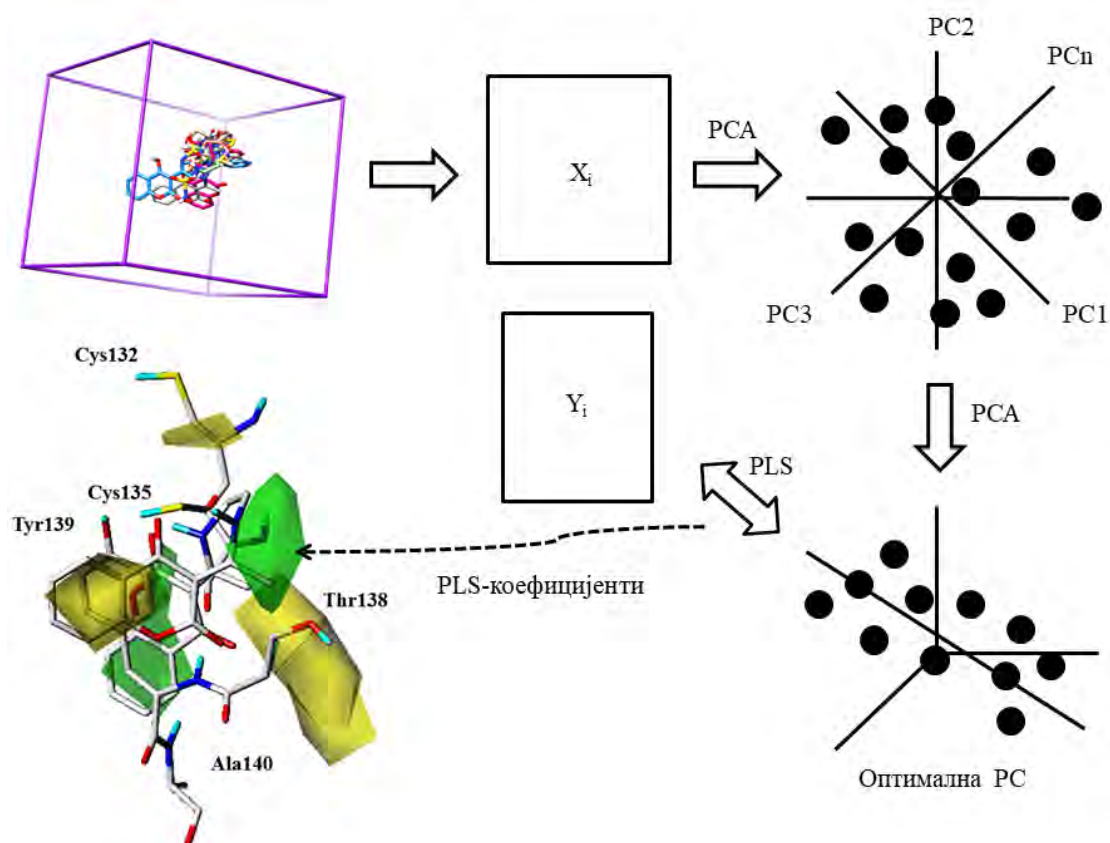
Математичка формулација овог израза представља управо матрицу $Y = TC' + F$. Остаци f_{im} представљају девијацију између биолошке активности и предвиђене активности и то су елементи резидуалне матрице F . Ако се израз за дескрипцију X -погодака (јед. 2.22) уврсти у претходну једначину, добија се следећи регресиони модел (јед. 2.33):

$$y_{im} = \sum a_{c_{ma}} \sum^k w_{ia}^* x_{ik} + f_{im} = \sum^k b_{mk} x_{ik} + f_{im} \quad (2.33)$$

Уколико се једначина (2.33) мало пажљивије погледа, лако је уочити да она представља линеарну једначину праве, облика $y = ax + b$. Из једначине могу се дефинисати тзв. PLS регресиони коефицијенти (вредности a у линеарној једначини праве), или скраћено *PLS-коефицијенти*, b_{mk} , као производ вектора оптерећења и вектора тежинских коефицијената (јед 2.34):

$$b_{mk} = \sum a c_{ma} w_{ia}^* \quad (2.34)$$

PLS-коефицијенти јесу и најважнији резултат PLS анализе, јер директно представљају коефицијенте који исказују корелацију између биолошке активности и вредности енергија поља молекулских интеракција.



Слика 2.20. Пројекција PLS-коефицијената у тродимензионалну просторну решетку.

PLS-коефицијенти настају из PLS анализе најоптималније принципијелне компоненте, те се пројектују унутар тродимензионалне просторне решетке у коју је смештен тренинг сет (Слика 2.20). Са Сlike 2.20 може се закључити да се PLS-коефицијенти, као корелациони коефицијенти, директно приказују на екрану монитора као 3-D QSAR модел, те се помоћу њих могу дефинисати функционалне групе које

доприносе повећавању биолошке активности и које је смањују. Обзиром да PLS-кофицијенти настају из предвиђања активности свих једињења тренинг сета, они представљају 3-D QSAR модел глобално, односно заједнички су за свако једињење тренинг сета.

Даљи квалитет PLS анализе јесте да се помоћу X-погодака такође могу израчунати и вредности самих енергија поља молекулских интеракција помоћу релације (јед. 2.35):

$$x_{ik} = \sum a t_{ia} p_{ak} + e_{ik} \quad (2.35)$$

Из једначине која представља матрицу $X = TP' + E$ може се закључити да се вредност енергије поља молекулских интеракција може изразити као производ вектора X-погодака (t_{ia}) и вектора оптерећења. Ово је јако значајно јер свака димензија анализе може бити подвргнута субтракцији, односно математичкој методи у којој се компонента $t_{ia} p_{ak}$ уклања из елемената x_{ik} . Овим се PLS модел може исказати преко тежинских коефицијената који указују на остатке претходне димензије E_{a-1} , уместо да се врши међусобна интер-релација између X-варијабли као код PCA. Сходно томе, једначина (2.22) постаје (2.36):

$$t_{ia} = \sum_k w_{ia}^* x_{ik} e_{ik,a-1} \quad (2.36)$$

$$e_{ik,a-1} = e_{ik,a-2} - t_{ia-1} p_{a-1k} \quad (2.37)$$

$$e_{ik,0} = x_{ik} \quad (2.38)$$

Ипак, тежински коефицијенти, који указују на претходну димензију, директно се могу трансформисати до w^* који дају директну везу са X (једначине 2.22 и 2.36). Повезаност две врсте тежинских коефицијената дата је матрицом $W^* = W(P'W)^{-1}$. PLS тежински коефицијенти W^* корисни су за селекцију хемијских варијабли на оне које утичу на биолошки одговор и оне које не. Такође, могу дати и одговор на питање које X-варијабле дају сличну и/или јединствену информацију о једињењима? На сличан начин тежински коефицијенти C откривају сличности између биолошких одговора.

PLS анализа може такође да израчуна и Y -поготке (u_a), који добро сумирају вредности биолошке активности у Y матрици ($Y = UC' + G$) (јед. 2.39):

$$y_{im} = \sum a u_{ia} c_{am} + g_{im} \quad (2.39)$$

На крају треба укратко представити и алгоритам којим се одвија PLS анализа. Анализа почиње са претпостављеним првим вектором поготка $u_{1(0)}$ Y блока, односно колоном у Y матрици са највећом варијацијом. Када се први вектор поготка дефинише, даљи кораци су:

1. Израчунавање тежинског вектора (нормализација, јед. 2.40):

$$w'_{1(0)} = u'_{1(0)} X \quad (2.40)$$

2. Израчунавање вектора поготка за X блок (јед. 2.41)

$$t_{1(0)} = X w_{1(0)} \quad (2.41)$$

3. Коришћење вектора поготка X блока за израчунавање вектора оптерећења Y блока (нормализација, јед. 2.42):

$$c'_{1(0)} = t'_{1(0)} Y \quad (2.42)$$

4. Коришћење вектора оптерећења Y блока за израчунавање унапређеног вектора поготка $u_{1(1)}$ Y блока (јед. 2.43):

$$u_{1(1)} = Y c_{1(0)} \quad (2.43)$$

5. Потврда конвергенције израчунавањем (јед. 2.44):

$$\frac{\|u_{1(0)} - u_{1(1)}\|}{u'_{1(1)}u_{(1)}} < 10^{-10} \quad (2.44)$$

6. Ако је критеријум конвергенције испуњен иде се на следећи корак, ако не, израчунавање се враћа на почетак, при чему се $u_{1(1)}$ користи као претпостављени вектор.
7. Након конвергенције, израчунавају се PLS оптерећења за X блок (јед. 2.45):

$$p'_1 = t'_{1(0)}X \quad (2.45)$$

8. Израчунавање првог корелационог коефицијента d_{11} унутрашње релације (јед. 2.46):

$$d_{11} = \frac{t'_1 u_1}{(t'_1 t_1)} \quad (2.46)$$

9. Уклањање варијације описане првом PLS компонентом и одређивање матрица E и F као матрица остатака (јед. 2.47 и 2.48):

$$E = X - t_1 p'_1 \quad (2.47)$$

$$F = Y - d_{11} t_1 c'_1 \quad (2.48)$$

10. Коришћење E и F матрица као почетних матрица за дефинисање следеће PLS димензије и повратак на први корак.

2.9.5.4. УНУТРАШЊА ВАЛИДАЦИЈА 3-D QSAR МОДЕЛА

Иницијална процена квалитета PCA/PLS регресионе анализе врши се унутрашњом валидацијом модела, помоћу корелационог квадратног коефицијента, r^2 , односно коефицијента унакрсне корелације, q^2 . Примарни задатак 3-D QSAR методе је да предвиди активност молекула из тренинг сета. Као улазни параметар за PLS анализу потребно је знати $Y_{\text{експериментално}}$, као вредност биолошке активности молекула, а излазни резултат PLS анализе јесте $Y_{\text{израчунато}}$, као главна вредност која се добија након

3-D QSAR анализе. Коефицијент који најпре описује однос између експерименталне и израчунате активности јесте квадратни корелациони коефицијент.

Вредност квадратног корелационог коефицијента је мерило квалитета регресије. Његова вредност може бити између 0 и 1 и указује на степен варијације вредности зависне варијабле, односно биолошке активности, која се добија линеарном PLS регресионом анализом. Математички, квадратни корелациони коефицијент може се исказати на следећи начин (јед. 2.49):

$$r^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{експериментално}} - Y_{\text{израчунато}})^2}{\sum(Y_{\text{експериментално}} - \bar{Y}_{\text{експериментално}})^2} \quad (2.49)$$

У једначини се поред $Y_{\text{експериментално}}$ и $Y_{\text{израчунато}}$ помиње и вредност $\bar{Y}_{\text{експериментално}}$ која представља средњу вредност експериментално добијених активности. Израчунате вредности биолошке активности добијају се PLS анализом помоћу једначине $y_{im} = \sum k b_{mk} x_{ik} + f_{im}$, користећи сва једињења и све вредности енергија које се добијају израчунавањем поља молекулских интеракција. Другим речима, квадратни корелациони коефицијент мерило је тачности поновног израчунавања вредности биолошке активности за сваки молекул тренинг сета понаособ. Ово је важно напоменути да би се направила разлика између квадратног коефицијента унакрсне корелације. У идеалном случају, разлика између експерименталних и израчунатих вредности била би 0 и вредност r^2 била би 1. Међутим, то се никада не дешава, те се за квалитетну регресиону анализу сматра она код које је вредност r^2 већа од 0,9 и ближи се 1 (Слика 2.21). Такав резултат објашњава да је преко 90% варијације биолошке активности настало усред варијације у вредностима енергије поља молекулских интеракција.

Шта заправо r^2 вредност представља? То је статистичко мерило колико се вредности биолошке активности добијених регресионом анализом разликују од оних поново израчунатих вредности линеарним PLS моделом. У самој једначини израз:

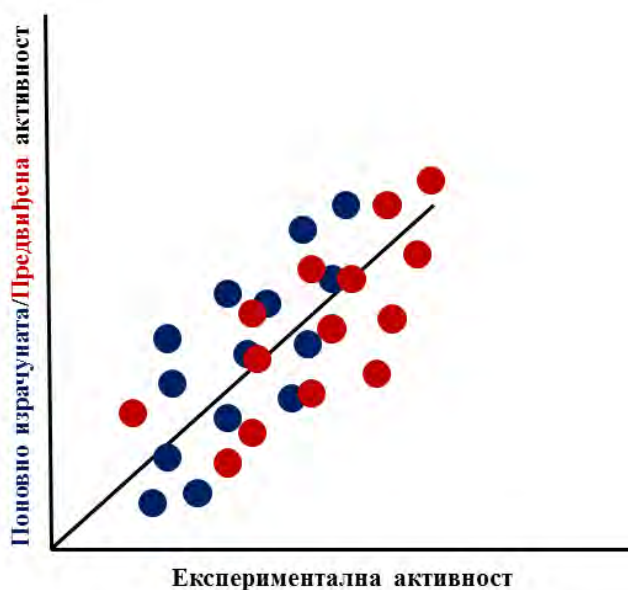
$$\sum (Y_{\text{експериментално}} - Y_{\text{израчунато}})^2$$

представља израчунату односно објашњену варијансу биолошке активности, док са друге стране израз:

$$\sum (Y_{\text{експериментално}} - \bar{Y}_{\text{експериментално}})^2$$

представља укупну варијансу биолошке активности. Сада се може разумети да вредност $r^2 = 0$ указује на то да 3-D QSAR модел није у могућности да објасни варијабилност у вредностима између експерименталне и израчунате активности око средње вредности активности, док $r^2 = 1$ указује да модел објашњава све варијације у предвиђеној активности око средње вредности. Што је вредност r^2 већа, то је модел моћнији.

Однос између вредности $Y_{\text{експериментално}}$ и $Y_{\text{израчунато}}$ компликован је и може се изразити графички (Слика 2.21):



Слика 2.21. Однос између израчунате и експерименталне биолошке активности.

Вредност квадратног корелационог коефицијента указује на то како се вредности израчунате биолошке активности уклапају у очекивани тренд експерименталних вредности биолошких активности. Вредност квадратног корелационог коефицијента указује на квалитет корелације, али не открива узрок који стоји иза релације између експерименталних и израчунатих вредности биолошке

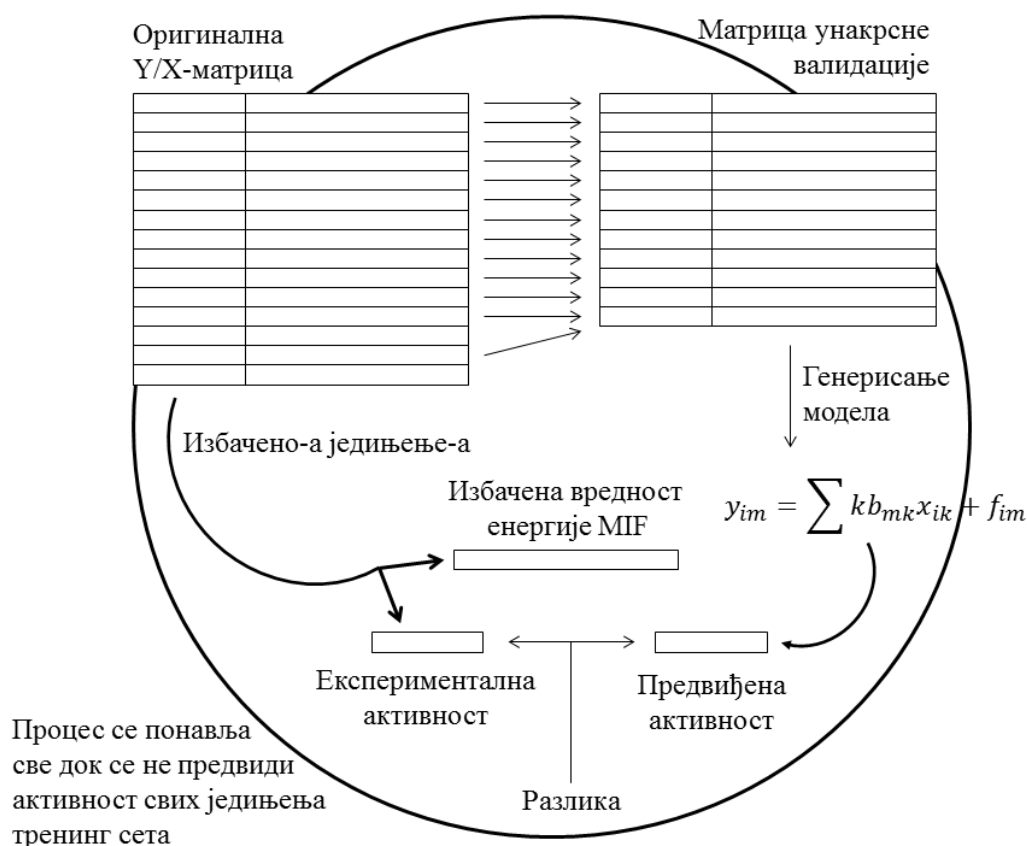
активности. Тај проблем се решава тзв. унакрсном корелацијом или валидацијом (енг. cross-validation). Унакрсна валидација подразумева насумично уклањање неколико једињења из тренинг сета, а самим тим и уклањање биолошке активности и вредности енергија поља молекулских интеракција тих једињења. По уклањању се генерише нови 3-D QSAR модел од преосталих једињења тренинг сета и помоћу таквог модела врши се предвиђање биолошке активности једињења која су уклоњена из тренинг сета. Значајно је поменути да се број принципијелних компоненти и PLS компоненти унутар свеобухватне анализе управо одређује након унакрсне валидације. Код унакрсне валидације добијамо предвиђену вредност биолошке активности која се карактерише квадратним коефицијентом унакрсне валидације, q^2 .

$$q^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{експериментално}} - Y_{\text{предвиђено}})^2}{\sum(Y_{\text{експериментално}} - \bar{Y}_{\text{експериментално}})^2} \quad (2.50)$$

Најједноставнија форма унакрсне валидације јесте избаци-један-напоље (енг. leave-one-out, LOO) приступ (Слика 2.22), где се елиминише само једно једињење тренинг сета (једна вредност). Понављањем PLS анализе за свако „избачено једињење” тренинг сета, израчунава се предвиђена вредност биолошке активности помоћу преосталих једињења тренинг сета, опет на основу једначине $y_{im} = \sum k b_{mk} x_{ik} + f_{im}$, при чему се добија квадратни коефицијент унакрсне валидације. Вредност q^2 представља средњу вредност анализа и обично је мања од r^2 па представља прави путоказ способности предвиђања 3-D QSAR модела.

Када се 3-D QSAR модел генерише, две основне карактеристике модела треба да буду његова способност предвиђања биолошке активности и робустност. Робустност је израз којим се описује колика је зависност између биолошке активности једињења које се елиминише из тренинг сета и осталих једињења којима се биолошка активности предвиђа. Робустним моделирањем назива се поступак смањивања осетљивости предвиђања биолошке активности „избаченог једињења” на варијацију експерименталне биолошке активности једињења „новог тренинг сета”, у циљу смањивања међусобне зависности биолошких активности и побољшања предвиђања активности „избаченог једињења”.

Овај компликовани израз објасниће се на следећи начин. Једноставни LOO приступ, иако стандардан у свим 3-D QSAR анализама, може се сматрати и неадекватним јер се предвиђа активност само једног једињења. Због тога треба тражити мало робустнију варијанту предвиђања, где се из тренинг сета узима рецимо пет једињења (енг. leave-5-out, L5O) или насумични број једињења (енг. leave-some-out, LSO), а од преосталих молекула се израчунава q^2 вредност, па се предвиђа активност избачених молекула. Процедура се понавља у већем броју итерација (најмање 100 понављања), након чега је могуће израчунати средњу вредност q^2 (Слика 2.20).



Слика 2.22. Процедура унакрсне валидације 3-D QSAR модела.

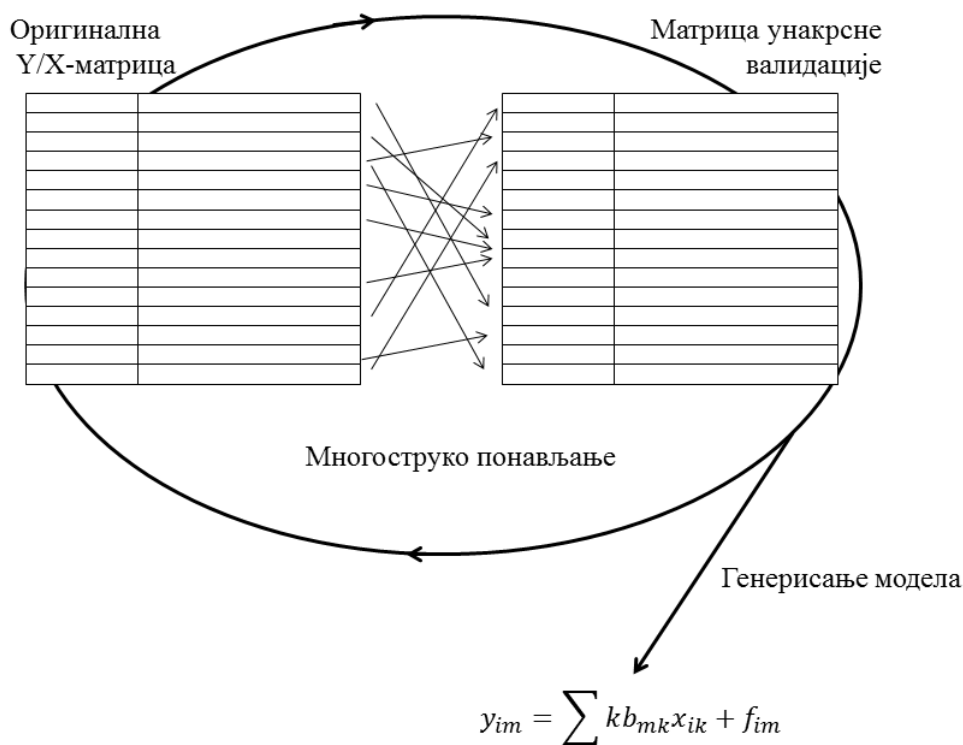
За уравнотежени систем, не би требало да буде много варијација у једначинама које се добијају, те вредности r^2 не би требало да буду много веће од q^2 . Такве вредности указују да је добијени 3-D QSAR модел робустан, односно да не постоји изразита међусобна зависност између вредности биолошке активности. Уколико, пак, постоји превелика разлика у вредностима r^2 и q^2 , значи да су вредности биолошких активности превише добро прерачунате или предвиђене (енг. over-fitting) и да постоји

висок степен међусобне повезаности између вредности биолошке активности. Другим речима, робустност 3-D QSAR модела је веома мала и способност предвиђања биолошких активности таквог модела је упитна.

Робустност, односно способност предвиђања биолошке активности може да се искаже преко стандардне девијације грешке предвиђања (енг. Standard Deviation Error of Prediction, SDEP) која се израчунава на следећи начин (јед. 2.51):

$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{експериментално}} - Y_{\text{предвиђено}})^2}{n}} \quad (2.51)$$

Када се генерише финални модел, веома је важно да се потврди да он није добијен случајном корелацијом. Таква екстерна валидација изводи се тзв. Y-мешањем. Процес је такав да се измешају вредности биолошке активности, тако да се сваком од молекула тренинг сета додели насумична вредност, различита од његове природне вредности. Потом се генерише 3-D QSAR модел, након чега би требало да све q^2 вредности буду негативне (Слика 2.23).



Слика 2.23. Процедура Y-мешања.

2.9.5.5. ЕКСТЕРНА ВАЛИДАЦИЈА 3-D QSAR МОДЕЛА

По генерисању 3-D QSAR студија, предиктивна моћ и робустност генерисаних модела проверена је на тест сету, сачињеном од претходно синтетисаних 4-хидроксикумарина, **ts-1-10c**, чија је *in vivo* антикоагулативна активност претходно потврђена.⁴⁹ Сва једињења су поравњана у активном центру VKORC1, применом идентичне процедуре за доковање као и за деривате **2a-h**.

2.9.6. ГЕНЕРИСАЊЕ МОДЕЛА 3-D ФАРМАКОФЕРЕ ЗАСНОВАНОГ НА БИОАКТИВНИМ КОНФОРМАЦИЈАМА 2a-h

Структуре деривата **2a-h** у комплексу са VKORC1 коришћене су као почетни молекули за добијање модела фармакофора. Помоћу софтвера LigandScout 2.0 детектоване су и тумачене најзначајније интеракције између VKORC1 и лиганда.¹²⁶ Интеракције између лиганда и макромолекула интерпретиране су из PDB фајла, а аутоматски је креиран и визуелизован модел фармакофере. Добијени модел је сачуван у *huroedit* формату, а затим конвертован у Discovery Studio 2.5 (Accelrys Software Inc., San Diego, USA, 2012) формат помоћу *Huroedit* алата. Сви прорачуни за добијање фармакофорних модела спроведени су применом Catalyst 4.11 софтверског пакета (Accelrys Software Inc., San Diego, USA, 2012). Модел заједничке фармакофере генерисан је помоћу *HipHop* модула, док су квантитативни фармакофорни модели креирани помоћу *HuroGen* модула Catalyst софтвера. Из анализе су добијени статистички параметри који су интерпретирани у одељку РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.

2.9.6.1. ЕКСТЕРНА ВАЛИДАЦИЈА 3-D ФАРМАКОФОРНОГ МОДЕЛА

По генерисању 3-D фармакофорних модела, предиктивна моћ и робустност генерисаних модела проверена је на тест сету сачињеном од претходно синтетисаних 4-хидроксикумарина, **ts-1-10c**, чија је *in vivo* антикоагулативна активност претходно потврђена.⁴⁹ Сва једињења су поравњана у активном центру VKORC1 применом исте процедуре за доковање као и за деривате **2a-h**.

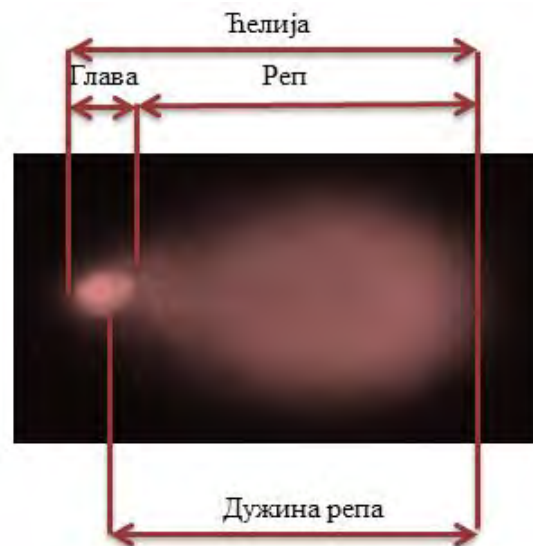
2.9.7. КОНФОРМАЦИОНА АНАЛИЗА 2a-*r*VKORC1 И 2f-*r*VKORC1 КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛСКОМ ДИНАМИКОМ

Добијени лиганд-*r*VKORC1 комплекси коришћени су за симулације молекулске динамике у присуству растварача. Симулације су извршене помоћу програма Desmond Molecular Dynamics System који је део пакета Schrödinger suite 2009.¹²⁴ Модели су припремљени применом 'system builder' модула. Параметри OPLS_2005 поља сила додељени су за све симулационе системе. Сваки антагонист-рецептор комплекс позициониран је у центру орторомбичне решетке, чиме је обезбеђено да систем буде окружен молекулима воде на растојању од 10 Å од било ког атома окренутог ка растварачу. Солватација је извршена помоћу TIP3 модела. За постизање неутралности система додати су јони Na⁺ и Cl⁻ у физиолошкој концентрацији од 0,15 М. Релаксација модел система извршена је применом минимизационог протокола, након чега је извршена молекулска динамика NPT алгоритмом у току од 1,2 ns. Контрола притиска примењена је да би се остварио притисак у ћелији од 1.013 bar, изотопном методом купловања. Методом Nose-Hoover термостатирања контролисана је температура на 310.15 К. Динамика ковалентних веза између тешких атома и водоника, извршена је помоћу SHAKE алгоритма, при чему је ротација веза вршена на сваких 2 fs. Интеракција трајекторија кретања извршена је помоћу RESPA алгоритма. Енергије електростатичких интеракција израчунате су помоћу Particle-Mesh Ewald (PME) методе. Блиске електростатичке Lennard-Jones интеракције су мерене до растојања од 9,0 Å. Трајекторије и енергије су снимане на сваких 4,8 ps. Алатом за анализу квалитета симулације вршена анализа RMSD и RMSF вредности, добијених из трајекторија, дужине водоничних веза, углова и van der Waals-ових интеракција из симулационих трајекторија.

2.10. ПРОТОКОЛИ *IN VIVO* ЕКСПЕРИМЕНАТА У ЦИЉУ ОДРЕЂИВАЊА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ И АНТИГЕНОТОКСИЧНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h

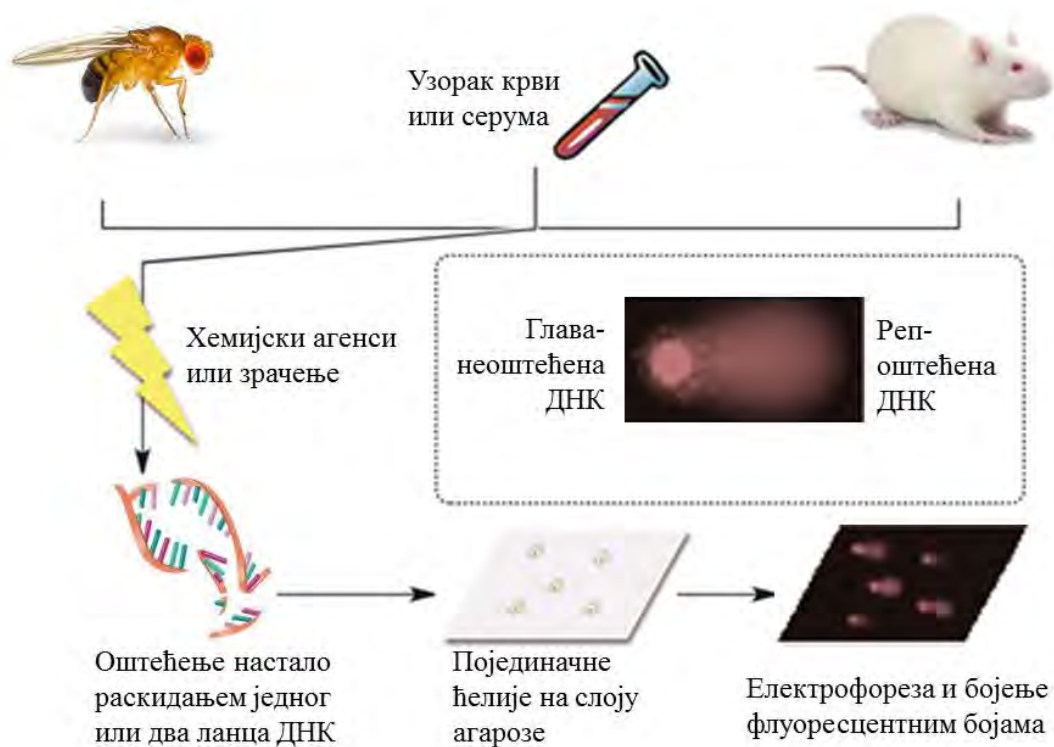
Када се открије неко ново једињење које поседује одличну активност, афинитет и селективност, поставља се питање да ли се једињење може сматрати кандидатом да се у клиничкој пракси сматра леком?¹⁰³ Чак и са повољним ADMETox особинама (апсорпција, дистрибуција, метаболизам, екскреција, токсикологија), регистрација новог лека захтева детаљне процене генотоксичне активности.¹⁰⁴ Један од најчешће примењиваних тестова за детекцију оштећења ДНК јесте комет тест, којим је могуће квантификовати степен раскидања двоструке спирале ДНК ланца у *in vitro* и *in vivo* условима.^{127,128} С обзиром да је комет тест веома једноставна, брза техника за анализу и квантификовање ДНК оштећења на нивоу индивидуалне ћелије, те да се може применити на ћелијама изолованим из различитих ћелија и ткива, стекао је широку пажњу последњих неколико година.

Комет тест (енг. Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE, или comet assay) једна је од високо осетљивих метода за тестирање генотоксичности, која се користи за детекцију широког спектра оштећења ДНК.^{127,128} Назив комет метода потиче од тога што оштећена ДНК, подвргнута електрофорези и посматрана под микроскопом, подсећа на комету – неоштећени део чини главу, а оштећени чини реп комете (Слика 2.24). Данас се највише користе две верзије комет теста, једну су предложили Olive и сарадници, а другу Singh и сарадници.^{129,130} Прва верзија теста изводи се у неутралним условима и омогућава специфично откривање дволанчаних прекида у молекулу ДНК. Друга верзија комет теста специјализована је за алкалне услове ($\text{pH} \geq 13$), омогућава откривање великог броја различитих оштећења генома и уједно се сматра оптималном за откривање ефеката различитих генотоксичних материја. Формирање комета последица је привременог раскидања једног или два ланца ДНК које се одвија током релаксације нативне или оштећене суперувизијене ДНК.¹³¹ Релаксација суперувизијене ДНК непрестано се одвија током живота ћелије. Принцип комет методе састоји се у хоризонталној електрофорези индивидуалних, појединачних, ћелија у агарозном гелу.¹³² Ћелије се могу изоловати из различитих организама (мишеви, пацови, винска мушица и др.) и ткива (јетра, бубрези, косна срж, плућа, мозак, слезина, дебело црево, бешика и др.) (Слика 2.25).^{133,134}



Слика 2.24. Изглед комете настале оштећењем ДНК.

На Слици 2.25 је дат преглед комет теста, са примерима неких организама и ткива на којима се може применити овај тест.



Слика 2.25. Принцип извођења комет теста.

2.10.1. ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h НАКОН

ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ

За потребе испитивања гетоксичности деривата хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина помоћу комет теста, коришћене су животиње третиране дериватима у концентрацији од 2 mg/kg телесне тежине. Педесет пацова подељено је у десет група, при чему је свака група садржала по пет животиња. Прва група, означена као негативна контрола, третирана је интраперитонеално физиолошким раствором (0,9% NaCl). Друга експериментална група, означена као позитивна контрола, третирана је интраперитонеално раствором ЕМС-а (етил метансулфонат) у концентрацији 300 mg/kg телесне масе. Преосталих осам група животиња одвојено су третиране по једном дозом од 2 mg/kg телесне масе хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина, интраперитонеално, узастопно седам дана. Осмог дана животиње су жртвоване и прикупљене су јетре и бубрези за даљу анализу комет тестом.

2.10.2. ИСПИТИВАЊЕ АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a, 2b и 2f НАКОН

ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ

Процена антигенотоксичне активности деривата вршена је на оним дериватима који нису испољили генотоксични ефекат, односно дериватима **2a**, **2b** и **2f**. Додатних двадесет пет животиња подељено је у пет експерименталних група, са по пет животиња у свакој групи. Прва група, означена као негативна контрола, С, третирана је интраперитонеално само физиолошким раствором. Друга група експерименталних животиња третирана је раствором ЕМС-а у концентрацији 300 mg/kg, док су животиње треће, четврте и пете групе интраперитонеално примале по једну дозу од 2 mg/kg деривата **2a**, **2b** и **2f**, 24 часа пре аплицирања инјекције ЕМС-а у концентрацији 300 mg/kg. Двадесет четири сата након апликације ЕМС-а животиње су жртвоване, и јетре и бубрези су прикупљени за даљу анализу комет тестом.

2.10.3. ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a и 2f НАКОН ОРАЛНЕ

АПЛИКАЦИЈЕ

За испитивање генотоксичне активности орално аплицираних деривата **2a** и **2f**, животиње су подељене у четири групе, где је поред група тертираних дестилованом

водом и дериватима **2a** и **2f** узета још једна група која је третирана раствором ЕМС-а у концентрацији од 300 mg/kg телесне масе. Животиње су седам дана третиране оралним путем дериватима **2a** и **2f** у концентрацији од 20 mg/kg телесне масе, једном дневно. Осмог дана животиње су жртвоване, након чега су јетра, бубрези и косна срж прикупљени за даљу анализу.

2.10.4. ИСПИТИВАЊЕ АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА **2a** И **2f** НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ

Антигенотоксична активност орално аплицираних деривата **2a** и **2f** процењена је тако што су животиње прво третиране испитиваним дериватима па потом ЕМС-ом. Животиње су третиране дериватима **2a** и **2f** у концентрацији 20 mg/kg телесне масе, а након тога раствором ЕМС-а концентрације 300 mg/kg телесне масе. Наредног дана извршено је жртвовање животиње; јетра и бубрези прикупљени су за даљу анализу.

2.10.5. ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА ОШТЕЋЕЊА ДНК АЛКАЛНИМ КОМЕТ ТЕСТОМ

Оштећење ДНК је мерено применом комет теста под алкалним условима, према методи коју су описали Singh и сарадници.¹³⁰

Реагенси коришћени за алкални комет тест:

70% етанол

1.5% "нормална" агароза у фосфатном пуферу:

20 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 70 mM KH₂PO₄, 340 mM NaCl, pH 7,4

HBSS (енг. Hank's Balanced Salt Solution) пуфер:

0,14 g/L CaCl₂, 0,4 g/L KCl, 0,06 g/L KH₂PO₄, 0,1 g/L MgCl₂·6H₂O, 0,1 g/L MgSO₄·7H₂O, 8,0 g/L NaCl, 0,35 g/L NaHCO₃, 0,09 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 1,0 g/L D-глюкоза, 20 mM EDTA и 10% DMSO

1% агароза са ниском тачком топљења (енг. low melting point agarose, LMPA) растворена у фосфатном пуферу

Пуфер за лизу:

2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0

Пуфер за електрофорезу:

300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13,0

Пуфер за неутрализацију:

0,4 Tris-HCl, pH 7,4,

97% етанол

Реагенс за бојење:

Етидијум бромид, 20 µg/mL

ПРИПРЕМАЊЕ ПЛОЧИЦА. Стаклене плочице опране су детергентом, осушене и обрисане 70% етанолом. За плочице је коришћена 1,5% "нормална" агароза у фосфатном пуферу.

ПРИПРЕМАЊЕ СУСПЕНЗИЈЕ ЋЕЛИЈА. Јетре, бубрези и косна срж бутне кости брзо су уклоњене са експерименталних животиња и пребачене на лед, а затим су одвојено припремане суспензије ћелија. Узорцима јетре, бубрега или косне сржи додато је по 1 mL свеже припремљеног и охлађеног HBSS пуфера, узорак је уситњен и процеђен. Поступак је поновљен три пута и прикупљена је коначна суспензија ћелија.

Потом је помешано 10 µl добијене суспензије ћелија и 75 µL 1% агарозе са ниском тачком топљења у фосфатном пуферу (LMPA). Након мешања, 85 µL добијене смеше је одпипетирано и нането на претходно припремљене стаклене плочице и одмах прекривено покровним стаклом, како би се ћелијска суспензија заједно са агарозом распоредила у танком слоју по предметном стаклу. Након 10 минута, покривна стакла пажљиво су уклоњена и нането је 100 µL 1% LMPA. Након додатних 10 минута, плочице су поређане у пластичне посуде са пуфером за лизу. Након 1 сата и 30 минута на 4°C, плочице су пребачене у пластичне посуде са пуфером за електрофорезу, 30 минута пре хоризонталне електрофорезе (2 kV и 139 mA током 30 минута). Плочице су извађене из кадице за електрофорезу, обрисане и поређане у пластичне посуде са пуфером за неутрализацију, а затим у 97% етанол 20 минута.

Пре анализирања плочице су осушене у Easy breeze gel dryer-у 30 минута, а затим бојене са 80 µL етидијум бромида и покривене покровним стаклом. Комете су анализиране и усликане помоћу Nikon флуоресцентног микроскопа (Ti-Eclipse) са CCD камером. Сто ћелија по слајду насумично је усликано и анализирано. Комете без глава

и оне са скоро целом ДНК у репу или са веома широким репом изузете су из анализе, јер оне могу представљати мртве ћелије.

Комете су прво визуелно анализирани и класификовани у пет категорија, дефинисаних као 0 (нема оштећења), 1, 2, 3 (мала, средња и велика миграција ДНК) и 4 (висок ниво деградације ДНК).¹³⁵ Укупан скор израчунат је применом формуле (2.16):¹³⁶

$$\begin{aligned} \text{Укупан скор} = & (\% \text{ ћелија у класи } 0 \times 0) + (\% \text{ ћелија у класи } 1 \times 1) + \\ & (\% \text{ ћелија у класи } 2 \times 2) + (\% \text{ ћелије у класи } 3 \times 3) + \\ & (\% \text{ ћелија у класи } 4 \times 4) \end{aligned} \quad (2.16)$$

Процент редукције (%P) у укупном скору након третмана дериватима хроман-2,4-диона, а у циљу утврђивања антигенотоксичног ефекта, рачунат је применом формуле (2.17):^{136,137}

$$\%P = \frac{\text{с. в. укупног скорa А} - \text{с. в. укупног скорa Б}}{\text{с. в. укупног скорa А} - \text{с. в. укупног скорa В}} \times 100 \quad (2.17)$$

где с.в. укупног скорa А представља средњу вредност укупног скорa у позитивној контроли (ЕМС); с.в. укупног скорa Б представља средњу вредност укупног скорa у групи третираној испитиваним једињењима и с.в. укупног скорa В представља средњу вредност укупног скорa у негативној контроли.

Након визуелне анализе, ћелије су квантификоване применом софтвера TriTekCometScore™ Freeware v1.5. Дужина репа, проценат ДНК у репу и репни моменат изабрани су као параметри за процену степена оштећења ДНК.

2.10.6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Добијени резултати статистички су анализирани помоћу SPSS софтвера (верзија 13.0), уз помоћ ANOVA статистичких параметара, при чему су резултати са $p < 0,05$ сматрани статистички значајним.

2.10.7. ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРКАЛАЦИЈЕ ДНК ДЕРИВАТИМА 2a-h ПОМОЋУ ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ СПЕКТРОСКОПИЈЕ

Фармакологија интеракције деривата **2a-h** са пацовском топоизомеразом Па (*rTopII α*) дефинисана је након одређивања места везивања деривата приликом интеракције. Најпре је процењена способност интеракције са ДНК. Припремљен је 1%-тни раствор натријум-ДНК (10 mg/mL) у Tris-HCl пуферу (pH 7,3) на температури 5°C, уз повремено мешање у току 24 сата ради хомогенизације.¹³⁸ Финална концентрација раствора ДНК одређена је спектрофотометријски на 260 nm помоћу коефицијента моларне екстинкције од 6600 cm⁻¹M⁻¹ (израженог у виду моларности фосфатне групе) и износила је 25 mM. Раствори доксорубицина (1 mM) и деривата **2a-h** (2 mg/L, концентрација која одговара концентрацији аплицираној на одраслим пацовима соја Wistar) припремљени су у PBS-у (pH 7,4). Ови раствори су у капима додати раствору ДНК, уз непрестано мешање да би се добио хомогени раствор.

Флуориметријски експерименти су изведени на Dyanmica HALO DB-20 UV-Vis спектрофотометру. Раствор ДНК, концентрације 200 mM, припремљен је разблаживањем горе наведеног раствора на температури 24±1°C. Узорци који садрже 0,06 mL једињења и ДНК раствора измешани су да би се добили експериментални раствори доксорубицина и испитиваних хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина.

За доксорубицин, флуоресцентни спектри забележени су на $\lambda_{ex} = 480$ nm и λ_{em} од 500 до 750 nm, а за деривате **2a-h** на $\lambda_{ex} = 205$ nm, и λ_{em} од 150 до 250 nm. Интензитет траке за доксорубицин на 592 nm искоришћен је за рачунање константе везивања (K_A). Резултати флуоресценције примењени су за процену вредности константе везивања комплекса формираних између једињења и ДНК. Из једначине (2.52):

$$\log[(F_0 - F)] = \log K_A + n \log [Q] \quad (2.52)$$

слободна фракција флуорофоре (f) може бити израчуната из модификоване Stern-Volmer једначине (2.53):

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK[Q]} + \frac{1}{f} \quad (2.53)$$

где је F_0 почетни интензитет флуоресценције, F интензитет флуоресценције у присуству молекула са којим се остварује интеракција, K је Stern–Volmer-ова константа смањења интензитета флуоресценције, $[Q]$ је моларна концентрација интеркалатора, а f је фракција флуорофоре доступне поларном пригушивачу, што указује на фракциони допринос укупној емисији приликом интеракције са хидрофобним пригушивачем. Вредност константе K_A може се израчунати из једначине $F_0/F = K[Q] + 1$.

2.10.8. ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ АТРАЗЕ

С обзиром да не постоји комерцијално доступна рекомбинована *rTopII α* , коришћена је хумана TopII α (*hTopII α*) са АТРазом, као модел на коме се могу извршити биолошки есеји. Према UniProt бази података (код P11388) хумани аналог поседује преко 88% сличности у секвенци са пацовском (код P41516), па је овај протеин примењен за одређивање активности АТРАЗе помоћу незнатно модификованог малахит зелено есеја.¹³⁹ Укратко, реагенс који садржи малахит зелено (0.0812%, wt/vol), поливинил алкохол (2.32%, wt/vol), амонијум молибдат (5.72%, wt/vol, у раствору 6 М HCl), и Milli-Q воду помешане у односу 2:1:1:2, припремљен и чуван је на температури од 4°C. Раствор АТР-а, концентрације 100 mM припремљен је у 100 mM раствору Tris-HCl пуфера при pH 7,4, 20 mM KCl и 6 mM MgCl₂. Реакциона смеша за одређивање активности АТРАЗе, запремине 100 mL, са различитим садржајем *hTopII α* (1–14 mg/mL) и АТР-ом инкубирана је у различитим временским интервалима. Оптимална концентрација протеина добијена је из есеја којим је извршена хидролиза АТР и примењена је за даља испитивања кинетике ензима. Реакције су започете додатком 250 mM раствора АТР-а и инкубирањем у току 2 часа на температури 37°C. Додавањем 800 mL реагенса малахит зелено реакција је заустављена, те је забележена апсорбанца на 620 nm на Microtiter Plate Reader-у (Synergy HT; BioTek). Вредности оптичке густине (OD₆₂₀) добијене за сваку концентрацију АТР-а без ензима, коришћене су за подешавање нуле уређаја, док је отпуштање неорганског фосфата израчунато из стандардне праве за фосфат. Брзина ензимских реакција анализирана је нелинеарном регресијом, која је описана Michaelis–Menten једначином. Вредности константе K_m и брзине V_{max} добијене су помоћу линеарне регресионе анализе реципрочних вредности брзине хидролизе АТР-а (1/V) и концентрације АТР-а (1/S). Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента.

2.10.8.1. ПРОЦЕНА ИНХИБИЦИЈЕ *h*ТОРII α -АТРАЗЕ

Инхибиција активности АТРАЗе мерена је након додатка испитиваних деривата, растворених у раствору PBS-а, у концентрацијама 0.5, 1, 2 и 4 mg/L, и изражена у IC₅₀ вредностима. За одређивање вредности K_m^{app} и V_{max}^{app} , анализирани су кинетички подаци хидролизе АТР-а помоћу линеарне регресионе анализе. Конструисан је график двоструких реципрочних вредности (Lineweaver–Burk–ова линеарна трансформација [1/V у односу на 1/S]) растућих концентрација инхибитора у односу на хидролизу АТР-а, у циљу тумачења начина инхибиције АТРАЗе.

2.10.9. МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ НА *r*ТОРII α

2.10.9.1. ПРЕГЛЕД СТРУКТУРА ТОРII α

Разматрање механизма генотоксичне и антигенотоксичне активности захтева добро познавање структуре ТорII α . Као што је већ поменуто, ТорII α је хомодимер који се састоји од три независна, али за активност неопходна, субрегиона који се називају *N*-терминус, ДНК-везујући и раскидајући домен и *C*-терминус.¹⁴⁰ У структури сваког *N*-терминуса налази се по један регион АТРАЗе у коме се врши везивање АТР-а и његова хидролиза пре и после раскидања двоструког ланца ДНК и његовог поновног спајања. Интеракција АТРАЗе са АТР-ом индукује димеризацију мономера или раздвајање, услед чега је *N*-капија затворена или отворена.¹⁴¹ Регион где се врши везивање и раскидање ДНК се састоји од TOPRIM (енг. TOPoisomerase/PRIMase) региона, који садржи јон Mg²⁺ укључен у механизам раскидања ДНК ланаца, и WHD (енг. winged-helix domain) област, која у себи садржи тирозин из активног центра. Оба ова региона укључена су у формирање ДНК-капије. На крају, *C*-терминус представља *C*-капију.¹⁴⁰

Када се познају основне структурне карактеристике ТорII α , могуће је конструисати хомологи модел ТорII α пацова, чија кристална структура још увек није позната. Примена метода молекулског доковања и молекулске динамике на хомологом моделу *r*ТорII α пацова нам даље може омогућити разумевање генотоксичне и антигенотоксичне активности испитиваних једињења.

2.10.9.2. СЕЛЕКЦИЈА КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА ТОРII α

Претраживањем PDB (Protein Data Bank) базе података издвојено је 34 кристалних структура ТОРII α , које су подељене у две групе: кристалне структуре АТРаза и кристалне структуре региона у коме се врши раскидање и поновно везивање ДНК. Пошто је циљ овог испитивања дефинисање биоактивних конформација деривата хроман-2,4-диона унутар ТОРII α , са PDB базе података преузете су кристалне структуре инхибитора АТРаза са PDB кодовима 1PVG,¹⁴² 1ZXМ, 1ZXN,¹⁴¹ 4GFH¹⁴³ и 4R1F,¹⁴⁴ те инхибитора региона у коме се врши раскидање и поновно везивање ДНК са кодовима 2ХСТ,¹⁴⁵ 3L4J, 3L4K,¹⁴⁶ 4BUL¹⁴⁷ и 4PLB.¹⁴⁸ Сви одабрани комплекси учитани су у графички кориснички интерфејс програма UCSF Chimera и побољшани додавањем атома водоника применом leap модула пакета Amber 12, након чега је извршена протонација сваког аминокиселинског и нуклеинског остатка, при рН 7,4, применом Antechamber модула Amber 12 пакета.^{92,93} Комплекси су солватисани (команда SOLVATEOCT) у просторној решетки уношењем растојања од 10 Å са молекулима воде (TIP3 модел), неутралисани јонима Na⁺ и Cl⁻ и подвргнути процесу минимизације применом Sander модула AMBER пакета поступком у 1000 корака, при чему је сваки наредни конформер имао најмању могућу енергију у односу на претходни (енг. steepest-descent energy minimization). Други корак у минимизацији система извршен је у 4000 корака при чему су парови конформера који садрже највећу и најмању енергију симултано минимизирани до постизања исте енергије (енг. conjugate-gradient energy minimization). С обзиром да су преузети хомодимери идентичне структуре, комплекси су поравњани применом MatchMaker модула имплементираног у Chimera софтвер, према кристалној структури ензима са кодом 4GFH, јер једино ова кристална структура садржи оба региона, АТРаза и ДНК-везујући и раскидајући регион, а затим су ланци раздвојени применом команде split преко командне линије. Одговарајући раздвојени ланци, који се налазе унутар једног мономера су поравњани и коришћени као почетни комплекси за молекулско доковање.

2.10.9.3. ХОМОЛОГО МОДЕЛОВАЊЕ *r*ТОРII α

С обзиром да кристална структура *r*ТОРII α још увек није доступна на PDB бази података, структура овог протеина добијена је применом процедуре хомологог

моделовања, имплементирани у аутоматизованом серверу SwissModel.¹⁴⁹ Одвојени поступци моделовања су коришћени да би се креирала комплетна структура *rTopIIa*.

Најпре је извршено упоређивање секвенци различитих модел организама помоћу BLAST модула UniProt базе података, да би се утврдило која врста поседује највећи проценат идентичности у примарној структури са *rTopIIa*. Највећи проценат поклапања од 88,31% је пронађен између секвенце људског (код P11388) и пацовског ензима (код P41516). Секвенца пацовског ензима са кодом P41516, која садржи 1526 аминокиселина, подвргнута је хомологом моделовању. SwissModel мод поравнања примењен је за припрему АТРаза, како би се на основу секвенце ензима пацова и хумане кристалне структуре, са кодом 4R1F и резолуцијом од 2,51 Å, генерисала пацовска АТРаза.¹⁴⁴ Затим је кристална структура хумане TopIIa са кодом 4FM9 (резолуција 2,90 Å), која не садржи инхибитор, коришћена за хомолого моделовање ДНК-везујућег и раскидајућег региона.¹⁴⁰ Добијене хомолого моделоване структуре поравњане су према кристалној структури са кодом 4GFH и сачуване као један фајл. Финализација модела извршена је помоћу Modeller софтвера имплементираниог у UCSF Chimera програм додавањем остатака који недостају и попуњавањем насумично увијене структуре.¹⁵⁰ Структура G-ДНК сегмента (енг. gate) добијена је помоћу 3-D DART моделера коришћењем 4GFH кристалне структуре, након чега је све то имплементирано у пацовску TopIIa.¹⁵¹ Потом је комплетна пацовска TopIIa припремљена у програму Chimera, као што је већ раније описано, и поравњана према основној структури TopIIa, да би се одредиле њихове релативне координате. Формирани ензим даље је коришћен за молекулско доковање и молекулску динамику АТР-а и деривата **2a-h**.

2.10.9.4. ПРИМЕНА МОЛЕКУЛСКОГ ДОКОВАЊА

Метода молекулског доковања примењена је иницијално за репродукцију постојећих кристалних структура инхибитора у комплексу са АТРазом и ДНК-везујућим и раскидајућим регионом. Ко-кристализовани инхибитори репродуковани су помоћу поновног доковања експерименталне конформације, поновног доковања насумичне конформације, унакрсног доковања експерименталне конформације и унакрсног доковања насумичне конформације применом алгоритама доковања имплементираних у AutoDock, AutoDockVina и DOCK6 програмима.^{94-96,152}

2.10.9.4.1. ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTODOCK ПРОГРАМА

AutoDock је први програм који је коришћен за репродукцију ко-кристализованих структура инхибитора. Ригидни центар и ротирајуће везе су подешене помоћу AutoDock Tools алата. Затим су из 3-D структура протеина уклоњени неполарни атоми водоника, док су Gasteiger-ова наелектрисања и параметри растварача подешени аутоматски. Доковање је извршено помоћу AutoDock 4.2 програма.⁹⁴ Димензије просторне решетке која окружује активни центар АТРаза су подешене на 23 Å x 16 Å x 17 Å, са растојањем од 0,375 Å између тачака просторне решетке, док су одговарајуће димензије решетке у ДНК-везујућем и раскидајућем региону подешене на 17 Å x 19 Å x 13 Å. Lamarckian-ов генетски алгоритам коришћен је у сврху генерисања конформација лиганата унутар активног центра. Глобална оптимизација почела је са популацијом од 200 случајно изабраних јединки, максималном проценом енергије од $1,0 \times 10^6$ и максимално 27 000 генерација. Извршено је укупно 100 конформационих претрага са толеранцијом RMS вредности од 0,5 Å.

2.10.9.4.2. ПОДЕШАВАЊЕ ПАРАМЕТАРА AUTODOCK VINA ПРОГРАМА

За програм AutoDockVina примењена су идентична подешавања параметара решетке и поља као и за програм AutoDock. Симулације доковања су изведене у енергетском опсегу од 10 kcal/mol и анализом 100 конформација. Резултат је садржао 20 различитих конформација за сваки рецептор.

2.10.9.4.3. ПОДЕШАВАЊА ПАРАМЕТАРА DOCK6 ПРОГРАМА

Репродукција кристалних структура инхибитора изведена је и помоћу DOCK6 програма. Током симулације доковања, протеин је посматран као ригидан док су инхибитори сматрани флексибилним и подвргнути су минимизацији енергије. Површина целог протеина израчуната је помоћу DMS програма, користећи сфере радијуса од 1,4 Å. Негативна слика површине је затим генерисана као скуп преклапајућих сфера помоћу SPHGEN модула примењених у програм DOCK6. Сфере које окружују инхибитор, а самим тим и карактеришу активни центар, сачуване су помоћу програма sphere selector. Ове сфере су послужиле за усмеравање лиганата ка

активном центру. Стерне и електростатичке интеракције између инхибитора и *r*ТорII α израчунате су помоћу програма GRID, при чему мерење вршено на растојању од 0,3 Å.

2.10.9.5. МОДЕЛИРАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h И МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ НА *r*ТОРII α

Све структуре АТР-а и деривата **2a-h** су моделиране применом Chemaxon's msketch модула (<http://www.chemaxon.com>) и оптимизоване молекулском механиком, након чега је извршена коректна протонација при рН 7,4. Лиганди су затим доковани у активном центру АТРазае, применом програма који је најбоље извршио репродукцију кристалних структура (AutoDock, AutoDockVina или DOCK6) и као што је предвиђено подешавањима молекулског доковања.

2.10.9.6. СИМУЛАЦИЈЕ МОЛЕКУЛСКЕ ДИНАМИКЕ

Добијени лиганд-АТР-*r*ТорII α комплекси коришћени су за симулације молекулске динамике у присуству растварача. Симулације су извршене помоћу програма Desmond Molecular Dynamics System, који је део пакета Schrödinger suite 2009.¹²⁴ Модели су припремљени применом 'system builder' модула. Параметри OPLS_2005 поља сила додељени су за све симулационе системе. Сваки инхибитор-ензим комплекс позициониран је у центру орторомбичне решетке, чиме је обезбеђено да систем буде окружен молекулима воде на растојању од 10 Å од било ког атома окренутог ка растварачу. Солватација је извршена помоћу TIP3 модела. За подешавање неутралности система додати су јони Na⁺ и Cl⁻ у физиолошкој концентрацији од 0,15 М. Релаксација модел система извршена је применом минимизационог протокола након чега је извршена молекулска динамика NPT алгоритмом у току од 1,2 ns. Контрола притиска је примењена да би се остварио притисак у ћелији од 1.013 bar, изотопном методом купловања. Методом Nose-Hoover термостатирања контролисана је температура на 310,15 К. Динамика ковалентних веза између тешких атома и водоника извршена је помоћу SHAKE алгоритма, при чему је ротација веза вршена на сваких 2 fs. Интеракција трајекторија кретања извршена је помоћу RESPA алгоритма. Енергије електростатичких интеракција израчунате су помоћу Particle-Mesh Ewald (PME) методе. Блиске електростатичке Lennard-Jones интеракције су мерене до растојања од 9,0 Å. Трајекторије и енергије су снимане на сваких 4,8 ps. Алатам за анализу квалитета симулације вршена анализа RMSD и RMSF вредности, добијених из

трајекторија, дужине водоничних веза, углова и van der Waals-ових интеракција из симулационих трајекторија.

2.10.9.6.1. ММ-GBSA ПРОРАЧУНИ И СЛОБОДНА ЕНЕРГИЈА РАЗЛАГАЊА

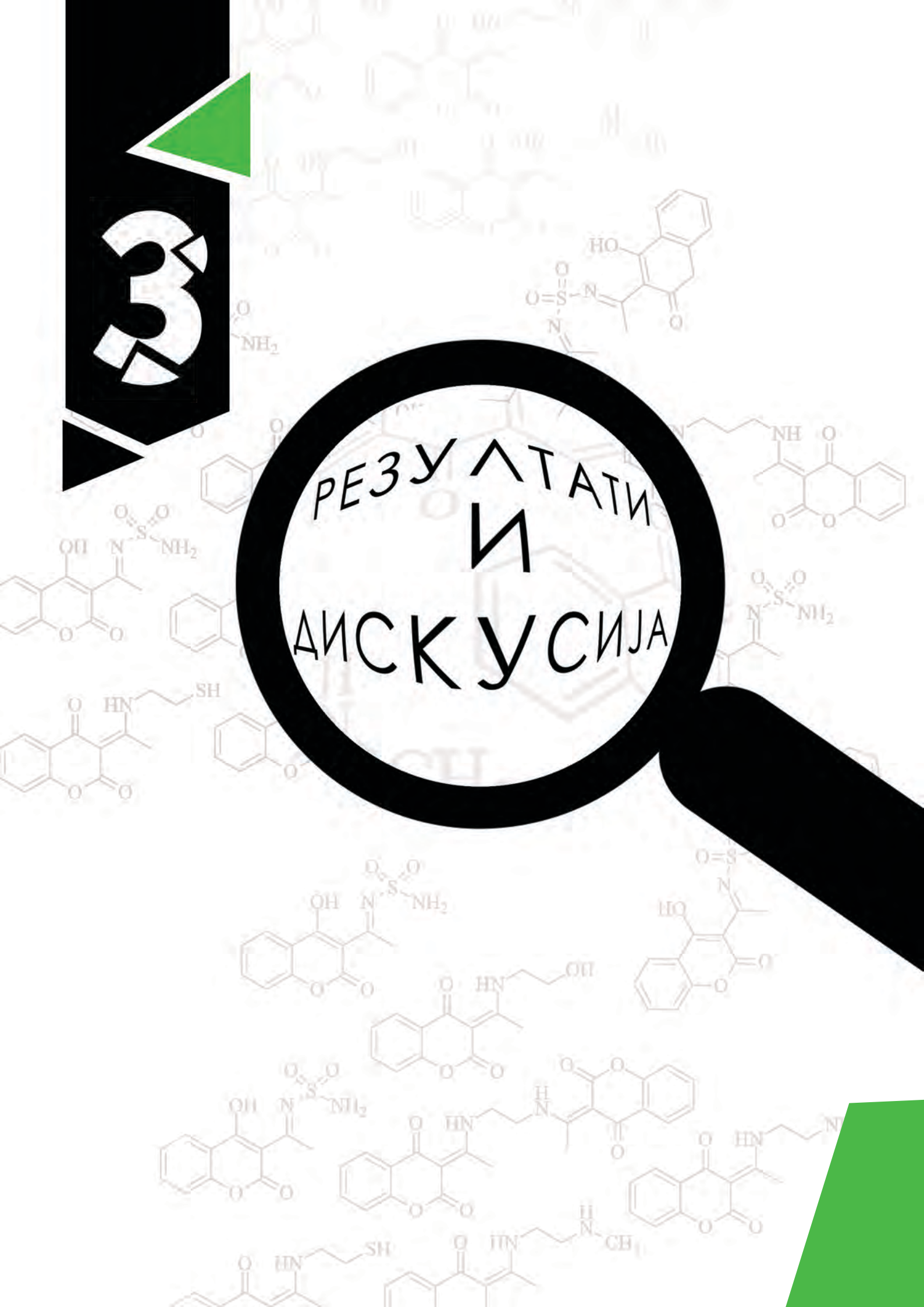
Слободна енергија везивања лиганда за рецептор израчуната је помоћу ММ-GBSA (енг. Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area) алгоритма према наведеној формули (2.18):¹⁵³

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S \quad (2.18)$$

где ΔE_{ele} одговара разлици електростатичких енергија између лиганда везаног за рецептор и слободног лиганда, израчуната помоћу OPLS_2005 поља сила, ΔE_{vdw} одговара van der Waals-овом доприносу енергије, док ΔG_{solv} одговара слободној енергији и солватацији израчунатој из GB/SA бесконачног модела. Embrace модул, имплементиран у MacroModel, коришћен је за израчунавање ΔE_{ele} , ΔE_{vdw} и ΔG_{solv} параметара. Промена ентропије, ΔS , је израчуната помоћу Rigid Rotor Harmonic Oscillator (RRHO) прорачуна. Применом овог алгоритма одређена је промена вибрационих, ротационих и транслационих ентропија везивања лиганда.



РЕЗУЛТАТИ
И
ДИСКУСИЈА



3.1. СИНТЕЗА НОВИХ ДЕРИВАТА ХРОМАН-2,4-ДИОНА КАО ПОТЕНЦИЈАЛНИХ АНТАГОНИСТА ВИТАМИНА К У ПРОЦЕСУ КОАГУЛАЦИЈЕ

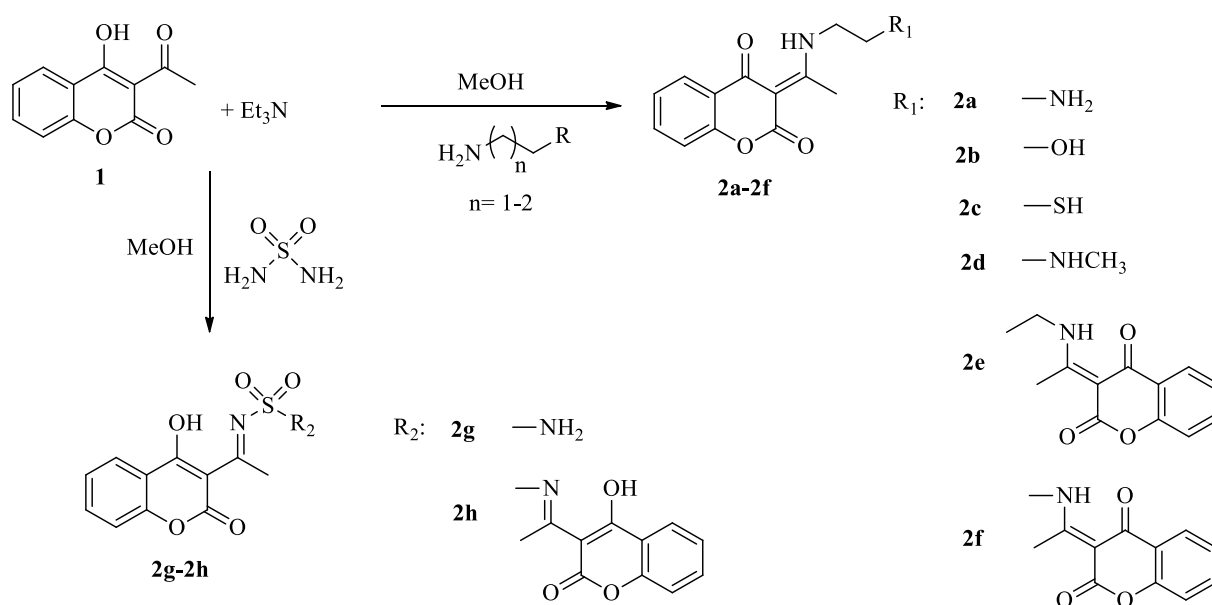
Међу свим документованим биолошким активностима једињења кумаринског типа,^{154–157} антикоагулативна активност 4-хидроксикумарина и њихових деривата свакако је од највећег значаја.¹⁵⁸ Водећи се овом премисом, ова докторска дисертација сумира напоре да се верификује *in vivo* антикоагулативна активност осам нових деривата хроман-2,4-диона и 4-хидрокси-2*H*-хромен-2-она (4-хидроксикумарина), до сада нетестираних као антикоагуланата. Хроман-2,4-диони (хроман-2,4-хинони) уобичајено се цитирају као под-класа 4-хидроксикумарина, обзиром да настају као производ интрамолекуларске таутомеризације хидроксилне групе на положају С4 кумарина.¹⁵⁹

Деривати хроман-2,4-диона синтетисани су применом конвенционалне и микроталасне методе. Конвенционалном методом синтетисани су **2a-f** као деривати 3-(1-аминоетилиден)хроман-2,4-диона, кондензацијом полазног једињења 3-ацетил-4-хидроксикумарина (**1**) са одговарајућим амином у присуству Et₃N (Шема 3.1). Реакција кондензације индуковала је интрамолекуларску таутомеризацију хидроксилне групе на положају С4 кумаринског језгра. Стога је уместо очекиване имино групе, формирана секундарна амино група вицинална егзо двострукој вези на положају С3. Реакцијом између еквимоларних количина полазних реагенаса добијени су деривати **2a-d** са једним хроман-2,4-хинонским прстеном. Деривати са два хроман-2,4-хинонска језгра, **2e** и **2f**, синтетисани су додатком два еквивалента Et₃N. Синтеза деривата **2b** није нова, али је процедура из литературе побољшана у циљу значајнијег приноса деривата.^{76,77}

Елементарна анализа и спектрални подаци у виду IR, ¹H NMR, ¹³C NMR и GC/MS спектра синтетисаних деривата (Прилог 1, Сlike 1–24) показали су потпуну сагласност са предложеном молекуларском структуром. Таутомеризација деривата **2a-f** потврђена је одсуством сигнала хидроксилне групе на положају С4 у ¹H NMR спектрима (Прилог 1, Сlike 2, 5, 8, 11, 14, 17), затим, појавом широког синглетног пика у области 14,00–11,08 ppm у ¹H NMR спектрима (Прилог 1, Сlike 2, 5, 8, 11, 14, 17) односно траке слабог интензитета у области 3420–3412 cm⁻¹ у IR спектрима (Прилог 1, Сlike 1,4,7,10,13,16) које одговарају NH протону. У прилог овом закључку јесте присуство сигнала у ¹³C NMR спектру који одговарају два различитим карбонилним групама и угљеницима који формирају бочну двоструку везу.

Са друге стране, реакцијом у атмосфери микроталасног зрачења и присуству сулфамида, добијени су деривати **2g** и **2h** (Шема 3.1), који не подлежу интрамолекуларској таутомеризацији. Додатком еквимоларних количина реагенса, формиран је моносупституисани сулфамидни дериват **2g**, док је додатком два еквивалента сулфамида добијен **2h**. Анализом ^1H NMR спектра (Прилог 1, Сlike 20 и 23) потврђено је присуство ОН-групе на положају С4, у виду широких синглета на положајима 13,86 и 14,48 ppm. Присуство имино групе је потврђено траком у области 1678–1674 cm^{-1} IR спектра (Прилог 1, Сlike 19 и 22) која се односи на $\text{C}=\text{N}$ везу.

Основна предност конвенционалне синтетичке методе је висока ефикасност виду приноса и једноставности процедуре којом се у једном кораку добијају једињења структурно слична витамин К 2,3-епоксиду. Са друге стране, применом микроталасне процедуре су синтетисани нови деривати 4-хидроксикумарина, који у *in vivo* условима могу подлећи реакцији таутомеризације.⁴⁹



Шема 3.1. Преглед општег поступка хемијске синтезе деривата **2a-h**.

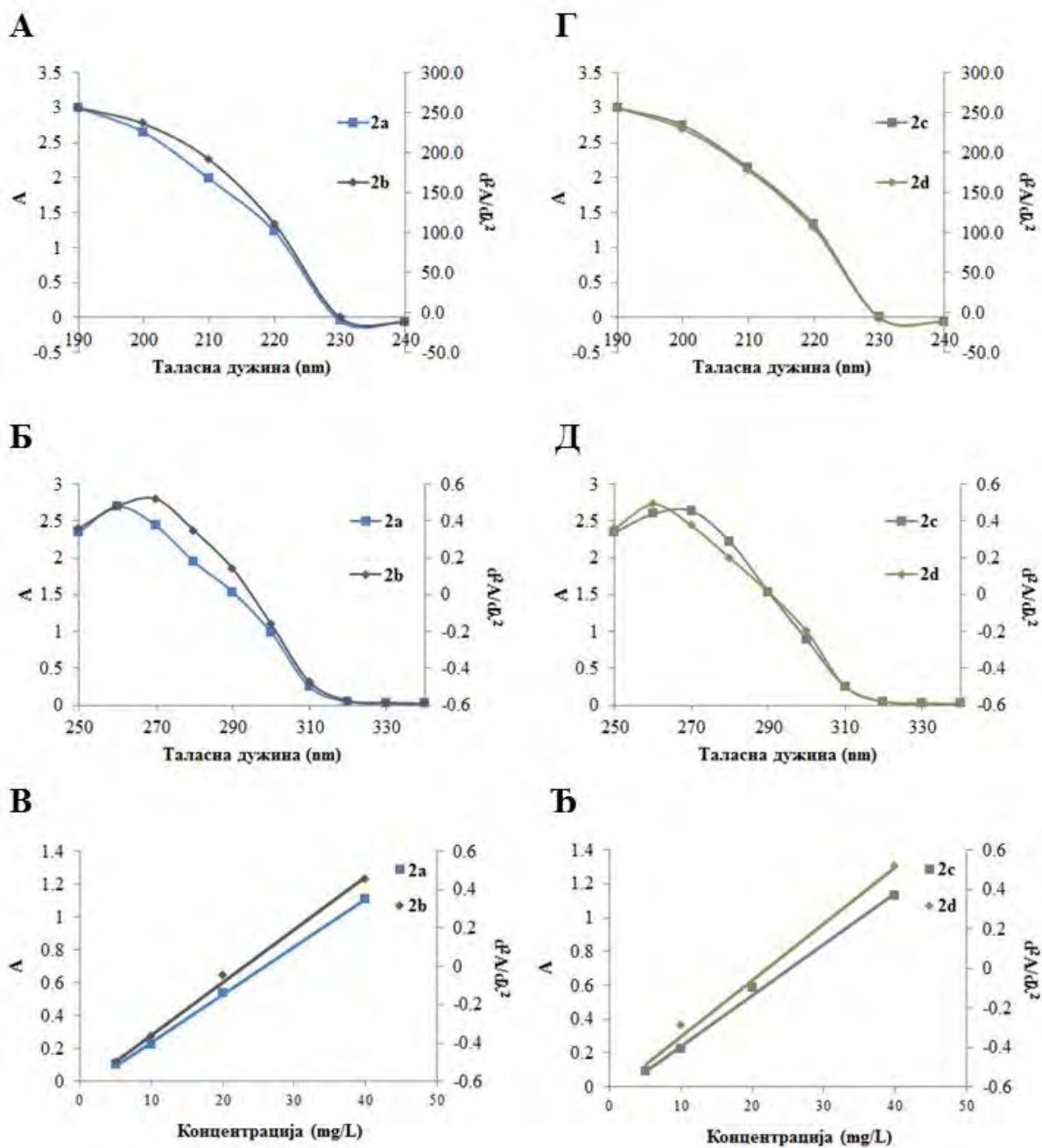
3.2. ПРЕДВИЂАЊЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ НОВОСИНТЕТИСАНИХ ДЕРИВАТА **2a-h**

3.2.1. ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА **2a-h** ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН

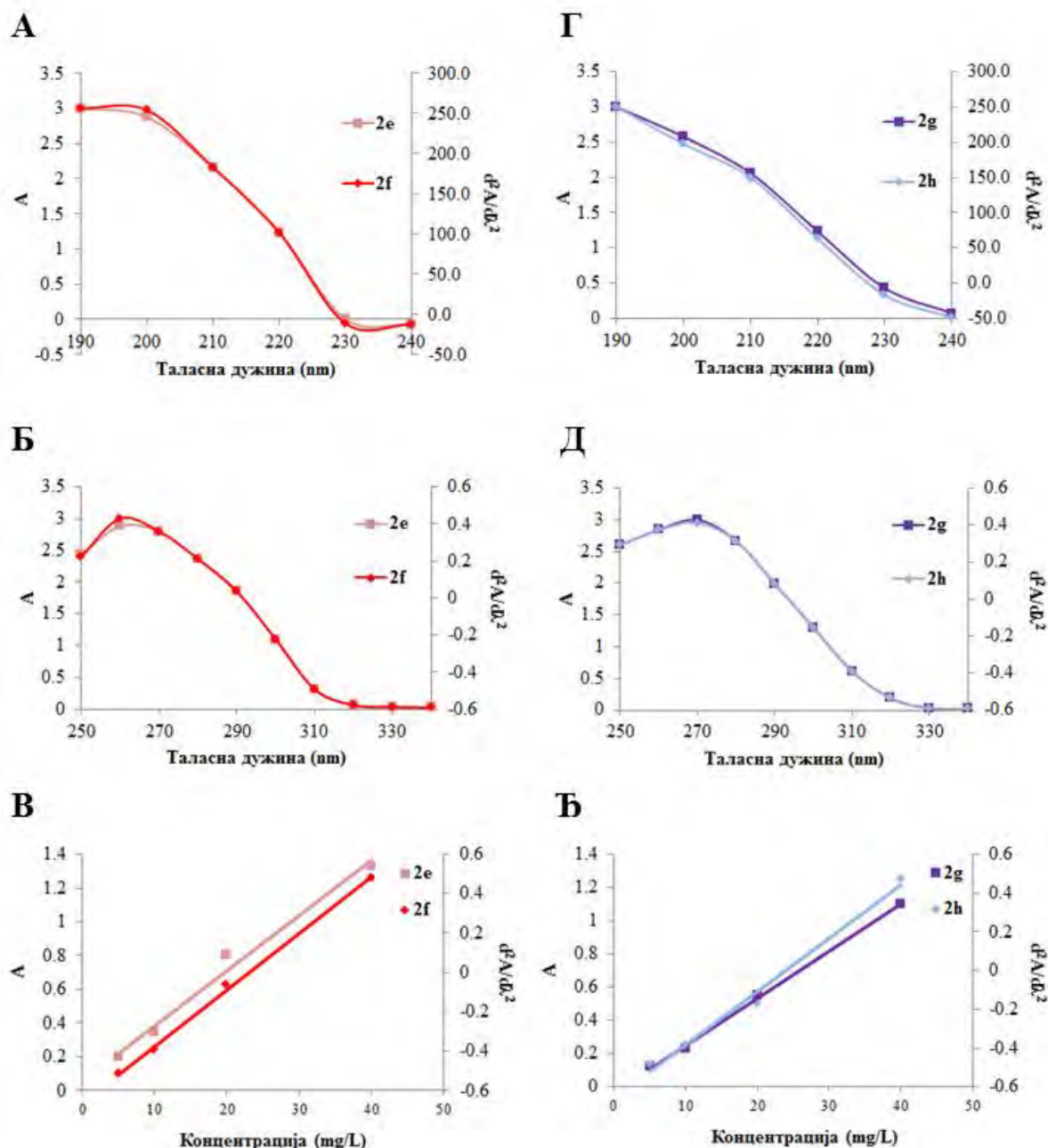
Антикоагулативна активност антагониста витамина К у многоме зависи од фармакокинетичких особина самих антагониста, проистеклих из интеракције са серумским албумином. Серумски албумин јесте носач антагониста витамина К до ендоплазматичког ретикулума и VKORC1 као молекулске мете, те анализа интеракција антагониста са серумским албумином може послужити као иницијални скрининг за дефинисање да ли се деривати од интереса уопште могу разматрати као антагонисти витамина К *in vivo*.

Након дефинисања таласних дужина на којима тестирани деривати показују максимум апсорпције (Експериментални део, Слика 2.2 и 2.3), применом другог извода UV-Vis апсорпционе спектроскопије вршена је процена да ли се деривати **2a-h** везују за хумани серумски албумин, и на који начин. Процена је извршена након комплексирања 20 mg/L деривата, односно концентрације која одговара 20 mg/kg телесне масе одраслог пацова соја Wistar, са албумином у физиолошкој концентрацији (35 g/L). Одређивањем тачака нултог прелаза (λ_{ZCP}) дефинисан је максимум апсорпције деривата независан од концентрације. Одређивањем тачака независне концентрације (λ_{SCIP}), дефинисане су таласне дужине максималне апсорпције антагонист-албумин комплекса.

За већину деривата тачке λ_{ZCP} и λ_{SCIP} одређене су на негативним вредностима других извода. Тако, тачке нултог прелаза деривата **2a** и **2b** одређене су на 228 и 229 nm (Слика 3.1A), док су λ_{ZCP} за **2c** и **2d** биле на 230 и 231 nm (Слика 3.1Г). Надаље, тачке нултог прелаза деривата **2e** и **2f** одређене су на 230 и 229 nm (Слика 3.2A), док су λ_{ZCP} за **2g** и **2h** биле на 240 и 241 nm (Слика 3.2Г). Очекивано, деривати хроман-2,4-диона показали су λ_{ZCP} на приближним вредностима, указујући на сличан начин везивања на серумски албумин, док су 4-хидроксикумарински деривати показали λ_{ZCP} на вишим таласним дужинама. Са друге стране, Li и сарадници су открили да се тачка нултог прелаза варфарина налази на 278 nm.⁷⁹



Слика 3.1. Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата А) 2a (■) и 2b (◆); (Г) 2c (■) и 2d (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, коришћени за одређивање тачке нултог прелаза; Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата Б) 2a (■) и 2b (◆); (Д) 2c (■) и 2d (◆) растворених у раствору PBS-а при рН 7,4, у присуству албумина (35 g/L у раствору PBS-а, при рН 7,4), коришћени за одређивање тачке независне концентрације; Калибрационе криве деривата (В) 2a (■) и 2b (◆); (Ђ) 2c (■) и 2d (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, конструисане помоћу спектра изведеног из тачке независне концентрације.



Слика 3.2. Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата А) **2e** (■) и **2f** (◆); (Г) **2g** (■) и **2h** (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, коришћени за одређивање тачке нултог прелаза; Апсорпциони спектри и други извод спектра деривата Б) **2e** (■) и **2f** (◆); (Д) **2g** (■) и **2h** (◆) растворених у раствору PBS-а при рН 7,4, у присуству албумина (35 g/L у раствору PBS-а, при рН 7,4), коришћени за одређивање тачке независне концентрације; Калибрационе криве деривата (В) **2e** (■) и **2f** (◆); (Б) **2g** (■) и **2h** (◆) растворених у раствору PBS-а, при рН 7,4, конструисане помоћу спектра изведеног из тачке независне концентрације.

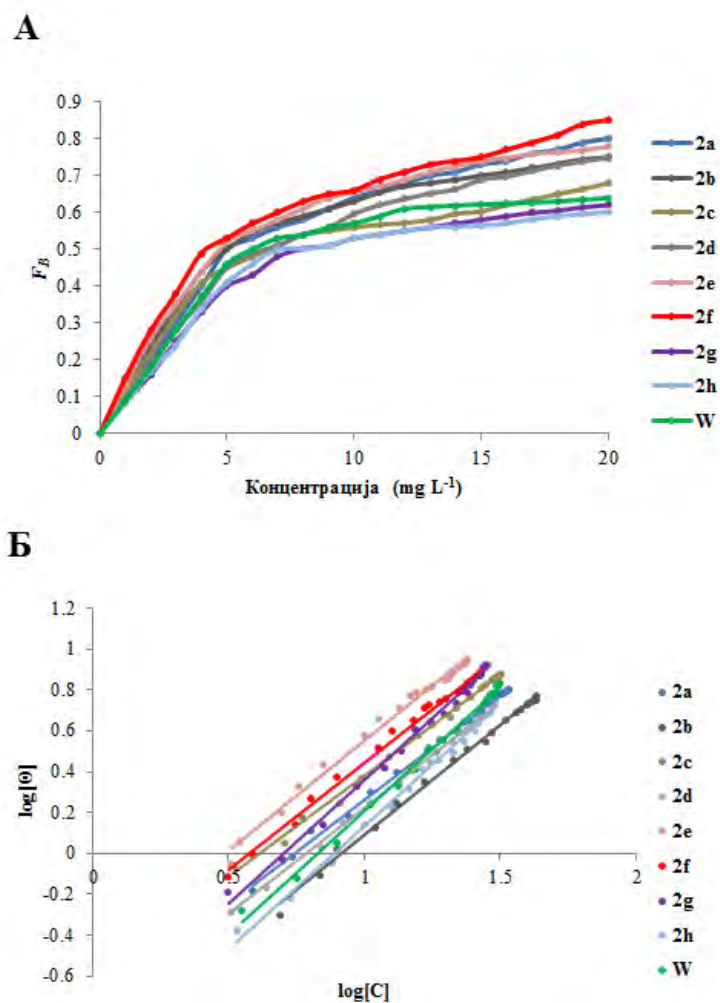
У присуству хуманог серумског албумина, забележено је батохромно померање тачака независних концентрација λ_{CISP} свих деривата у односу на λ_{ZCP} : 290-291 nm за **2a**, **2e** и **2f** (Слике 3.1Б и 3.2Б, респективно), 285-288 nm за **2b**, **2c** и **2d** (Слике 3.1Б и

3.1Д, респективно), 295 nm за **2g** и **2h** (Слике 3.2Д). Од свих тестираних једињења, једино су за **2a** и **2f** израчунате вредности тачака независних концентрација приближне варфарину, што је указало да се везивање антикоагуланта и деривата **2a** и **2f** за хумани серумски албумин одвија на сличан начин, те да се ова два једињења могу издвојити од осталих као потенцијални антикоагуланти *in vivo*.⁷⁹ Да једињења **2a** и **2f** испољавају потенцијал да буду антикоагуланти, показују и калибрационе криве раствора чистих деривата **2a** и **2f** у присуству албумина (35 g/L), конструисане у опсегу од 0,5 mg/L – 40 mg/L, са коефицијентом корелације између два деривата већим од 0,99 (Слике 3.1Ц и 3.2Ђ). Са друге стране, са Слике 3.2А јасно се може видети да се **2f** брже везује за серумски албумин у односу **2a** (Слика 3.1А) при концентрацијама од 1 до 40 mg/L. Ипак, разлика није толико изражена, па можемо закључити да се ови деривати на сличан начин везују за албумин.

За детаљнију анализу интеракција између деривата **2a-h** и албумина, спроведене су студије емисије флуоресцентног зрачења након интеракције са албумином. Као вид позитивне контроле коришћен је аспирин, познати антиинфламаторни лек, који се такође транспортује кроз крв помоћу албумина. Изотерме добијене помоћу Hill-ове теорије (Еспериментални део, секција 2.2.1.2, једначина 2.1) приказане су на Сликама 3.3. и 3.4., са којих се може видети да је везивање деривата **2a** и **2f** за хумани серумски албумин знатно интензивније од везивања варфарина. Scatchard-овом анализом података (Еспериментални део, секција 2.2.1.2, једначина 2.2) добијени су слични резултати.

Највећа забринутост када се разматра да ли ће неко једињење бити антикоагулант ипак представља то да ли ће једињење, било да је хроман-2,4-дионског или 4-хидроксикумаринског типа, након апликације изазвати унутрашње крварење. Стога је веома корисно предвидети токсичност или нежељене ефекте једињења пре саме администрације једињења на модел организму. У том смислу, разумевање механизма везивања антикоагуланта на серумски албумин може дати увид у ризик од унутрашњег крварења изазваног једињењем.¹⁶⁰

Први параметар којим се може предвидети могућност унутрашњег крварења јесте константа асоцијације (K_A). Са повећањем вредности константе асоцијације опада концентрација слободног антикоагуланта у плазми, а са њом и ризик од унутрашњег крварења. Константе везивања (K_A) и број центара n на којима се врши везивање за албумин, добијене из Hill-ових и Scatchard-ових модела, сумиране су у Табели 3.1.



Слика 3.3. А) Изотерме везивања деривата **2a-h** и варфарина (W) растворених у раствору PBS-a, на рН 7,4 и 310,15 К, при константној концентрацији албумина (35 g/L) у раствору PBS-a, на рН 7,4 без присуства аспирина; Б) Резултати Hill-ове анализе за деривате **2a-h** и варфарин (W) у раствору PBS-a, при рН 7,4, засноване на равнотежној концентрацији слободних деривата **2a-h** и варфарина (W). Интензитет флуоресценције упоређиван је са аминокиселином триптофан из активног центра серумског албумина која емитује флуоресцентно зрачење на 340 nm, док се екситација врши на 280 nm.

Применом Scatchard-ове теорије, која је прикладнија за рачунање константи везивања једињења за албумин, израчунате су константе асоцијације деривата **2a** ($K_A = 0,645 \mu\text{M}^{-1}$) и **2f** ($K_A = 0,875 \mu\text{M}^{-1}$).⁸⁸ Из Табеле 3.1 може се видети да су ове вредности знатно више у односу на константу добијену за варфарин ($K_A = 0,197 \mu\text{M}^{-1}$). Вредности указују на већи проценат везивања деривата и мању концентрацију слободних **2a** и **2f** у плазми. Закључено је да везивање **2a** и **2f** за серумски албумин узрокује смањени ризик од унутрашег крварења него у случају варфарина. Такође, односи равнотежних константи везивања за албумин, за деривате **2a** и **2f** на 310,15 К, израчунатих помоћу

Hill-ове и Scatchard-ове теорије су 1,356 и 1,334, из чега можемо закључити да ове методе дају сличне резултате. Другим речима, афинитет тестираних деривата ка албумину је сличан. Поређењем равнотежних константи **2f** и варфарина, израчунате вредности односа од 1,524 и 4,442, што указује на израженију разлику у начину везивања за албумин у корист једињења **2f**. Са друге стране, везивање деривата **2a** је 1,142, односно 3,274 пута јаче у односу на варфарин. Ипак, ове вредности указују да је **2f** можда јачи антикоагулант од **2a**.

ТАБЕЛА 3.1. Константе асоцијације (K_A и K_A') и број центара (n и n') на којима се врши везивање деривата **2a-h** и варфарина (W) на серумски албумин у одсуству и у присуству аспирина (ознака ' изнад константе), израчунате помоћу Hill-ове и Scatchard-ове анализе титрације на 310,15 K у раствору PBS-а, на рН 7,4.

ЈЕД.	n	n'	$K_A(\mu\text{M}^{-1})$	$K_A'(\mu\text{M}^{-1})$	МОДЕЛ
2a	$1,022 \pm 0,014$	$1,037 \pm 0,014$	$0,425 \pm 0,054$	$0,432 \pm 0,054$	Јед. 1
	$1,048 \pm 0,027$	$1,057 \pm 0,027$	$0,645 \pm 0,023$	$0,661 \pm 0,023$	Јед. 2
2b	$1,078 \pm 0,026$	$1,046 \pm 0,025$	$0,226 \pm 0,032$	$0,125 \pm 0,024$	Јед. 1
	$1,096 \pm 0,012$	$1,064 \pm 0,038$	$0,353 \pm 0,027$	$0,879 \pm 0,053$	Јед. 2
2c	$1,056 \pm 0,067$	$1,078 \pm 0,024$	$0,113 \pm 0,022$	$0,115 \pm 0,021$	Јед. 1
	$1,074 \pm 0,031$	$1,067 \pm 0,032$	$0,357 \pm 0,041$	$0,445 \pm 0,038$	Јед. 2
2d	$1,018 \pm 0,014$	$1,057 \pm 0,014$	$0,225 \pm 0,054$	$0,422 \pm 0,054$	Јед. 1
	$1,059 \pm 0,024$	$1,061 \pm 0,027$	$0,235 \pm 0,011$	$0,561 \pm 0,021$	Јед. 2
2e	$1,018 \pm 0,014$	$1,057 \pm 0,014$	$0,225 \pm 0,054$	$0,422 \pm 0,054$	Јед. 1
	$1,059 \pm 0,024$	$1,061 \pm 0,027$	$0,235 \pm 0,011$	$0,561 \pm 0,021$	Јед. 2
2f	$1,049 \pm 0,281$	$1,075 \pm 0,281$	$0,567 \pm 0,047$	$0,573 \pm 0,047$	Јед. 1
	$1,278 \pm 0,013$	$1,283 \pm 0,013$	$0,875 \pm 0,013$	$0,882 \pm 0,013$	Јед. 2
2g	$1,099 \pm 0,221$	$1,089 \pm 0,382$	$0,166 \pm 0,024$	$0,275 \pm 0,042$	Јед. 1
	$1,175 \pm 0,013$	$1,183 \pm 0,013$	$0,275 \pm 0,013$	$0,382 \pm 0,012$	Јед. 2
2h	$1,022 \pm 0,001$	$1,132 \pm 0,251$	$0,363 \pm 0,067$	$0,373 \pm 0,042$	Јед. 1
	$1,173 \pm 0,016$	$1,232 \pm 0,014$	$0,372 \pm 0,011$	$0,362 \pm 0,011$	Јед. 2
W	$1,209 \pm 0,143$	$1,176 \pm 0,143$	$0,372 \pm 0,016$	$0,367 \pm 0,016$	Јед. 1
	$1,295 \pm 0,002$	$1,274 \pm 0,002$	$0,197 \pm 0,018$	$0,184 \pm 0,018$	Јед. 2

Вредности K_A за остале деривате биле су значајно мање што је указало на то да би, и поред потенцијалне антикоагулативне активности, апликација осталих деривата била ризична са аспекта унутрашњег крвањења. Овај резултат био је и одличан филтер јер је указао на то да се једињења **2a** и **2f** могу чак и пре евалуације антикоагулативне активности сматрати кандидатима за *in vitro* и *in vivo* студије.

Један од важних резултата проистекао из експеримената флуоресценције био је број молекула деривата **2a–h** који се могу везати за серумски албумин. За све испитиване деривате, израчунати број центара на којима се врши везивање за албумин (n) износио је приближно 1, што је у сагласности са кристалографским подацима за варфарин, према којима постоји само један положај на албумину где се варфарин везује. Онај резултат указао је да вреди урадити *in silico* предвиђање конформације тестираних једињења приликом везивања за серумски албумин, применом молекулског доковања. Дефинисање биоактивних конформација, нарочито у случају једињења **2a** и **2f**, дало би важне параметре у циљу потврде потенцијалне антикоагулативне активности једињења и малог ризика по изазивање унутрашњег крварења. Резултати предложених експеримената изложени су у даљем тексту.

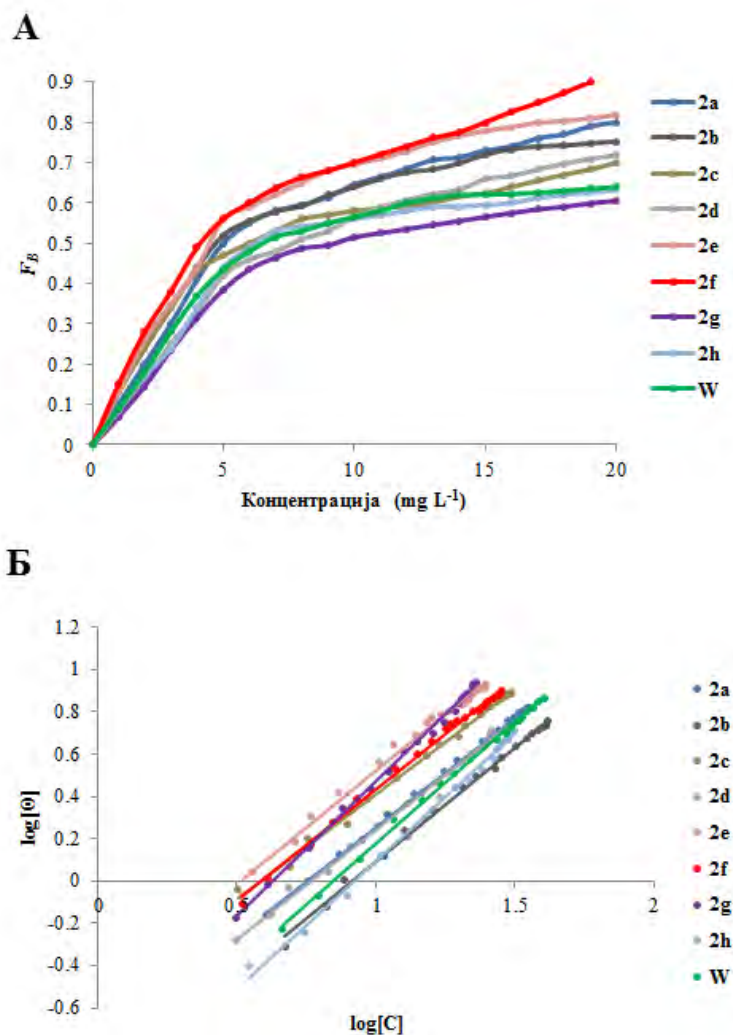
3.2.2. ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2a-h ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН У ПРИСУСТВУ АСПИРИНА

На Слици 3.4 приказани су спектри флуоресценције комплекса деривата **2a–h** и варфарина са серумским албумином у присуству аспирина. Иницијалном анализом графика закључено је да везивање аспирина за серумски албумин чак утиче и на благо повећање интензитета флуоресценције антикоагулант-серумски албумин комплекса деривата **2a** и **2f**; повећани интензитети флуоресценције у оба раствора указују на то да једињења имају још јачи афинитет према везивању за серумски албумин, што је корелирало са тврдњом да се деривати могу сматрати кандидатима за антикоагуланте *in vitro* и *in vivo*. Афинитет једињења према крвном транспортеру потврђен је након израчунавања константи асоцијација након додавања аспирина (K_A').

У поређењу са резултатима добијеним за системе у којима нема аспирина (Табела 3.1), вредности K_A' за **2a** и **2f** порасле су након додатка аспирина до вредности $K_A' = 0,882 \mu\text{M}^{-1}$ за **2f** и $K_A' = 0,661 \mu\text{M}^{-1}$ за **2a**, док је константа асоцијације за раствор са варфарином опала до вредности $K_A' = 0,184 \mu\text{M}^{-1}$ (Табела 3.1).

Повећане вредности K_A' деривата **2a** и **2f** указале су да аспирин не утиче на повећање концентрације једињења у плазми. Другим речима, када једињења **2a** и **2f** једном заузму место у активном центру серумског албумина, врло је тешко заменити их аспирином пре доласка до ендоплазматичног ретикулума. Тиме је индицирано да једињења не би требало да поседују капацитет изазивања унутрашњег крварења. Што се тиче варфарина, додатно смањење K_A' вредности указује на то да је комплекс

варфарин-серумски албумин веома лабилан и да постоји велики ризик од унутрашњег крварења индукован варфарином.

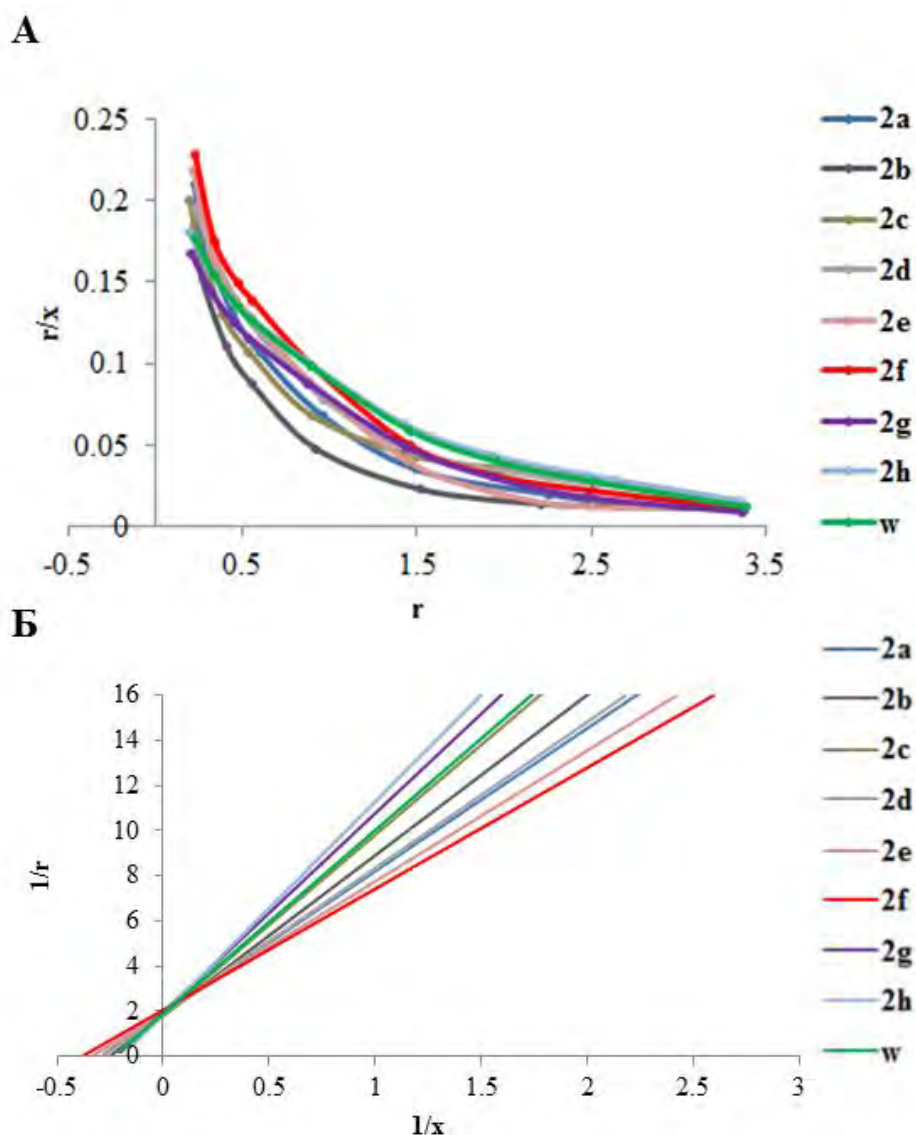


Слика 3.4. А) Изотерме везивања деривата **2a–h** и варфарина растворених у раствору PBS-а, на рН 7,4 и 310,15 К, при константној концентрацији албумина (35 g/L) у раствору PBS-а, на рН 7,4 у присуству аспирина; Б) Резултати Hill-ове анализе за деривате **2a–h** и варфарин у раствору PBS-а, при рН 7,4, засноване на равнотежној концентрацији слободних деривата **2a–h** и варфарина. Интензитет флуоресценције упоређиван је са аминокиселином триптофан из активног центра серумског албумина која емитује флуоресцентно зрачење на 340 nm, док се ексцитација врши на 280 nm.

3.2.3. ОДРЕЂИВАЊЕ ПРОЦЕНТА ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h ЗА СЕРУМСКИ АЛБУМИН

Након дефинисања вредности константи асоцијација и броја везивних места деривата везаних за серумски албумин, одређен је и проценат везивања деривата HPLC анализом. Тако, деривати **2a**, **2f** и варфарин везују се у високом проценту за серумски

албумин, што се може закључити из остатка слободних фракција ових једињења у систему који износи 0,7, 0,6 и 0,8% (Табела 3.2, колона U од енг. unbound, неvezано). Дијаграм везивања једињења **2a-h** и варфарина у различитим концентрацијама за албумин према Scatchard-овој анализи је приказан на Слици 3.5А.



Слика 3.5. А) Scatchard-ов дијаграм слободних деривата **2a-h**, и варфарина у раствору албумина (35 g/L у PBS-у, рН 7,4); Б) Lineweaver-Burk-ов дијаграм везаних једињења **2a-h** и варфарина у раствору албумина. Апсциса: реципрочна вредност концентрације слободног (неvezаног) молекула. Ордината: реципрочна вредност броја везаних молекула по молекулу албумина.

Анализом је потврђено да сва једињења имају по једно специфично место везивања (n_1) док је број неспецифичних везивних места (n_2) био у интервалу од 3,8 до 4,2. Дериват **2f** испољава бољи афинитет ка албумину са најнижом вредношћу

константе дисоцијације (K_{d1}) од 1,2 μM , а затим следе **2a** ($K_{d1} = 1,6 \mu\text{M}$) и варфарин ($K_{d1} = 5,3 \mu\text{M}$). Константа дисоцијације представља још један значајан индекс који предвиђа ризик од крварења након апликације деривата. Што је нижа вредност константе дисоцијације, јаче је везивање антикоагуланта за серумски албумин, већи је афинитет антикоагуланта према носачу, мања је концентрација слободног антикоагуланта у плазми и мања могућност индуковања унутрашњег крварења.¹⁶¹ Као што се може видети из Табеле 3.2, вредности K_{d1} значајно су мање за деривате **2f** и **2a** у односу на варфарин. Како су вредности K_{d1} и K_A реципрочне, што је такође потврђено и експерименталним израчунавањима (Табела 3.2 у односу на Табелу 3.1) обе константе указују на то да након везивања за серумски албумин, у плазми остаје ниска концентрација **2a** и **2f**, те да ова два деривата показују мали ризик за изазивање унутрашњег крварења.

ТАБЕЛА 3.2. Процентуалне вредности слободних једињења и параметри везивања за **2a-h** и варфарин у раствору хуманог серумског албумина.

ЈЕД.	U %	СПЕЦИФИЧНО ВЕЗИВАЊЕ		НЕ-СПЕЦИФИЧНО ВЕЗИВАЊЕ		МОДЕЛ
		n_1	K_{d1} (μM)	n_2	K_{d2} (μM)	
2a	0,7±0,1	0,9±0,1	1,632±0,324	3,8±0,2	55,2±2,4	Јед. 1
	0,8±0,1	1,0±0,1	1,846±0,543	3,7±0,2	45,6±3,8	Јед. 2
2b	0,6±0,2	1,1±0,2	0,979±0,065	4,0±0,1	18,2±1,7	Јед. 1
	0,7±0,2	1,0±0,1	1,221±0,153	3,8±0,2	11,3±2,5	Јед. 2
2c	0,7±0,2	1,2±0,1	0,998±0,031	3,6±0,1	18,7±1,6	Јед. 1
	0,8±0,2	1,0±0,1	1,131±0,242	3,7±0,1	22,5±1,4	Јед. 2
2d	0,9±0,2	0,8±0,1	0,987±0,052	4,1±0,2	22,7±1,2	Јед. 1
	0,9±0,2	0,9±0,1	1,291±0,074	4,3±0,2	17,8±0,7	Јед. 2
2e	0,7±0,2	1,0±0,2	0,982±0,081	3,9±0,1	23,7±0,9	Јед. 1
	0,6±0,2	1,0±0,1	0,996±0,032	3,7±0,2	17,9±0,8	Јед. 2
2f	0,6±0,1	1,3±0,2	1,233±0,142	3,9±0,1	52,7±5,1	Јед. 1
	0,6±0,1	1,1±0,1	1,779±0,423	3,8±0,1	38,4±2,3	Јед. 2
2g	0,8±0,2	1,2±0,2	1,928±0,145	3,6±0,1	36,4±2,1	Јед. 1
	0,7±0,2	1,0±0,1	1,895±0,266	3,6±0,1	26,2±1,4	Јед. 2
2h	0,9±0,2	0,9±0,1	1,883±0,195	3,9±0,1	26,8±1,1	Јед. 1
	0,9±0,2	0,8±0,1	2,894±0,346	4,0±0,1	27,6±0,9	Јед. 2
W	0,8±0,2	1,1±0,1	5,325±0,325	4,2±0,5	71,8±7,4	Јед. 1
	0,9±0,2	1,0±0,1	4,785±0,211	4,3±0,1	54,3±3,1	Јед. 2

На Слици 3.5Б приказани су резултати специфичног везивања **2a-h** и варфарина за албумин, добијени из реципрочних вредности за r и x према Lineweaver-Burk-у, где r

представља број везаних молекула по молекулу албумина док x представља концентрацију слободног (невезаног) молекула.⁸⁹ Са слике можемо видети да криве за различите лиганде пресецају y -осу у једној тачки, а x -осу у више тачака.

3.2.4. МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА **2a** И **2f** НА ХУМАНОМ СЕРУМСКОМ АЛБУМИНУ

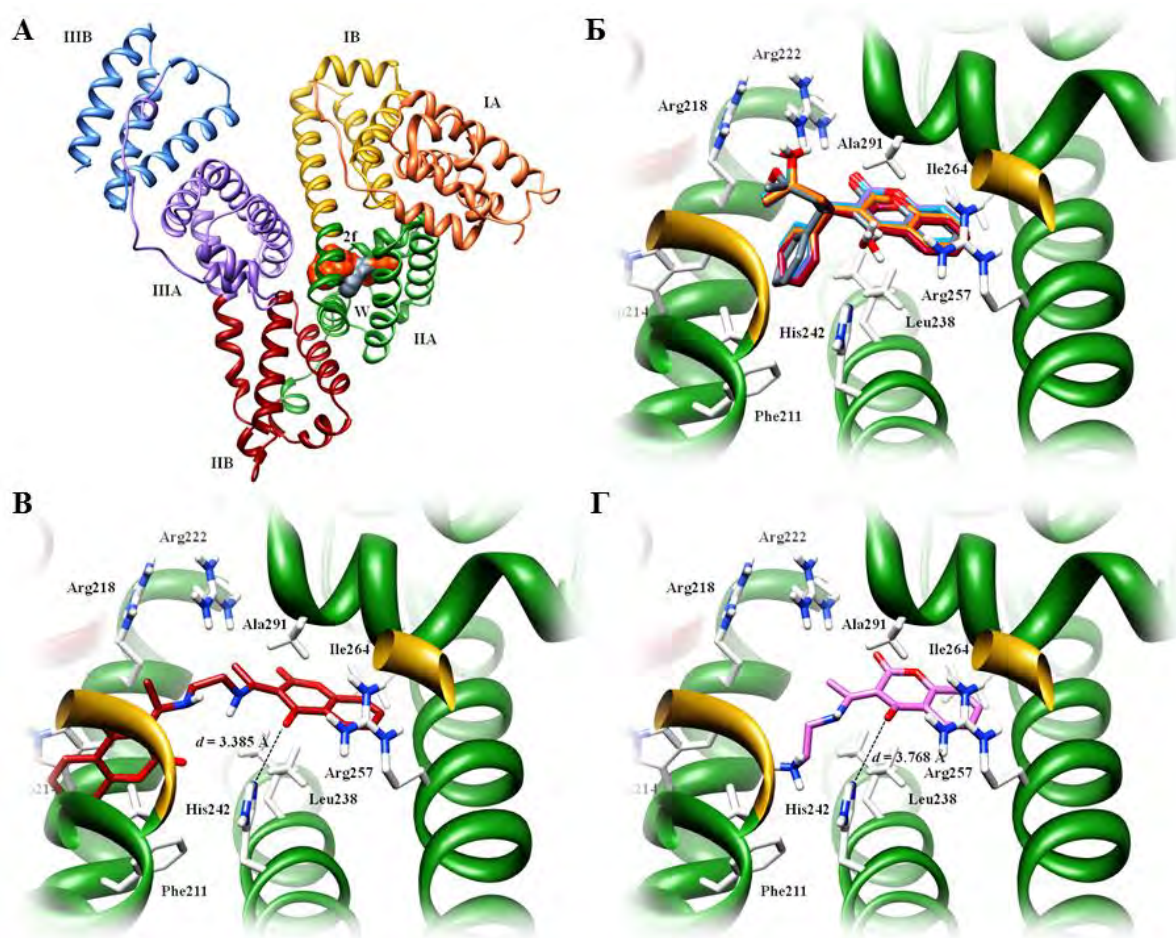
Током транспорта лека до молекулске мете VKORC1, варфарин се везује за суб-домен ПА хуманог серумског албумина (Слика 3.6А).⁵⁶ Да би се репродуковала конформација варфарина (Слика 3.6Б, тамно сива структура), а све са циљем проналажења најбољег *in silico* алгорита за предвиђање конформација деривата **2a** и **2f** у суб-домену ПА хуманог серумског албумина, коришћена су три различита алгорита/скоринг функције за молекулско доковање. Анализа интеракција варфарина са активним центром хуманог серумског албумина извршена је помоћу четири различите процедуре које су описане као поновно доковање експерименталне конформације (Слика 3.6Б, љубичаста структура), поновно доковање насумичне конформације (Слика 3.6Б, плава структура), унакрсно доковање експерименталне конформације (Слика 3.6Б, наранџаста структура) и унакрсно доковање насумичне конформације (Слика 3.6Б, црвена структура).

Анализирајући резултате примене молекулског доковања (Табела 3.3) утврђено је да је скоринг функција програма AutoDockVina најбоље репродуковала кристалну структуру варфарина, са најнижом RMSD вредношћу, јер је постигнуто преклапање конформација добијених поновним и унакрсним доковањем експерименталне или насумичне конформације са конформацијом варфарина из кристалне структуре.

С обзиром да се за серумски албумин може везати велики број различитих једињења, скоринг функција програма AutoDock Vina примењена је да би се утврдило да ли ће се испитивана једињења **2f** (Слика 3.6В) и **2a** (Слика 3.6Г) везати у активном центру хуманог серумског албумина на сличан начин варфарину, чиме би се омогућио несметани транспорт до VKORC1.

Према расположивим кристалним структурама, уочено је да се субдомен ПА, у коме се варфарин везује за албумин, састоји од две подшупљине које су означене као улазна и главна шупљина. Улазна шупљина у кристалној структури је попуњена 3(3-оксо-1-фенилбутил)-остатком варфарина. Према резултатима добијеним молекулским доковањем, уочено је да исту шупљину попуњавају други хромански прстен деривата

2f и терминална аминокиселинска група деривата **2a**, које су везане за главни хромански прстен **2f** и **2a** преко етилендиаминског моста. Бензил остатак другог хроманског прстена деривата **2f** стабилизован је у улазној шупљини хидрофобним интеракцијама са аминокиселинама Phe211, Trp214, Leu219 и Leu238. Поред описаних хидрофобних интеракција, успостављају се и електростатичке интеракције између лактонског карбонила другог хроман-2,4-дионског прстена и His242. У случају деривата **2a**, терминална аминокиселинска група успоставља електростатичке интеракције са His242; на тај начин бива стабилизована у улазној шупљини субдомена IIIA.



Слика 3.6. (А) Кристална структура хуманог серумског албумина. (Б) Ко-кристализована експериментална конформација варфарина (сива боја), конформација варфарина добијена поновним доковањем (љубичаста боја), конформација варфарина добијена поновним доковањем насумичне конформације (плава боја), конформација варфарина добијена унакрсним доковањем (наранџаста боја), конформација варфарина добијена унакрсним доковањем насумичне конформације (црвена боја) (В) Најбоље докована структура деривата **2f**. (Г) Најбоље докована структура деривата **2a**.

ТАБЕЛА 3.3. Резултати репродукције кристалне структуре варфарина у активном центру хуманог серумског албумина помоћу програма AutoDock, Vina и DOCK6.

ЛИГАНД	AUTO DOCK	VINA	DOCK6	AUTO DOCK	VINA	DOCK6
	Поновно доковање експерименталне конформације (RMSD Å)			Поновно доковање насумичне конформације (RMSD Å)		
1h9z	1,485	1,047	1,897	1,675	1,292	2,435
1h2a	2,143	0,667	1,024	2,546	2,263	4,326
2bxd	1,647	0,668	3,412	2,087	1,158	3,296
	Унакрсно доковање експерименталне конформације (RMSD Å)			Унакрсно доковање насумичне конформације (RMSD Å)		
1h9z	2,423	1,432	4,345	3,321	1,823	2,637
1h2a	1,769	1,754	2,539	3,536	2,103	5,238
2bxd	2,496	1,647	3,982	1,659	1,734	2,531

Хроманска језгра деривата **2f** и **2a** попуњавају главну шупљину субдомена IIА. Главна шупљина садржи и хидрофобни џеп, сачињен од аминокиселина Leu219, Arg222, Phe223, Leu234, Ile264, Leu257 и Ile290, који се не окупира дериватима **2f** и **2a**. Овај џеп подељен је аминокиселинама Ala291 и Leu238 на два дела. Хроманско језгро оба деривата најпре остварује хидрофобни контакт са аминокиселинама у окружењу. Тако, фенил група хроманског прстена остварује интеракције са Ile260, Ile264 и Ile290, као и са алифатичним деловима Arg257 и Ser287. Атоми кисеоника C4 карбонилне групе оба деривата стабилизовани су водоничним везама које остварују са бочним ланцем His242. Везе су сличне по интензитету јер измерене дужине износе $d_{\text{НВ}} = 3,385 \text{ \AA}$ за **2f** и $d_{\text{НВ}} = 3,768 \text{ \AA}$ за **2a**. Лактонски кисеоници усмерени су ка шупљини у зиду џепа и не успостављају специфичне интеракције са протеином. Са друге стране, атоми кисеоника карбонилне групе лактонског остатка позиционирани су у близини ϵ -азотовог атома Arg222, успостављајући електростатичке интеракције. Први хроман-2,4-дионски прстен оба деривата додатно је стабилизован хидрофобним интеракцијама које се остварују између метил групе везане за двоструку везу на положају C3 хроманског прстена и бочног ланца Ala291. Остварене водоничне, електростатичке и хидрофобне интеракције деривата су у субдомену IIА серумског албумина, указују да су добијене конформације деривата **2f** и **2a** упоредиве са конформацијом варфарина, те да се транспорт до VKORC1 највероватније одвија на сличан начин.

3.2.5. ПРЕДВИЂАЊЕ КАРАКТЕРИСТИКА ДЕРИВАТА 2a-h ПОМОЋУ ADMETОХ ДЕСКРИПТОРА

Последњи сегмент предвиђања токсичности деривата пре саме апликације, био је предвиђање њихове токсичности кроз ADMETох особине. ADME је абревијација која у фармакокинетици и фармакологији означава апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам и екскрецију (енг. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion), и представља диспозицију фармацеутског једињења у организму. Ова четири критеријума утичу на концентрацију једињења и његову кинетику када се једињење као лек изложи ткивима, те утиче на ефикасност и фармаколошку активност самог једињења.

Према резултатима приказаним у Табели 3.4, предвиђено је да ће се сва једињења изузев **2h** лако ресорбовати у цревима. Деривати **2b** и **2d** су умерено растворни у води, а остали добро. За једињење **2f** постоји већа вероватноћа да ће се везати за транспортни протеин него **2a**, што је у колизији са претходно описаним резултатима. Продор из крви у мозак умерено је остварив. Пошто не инхибирају ензим Цитохром P450 2D6, сва једињења лако подлежу хидроксилацији у првој фази метаболизма и могу се екскретовати у виду глукуронида. Предвиђања показују да деривати **2f** и **2a** неће бити токсични на нивоу јетре.

ТАБЕЛА 3.4. Предвиђене ADMETох карактеристике испитиваних деривата.

ЈЕД.	ADMET ПАРАМЕТРИ							
	РЦ ^a	Р ^b	ВВВ ^b	ЦитP4502D6 ^г	РРВ ^d	AlogP98 ^h	PSA ^e	T ^ж
2a	0	3	2	0	1	-0,753	88,595	0
2b	0	4	3	1	2	0,541	77,171	1
2c	0	3	3	0	2	1,513	56,341	0
2d	0	4	3	0	2	-0,547	56,341	0
2e	0	3	2	0	0	2,226	112,683	0
2f	0	3	2	0	2	2,164	112,683	0
2g	0	3	4	0	2	-0,204	120,998	0
2h	3	3	4	0	1	1,996	151,341	1

^a Ресорпција у цревима (0: добра; 1: умерена; 2: слаба; 3: веома слаба); ^b Растворљивост у води (0: екстремно слаба; 1: веома слаба; 2: умерена; 3: добра; 4: оптимална; 5: превише растворно); ^г Продор из крви у мозак (0: веома висок; 1: висок; 2: умерен; 3: слаб; 4: недефинисан); ^д Инхибиција ензима Цитохром P450 2D6 (0: не инхибира; 1: инхибира); ^e Везивање за протеине плазме (0: < 90%; 1: > 90%; 2: > 95%); ^h Партициони коефицијент, LogP ($\leq -2,0$ или $\geq 7,0$: веома слабо апсорбује); ^e Поларна доступна површина (> 150: веома слабо апсорбује); ^ж Токсичност на нивоу јетре (0: нису токсична; 1: токсична).

3.3. АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ, ТОКСИЧНОСТ И ФАРМАКОЛОШКИ ПРОФИЛ ДЕРИВАТА **2a-h**

3.3.1. АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ

Након иницијалне *in vitro* процене на серумском албумину који би се од тестираних деривата могли администрирати као антикоагуланти, извршена је евалуација антикоагулативне активности тестираних деривата **2a-h** *in vivo*. Евалуација је извршена након интраперитонеалне апликације на одраслим пацовима соја Wistar, у три различите концентрације, 0,5, 1 и 2 mg/kg телесне тежине (Табела 3.5). Једињења су аплицирана у три различите концентрације, јер је циљ експеримента био да се добије одговарајућа зависност између концентрације и активности, односно концентрација која повећава протромбинско време до 200%. Тиме би се спречила смртност експерименталних животиња обзиром на чињеницу да LD₅₀ вредности испитиваних деривата нису биле познате. Изабран је третман у трајању од седам дана континуиране терапије јер варфарин и други клинички примењивани антикоагуланти испољавају своје антикоагулативно дејство након дугорочног примењивања.¹⁶²

Иако се клинички коришћени антикоагуланти примењују орално, у тренутној фази евалуације изабрано је интраперитонеално дозирање, као начин за добијање пуног ефекта тестираних једињења у примењеној концентрацији. Како се интраперитонеалним аплицирањем једињења директно уносе у јетру, тако се тренутно изазива интеракција између деривата и ензима јетре VKORC1 и врши његова инхибиција.¹⁶³ Интраперитонеалном апликацијом обезбеђује се да примарни пут апсорпције једињења буде кроз мезентеричне крвне судове који се уливају у порталну вену и пролазе кроз јетру. Lukas и сарадници су показали да се једињења аплицирана интраперитонеално примарно адсорбују кроз јетру пре него што доспеју до других органа.¹⁶³ Поред тога, интраперитонеална апликација примењена је да би свака животиња примила тачно одређену дозу, на најбезбеднији начин.

Активност једињења узимана је у обзир само у *in vivo* условима, јер је фармакологија инхибиције коагулационог циклуса кумаринима и сродним антикоагулантима значајна само ако је активност посматрана на молекулском нивоу, т.ј. ако антикоагуланти антагонирају циклус витамина К. Деривати **2a-f** су по структури компетитивни антагонисти витамин К 2,3-епоксида и због тога могу бити

антагонисти VKORC1. Са друге стране, деривати **2g-h** у својој структури садрже 4-хидроксикумарински прстен, који је основа структуре варфарина. Стога и ови деривати могу бити потенцијални антикоагуланти. Јасан увид у структурне карактеристике које одређују активност сваког једињења добијен је након дискусије о резултатима који се односе на сваку појединачну концентрацију (Табела 3.5).

ТАБЕЛА 3.5. Вредности коагулационих и биохемијских параметара из плазме и серума након седмодневне интраперитонеалне апликације деривата **2a-h** на одраслим пацовима соја Wistar.

Јед.	Конц. (mg/kg)	PT (сек)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	БИЛИРУБИН μmol/L
2a	0,5	^a 24,2±0,5 ^{*†}	81,89±0,24 ^{*†}	31,86±0,14 [*]	383,10±0,25 ^{*†}	28,42±0,25 ^{*†}
	1	48,4±0,5 ^{*‡}	103,89±0,28 ^{*‡}	39,29±0,23 ^{*‡}	355,41±0,14 ^{*‡}	44,08±0,32 ^{*‡}
	2	90,0±0,9 [*]	58,58±0,32 ^{*§}	26,63±0,24 ^{*§}	412,82±0,38 ^{*§}	30,49±0,17 [*]
2b	0,5	22,0±0,2 [*]	52,60±0,46 ^{*†}	43,65±0,22 ^{*†}	348,45±0,45 ^{*†}	44,11±0,35 ^{*†}
	1	25,3±0,7 ^{*‡}	73,50±0,25 ^{*‡}	46,71±0,41 ^{*‡}	345,05±0,35 ^{*‡}	26,51±0,41 ^{*‡}
	2	84,3±0,9 ^{*§}	52,47±0,18 ^{*§}	29,25±0,15 ^{*§}	353,27±0,26 ^{*§}	33,07±0,36 ^{*§}
2c	0,5	29,5±0,3 ^{*†}	59,89±0,47 ^{*†}	27,06±0,26 ^{*†}	289,85±0,42 ^{*†}	39,80±0,32 ^{*†}
	1	21,5±0,4 ^{*‡}	79,18±0,25 ^{*‡}	30,99±0,24 ^{*‡}	323,56±0,13 ^{*‡}	25,85±0,41 [*]
	2	20,5±0,4 ^{*§}	123,09±0,23 ^{*§}	29,25±0,17 ^{*§}	551,59±0,18 ^{*§}	32,31±0,35 ^{*§}
2d	0,5	25,8±0,4 ^{*†}	85,55±0,24 ^{*†}	44,96±0,19 ^{*†}	446,54±0,46 ^{*†}	27,93±0,21 ^{*†}
	1	32,8±0,6 ^{*‡}	78,57±0,15 [*]	34,48±0,16 ^{*‡}	439,74±0,24 ^{*‡}	39,67±0,41 ^{*‡}
	2	33,4±0,8 ^{*§}	80,32±0,16 ^{*§}	30,99±0,35 ^{*§}	389,13±0,32 ^{*§}	35,89±0,32 ^{*§}
2e	0,5	22,1±0,3 [*]	105,20±0,24 ^{*†}	43,65±0,42 ^{*†}	456,13±0,21 ^{*†}	32,10±0,41 ^{*†}
	1	78,4±0,6 ^{*‡}	115,24±0,21 ^{*‡}	41,90±0,16 ^{*‡}	545,47±0,24 ^{*‡}	29,13±0,21 ^{*‡}
	2	79,4±0,6 [*]	139,24±0,22 ^{*§}	53,69±0,27 ^{*§}	414,26±0,56 ^{*§}	54,04±0,41 ^{*§}
2f	0,5	25,8±0,5 ^{*†}	94,80±0,15 ^{*†}	47,58±0,34 ^{*†}	388,28±0,52 ^{*†}	41,47±0,25 ^{*†}
	1	79,3±0,6 ^{*‡}	107,51±0,24 ^{*‡}	54,56±0,24 ^{*‡}	520,68±0,61 ^{*‡}	33,43±0,21 ^{*‡}
	2	130,0±1,1 ^{*§}	108,41±0,14 ^{*§}	48,89±0,35 ^{*§}	415,20±0,34 ^{*§}	37,96±0,21 ^{*§}
2g	0,5	25,1±0,2 ^{*†}	90,42±0,23 ^{*†}	40,81±0,41 ^{*†}	445,69±0,33 ^{*†}	21,46±0,16 ^{*†}
	1	23,1±0,2 ^{*‡}	98,28±0,14 ^{*‡}	37,32±0,35 ^{*‡}	572,65±0,18 ^{*‡}	27,09±0,21 ^{*‡}
	2	29,6±0,2 ^{*§}	98,21±0,27 ^{*§}	26,98±0,51 ^{*§}	374,43±0,25 ^{*§}	16,17±0,41 ^{*§}
2h	0,5	19,5±0,3 ^{*†}	92,69±0,52 [†]	48,02±0,15 ^{*†}	370,70±0,47 ^{*†}	29,22±0,35 ^{*†}
	1	21,7±0,4 ^{*‡}	93,85±0,43 ^{*‡}	35,79±0,26 ^{*‡}	341,48±0,26 ^{*‡}	28,42±0,36 ^{*‡}
	2	30,2±0,4 ^{*§}	106,51±0,35 ^{*§}	43,87±0,27 ^{*§}	474,65±0,51 ^{*§}	43,06±0,25 ^{*§}
W	0,5	21,9±0,2 [*]	92,10±0,24	31,65±0,41 [*]	479,15±0,21 [*]	46,97±0,52 [*]
	1	49,8±0,6 [*]	97,48±0,22 [*]	31,43±0,31 [*]	313,97±0,33 [*]	25,35±0,23 [*]
	2	89,8±0,4 ^{*§}	106,07±0,32 ^{*§}	39,29±0,47 ^{*§}	417,49±0,14 ^{*§}	30,30±0,45 ^{*§}
C		14,5±0,1	92,80±0,21	29,25±0,42	376,18±0,35	15,73±0,36

^aСредње вредности три независна експеримента; n = 50 пацова; 5 пацова по групи; * p < 0,05 поређено са негативном контролом; †p < 0,05 поређено са варфарином у концентрацији 0,5 mg/kg; ‡p < 0,05 поређено са варфарином у концентрацији 1 mg/kg; §p < 0,05 поређено са варфарином у концентрацији 2 mg/kg.

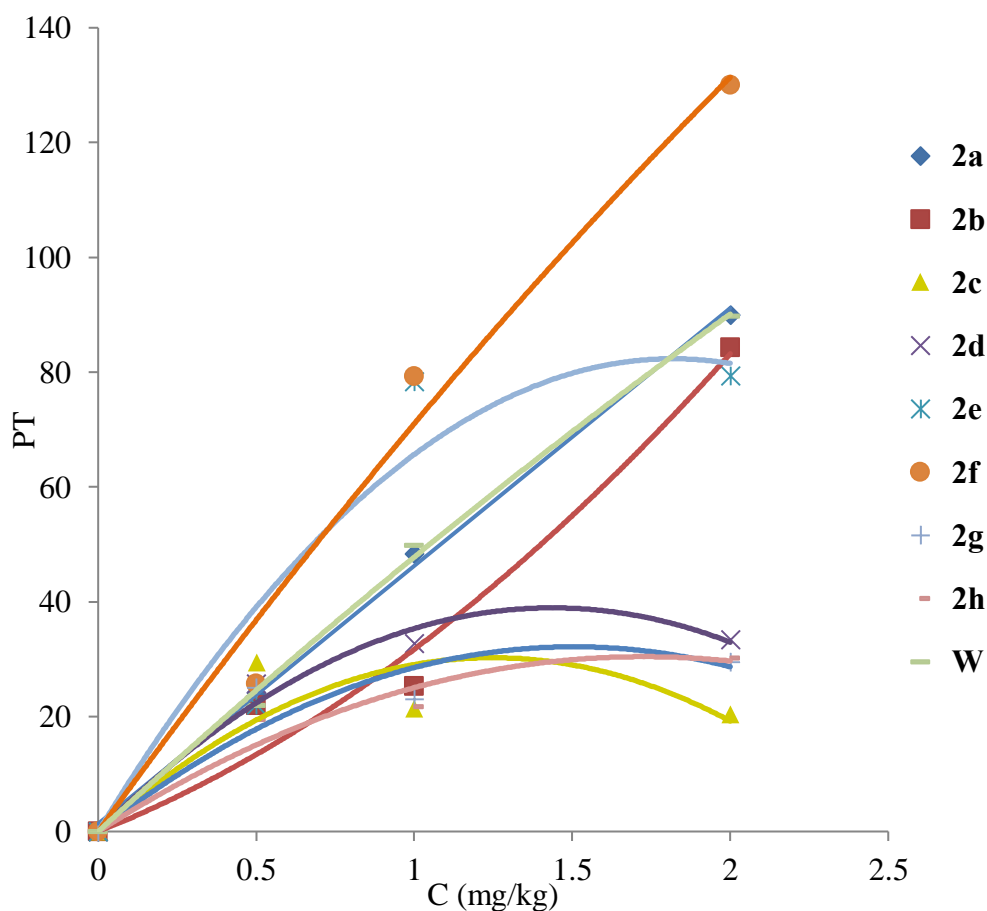
Након администрације деривата **2a-h** у концентрацији од 0,5 mg/kg телесне масе примећено је да активност опада следећим редоследом **2c > 2d = 2f > 2g > 2a > 2e > 2b > W > C > 2h**. Седам деривата, изузев **2h**, показало је бољу активност од варфарина. То није било изненађујуће знајући да варфарин испољава добру антикоагулативну активност након седмодневног континуираног третмана у вишим концентрацијама.¹⁶² У поређењу са нормалним протромбинским временом измереним код животиња третираних са физиолошким раствором (0,9 % NaCl, C) као негативном контролом (PT = 14,5 сек), односно повећаном вредности протромбинског времена индукованом након администрације клиничког антикоагуланта варфарина (PT = 21,95 сек) као позитивном контролом, активност испитиваних једињења била је у интервалу PT = 22,0 – 29,5 сек. На основу резултата може се закључити да деривати који садрже хроман-2,4-дионско језгро (**2a-f**) јесу бољи антикоагуланти од 4-хидроксикумарина (**2g-h**).

Са повећањем концентрације, деривати са етан-1,2-диаминским (**2f**, PT = 79,3 сек) и пропан-1,3-диаминским (**2e**, PT = 78,4 сек) остатком на положају C-3 и додатним хроман-2,4-дионским прстеном везаним за терминалну аминок групу, показали су се као бољи антикоагуланти од варфарина (PT = 49,8 сек). Остали деривати испољили су слабију активност од варфарина. Активност деривата **2a** (PT = 48,4 сек), који садржи етан-1,2-диамински остатак, била је незнатно мања од варфарина и може се поредити са њим (PT = 49,8 сек).

При највишој концентрацији, само су деривати **2f** (PT = 130,0 сек) и **2a** (PT = 90,0 сек) показали бољу активност од варфарина (PT = 89,8 сек). Добијени резултати нам указују на то да присуство хроман-2,4-дионског прстена и етилендиаминског остатка на положају C-3 повољно утичу на *in vivo* антикоагулативну активност тестираних деривата.

Одлука да се животиње третирају дериватима **2a-h** у три различите концентрације била је оправдана, јер се код најактивнијих деривата, **2a** и **2f**, добила линеарна зависност између концентрације и активности (Слика 3.7). Приказани резултати су у сагласности са добро познатом антикоагулативном особином варфарина, да се протромбинско време линеарно повећава са повећањем дозе.¹⁶² Како су једино деривати **2a** и **2f** показали линеарну зависност, остали деривати се не могу

класификовати као антикоагуланти, јер њихова активност опада са порастом концентрације.



Слика 3.7. Крива зависности *in vivo* антикоагулативне активности и концентрације деривата **2a-h**.

Даље, након интраперитонеалне апликације деривата потврђена су предвиђања проистекла из интеракција са серумским албумином, да се једињења **2a** и **2f** могу разматрати као антикоагуланти, што је представљало изузетну валидацију *in vitro* експеримената.

3.3.2. АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА **2a** И **2f** НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ

Следећи корак у евалуацији антикоагулативне активности био је орална апликација најактивнијих деривата **2a** и **2f**. Администрација *per os* уобичајени је начин преписивања терапије пацијентима којима је терапија антикоагулантима неопходна.

Ипак, највећи проблем овакве терапије је то што се дозирање одређује за сваког пацијента понаособ и захтева константни мониторинг. Обзиром на то да је експеримент планиран на експерименталним животињама, узета је десетострука концентрација једињења за апликацију, због непознанице колико ће заправо експерименталне животиње орално узети раствор антикоагуланта на дневној бази.

Резултати *in vivo* антикоагулативне активности деривата **2a**, **2f** и варфарина, аплицираних орално на одраслим пацовима соја Wistar, у концентрацији од 20 mg/kg телесне масе, приказани су у Табели 3.6. Активност је одређена мерењем протромбинског времена (PT) и представљена је у секундама. Такође, антикоагулативна активност за свако једињење изражена је у INR јединицама.³ Примењен је третман седмодневне континуиране терапије јер варфарин и други клинички антикоагуланти испољавају своје дејство након дугорочне примене.¹⁶⁰

ТАБЕЛА 3.6. Вредности коагулационих и биохемијских параметара из плазме и серума након седмодневног оралног третмана дериватима **2a**, **2f** и варфарином (W) у концентрацији 20 mg/kg телесне тежине на одраслим пацовима соја Wistar.

Јед.	Конц. (mg/kg)	PT (сек)	INR	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	γ-GT (U/L)
2a	20	56,63±0,24 ^{a†}	2,6 [†]	80,88±0,24 ^{*†}	56,75±0,54	198,04±0,18 ^{*†}	10,31±0,15
2f	20	60,08±0,35 [*]	2,8	117,13±0,12 [*]	58,20±0,12	269,86±0,47 ^{*†}	8,44±0,29
W	20	75,20±0,51 [*]	4,1	118,42±0,18 [*]	59,85±0,46	237,79±0,34 [*]	11,05±0,03
C		14,30±0,57 [†]		109,88±0,61 [†]	52,42±0,18	228,22±0,16 [†]	7,17±0,38

^aСредње вредности три независна експеримента; n = 50 пацова; 5 пацова по групи; * p < 0,05 поређено са негативном контролом; †p < 0,05 поређено са раствором варфарина у концентрацији од 20 mg/kg.

Из Табеле 3.6 може се видети да, у односу на негативну контролу (PT = 14,30 сек), варфарин испољава најбољу антикоагулативну активност (PT = 75,20 сек, INR = 4,1), а затим деривати **2f** (PT = 60,08 сек, INR = 2,8) и **2a** (PT = 56,63 сек, INR = 2,6). Према добијеним резултатима, варфарин је показао незнатно бољу антикоагулативну активност у односу на деривате **2f** и **2a**, узимајући у обзир само вредности за протромбинско време. Ипак, прави потенцијал антикоагуланта у терапији огледа се у његовој INR вредности, јер терапија помоћу новог антикоагуланта треба да буде прописана и примењивана у оквиру одређене вредности INR.³ Тако, када је INR вредност антикоагуланта мања од 2,0, активност једињења може бити праћена повећаним ризиком од венске тромбозе, док у случајевима када је INR вредност већа од 4,0 постоји повећан ризик од унутрашњег крварења.

Током третмана варфарином, примећена је крвава столица код једне од експерименталних животиња. Као што је и било предвиђено везивањем варфарина за серумски албумин, терапија клиничким антикоагулантом проузроковала је мање унутрашње крварење које је потврђено INR вредношћу већом од 4,0. С друге стране, деривати **2f** и **2a** показали су значајну антикоагулантну активност, без појаве унутрашњег крварења као нежењеног ефекта. Поред тога, на основу INR вредности које су се кретале у препорученом INR опсегу антикоагуланта у појединачним терапијама, од 2,6 до 2,8, једињења могу бити укључена у лечење пацијената који пате од атријалне фибрилације и венске тромбозе.

3.3.3. ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ХЕПАТОЦИТА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

Процена хемијски изазваног оштећења јетре након администрације деривата **2a-h** (Табела 3.5) извршена је одређивањем каталитичке активности ензима серума, аспартат трансминазе (AST), аланин трансминазе (ALT) и алкалне фосфатазе (ALP), као хепатоцелуларних параметара, те праћењем концентрације билирубина као хепатобилијарног параметра.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Параметри AST, ALT и ALP осетљиви су индикатори акутног оштећења јетре.¹⁶⁴ Код хемијски изазваних оштећења ћелијске мембране хепатоцита, каталитичка активност AST и ALT се повећава и ензими се ослобађају у екстрацелуларну средину.¹⁶⁷ Пошто је ALP екстрацелуларни ензим, пораст његове каталитичке активности није поуздан индикатор трајног оштећења јетре.¹⁶⁸ Концентрација билирубина је користан клинички параметар за дијагностификовање поремећаја функције јетре или билијарног тракта.¹⁶⁹

Биохемијске анализе спроведене су на узорцима крвног серума добијених након апликације деривата **2a-h** у три различите концентрације (Табела 3.5). Интраперитонеална администрација деривата који је показао најбољу антикоагулативну активност, **2f**, узроковала је да каталитичка активност AST расте са повећањем концентрације деривата, али се ипак могла упоредити са позитивном контролом. Тако су вредности за AST у узорцима серума засићених дериватом **2f** биле 1,02-, 1,16- и 1,17-пута веће у односу на негативну контролу, а 1,02-, 1,10- и 1,02-пута веће у односу на узорке са варфарином. Ове вредности указале су да **2f** изазива слабо или незнатно оштећење ћелија јетре. Додатно, мале промене каталитичке активности

ALP са порастом концентрације (1,03-, 1,52- и 1,11-пута више у односу на негативну контролу) сугеришу да је **2f** изазвао инфламацију, али не и некрозу хепатоцита. Са друге стране, друго једињење по активности, **2a**, није изазвало инфламацију ткива јер је каталитичка активност AST-а опадала са порастом концентрације деривата. У узорцима који су садржали 2 mg/kg деривата **2a**, вредност за AST била је чак и нижа у односу на негативну контролу, 63,13% од нормалне вредности лабораторијских животиња. Слично понашање је забележено и анализом каталитичке активности ALT. На основу концентрације укупног билирубина, закључено је да нису забележене промене на јетри након администрације деривата **2a** и **2f**. Појава да се каталитичка активност ензима не мења или опада са порастом концентрације деривата, може се повезати са чињеницом да се деривати вероватно лако екскретују у виду 7-хидрокси-глукуронида, односно, да се не задржавају у организму.¹⁷⁰

3.3.4. ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ХЕПАТОЦИТА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a и 2f

Процена хемијски изазваног оштећења јетре пацова, након оралне апликације испитиваних једињења **2a** и **2f** у десетострукој концентрацији, извршена је такође одређивањем каталитичке активности ензима серума, аспартат трансминазе (AST), аланин трансминазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP) и γ -глутамил трансферазе (γ -GT).

Након оралне администрације, каталитичка активност AST опадала је следећим редоследом: варфарин (W) > **2f** > C > **2a** (Табела 3.6). Из приложеног се могло закључити да је највећи пораст каталитичке активности ензима забележен у узорцима третираним варфарином, а затим у узорцима третираним једињењем **2f**. У односу на негативну контролу, вредности каталитичке активности AST у серуму засићеног варфарином биле су 1,08-пута веће од оних у негативној контроли, док су вредности каталитичке активности AST у серуму засићеног са **2f** биле 1,06-пута веће од активности ензима у негативној контроли. С друге стране, **2a** није узроковао инфламацију хепатоцита, већ је дериват показао антиинфламаторну активност, јер је каталитичка активност AST била на вредности 73,61% од вредности измерене у узорцима серума нетретираних животиња.

Сличан тренд примећен је током анализе каталитичке активности АЛТ. Каталитичка активност у испитиваним узорцима опадала је следећим редоследом: варфарин > **2f** > **2a** > С. Инфламација изазвана третманом са дериватом **2f** била је нижа од оне која је изазвана варфарином, јер је измерена активност овог ензима у серуму животиња третираних дериватом **2f** била 97,24% од вредности измерене за варфарин. Ипак, појавио се изузетак код узорка засићеног са **2a**, где је забележена активност ензима била 1.08- пута већа од вредности измерене у негативној контроли. Како ова разлика није статистички значајна, може се рећи да **2a** не изазива инфламацију хепатоцита.

Анализом каталитичке активности АЛР уочено је да се у узорцима третираним дериватом **2f** повећала активност ензима 1,13- и 1,18-пута у односу на позитивну и негативну контролу, што је указало на то да **2f** изазива благо оштећење хепатоцита. Међутим, АЛР је екстрацелуларни ензим, и његова каталитичка активност није довољно поуздан индикатор некрозе ткива.¹⁶⁸ Каталитичка активност АЛР у узорку третираном са **2a** смањивала се у односу на позитивну и негативну контролу и износила је 83,28% и 86,77% од активности овог ензима у контролама, што говори да ни **2a** не проузрокује оштећење хепатоцита.

Испитивање активности ензима γ -ГТ у узорцима третираним дериватима **2f** и **2a** је показало пораст каталитичке активности ензима. Тако, у узорцима засићеним са **2f**, активност ензима била је 1,18-пута већа у односу на вредност негативне контроле, док је у узорцима засићеним са **2a** каталитичка активност ензима била 1,44-пута већа него у узорцима негативне контроле. Варфарин је у односу на ове деривате изазвао значајније повећање каталитичке активности ензима, јер су вредности била 1,30- и 1,07-пута више од вредности за **2f** и **2a**. Ови резултати показују да варфарин изазива највеће оштећење ћелија јетре, а да је то оштећење знатно мање у узорцима третираним са **2a** и **2f**.

3.3.5. АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h

Други вид процене токсичности деривата **2a-h** након интраперитонеалне апликације спроведен је одређивањем нивоа оштећења јетре изазваног оксидативним стресом. Степен оштећења одређен је помоћу антиоксидативних маркера попут редукованог глутатиона (GSH), каталазе (CAT) и тиобарбитурна киселина-реагујућих

супстанци (TBARS). Додатна испитивања су вршена јер једињења која могу да генеришу слободне радикале могу изазвати патогенезу широког спектра болести: хипертензију, Алцхајмерову и Паркинсонову болест, и карцином настао оштећењем ДНК. ¹⁷¹⁻¹⁷³

ТАБЕЛА 3.7. Укупан садржај протеина и каталитичка активност антиоксидативних ензима јетре након седмодневне континуиране интраперитонеалне апликације деривата **2a-h** и варфарина на одраслим пацовима соја Wistar.

ЈЕД.	КОНЦ. (mg/kg)	TP g/L	GSH mg/g	CAT $\mu\text{mol/mg}$	TBARS nmol/mg
2a	0,5	26,86±0,14 ^a	9,44±0,22 ^{*†}	11,27±0,24 ^{*†}	0,47±0,06 [†]
	1	26,02±0,12	9,19±0,14 ^{*‡}	14,23±0,12 ^{*‡}	0,47±0,03 ^{*‡}
	2	25,52±0,23	9,54±0,21 ^{*§}	15,30±0,15 ^{*§}	0,48±0,01 ^{*§}
2b	0,5	23,56±0,16	8,18±0,23 ^{*†}	18,22±0,13 ^{*†}	0,60±0,02 ^{*†}
	1	20,86±0,32	10,02±0,21 ^{*‡}	20,59±0,24 ^{*‡}	0,56±0,12 ^{*‡}
	2	26,61±0,17	7,68±0,17 ^{*§}	23,52±0,13 ^{*§}	0,52±0,06 ^{*§}
2c	0,5	29,53±0,28	9,30±0,36 ^{*†}	9,35±0,17 [*]	0,63±0,03 ^{*†}
	1	25,67±0,16	9,08±0,14 ^{*‡}	15,48±0,62 ^{*‡}	0,63±0,01 [*]
	2	27,29±0,14	10,22±0,16 ^{*§}	12,35±0,32 ^{*§}	0,78±0,08 ^{*§}
2d	0,5	15,22±0,32	12,36±0,51 ^{*†}	30,16±0,45 ^{*†}	1,09±0,10 ^{*†}
	1	16,09±0,14	10,99±0,41 ^{*‡}	26,96±0,24 ^{*‡}	1,09±0,15 ^{*‡}
	2	14,67±0,45	11,93±0,31 ^{*§}	29,29±0,37 ^{*§}	1,31±0,24 ^{*§}
2e	0,5	29,24±0,16	6,29±0,23 ^{*†}	13,02±0,31 ^{*†}	0,41±0,02 [†]
	1	20,60±0,13	8,86±0,13 ^{*‡}	18,43±0,25 ^{*‡}	0,40±0,02 ^{*‡}
	2	15,99±0,27	12,94±0,16 ^{*§}	23,24±0,31 ^{*§}	0,82±0,26 ^{*§}
2f	0,5	22,12±0,24	9,52±0,14 ^{*†}	17,08±0,36 ^{*†}	0,52±0,25 ^{*†}
	1	21,18±0,23	8,68±0,32 ^{*‡}	17,44±0,25 ^{*‡}	0,52±0,32 ^{*‡}
	2	23,29±0,14	7,84±0,15 ^{*§}	18,69±0,26 ^{*§}	0,42±0,12 ^{*§}
2g	0,5	20,61±0,13	11,98±0,61 ^{*†}	16,08±0,31 ^{*†}	0,85±0,15 [*]
	1	24,33±0,17	10,50±0,31 ^{*‡}	13,68±0,22 ^{*‡}	0,87±0,09 ^{*‡}
	2	25,18±0,23	9,34±0,38 ^{*§}	13,06±0,28 ^{*§}	0,70±0,07 ^{*§}
2h	0,5	21,78±0,15	10,36±0,42 ^{*†}	15,54±0,31 ^{*†}	0,83±0,06 [*]
	1	26,70±0,16	10,83±0,21 ^{*‡}	8,74±0,36 ^{*‡}	0,84±0,03 ^{*‡}
	2	28,81±0,18	8,76±0,24 ^{*§}	10,76±0,25 ^{*§}	0,64±0,04 [*]
W	0,5	25,44±0,34	10,28±0,35 [*]	9,40±0,26 [*]	0,84±0,01 [*]
	1	21,34±0,41	11,85±0,23 [*]	16,49±0,34 [*]	0,62±0,05 [*]
	2	29,06±0,34	9,92±0,42 [*]	7,56±0,15 [*]	0,64±0,05 [*]
C		30,75±0,14	6,97±0,21	12,23±0,36	0,45±0,03

^aСредње вредности три независна експеримента; n = 50 пацова; 5 пацова по групи; ^{*}p < 0,05 поређено са негативном контролом; [†]p < 0,05 поређено са варфарином у концентрацији 0,5 mg/kg; [‡]p < 0,05 поређено са варфарином у концентрацији 1 mg/kg; [§]p < 0,05 поређено са варфарином у концентрацији 2 mg/kg.

Ако присуство ксенобиотика индукује стварање оксидативних врста у ћелији, концентрација GSH се смањује, јер је тиолна група цистеина у могућности да донира еквивалент редукције како би се смањила количина осталих радикала.¹⁷⁴ Са порастом концентрације, дериват **2f** изазвао је минимално смањење концентрације GSH, па су у односу на негативну контролу вредности 1,40-, 1,24- 1,12-пута ниже (Табела 3.7). Резултати указују на то да **2f** може утицати на стварање оксидативних врста у организму. Са друге стране, концентрација GSH код деривата **2a** расте са повећањем концентрације: 1,34-, 1,32- и 1,37-пута у односу на негативну контролу, сугеришући да нема појаве оксидативног стреса.

Тумачењем резултата за **2f**, поставља се питање да ли се овај дериват ковалентно везује за GSH? Кумарински и хроменски прстен без субституената на положају С3 може формирати ковалентну везу са GSH преко тиолне групе.¹⁷⁵ Резултат овог метаболичког пута је формирање 3-глутатионил-4-хидрокси-3,4-дихидроксикумарина и 4-глутатионил-4-хидрокси-3,4-дихидроксикумарина, врста које се јављају након додатка тиолне групе кумарин-3,4-епоксиду. Специфични епоксид нотирани је као примарни токсични кумарински интермедијер који се може створити у микрозомима јетре, обзиром да је епоксидација кумаринског језгра са СутР450 један од главних биоактивационих путева. Анализом резултата из Табеле 3.7, може се закључити да са порастом концентрације деривата опада концентрација GSH. Смањење концентрације GSH указује да нема формирања 3,4-епоксида као реактивне врсте током метаболичке активације деривата. Резултати су свакако у корелацији са онима које описују токсиколошки профил и, што је још важније, указују на то да деривати нису селективно токсични по поједина ткива. Тврдња је потврђена чињеницом да нема литературних података који описују стварање варфарин-3,4-епоксида током метаболичке активације клиничког антикоагуланта. Из свега следи да деривати хроман-2,4-диона или 4-хидроксикумарина, супституисани у положају С3, највероватније нису подложни кондензацији са GSH и да нису токсични на том нивоу.

Додатне информације о томе да ли **2f** и **2a** могу генерисати реактивне кисеоничне врсте добијене су из осталих антиоксидативних маркера. Смањење каталитичке активности САТ је повезано са појавом оксидативног стреса.¹⁷⁶ То значи да САТ може бити осетљив индикатор оксидативног оштећења ћелије. У узорцима засићеним са дериватима **2f** и **2a**, активност САТ расте са порастом концентрације: 2,45-, 2,50- и 2,67-пута, и 1,62-, 2,04- и 2,19-пута у односу на негативну контролу. На

основу ових резултата може се закључити да најактивнија једињења не изазивају оксидативни стрес.

И на крају, извршена је анализа концентрације тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS). TBARS настаје као последица пораста липидне пероксидације, након оштећења липопротеина из ћелијске мембране.¹⁷⁷ Пораст концентрације TBARS указује на озбиљна оштећења ћелијске мембране. У поређењу са негативном контролом, концентрација TBARS опада са порастом концентрације деривата **2f** и остаје приближно иста код деривата **2a**, што потврђује да најактивнија једињења нису токсична и не изазивају настанак оксидативног стреса.

3.3.6. АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a и 2f

Процена оксидативног стреса у хомогенатима јетре и бубрега насталог оралним третирањем животиња једињењима **2a**, **2f** и варфарином, вршена је одређивањем концентрације редукованог глутатиона (GSH) и тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS), те каталитичке активности ензима каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD). Резултати су приказани у Табели 3.8.

Концентрација GSH се у хомогенатима јетре пацова смањивала следећим редоследом: **2f** > **2a** > C > W. Редослед је указао да је присуство варфарина у узорцима изазивало највиши ниво оксидативног стреса, пошто концентрација GSH износи 62,59% од вредности негативне контроле. Са друге стране, **2a** и **2f** нису били иницијатори настанка оксидативног стреса у ћелијама јетре, јер је концентрација GSH у одговарајућим узорцима била 1,10- и 1,52-пута већа у односу на негативну контролу. Слични резултати добијени су и у узорцима хомогената бубрега. У присуству варфарина забележен је настанак слободних радикала услед смањења концентрације редукованог глутатиона, 97,43% у односу на вредности у негативној контроли. За разлику од варфарина, у узорцима који су третирани дериватима **2a** и **2f** забележен је пораст концентрације GSH у хомогенатима бубрега, и то 1,22- и 1,25-пута у односу на негативну контролу.

У узорцима хомогената јетре који садрже **2a**, каталитичка активност каталазе повећана је 1,13-пута у односу на активност измерену у негативној контроли, што указује да **2a** не изазива оксидативни стрес. Дериват **2f** изазвао је оксидативни стрес јер је активност CAT у овом узорку смањена за 70% у поређењу са негативном контролом.

Међутим, у поређењу са варфарином, може се видети да су вредности активности ензима 1,14-пута веће у односу на **2f**. Слична запажања била су и за хомогенате бубрега. Повећањем каталитичке активности у узорцима који садрже једињење **2a** у односу на негативну контролу потврђено је да **2a** није индуктор оксидативног стреса. У узорцима који садрже **2f** примећено је смањење каталитичке активности за 72,5% од вредности измерене у негативној контроли, и повећање активности 1,40-пута у односу на позитивну контролу.

ТАБЕЛА 3.8. Укупни садржај протеина и каталитичка активност антиоксидативних ензима јетре и бубрега након седмодневне оралне апликације деривата **2a**, **2f** и варфарина на одраслим пацовима соја Wistar.

ЈЕД.	ОРГАН	КОНЦ. (mg/kg)	TP g/L	GSH mg/g	CAT μmol/mg	TBARS nmol/mg	SOD U/mg
ЈЕТРА							
2a		20	31,61±0,36 ^a	8,00±0,33	18,42±0,46	1,12±0,74	5,95±0,48
2f		20	38,80±0,21 ^{*†}	11,02±0,22 [†]	11,41±0,17 ^{*†}	1,04±0,51	4,85±0,19
W		20	24,66±0,15	4,55±0,16	10,00±0,34	1,48±0,34	3,68±0,24
C			31,39±0,11	7,27±0,14	16,30±0,28	1,17±0,21	6,04±0,48
БУБРЕГ							
2a		20	10,81±0,25	9,05±0,05	52,30±0,71 ^{*†}	1,54±0,42	1,78±0,23
2f		20	19,33±0,50	9,29±0,19	31,87±0,52 ^{*†}	0,74±0,37	0,97±0,08
W		20	13,66±0,41	7,22±0,18	22,76±0,37	0,99±0,44	0,88±0,36
C			13,64±0,11	7,41±0,23	43,95±0,41	1,28±0,38	1,34±0,17

^aСредње вредности три независна експеримента; n = 50 пацова; 5 пацова по групи; * p < 0,05 поређено са негативном контролом; † p < 0,05 поређено са раствором варфарина у концентрацији од 20 mg/kg.

Концентрација TBARS била је нижа у узорцима **2a** и **2f** у поређењу са негативном контролом. У односу на негативну контролу, у узорку засићеном са **2a** концентрација TBARS била је 95,73% од референтне вредности, док је у узорку засићеном са **2f** концентрација TBARS била 88,88% од референтне вредности. Са друге стране, у односу на позитивну контролу, у узорку засићеном са **2a** концентрација TBARS била је 75,68% од референтне вредности, док је у узорку засићеном са **2f** концентрација TBARS била 70,27% од референтне вредности. Ово указује да једињења нису изазвала лизу ћелијске мембране хепатоцита. У узорцима хомогената бубрега, концентрација TBARS се повећава у присуству **2a** и то 1,20-пута у односу на негативну и 1,55-пута у односу на позитивну контролу, што је указало на појаву оксидативног стреса. Дериват **2f** није утицао неповољно на ткиво бубрега јер је концентрација

TBARS у узорцима деривата нижа у поређењу са референтном контролом и варфарином.

Из Табеле 3.8 може се видети да је присуство деривата **2a** и **2f** у хомогенатима јетре смањило каталитичку активност SOD на ниво од 98,50% и 80,30 %, у односу на негативну контролу. Варфарин је још у вишем степену индуковао смањење каталитичке активности SOD јер је у односу на негативну контролу каталитичка активност ензима била на нивоу од 60,93%. Дериват **2a** није утицао неповољно на ткиво бубрега, јер је каталитичка активност повећана у поређењу са негативном контролом, али се код деривата **2f** активност ензима смањила на ниво од 72,39% у односу на вредности измерене у негативној контроли. Највиши пораст каталитичке активности SOD забележен је код животиња третираних варфарином, јер је ниво каталитичке активности ензима био на 65,67% односу на вредност негативне контроле, те је стога варфарин изазивао највиши оксидативни стрес.

3.3.7. ХИСТОПАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ ТКИВА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА 2a-h

Финална евалуација ефекта администрације деривата **2a-h** на ћелије јетре, извршена је хистопатолошком анализом узорака јетре пацова који су третирани дериватима у највишој концентрацији, 2 mg/kg (Табела 3.9).

Анализирани су само узорци са највишом концентрацијом јер се тада добија најбоља зависност између концентрације и активности за **2a** и **2f**. Резултати хистопатолошких анализа сумирани су у Табели 3.9 и на Сликама 3.8 и 3.9.

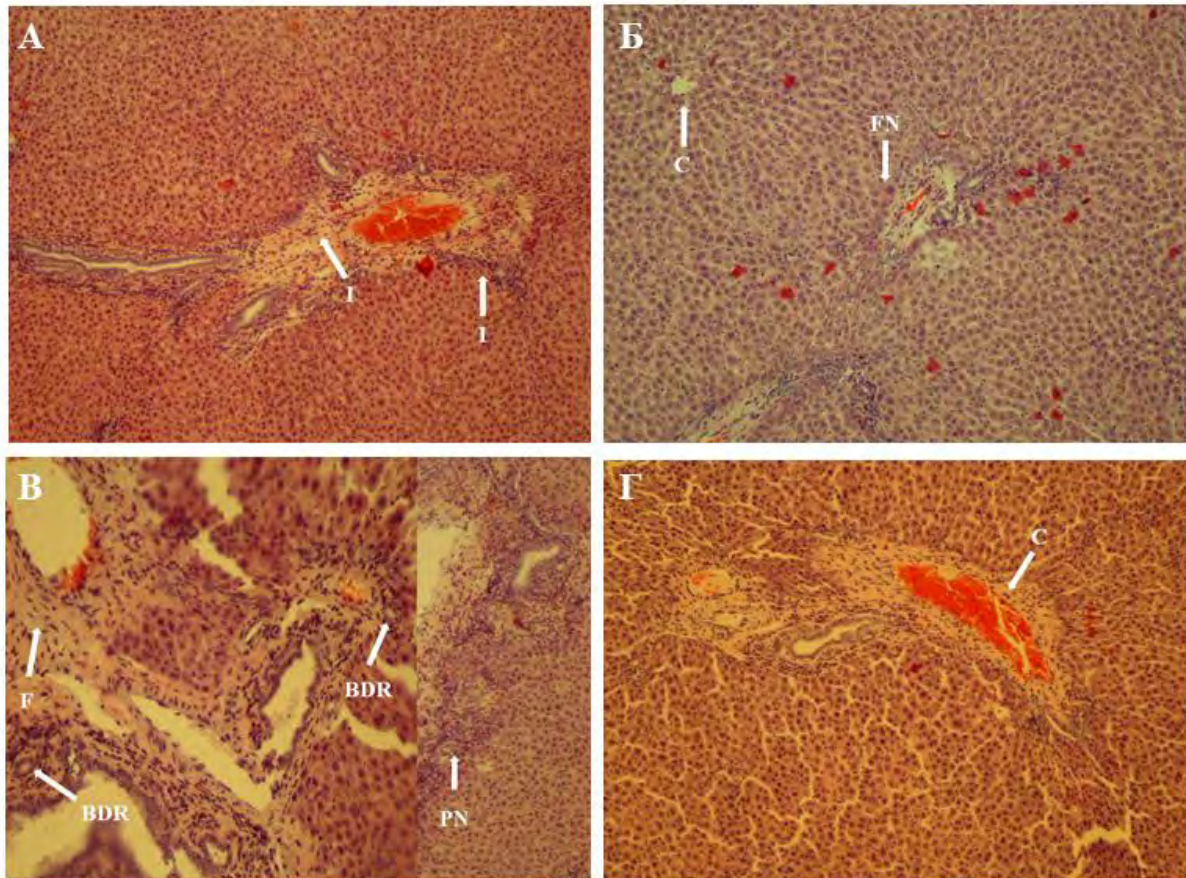
Фотомикрографи пресека јетри третираних дериватима **2a-h**, варфарином и негативном контролом су приказане на Слици 3.8. У односу на негативну контролу (Табела 3.9 и Слика 3.8Г), где је забележена само пасивна хиперемија (конгестија), варфарин (Табела 3.9 и Слика 3.8В) је изазвао оштећења јетре која се виде као умерено проширење портних простора, инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага (Табела 3.9). Затим, примећене су и области са умереном фокалном некрозом градуалног типа. Када је извршено упоређивање фотомикрографа деривата **2f** (Табела 3.9 и Слика 3.8А) и варфарина (Табела 3.9 и Слика 3.8В), примећено је минимално оштећење у виду инфилтрације лимфоцита, леукоцита и макрофага. Промене на јетри након апликације деривата **2a** (Табела 3.9 и Слика 3.8Б) окарактерисане су као минимална фокална некроза.

ТАБЕЛА 3.9. Морфолошке промене забележене на јетрама пацова након континуиране седмодневне апликације деривата **2a-h** и варфарина (W) у концентрацији од 2 mg/kg телесне тежине.

ЈЕД.	МОРФОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ								
	C ^a	DHL ^b	BD ^b	SR ^г	I ^д	FN ^ђ	N ^е	DBR ^ж	F ^з
2a	+ ^и				+	+			
2b	+	+			++	+			
2c	+		+		+	+			+
2d	++				++	+			
2e	+				++	+			+
2f	+				+				
2g	+				++	++			
2h	+			+	++				
W	+				+	++	++	+	
C	+								

^aКонгестија (енг. Congestion); ^bДисконтинуиране линије хепатоцита (енг. Discontinuous hepatocytes lines); ^вБалонирајућа дегенерација (енг. Balloon degradation); ^гЗнаци регенерације (енг. Signs of regenerations); ^дИнфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага (енг. Infiltration of lymphocytes, leucocytes and magrophagi); ^ђФокална некроза (енг. Focal necrosis); ^еПостепена некроза (енг. Piecemeal necrosis); ^жРеакција жучних канала (енг. Biliary ductular reaction); ^зФиброза (енг. Fibrosis); ^и+: минимално оштећење; ++: умерено оштећење; +++: велико оштећење; празне колоне указују да нема видљивог оштећења.

Сви аплицирани деривати изазвали су умерену конгестију, односно изазвали навалу крви у ћелије хепатоцита. Овакво понашање деривата било је очекивано, обзиром на њихов антикоагулативни потенцијал. Друга значајна промена на јетри била је инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага, антиинфламаторни механизам хепатоцита активиран у циљу да јетра прихвати аплициране деривате као ксенобиотике без озбиљних физиолошких последица по саму јетру. Сви деривати осим **2f** и **2h** (Табела 3.9, Сlike 3.8 и 3.9) изазвали су и фокалну некрозу хепатоцита, односно појаву бројних, ситних, сфероидних делова ткива, величине 1-3 mm, који манифестују коагулативну некрозу и карактеристично су повезани са агенсима који се хематогено шире. Одсуство фокалне некрозе код деривата **2f** био је још један доказ *in vivo* да се ово једињење може сматрати потенцијалним клиничким антикоагулантом. Деривати **2c** и **2e** изазвали су и фиброзу јетре, односно формирање вишка влакнастог везивног ткива у јетри у реактивном процесу. Другим речима, ова једињења изазвала су лезије на ткиву јетре, те су као таква окарактерисана као небезбедна за даљу апликацију.

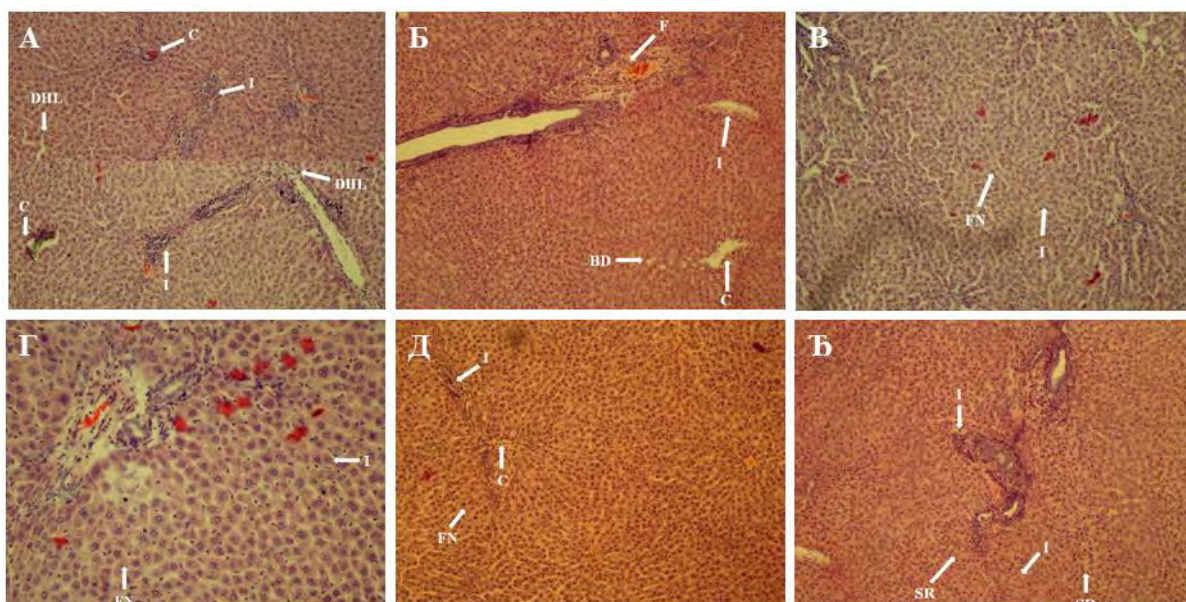


Слика 3.8. Фотомикрографи пресека јетри деривата **2f** (А), **2a** (Б), варфарина (В), и негативне контроле (Г). Стрелице указују на: С – конгестија (енг. Congestion); DHL – дисконтинуиране линије хепатоцита (енг. Discontinuous hepatocytes lines); BD – балонирајућа дегенерација (енг. Balloon degradation); SR – знаци регенерације (енг. Signs of regenerations); I – инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага (енг. Infiltration of lymphocytes, leucocytes and magrophagi); FN – фокална некроза (енг. Focal necrosis); PN – постепена некроза (енг. Piecemeal necrosis); BDR – реакција жучних канала (енг. Biliary ductular reaction); F – фиброза (енг. Fibrosis).

Са друге стране, апликација варфарина изазвала је, поред већ наведених патолошких промена и умерено одумирање ткива јетре и минимално оштећење жучних канала, што је још једном потврдило агресивну природу овог клиничког антикоагуланта. Тиме је на неки начин и оправдана тежња да се овај клинички антикоагулант замени новим.

Генерални закључак је да најактивнија једињења (**2a** и **2f**) не изазивају значајне промене на хепатоцитима; сва оштећења су забележена као минималне патоморфолошке промене. Ово је био изузетно значајан резултат који је показао да има резона јетру и бубреге експерименталног модел организма подвргнути и већој концентрацији деривата **2a** и **2f**, не би ли се утврдио прави утицај деривата на органе

приликом оралне (клиничке) администрације. Након оралне администрације деривата **2a** и **2f** извршена је хистопатолошка анализа јетре и бубрега лабораторијских животиња.



Слика 3.9. Фотомикрографи пресека јетри третираних дериватима **2b** (А), **2c** (Б), **2d** (В), **2e** (Г), **2g** (Д) и **2h** (Ђ). Стрелице указују на: С – конгестија (енг. Congestion); DHL – дисконтинуиране линије хепатоцита (енг. Discontinuous hepatocytes lines); BD – балонирајућа дегенерација (енг. Balloon degradation); SR – знаци регенерације (енг. Signs of regenerations); I – инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага (енг. Infiltration of lymphocytes, leucocytes and magrophagi); FN – фокална некроза (енг. Focal necrosis); PN – постепена некроза (енг. Piecemeal necrosis); BDR – реакција жучних канала (енг. Biliary ductular reaction); F – фиброза (енг. Fibrosis).

3.3.8. ХИСТОПАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ ТКИВА ЈЕТРЕ И БУБРЕГА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a и 2f

Након апликације *per os*, поред хистопатолошке анализе јетре, извршена је и хистопатолошка анализа бубрега. Бубрези су узети у разматрање као централни орган који врши екскрецију најактивнијих једињења. Иако детаљна анализа метаболизма тестираних деривата није извршена, било је важно дефинисати како једињења утичу на орган током прве и друге фазе метаболизма. Наиме, познато је да хромански и кумарински деривати у првој фази метаболизма подлежу хидроксилацији положаја С7 помоћу СутР2С6, док се друга фаза метаболизма своди на глукуронидацију. Резултати детаљне хистопатолошке анализе ткива јетре и бубрега након седмодневног

континуираног оралног третмана дериватима **2a**, **2f** и варфарином су приказани у Табели 3.10.

ТАБЕЛА 3.10. Морфолошке промене забележене на јетрама и бубрезима пацова након континуиране седмодневне оралне апликације деривата **2a**, **2f** и варфарином (W) у концентрацији од 20 mg/kg телесне тежине.

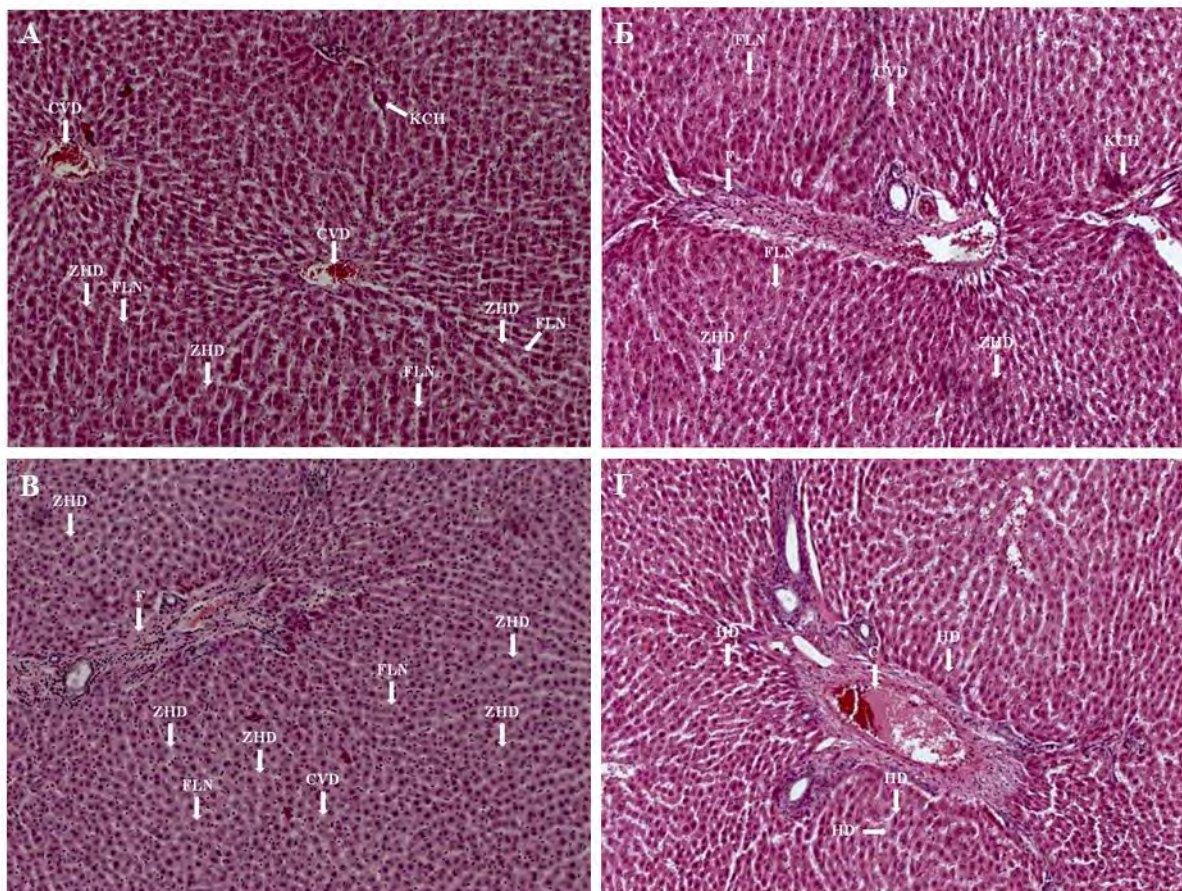
ОРГАН ЈЕДИЊЕЊЕ	МОРФОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ										
	C ^a	CVD ^b	ZHD ^b	FLN ^г	KCH ^д	F ^ђ	H ^е	IE ^ж	GA ^з	HD ^и	NTE ^ј
ЈЕТРА											
2a	+ ^к	+	+	+	+	+					
2f	++	+	+	+	+	+					
W	+++	++	++	+++	+++	++					
C	+									+	
БУБРЕГ											
2a	+							+			+
2f	+							+			+
W	+++						+++	+++	++	++	+++
C	+									+	+

^aКонгестија (енг. congestion); ^bПроширене централне вене (енг. Central veins distension); ^вЗонална хидропсна дегенерација хепатоцита (енг. Zonal hydropic degeneration of hepatocytes); ^гФокална некроза лизирањем (енг. Focal lytic necrosis); ^дХиперплазија Купферових ћелија (енг. Kupffer cell hyperplasia); ^ђФиброза (енг. Fibrosis); ^еКрварење (енг. Hemorrhaging); ^жЕдем интерстицијума (енг. Interstitial edema); ^зАтрофија гломерула са проширењем субкапсуларног простора (енг. Glomerular atrophy distension of capsular space); ^иХидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића (енг. Hydropic degenerescence in tubular epithelium); ^јНекроза епитела тубула и сабирних каналића (енг. Necrosis of tubular epithelial cells); ^к+: минимално оштећење; ++: умерено оштећење; +++: велико оштећење; празне колоне указују да нема видљивог оштећења.

У узорцима ткива јетре третираним варфарином и дериватима **2f** (Слика 3.10А) и **2a** (Слика 3.10Б) забележене су следеће морфолошке промене: конгестија, проширење централних вена, зонална хидропсна дегенерација хепатоцита, фокална некроза лизирањем, хиперплазија Купферових ћелија и фиброза; код негативне контроле уочене су конгестија и хидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића (Слика 3.10Г). У односу на негативну контролу и деривате **2a** и **2f**, варфарин је изазвао највеће промене ткива јетре. Код деривата **2a** и **2f** су забележене исте морфолошке промене као и код варфарина, али знатно слабијег интензитета.

Конгестија је била очекивана и интензитет конгестије указао је поново да је једињење **2f** бољи антикоагулант од **2a**. Проширење централне вене јетре (лат. *vena porta*) био је рефлекс који је указао на повишени број откуцаја срца лабораторијских животиња, затим на повишену вредност крвног притиска и на повећању активност

симпатетичних нерава мишића. Ове физиолошке промене су указале на изразит антикоагулативни потенцијал једињења **2a** и **2f** али и на потенцијална нежељена дејства.

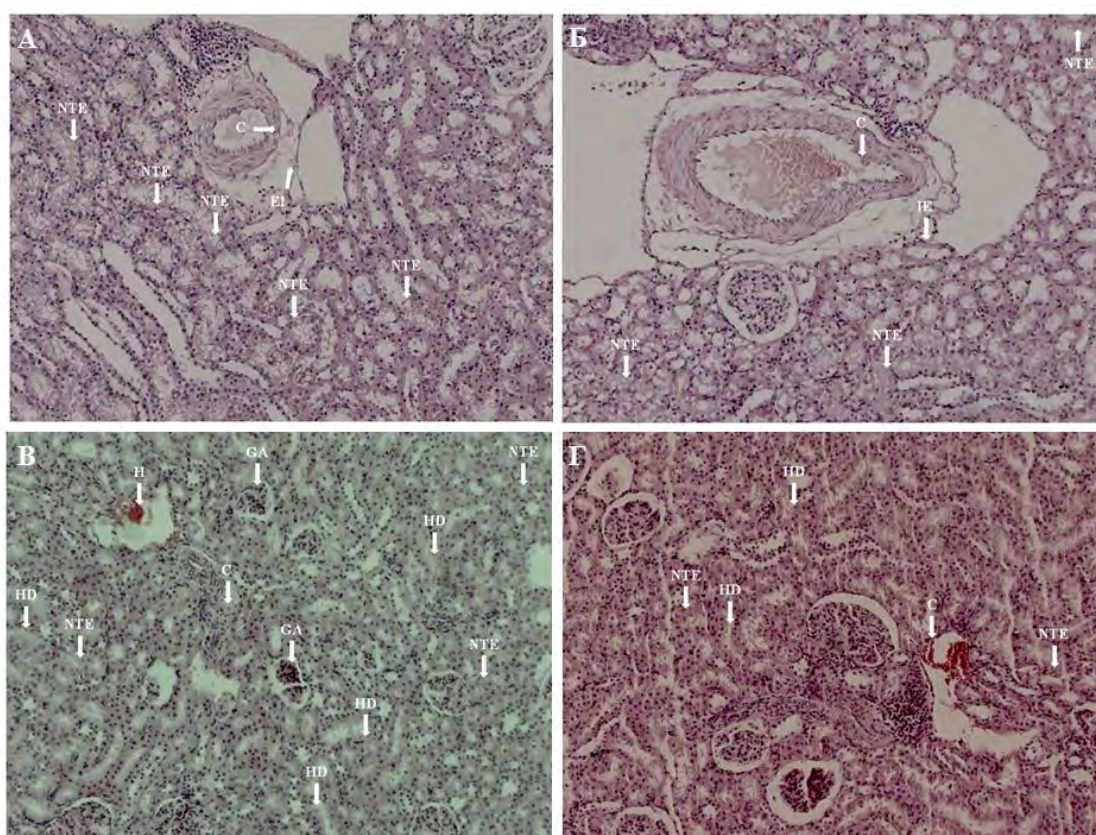


Слика 3.10. Фотомикрографи пресека јетри третираних дерватима **2a** (А), **2f** (Б), варфарином (В), и негативном контролом (Г). Стрелице указују на С – конгестија (енг. Congestion, пасивна хиперемија); CVD – Проширене централне вене (енг. Central veins distension); ZHD – Зонална хидропсна дегенерација хепатоцита (енг. Zonal hydropic degeneration of hepatocytes); FLN – Фокална некроза лизирањем (енг. Focal lytic necrosis); КСН – Хиперплазија Купферових ћелија (енг. Kupffer cell hyperplasia); F – Фиброза (енг. Fibrosis); Н – Крварење (енг. Hemorrhaging); IE – Едем интерстицијума (енг. Interstitial edema); GA – Атрофија гломерула са проширењем субкапсуларног простора (енг. Glomerular atrophy distension of capsular space); HD – Хидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића (енг. Hydropic degenerescence in tubular epithelium); NTE – Некроза епитела тубула и сабирних каналића (енг. Necrosis of tubular epithelial cells).

Надаље, зонална хидропсна дегенерација хепатоцита указује на оштећење жучних канала, које је у случају деривата **2a** и **2f** минимално, а у случају варфарина максимално. Као и у случају интраперитонеалне апликације, деривати су изазвали благу фокалну некрозу и фиброзу ткива јетре. Са друге стране, хипертрофија и хиперплазија Купферових ћелија обично се јављају заједно као последица инфлукса

ксенобиотику или у случају благе инфламације јетре. Детаљније анализе инфламације ткива јетре наком оралне апликације деривата **2a** и **2f** нису извршене па није било могуће потврдити запаљенски процес унутар хепатоцита.

У хистопатолошким узорцима бубрега, поред конгестије, забележене су и нове промене, које нису уочене на ткиву јетре пацова: крварење, едем интерстицијума, атрофија гломерула са проширењем субкапсуларног простора, хидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића, и некроза епитела тубула и сабирних каналића. Морфолошке промене, забележене код нетретираних животиња, биле су конгестија и хидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића (Слика 3.11Г).



Слика 3.11. Фотомикрографи пресека бубрега третираних дериватима **2a** (А), **2f** (Б), варфарином (В), и негативном контролом (Г). Стрелице указују на С – конгестија (енг. congestion, пасивна хиперемија); CVD – Проширене централне вене (енг. Central veins distension); ZHD – Зонална хидропсна дегенерација хепатоцита (енг. Zonal hydropic degeneration of hepatocytes); FLN – Фокална некроза лизирањем (енг. Focal lytic necrosis); КСН – Хиперплазија Купферових ћелија (енг. Kupffer cell hyperplasia); F – Фиброза (енг. Fibrosis); Н – Крварење (енг. Hemorrhaging); IE – Едем интерстицијума (енг. Interstitial edema); GA – Атрофија гломерула са проширењем субкапсуларног простора (енг. Glomerular atrophy distension of capsular space); HD – Хидропсна дегенерација епитела тубула и сабирних каналића (енг. Hydropic degenerescence in tubular epithelium); NTE – Некроза епитела тубула и сабирних каналића (енг. Necrosis of tubular epithelial cells).

Као и код узорака јетре пацова, варфарин је изазвао настанак најинтензивнијих морфолошких промена. Додатно, за разлику од деривата **2a** (Слика 3.11А), **2f** (Слика 3.11Б) и негативне контроле, код варфарина је уочено и унутрашње крварење (Слика 3.11В). Варфарин је као лек изазвао и појаву бубрежног интерстицијалног едема, односно акумулацију вишка телесних течности у бубрежном интерстицијуму. Овакв хистопатолошки резултат један је од уобичајених симптома болести бубрега. Бубрежни едем настаје системски и повезан је са атрофијом гломерула са проширењем субкапсуларног простора које указује да бубрези задржавају воду и соли натрујума. Овај симптом такође је повезан са некрозом епитела тубула и сабирних каналића која је такође била најизраженија код варфарина, док су деривати **2a** и **2f** изазвали незнатно оштећење. Акумулација воде у бубрезима након администрације варфарина такође је потврђена појавом хидропсне дегенерације епитела тубула и сабирних каналића. У препаратима који су се односили на **2a** и **2f** ово патофизиолошко стање није забележено, што је потврдило да кандидати за антикоагуланте не изазивају озбиљно оштећење бубрега.

Све до сада описане морфолошке промене на јетри и бубрезима за **2a** и **2f**, било након интраперитонеалне или оралне апликације, уобичајене су када се ткиво прилагођава на нови ксенобиотик. Интензитет промена, које су означене махом као минимално оштећење или умерено оштећење, указују на то да се органи лако прилагођавају једињењима и да потенцијални антикоагуланти подлежу већ постојећим механизмима екскреције кроз прву и другу фазу метаболизма.

Са друге стране, индикатори који су предвидели појачан ризик од унутрашњег крварења администрацијом варфарина, а који су добијени након анализе везивања за серумски албумин, још једном су потврђени током оралне апликације на хистолошком препарату бубрега. Иако једињења **2a** и **2f** свакако захтевају даља структурна прилагођавања у смислу смањења до сада описаних нежељених ефеката, они су и у фази претклиничких испитивања безбеднији од варфарина за апликацију, што је значајан резултат.

3.4. СТРУКТУРНИ АСПЕКТИ НЕОПХОДНИ ЗА АНТИКОАГУЛАТИВНУ АКТИВНОСТ

ДЕРИВАТА **2a-h**

Након опсежних експеримената који су потврдили да се деривати **2a** и **2f** могу сматрати антикоагулантима *in vivo*, следећи корак био је утврђивање фармакологије антагонизма циклуса витамина К. Постоји много полемика о томе на који начин варфарин и слична једињења антагонирају коагулациони циклус. Варфарин је антагонист редуције витамин К 2,3-епоксида до витамина К. Током процеса редуције, VKORC1 се преводи из своје редуковане форме, у којој Cys132 и Cys135 постоје у форми сулфхидрила, у оксидовану форму, у којој Cys132 и Cys135 формирају дисулфидну везу. Сам механизам антагонизма овог процеса је до данас непознат и поставља се питање да ли се варфарин ковалентно везује за ензим? Такође, обзиром да су **2a** и **2f** структурни аналози витамина К а не варфарина, следеће питање је да ли ови антагонисти испољавају фармакологију идентичну варфарину? Према механизму који је предложио Silverman (Увод, Шема 1.20), витамин К_{2,3}-епоксид је супстрат редуковане форме VKORC1, па је право питање да ли и деривати **2a** и **2f**, као структурни аналози витамин К 2,3-епоксида, јесу антагонисти редуковане форме VKORC1?

Подсећања ради, да би се процес редуције епоксидне форме витамина К започео, оксидована форма VKORC1 се у *in vitro* условима редукује помоћу DTT-а (дитиотреитол),⁵⁸ док се у организму овај процес одвија у присуству микрозомалне NADH-зависне липоамид редуктазе.⁵⁵ У светлу антагонизма процеса коагулације варфарином, преинкубација оксидоване форме VKORC1 са DTT-ом пре додатка варфарина утиче на антагонизам VKORC1.⁵⁹ Експериментални подаци сугеришу да се варфарин лакше везује за оксидовану форму ензима него за редуковану.^{59,60} Варфарин брже антагонира активност оксидоване форме VKORC1 када се ензим прво изложи варфарину, па тек онда DTT-у.⁵⁹

У *in vivo* условима, са друге стране, редукована форма липоамид редуктазе стимулише активност оксидоване форме VKORC1 на сличан начин као DTT.⁵⁵ Иако се варфарин везује за оксидовану форму VKORC1, ензим се мора редуковати да би могао да изврши конверзију еоксида у хидрохинонску форму.⁵⁴ Тек након активације ензима, односно његове редуције, наступа антагонизам коагулационог циклуса варфарином или сличним једињењима.

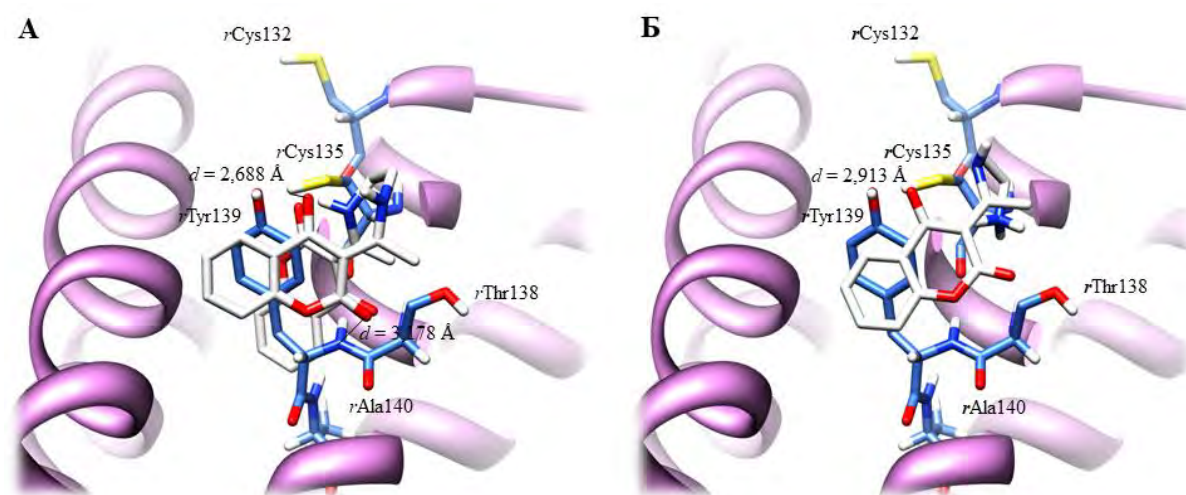
Обзиром на чињеницу да варфарин са великим афинитетом остварује интеракцију са VKORC1, дуго се сматрало да се интеракција одвија иреверзибилним механизмом.⁶⁴ У прилог иреверзибилном антагонизму, Silverman и сарадници су предложили да се депротоновани облик варфарина везује за редуковани облик VKORC1.⁶⁰ Ипак, према досадашњим сазнањима, варфарин се не може превести у епоксидну форму, као што је то случај код витамина К. Стога не постоји могућност да се антагонизам спроведе ковалентним механизмом, аналогно предложеном механизму редукције витамин К 2,3-епоксида.^{58,63} Супротно Silverman-овом закључку, новије студије су потврдиле да је оксидовани облик VKORC1 мета за варфарин (Увод, Шема 1.21).^{65,66} Стога је предложено да се механизам антагонизма не одвија ковалентним механизмом. Овај закључак је заправо и логичан, јер би онда варфарин могао да преко своје хидроксилне групе на положају 4 да дâ еквивалент редукције за редукцију дисулфидне везе оксидованог VKORC1.

Међутим, **2a** и **2f** по својој структури могу бити само антагонисти редуковане а не оксидоване форме VKORC1. То би заправо значило да ови антагонисти витамина К имају другачију фармакологију антагонизма VKORC1 у односу на варфарин, што је требало потврдити и *in silico* експериментима. Да би се овај постулат потврдио или оповргнуо, спроведене су студије молекулског доковања, 3-D QSAR студије, 3-D фармакофорне студије и студије молекулске динамике, којима је испитивано којим се од предложених механизма, реверзибилним или ковалентним, деривати **2f** и **2a** везују за редуковану форму VKORC1.

3.4.1. ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА 2f и 2a ЗА rVKORC1 ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ НЕКОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ

Топологија хомологог модела VKORC1 пацова (лат. *Rattus norvegicus* VKORC1, rVKORC1) била је са 4 трансмембранска хеликса и упоредива са осталим хомологим моделима представљеним у литератури. У биоактивној конформацији најактивнијег антагониста витамин К, деривата **2f** (Слика 3.12A), карбонилна група лактонског прстена првог хроман-2,4-дионског језгра усмерена је ка формирању слабе водоничне везе ($d_{\text{НВ}} = 3,178 \text{ \AA}$) са атомом азота који гради пептидну везу између rThr138 и rTyr139. Хроман-2,4-дионски прстен је оријентисан ка фенил групи rTyr139 услед јаких π - π хидрофобних интеракција. Даље, NH група rThr138-rTyr139 пептидне везе додатно успоставља електростатичке интеракције са С-4 карбонилном групом другог

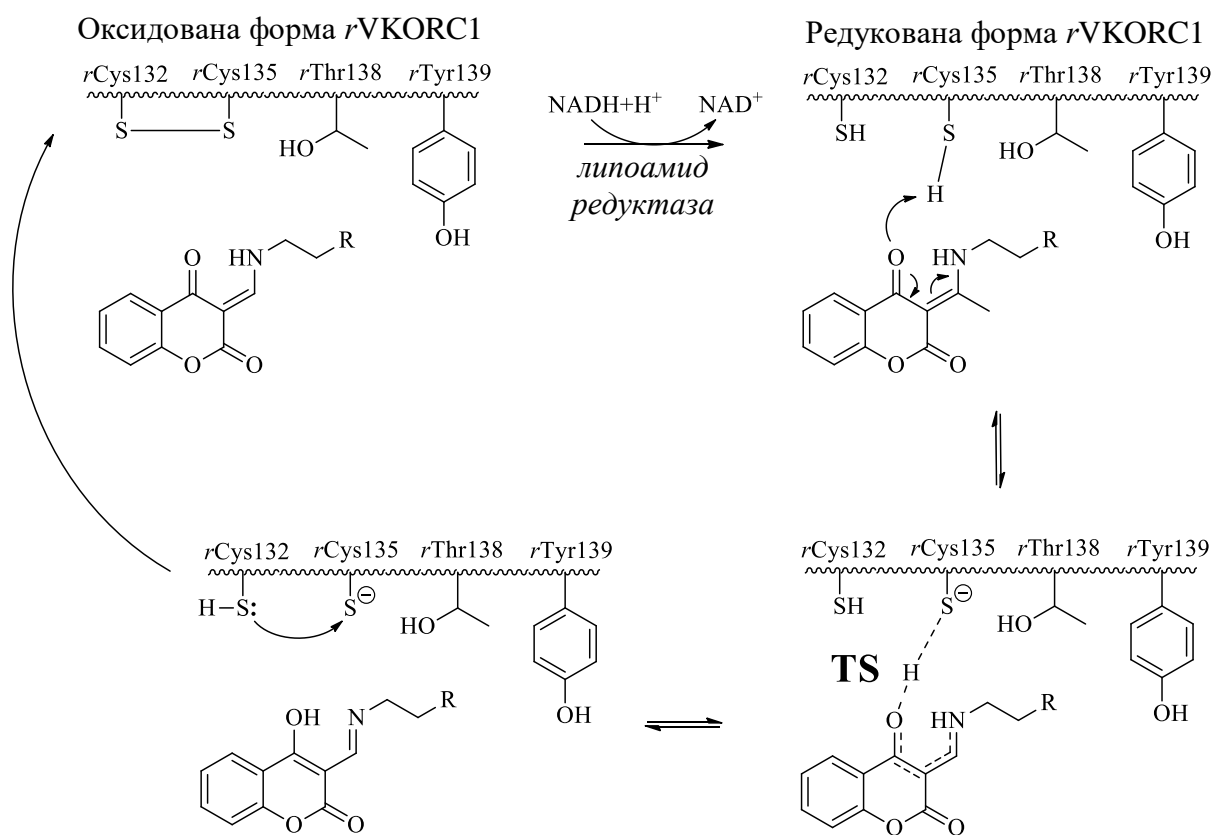
хроман-2,4-дионског прстена. Ова специфична интеракција у великој мери одређује конформацију **2f** у активном центру, јер је директна последица тога усмеравање другог хроман-2,4-дионског прстена иза *r*Tyr139. На тај начин *r*Tyr139 је окружен дериватом **2f** у виду конформације у облику сендвича. Етилендиамински скелет доприноси активности деривата **2f** тако што попуњава простор око *r*Tyr139 и што додатно стабилизује дериват у активном центру. Стабилизација се остварује јер је амино група, која се налази у близини хроман-2,4-дионског прстена, довољно близу да би се успоставиле електростатичке интеракције са кисеоником хидроксилне групе *r*Tyr139. Ова последња интеракција индиректно обезбеђује одговарајућу оријентацију С4 карбонилне групе првог прстена деривата **2f** ка водониковом атому из SH групе аминокиселине *r*Cys135. Поред тога, остварују се привлачне интеракције између лактонског карбонила другог хроман-2,4-дионског прстена и SH групе *r*Cys135.



Слика 3.12. Везивање најбоље доковане биоактивне конформације **2f** (А) и **2a** (Б) у активном центру VKORC1 пацова (*r*VKORC1, представљен је љубичастом бојом; због прегледности слика, приказани су само поларни атоми водоника).

Успостављена интеракција између *r*Cys135 и карбонилне групе на положају С4 хроман-2,4-дионског језгра указала је на могућност да поменути карбонилни кисеоник може бити акцептор водоничне везе са *r*Cys135. Под условом да може да се награди водонична веза, протон са SH групе може лако прећи на С4 карбонилну групу деривата **2f** (Шема 3.2). Постојање водоничне везе је и потврђено, обзиром на чињеницу да је дужина преносног пута $d_{\text{HВ}} = 2,688 \text{ \AA}$. Само постојање водоничне везе даље указује да се трансфер протона врши преко формирања прелазног стања.^{49,178} Све наведене

повољне интеракције деривата **2f** са ензимом дају ниске предвиђене вредности константе антагонизма, $K_a = 68,9$ nM.



Шема 3.2. Предложени механизам реверзибилног пута антагонизма коагулационог циклуса дериватима **2a** и **2f**.

Биоактивна конформација **2a** (Слика 3.12Б) слична је просторној оријентацији деривата **2f**. Положај хроман-2,4-дионског прстена је сличан као код **2f**. Међутим, упркос чињеници да се исте интеракције одвијају између *rTyr139* и антагониста, раван хроман-2,4-дионског прстена деривата **2a** ротирана је за приближно 30° у односу на раван првог прстена деривата **2f**. Због ове ротације, нема успостављања водоничне везе између лактонског карбонила и пептидне везе *rThr138-rTyr139*, јер је измерена удаљеност $d = 4,112$ Å. Ипак, откривено је неколико повољних интеракција. Протонована терминална амино група етилендиамина је довољно близу хидроксилној групи *rThr138* да се успостављају електростатичке интеракције. Даље, карбонилна група на положају C4 је, као и у случају једињења **2f**, повољно оријентисана ка формирању водоничне везе са *rCys135* ($d_{\text{HВ}} = 2,913$ Å). Пошто деривати **2a** и **2f** имају

сличан просторни распоред у активном центру ензима, тако је и њихова антикоагулативна активност поредива. Сада се поставља питање: Зашто је дериват **2f** активнији од **2a**? Разумно објашњење је да оријентација деривата **2a** у **2a-rVKORC1** комплексу није компактна као код деривата **2f** у одговарајућем комплексу. Стога, **2a** није довољно стабилизован да лако прихвати атом водоника са *rCys135*. Одсуство јаке везе се одражава и у константи антагонизма која износи $K_a = 498,8$ nM, што је ниже у односу на **2f**.

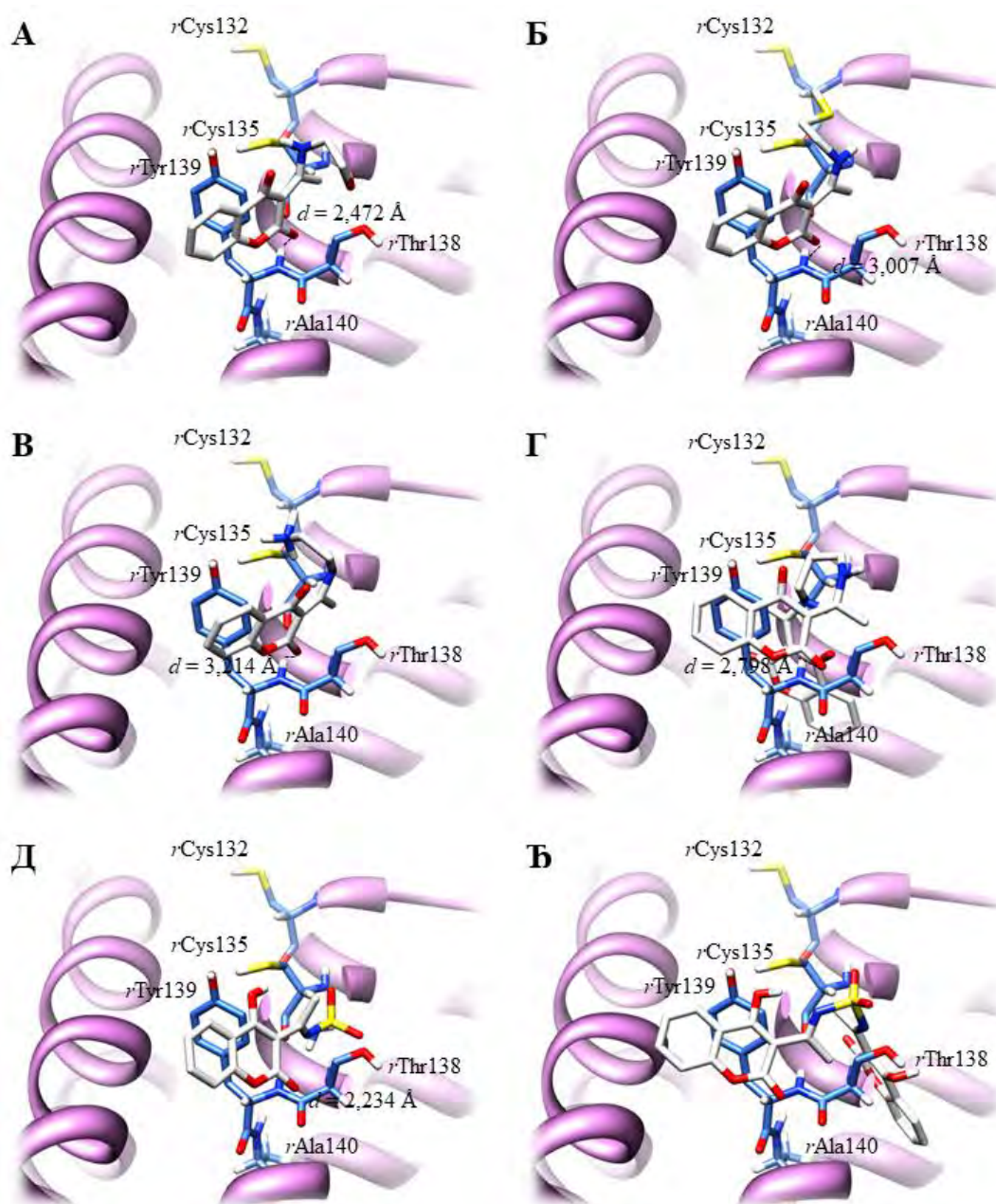
На основу свих приказаних закључака, Шема 3.2 сумира могућ начин антагонистичког деловања деривата **2f** и **2a** преко реверзибилног механизма. Резултати које је представио Gebauer не пружају дефинитиван закључак на који начин варфарин врши антагонизам *rVKORC1*, већ је само показано да је овај процес реверзибилан.⁶⁵ Резултати који проистичу из молекулског доковања, односно биоактивне конформације деривата, указују да се реакција антагонизма ензима одвија преко прелазног стања TS (енг. Transition State).

3.4.2. ВЕЗИВАЊЕ НЕАКТИВНИХ ДЕРИВАТА ЗА *rVKORC1* ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ НЕКОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ

Молекулско доковање допринело је и разумевању због чега су остали испитивани деривати показали знатно мању активност од деривата **2a** и **2f**. Тако, главна карактеристика добијених биоактивних конформација **2b** (Слика 3.13А), **2c** (Слика 3.13Б) и **2d** (Слика 3.13Ц) јесте да су поменути деривати ротирани ван равни коју формирају хроман-2,4-дионска језгра **2f** и **2a** за приближно 45°. Упркос чињеници да су сви деривати стабиловани водоничном везом која се успоставља између лактонског карбонила и пептидне везе *rThr138-rTyr139*, не постоје друге повољне интеракције између хроман-2,4-дионског језгра и *rTyr139*, па је директна последица то да је удаљеност карбонилне групе на положају C4 сувише велика да би се наградила водонична веза са *rCys135*: за једињења **2b**, **2c** и **2d** дистанца између C4 карбонила и сулфхидрилне групе *rCys135* износи $d = 5,780$, $d = 6,171$ и $d = 5,738$ Å. Стога, ова једињења не могу се сматрати ефикасним антикоагулантима.

Што се тиче једињења **2e** (Слика 3.13Д), по структури врло сличног антагонисту **2f**, присуство додатне метиленске групе у пропилендиаминском мосту између два хроман-2,4-дионска језгра узрокује да је други хроман-2,4-дионски прстен **2e**, у односу

на **2f**, репозициониран ближе *r*Thr138, и да заузима другачију оријентацију унутар активног центра. Због тога нема одговарајуће интеракције другог језгра са *r*Tyr139, што утиче на то да је и карбонилна група на положају C4 првог језгра сувише удаљена од сулфхидрилне групе *r*Cys135 ($d = 4,112 \text{ \AA}$). Наравно, услед недостатка водоничне везе између каталитичке аминокиселине и једињења, активност једињења је мања.



Слика 3.13. Везивање најбоље доковане биоактивне конформације **2b** (А), **2c** (Б), **2d** (В), **2e** (Д), **2g** (Ђ) и **2h** (Е) у активном центру VKORC1 пацова (*r*VKORC1, представљен је љубичастом бојом; због прегледности слика, приказани су само поларни атоми водоника).

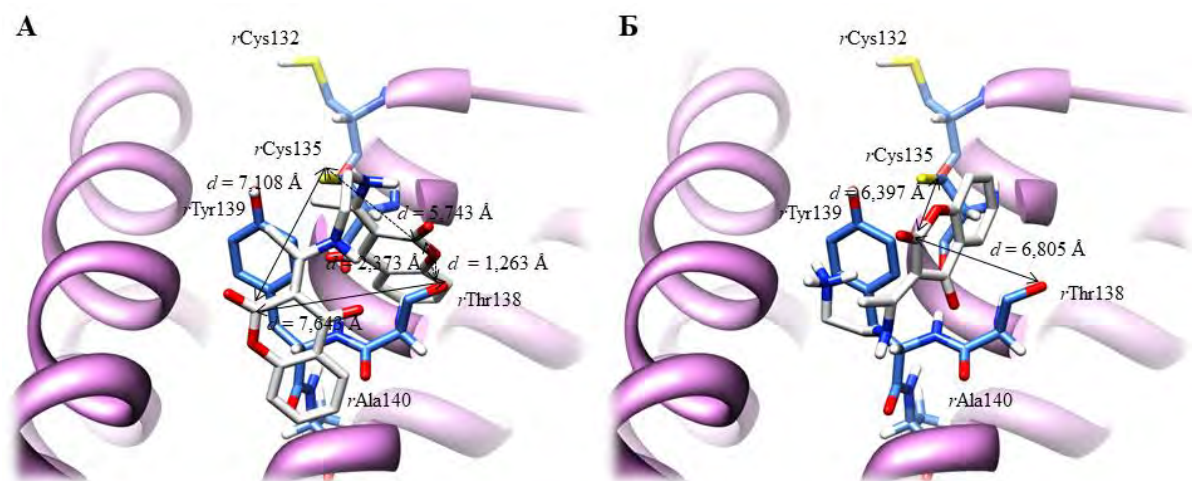
Узрок одсуства активности једињења **2g** (Слика 3.13Б) и **2h** (Слика 3.13Е) у односу на **2a**, **2f** и варфарин такође је занимљив. Једињења су адекватно позиционирана ($d = 3,259 \text{ \AA}$ и $d = 3,102 \text{ \AA}$) према аминокиселини *r*Cys135, конформације су упоредиве са **2a** и **2f**. Ипак, присуство сулфонамида кондензованог са C=N групом не дозвољава спонтану интрамолекулску таутомеризацију C4 хидроксилне групе. Како не постоји могућност стварања карбонилне групе на положају C4, нема ни значајне активности. Да би дошло до антикоагулативне активности, једињења би морала да се депротонују до отворене депротоноване форме.⁴⁹

3.4.3. ВЕЗИВАЊЕ ДЕРИВАТА **2f** И **2a** ЗА *r*VKORC1 ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ КОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ

Анализом резултата добијених из студија молекулског доковања процењена је и могућност да потенцијални антикоагуланти свој капацитет испоље иреверсним механизмом. Да би дошло до ковалентног везивања деривата **2f** и **2a**, у сагласности са литературним наводима, неопходно је да, након редукције *r*VKORC1, егзо двострука веза хроман-2,4-диона најпре буде протонвана од стране аминокиселине *r*Thr138, након чега се формира нестабилан таутомер.⁶⁰ Лактонска карбонилна група овог интермедијера даље је подложна нуклеофилном нападу *r*Cys135 (пут а) или *r*Thr138 (пут б), при чему настају одговарајући ковалентни ацил интермедијери (Шема 3.3). Обзиром да најбоље доковане конформације не пружају могућност да се механизам антагонизма *r*VKORC1 дериватима **2f** и **2a** одвија иреверсним путем, у обзир су узете конформације најбољег кластера, односно конформације са најнижом енергијом из групе упоредивих конформација.

Конформација **2f** добијена из најбољег кластера (Слика 3.14А) последица је позиционирања другог хроман-2,4-дионског прстена између *r*Cys135 и *r*Thr138, док је први прстен за разлику од најбоље доковане конформације удаљен од *r*Tyr139. Оријентација другог прстена настала је под утицајем електростатичког привлачења између лактонског кисеоника и хидроксилне групе *r*Thr138. Карбонилна група на положају C4 окренута је ка *r*Cys135 анјону, али нема електростатичког привлачења. Измерена растојања између деривата и аминокиселина из активног центра сугеришу на могућност да други прстен може бити мета за нуклеофилни напад само преко пута б. С тим у вези, растојање између лактонског карбонила и *r*Thr138 анјона износи $d = 2,373$

Хроман-2,4-дионски прстен деривата **2a** (Слика 3.14Б) позициониран је под правим углом у односу на *r*Tyr139, при чему долази до електростатичког привлачења хидроксилне групе аминокиселине и карбонилне групе лактона из хроманског језгра. Додатна стабилизација остварена је помоћу π - π електронских интеракција између *r*Tyr139 и двоструке везе на С-3 положају. Лактонска функционална група окренута је ка медијуму мембране, супротно активном центру ензима. Протонована терминална амино група етилендиамина близу је фенил групе *r*Tyr139, па се формирају хидрофобне интеракције. Измерено растојање између лактонске карбонилне групе и анјона *r*Cys132, односно *r*Thr138, јесте $d = 6,805 \text{ \AA}$ и $d = 6,397 \text{ \AA}$, што указује да нема могућности да се награди ковалентна веза. Додатно, предвиђена вредност за константу антагонизма најбољег кластера деривата **2a** износи $K_a = 819 \text{ mM}$.

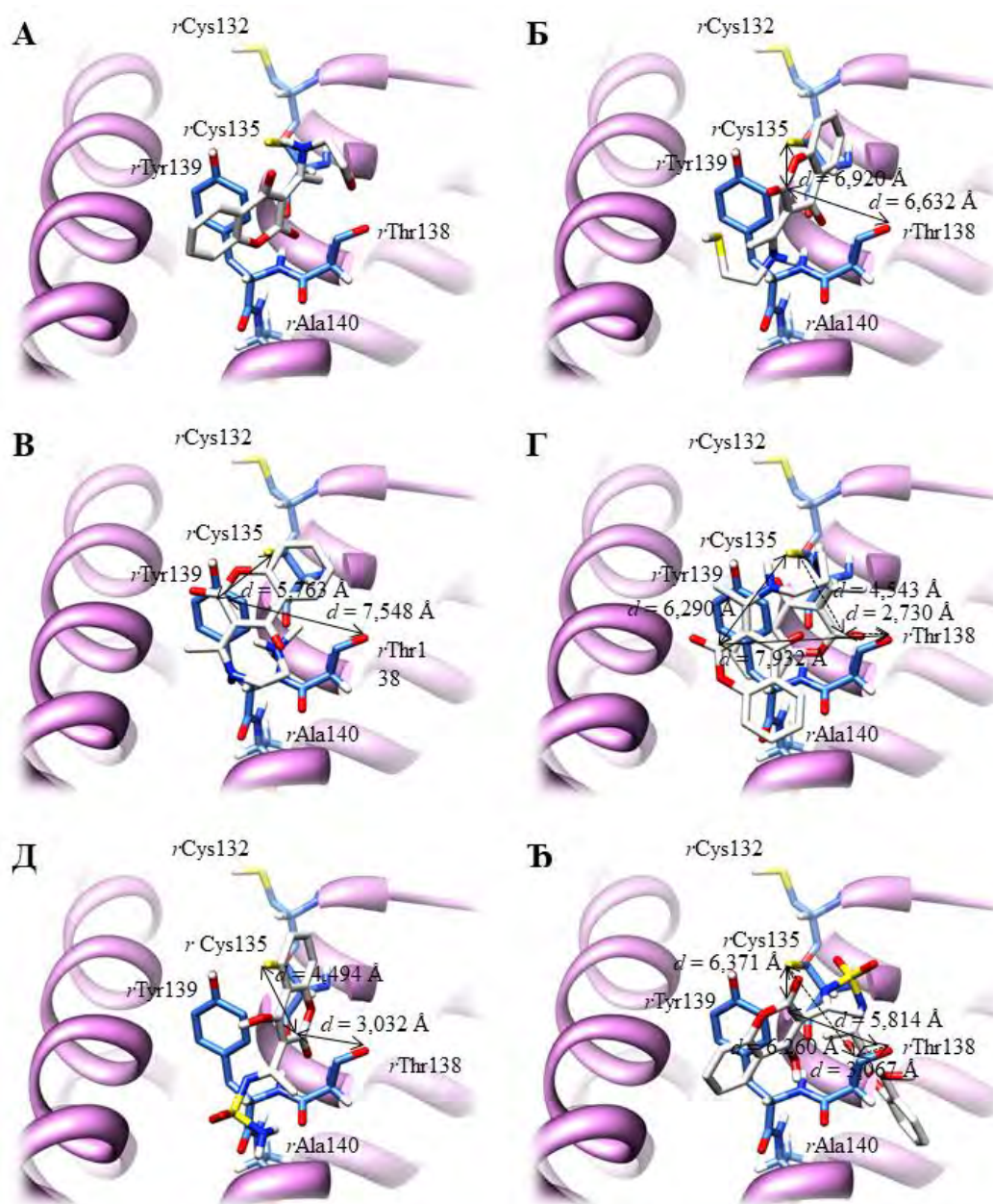


Слика 3.14. Везивање биоактивне конформације добијене из најбољег кластера деривата **2f** (А) и **2a** (Б) у активном центру VKORC1 пацова (*r*VKORC1, представљен је љубичастом бојом; због прегледности приказани су само поларни водоникови атоми; растојања између првог прстена и Cys35 и Thr138 приказана су пуном линијом, док су одговарајућа растојања за други прстен приказана испрекиданом линијом).

Обзиром да не постоји преклапање између најбоље доковане конформације и конформације најбољег кластера, може се закључити да је испољавање антикоагулативне активности ковалентним механизмом тешко оствариво, чак и за **2f**, упркос чињеници да дериват заузима конформацију која би ковалентно везивање и омогућила.

3.4.4. ВЕЗИВАЊЕ НЕАКТИВНИХ ДЕРИВАТА ЗА *r*VKORC1 ПРЕМА ПРЕДЛОЖЕНОМ КОВАЛЕНТНОМ МЕХАНИЗМУ

Сагледавањем конформација најбољег кластера за неактивна једињења утврђено је да ни она не подлежу ковалентној модификацији од стране ензима (Слика 3.15).



Слика 3.15. Везивање биоактивне конформације добијене из најбољег кластера деривата **2b** (А), **2c** (Б), **2d** (В), **2e** (Г), **2g** (Д) и **2h** (Ђ) у активном центру VKORC1 пацова (*r*VKORC1, представљен је љубичастом бојом; због пре гледности приказани су само поларни водоникови атоми, растојања између првог прстена и Cys35 и Thr138 приказана су пуном линијом, док су одговарајућа растојања за други прстен приказана испрекиданом линијом).

Најбоља докована и конформација најбољег кластера **2b** (Слика 3.15А) представљају идентичну конформацију, па се искључује ковалентни механизам. Конформација једињења **2c** (Слика 3.15Б) упућује на то да ово једињење можда испољава ковалентни механизам: лактонски део кумаринског прстена комплетно је окренут према *r*Thr138 и позициониран је адекватно за пут б (Шема 3.3). Ипак, удаљеност између прстена и аминокиселине износи $d = 6,632 \text{ \AA}$, удаљеност је толика да чак ни индуковано прилагођавање не би довело до ковалентне модификације. Што се тиче једињења **2d** (Слика 3.15В), лактонски карбонил овог хинона оријентисан је ка *r*Tyr139 и предалеко је у односу на *r*Cys135 ($d = 7,548 \text{ \AA}$) и *r*Thr138 ($d = 5,763 \text{ \AA}$). Што се тиче деривата **2e** (Слика 3.15Г), његова биоактивна поза упоредива је са конформацијом најбољег кластера **2f**, али је **2e** без активности, па је свако разматрање ковалентног механизма сувишно.

Што се тиче деривата 4-хидроксикумарина, хидроксилна група на положају С4 кумарина **2g** (Слика 3.15Д) стабилизована је електростатичком интеракцијом са хидроксилном групом *r*Tyr139, кумаринско језгро налази се између *r*Cys135 и *r*Thr138 ($d = 4,494 \text{ \AA}$; $d = 3,032 \text{ \AA}$). Други кумарински дериват **2h** (Слика 3.15Ђ) гради готово пирамидалну конформацију која окупира целокупни активни центар. Ипак, нити први нити други кумарински прстен нису просторно адекватно позиционирани да би трпели ковалентне модификације од стране *r*Cys135 ($d = 6,371 \text{ \AA}$; $d = 5,814 \text{ \AA}$) или *r*Thr138 ($d = 6,260 \text{ \AA}$; $d = 3,067 \text{ \AA}$).

3.4.5. 3-D QSAR СТУДИЈЕ АНТИКОАГУЛАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h

Студије молекуског доковања биле су први експериментални доказ да се антикоагулативна активност деривата **2f** и **2a** своди на оксидацију аминокиселине *r*Cys135, односно, редукцију карбонилне групе на положају С4 хроман-2,4-дионског језгра. Оксидо-редукција се највероватније одвија преко прелазног стања (Шема 3.2). Биоактивне конформације најбоље докованих једињења даље су искоришћене за генерисање 3-D QSAR модела, са циљем да се хемијска информација која лежи скривена у оствареним антагонист-*r*VKORC1 интеракцијама преточи у разумљив модел који описује зависност активности антагониста од њихове структуре, SAR (енг. Structure-activity relationships).

Велики недостатак добијених модела јесте број једињења у тренинг сету. Само осам једињења свакако је мали број за добијање квалитетног 3-D QSAR модела који би могао да се користи као валидни алат за предвиђање активности антикоагуланата као антагониста *rVKORC1*. Друга мана модела јесте превелика сличност молекула; за валидан и робустан 3-D QSAR модел неопходна је што већа разноликост у хемијској структури унутар тренинг сета. Ипак, квалитет добијеног модела је то што је добијен преклапањем антагониста на основу структуре рецептора а не на основу структуре самих једињења, па модел колико-толико даје реалну слику о активности. Због наведених недостатака, добијени модели коришћени су као помоћно а не главно средство у сагледавању активности.

Након генерисања поља молекулских интеракција, анализа на који начин вредности енергија стерних и електростатичких интеракција, односно вредности енергија водоничних веза, утичу на активност антагониста, вршена је на основу CoMFA и CoMSIA методологије. Регресиона анализа вршена је методом пројекције латентних структура (варијабли) (енг. Projection of Latent Structures, PLS), те су вредности регресионих коефицијената који врше корелацију активности са измереним енергијама приказане одговарајућим PLS-коефицијентима. Добијени PLS-коефицијенти поравњани су са активним центром VKORC1 пацова и пружили су прави увид у фармаколошки активне регионе аплицираних једињења. CoMFA и CoMSIA методе коришћене у овој студији допринеле су дефиницији девет финалних 3-D QSAR модела (Табела 3.11). Модели су добијени након израчунавања EC₅₀ вредности, односно концентрација које су повећале протромбинско време за 50%, даље коришћене као $\log(1/EC_{50})$ односно pEC₅₀ вредност.

Статистички најзначајнији модели који су коришћени за дескрипцију антикоагулативне активности јесу CoMFA ($r^2 = 0,927$, $q^2_{LOO} = 0,893$), CoMSIA стерни модел ($r^2 = 0,908$, $q^2_{LOO} = 0,785$), CoMSIA хидрофобни модел ($r^2 = 0,929$, $q^2_{LOO} = 0,824$) те CoMSIA модел донора и акцептора водоничних веза ($r^2 = 0,853$, $q^2_{LOO} = 0,864$). Према вредностима r^2 , сви модели су робустни и са великом варијансом (Табела 3.12). Такође, модели су према вредностима q^2_{LOO} робустни и поседују велику предиктивну моћ (Табела 3.13). Обзиром да су све вредности Yq_{LOO} негативне, сви модели су добијени статистички значајном а не случајном корелацијом.

ТАБЕЛА 3.11. Статистички параметри генерисаних CoMFA и CoMSIA 3-D QSAR модела.

3-D QSAR МОДЕЛ	PC ^a	r^{2b}	$q^2_{LOO}{}^b$	$Yq^2_{LOO}{}^c$	SD ^d	SEE ^e	F ^c
CoMFA	2	0,927	0,893	-0,234	0,116	0,137	95,683
CoMSIA	1	0,944	0,747	-0,186	0,189	0,138	17,732
CoMSIA (S)	2	0,908	0,885	-0,232	0,125	0,140	91,138
CoMSIA (E)	1	0,875	0,631	-0,146	0,187	0,189	6,789
CoMSIA (S + E)	1	0,934	0,737	-0,187	0,099	0,166	99,534
CoMSIA (HYD)	1	0,929	0,824	-0,221	0,132	0,169	99,945
CoMSIA (HD)	1	0,884	0,819	-0,175	0,146	0,146	85,344
CoMSIA (HA)	1	0,832	0,616	-0,182	0,184	0,122	7,254
CoMSIA (HD + HA)	1	0,853	0,864	-0,221	0,122	0,134	19,440

^aPC – Оптималан број принципијелне компоненте за модел; ^b r^2 – Конвенционални квадратни корелациони коефицијент; ^b q^2_{LOO} – Корелациони коефицијент добијен унакрсном валидацијом; ^c Yq^2_{LOO} – Y валидација; ^dSD – стандардна валидација; ^eSEE – стандардна грешка процене; ^cF – Fisher-ова вредност; CoMSIA (S) – CoMSIA стерни модел; CoMSIA (E) – CoMSIA електростатички модел; CoMSIA (S + E) – CoMSIA стерни и електростатички модел; CoMSIA (HYD) – CoMSIA хидрофобни модел; CoMSIA (HD) – CoMSIA модел донора водоничне везе; CoMSIA (HA) – CoMSIA модел акцептора водоничне везе; CoMSIA (HD + HA) – CoMSIA модел донора и акцептора водоничних веза.

ТАБЕЛА 3.12. Предиктивна моћ генерисаних CoMFA и CoMSIA 3D-QSAR модела након поновног израчунавања.

Јед.	EC ₅₀ mg/kg	CoMFA pEC ₅₀			CoMSIA 1 ^a pEC ₅₀			CoMSIA 2 ^b pEC ₅₀			CoMSIA 3 ^b pEC ₅₀		
		Екс.	Изр.	Раз.	Екс.	Изр.	Раз.	Екс.	Изр.	Раз.	Екс.	Изр.	Раз.
2a	0,94	2,95	3,02	0,07	2,95	2,92	0,30	2,95	2,87	0,15	2,95	2,96	0,16
2b	3,73	2,62	2,61	0,01	2,62	2,62	0,19	2,62	2,52	0,09	2,62	2,61	0,18
2c	0,96	3,09	3,02	0,07	3,09	3,09	0,07	3,09	3,12	0,10	3,09	3,13	0,11
2d	1,98	2,82	2,70	0,12	2,82	2,82	0,12	2,82	2,76	0,06	2,82	2,76	0,06
2e	0,85	3,07	3,06	0,01	3,07	3,07	0,01	3,07	2,99	0,27	3,07	2,99	0,13
2f	0,69	3,18	3,19	0,01	3,18	3,18	0,01	3,18	3,19	0,02	3,18	3,18	0,01
2g	2,07	2,73	2,78	0,05	2,73	2,73	0,05	2,73	2,76	0,08	2,73	2,57	0,11
2h	1,97	2,71	2,72	0,01	2,71	2,71	0,01	2,71	2,77	0,07	2,71	2,74	0,04

^aCoMSIA 1 – CoMSIA стерни модел; ^bCoMSIA 2 – CoMSIA хидрофобни модел;

^bCoMSIA 3 – CoMSIA модел донора и акцептора водоничних веза.

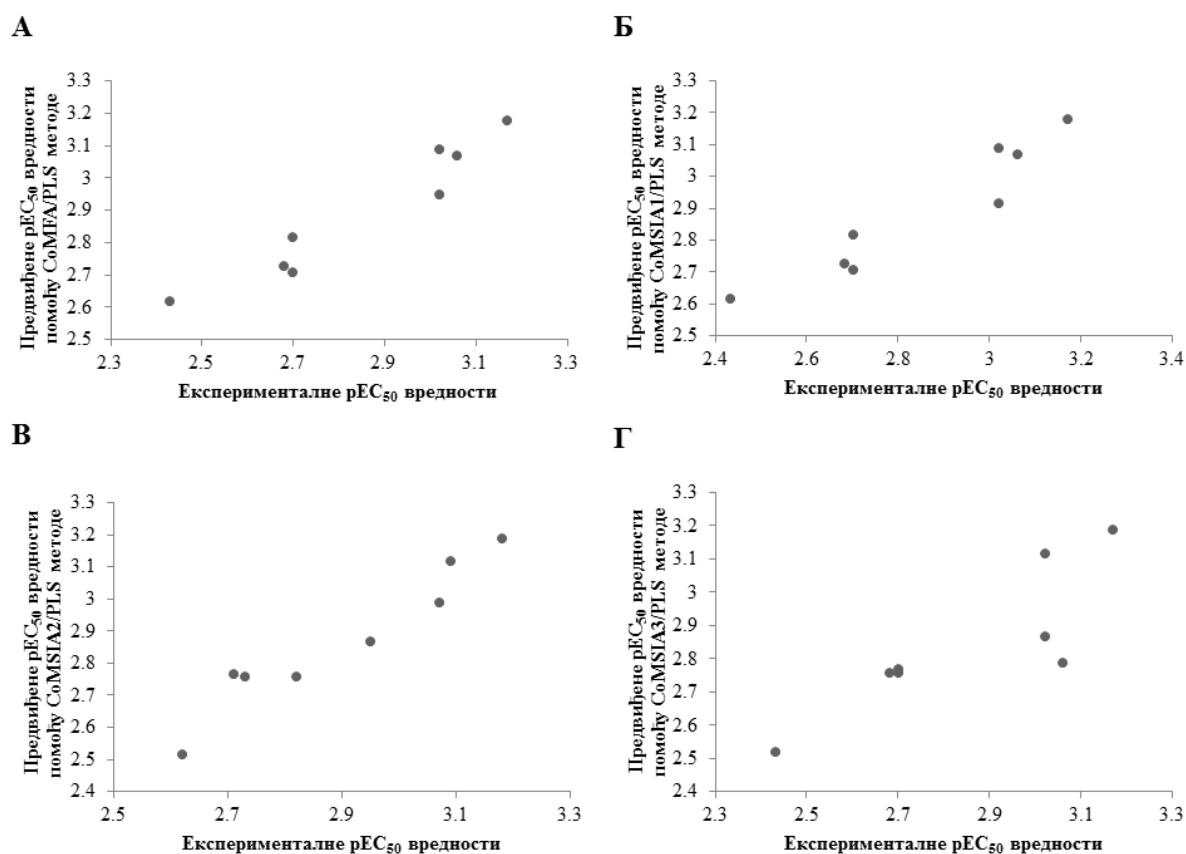
Дијаграми корелација између поновно израчунатих/предвиђених и експерименталних pEC₅₀ вредности, коришћењем најбољих модела, приказан је на Слици 3.16.

ТАБЕЛА 3.13. Предиктивна моћ генерисаних CoMFA и CoMSIA 3D-QSAR модела након унакрсне валидације LOO методом.

Јед.	EC ₅₀ mg/kg	CoMFA pEC ₅₀			CoMSIA 1 ^a pEC ₅₀			CoMSIA 2 ^b pEC ₅₀			CoMSIA 3 ^b pEC ₅₀		
		Екс.	Пред.	Раз.	Екс.	Пред.	Раз.	Екс.	Пред.	Раз.	Екс.	Пред.	Раз.
2a	0,94	2,95	2,68	0,27	2,95	2,93	0,02	2,95	2,82	0,13	2,95	2,94	0,01
2b	3,73	2,62	2,44	0,18	2,62	2,61	0,01	2,62	2,55	0,07	2,62	2,57	0,05
2c	0,96	3,09	2,92	0,17	3,09	2,98	0,11	3,09	3,15	0,06	3,09	3,07	0,02
2d	1,98	2,82	2,69	0,11	2,82	2,77	0,05	2,82	2,69	0,13	2,82	2,71	0,11
2e	0,85	3,07	2,99	0,08	3,07	3,05	0,02	3,07	3,01	0,06	3,07	2,89	0,18
2f	0,69	3,18	3,05	0,13	3,18	3,11	0,07	3,18	3,12	0,06	3,18	3,15	0,03
2g	2,07	2,73	2,68	0,05	2,73	2,74	0,01	2,73	2,71	0,02	2,73	2,61	0,12
2h	1,97	2,71	2,52	0,19	2,71	2,66	0,05	2,71	2,73	0,02	2,71	2,69	0,02

^aCoMSIA 1 – CoMSIA стерни модел; ^bCoMSIA 2 – CoMSIA хидрофобни модел;

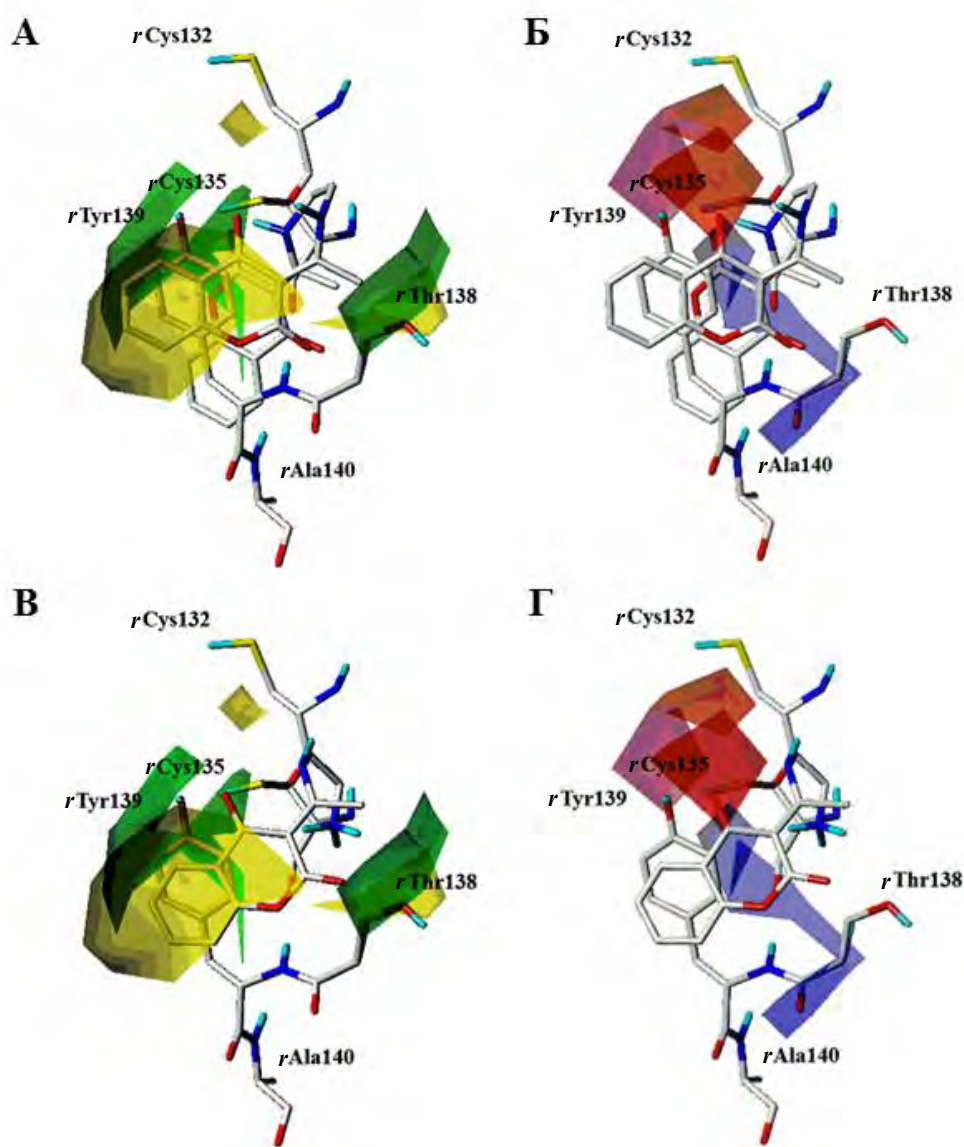
^bCoMSIA 3 – CoMSIA модел донора и акцептора водоничних веза.



Слика 3.16. Дијаграм односа поново израчунатих/предвиђених и експерименталних pEC₅₀ вредности помоћу CoMFA (A); CoMSIA 1 (B); CoMSIA 2 (V); CoMSIA 3 (G) модела.

Функционалне групе које повећавају или смањују антикоагулативну активност испитиваних деривата најпре су дефинисане PLS-кофицијентима који проистичу из CoMFA модела (Слика 3.17), коришћењем мапа проистеклих из стерних и

електростатичких интеракција. Варијанса модела била је $r^2 = 0,927$, док је квадратни коефицијент унакрсне валидације био $q^2 = 0,793$, са оптималном вредношћу принципијелне компоненте $PC = 2$ (Табела 3.11). Модел поседује оптималну робустност и предиктивни капацитет, те се може користити за предвиђање EC_{50} вредности датог тренинг сета.



Слика 3.17. SoMFA стерни PLS-коефицијенти деривата **2f** (A) и **2a** (B); SoMFA електростатички PLS-коефицијенти деривата **2f** (Б) и **2a** (Г). (Због прегледности, приказани су само поларни водоникови атоми).

Стерне интеракције окарактерисане су како позитивним (зелени изоплети) тако и негативним (жути изоплети) вредностима PLS-коефицијената. Зелене контуре

указују на регионе молекула где волуминозније функционалне групе позитивно утичу на антикоагулативну активност, док жуте контуре указују на функционалне групе које активност смањују. Са друге стране, електростатичке интеракције такође су окарактерисане позитивним (црвене мапе) и негативним (плаве мапе) вредностима PLS-коэффицијената. Црвене мапе указују на функционалне групе чији електрон-донорски капацитет повећава активност, плаве мапе указују на функционалне групе чији електрон-акцепторски капацитет повећава активност.

Према оријентацији зелених PLS-коэффицијената бензенов прстен првог хроман-2,4-дионског језгра **2f** и **2a** остварује са *r*Tyr139 стерне интеракције (Слика 3.17А и 3.17Ц). Обзиром да је ова привлачна интеракција између антагониста и активног центра ензима предвиђена молекулским доковањем, зелене контуре потврђују да је хроман-2,4-дионско језгро неопходно за антикоагулативну активност. Други зелени полиедар лоциран је између лактонског карбонила другог хроман-2,4-дионског језгра **2f** и *r*Cys135. Поменута контура указује на изузетну важност интеракције формиране између назначене карбонилне групе и *r*Cys135, за интермолекулску стабилизацију антагониста у активном центру *r*VKORC1. Надаље, према положају трећег региона позитивних PLS-коэффицијената који описују стерне интеракције, метил група вицинална првом хроман-2,4-дионском језгру **2f** остварује хидрофобне интеракције са метил групом R-остатка *r*Thr138 и додатно везује антагонист. Слична интеракција опажена је и за **2a**. Ова интеракција свакако потпомаже формирање жлебне конформације етилендиаминског моста помоћу које **2f** смешта *r*Tyr139 у конформациони сендвич.

Са друге стране, положај негативних PLS-коэффицијената који описују стерне интеракције указују на то да промена положаја првог хроман-2,4-дионског језгра условљава ниво активности. Тако, велика жута контура описује регион поравнања хроман-2,4-дионског и 4-хидроксикумаринског језгра (Слика 3.17А и 3.17Ц). У односу на положај првог хроман-2,4-дионског језгра **2f** и **2a**, конформациона промена одговарајућег сегмента **2b** (Слика 3.13А) те **2c** (Слика 3.13Б) и **2d** (Слика 3.13В), кључна је за нижу антикоагулативну активност ових антагониста. Даље, још једна велика жута мапа лоцирана је изнад *r*Cys135, у региону који је окупиран са $-\text{CH}_2-\text{SH}$ и $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ групама **2c** и **2d**. По овој одбојној хидрофобној интеракцији, немогуће је повећати волуминозност молекула у региону каталитичких аминокиселина; смањење стерних сметњи у том под-региону могло би да релаксира интензитет стерних интеракција између антагониста и *r*VKORC1, што би довело до активнијих једињења.

Неповољан утицај поседују и ре-лоцирана друга хроман-2,4-дионска језгра **2e** (Слика 3.13Д) и **2h** (Слика 3.13Ђ) и то на аминокиселину *r*Thr138.

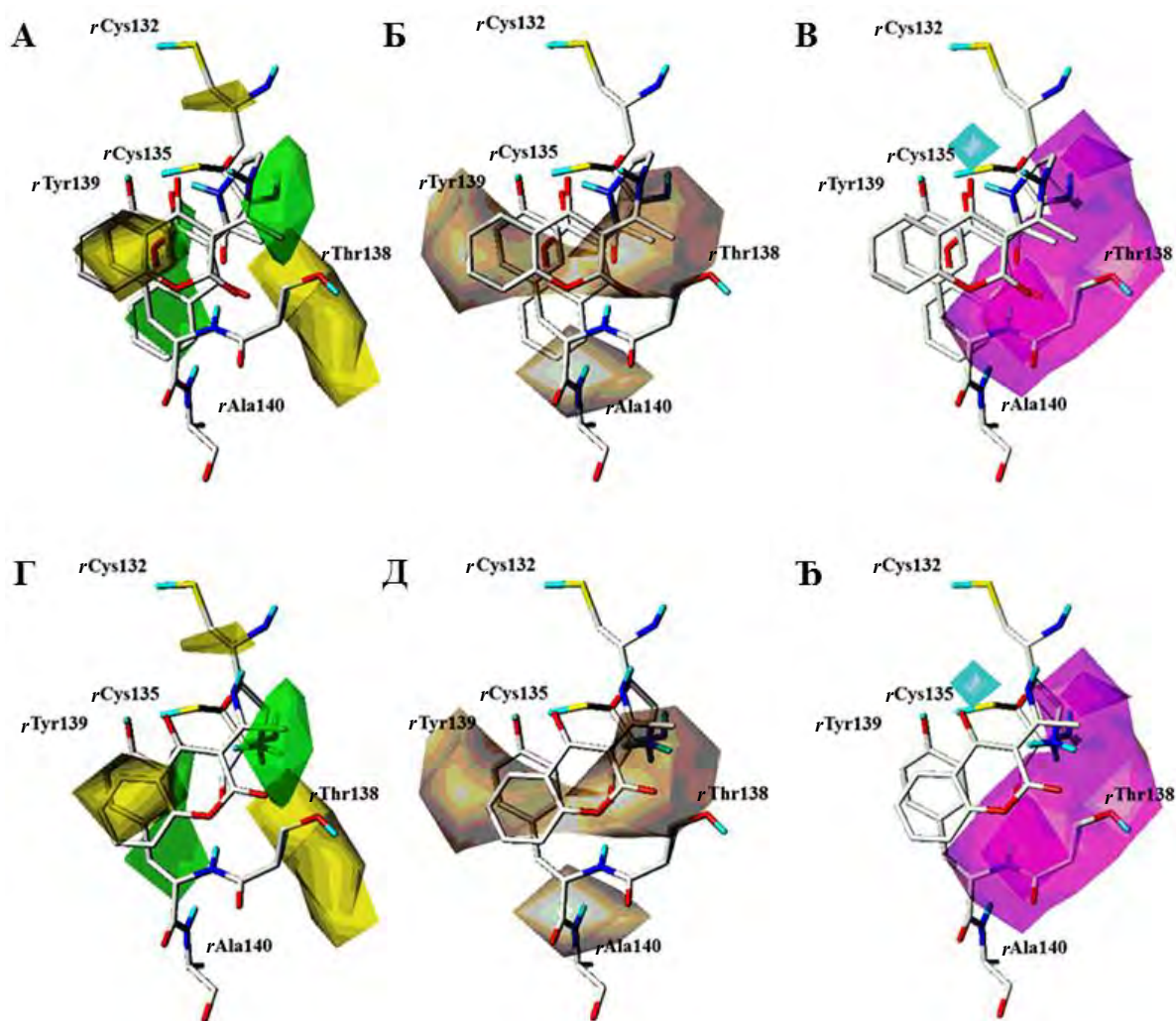
PLS-кофицијенти проистекли из електростатичких интеракција деривата **2f** и **2a** представљени су на Сликама 3.17Б и 3.17Д. Плави полиедри индикатори су региона где функционалне групе активних једињења показују позитивну тенденцију за донарањем протона за грађење водоничне везе. Подсећања ради, студије молекулског доковања предвиделе су грађење водоничне везе између мање активних једињења и пептидне везе *r*Thr138-*r*Tyr139. Обзиром да се плави PLS-кофицијенти исцртавају између лактонског карбонила као акцептора водоничне везе и азота из пептидне везе као донора, закључак је да формирање такве водоничне везе повећава активност антагониста. Антагонист **2f**, као најактивније једињење, формира наведену водоничну везу, док је антагонист **2a** не формира, и то је један од разлога повећане антикоагулативне активности деривата **2f**. Плави PLS-кофицијенти такође квантификују и интеракцију између лактонског карбонила другог прстена и *r*Cys135.

Надаље, положај црвених PLS-кофицијената описује потенцијал сулфхидрилне групе *r*Cys135 као донора водоничне везе према карбонилу на положају С4 хроман-2,4-дионског језгра деривата **2f** и **2a** (Слике 3.17Б и 3.17Д). Нотирани важни региони директно указују да се антикоагулативна активност најактивнијих једињења одвија прихватањем протона са каталитичке аминокиселине (Шема 3.2). Друга заједничка контура црвених PLS-кофицијената лоцирана је око хидроксилне групе R-остатка *r*Tyr139, која формира електростатичку интеракцију а можда чак и водоничну везу која није детектована молекулским доковањем, са карбонилом на положају С4 хроман-2,4-дионског језгра; ова интеракција даје велики допринос стабилизацији једињења у активном центру.

У односу на CoMFA методологију, CoMSIA је у предности јер може да експлоатише различита поља PLS-кофицијената, односно да врши декомпозицију стерних, електростатичких и енергија водоничних веза на засебне PLS-кофицијенте (Слика 3.18). Три статистички најбоља CoMSIA модела били су CoMSIA стерни модел (CoMSIA 1, Табела 3.11, $r^2 = 0,908$, $q^2_{CV} = 0,785$, PC = 2), затим CoMSIA хидрофобни модел (CoMSIA 2, Табела 3.11, $r^2 = 0,929$, $q^2_{CV} = 0,724$, PC = 1), те CoMSIA модел донора и акцептора водоничних веза (CoMSIA 3, Табела 3.11, $r^2 = 0,853$, $q^2_{CV} = 0,764$, PC = 1).

CoMSIA стерни модел продукује сличне PLS-кофицијенте већ описаним CoMFA моделом. Код CoMSIA хидрофобног модела, функционалне групе које

остварују повољне хидрофобне интеракције прекривене су браон-сивим PLS-коэффицијентима док су оне које остварују повољне хидрофилне интеракције означене белим PLS-коэффицијентима. Поменуте мапе су такође у сагласности са CoMFA стерним моделом. Најинтересантнији су били PLS-коэффицијенти добијени након транслагације енергија водоничних веза у тродимензионални простор. Тако, небеско плаве и љубичасте мапе указују на регионе где доноси водоничне везе повећавају и смањују активност, док розе и црвени коэффицијенти указују на регионе где акцептори водоничне везе повећавају и смањују активност.

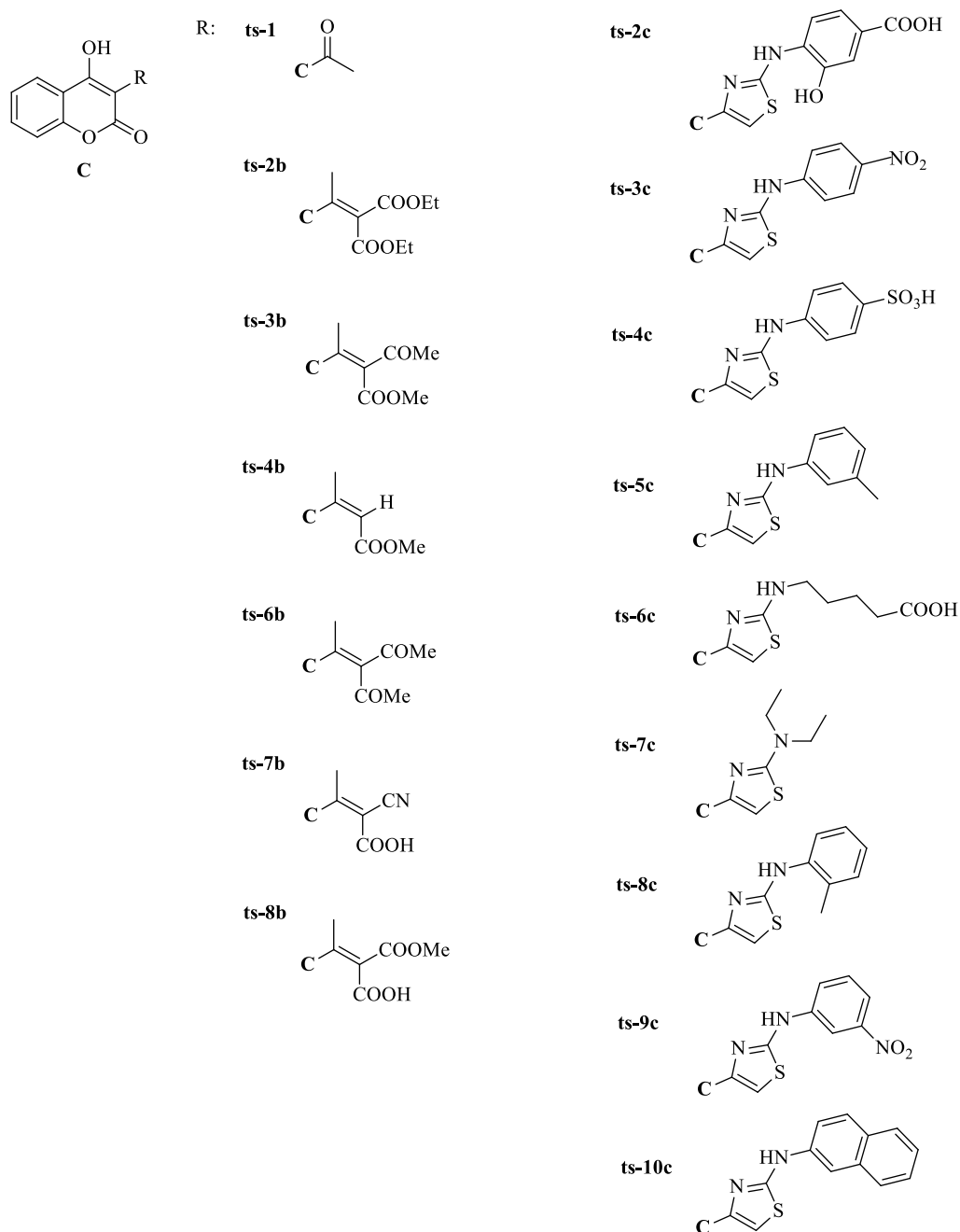


Слика 3.18. CoMSIA стерни PLS-коэффицијенти деривата **2f** (А) и **2a** (Г); CoMSIA хидрофобни PLS-коэффицијенти деривата **2f** (Б) и **2a** (Д); CoMSIA PLS-коэффицијенти донора и акцептора водоничних веза деривата **2f** (В) и **2a** (Е). (Због прегледности, приказани су само поларни водоникови атоми).

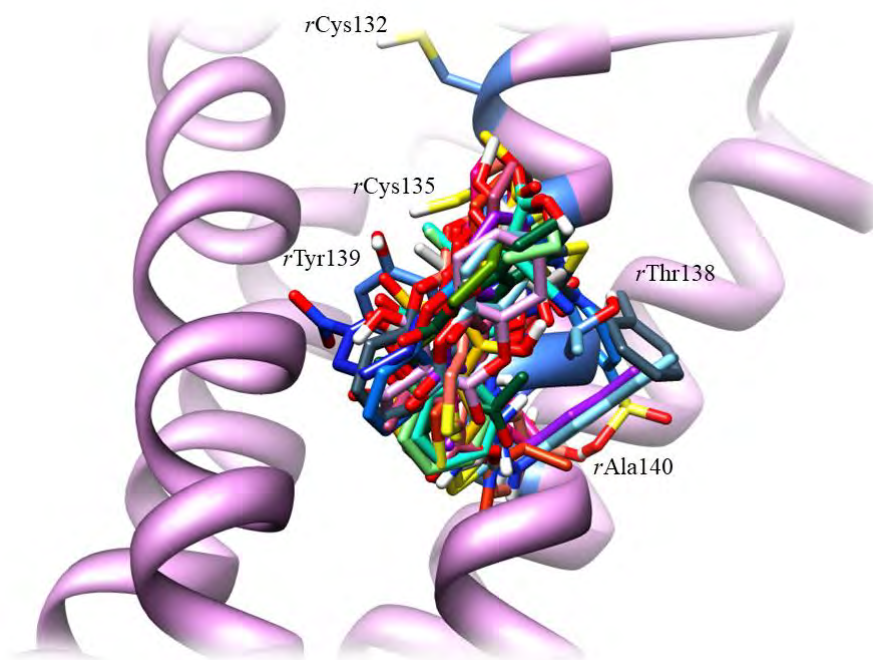
Небеско-плави PLS-коэффицијенти још једном потврђују трансфер протона са сулфхидрилне групе *rCys135* на С4 карбонил **2f** (Слика 3.18В) и **2a** (Слика 3.18Е).

Додатно, розе PLS-коэффицијенти потврђују водоничне везе остварене са *r*Thr138-*r*Tyr139.

На крају, екстерна валидација предиктивне активности генерисаних модела извршена је помоћу тест сета састављеног од 16 4-хидроксикумарина (Шема 3.4, Табела 3.14) који су у претходном раду окарактерисани као *in vivo* антикоагуланти.⁴⁹ Пре инкорпорације тест сета у моделе, извршено је поравнање структура једињења у активном центру *r*VKORC1 на исти начин као и за тренинг сет (Слика 3.19).



Шема 3.4. Структуре 4-хидроксикумарина коришћене као тест сет за валидацију 3-D QSAR и 3-D фармакофорног модела.



Слика 3.19. Поравнање тест сета у активном центру VKORC1 пацова.

Резултати екстерне валидације приказани су у Табели 3.14. Сви генерисани модели показују добру предиктивну моћ за тест сет сачињен од 4-хидроксикумарина.

ТАБЕЛА 3.14. Екстерна валидација 3-D QSAR модела.

Јед.	pEC ₅₀	CoMFA		CoMSIA 1 ^a		CoMSIA 2 ^b		CoMSIA 3 ^b	
		Пред.	Раз.	Пред.	Раз.	Пред.	Раз.	Пред.	Раз.
ts-1	2,77	2,84	0,07	2,86	0,09	2,91	0,14	2,87	0,10
ts-2b	3,85	3,82	0,03	3,83	0,02	3,85	0,00	3,79	0,06
ts-3b	2,94	3,02	0,08	3,11	0,17	3,14	0,12	3,09	0,15
ts-4b	2,56	2,65	0,09	2,67	0,11	2,72	0,16	2,61	0,05
ts-6b	2,86	2,74	0,12	2,78	0,08	2,81	0,05	2,72	0,14
ts-7b	2,63	2,82	0,19	2,85	0,22	2,92	0,29	2,74	0,11
ts-8b	2,50	2,61	0,11	2,63	0,13	2,72	0,22	2,59	0,09
ts-2c	2,63	2,34	0,29	2,46	0,17	2,48	0,15	2,55	0,08
ts-3c	2,63	2,34	0,29	2,51	0,12	2,55	0,08	2,57	0,06
ts-4c	3,85	3,83	0,02	3,84	0,01	3,86	0,01	3,84	0,01
ts-5c	4,16	4,18	0,02	4,21	0,05	4,28	0,12	4,19	0,03
ts-6c	3,03	3,10	0,07	3,12	0,09	3,19	0,16	3,07	0,04
ts-7c	3,03	3,11	0,08	3,15	0,12	3,24	0,21	3,06	0,03
ts-8c	2,27	2,32	0,05	2,40	0,13	2,47	0,20	2,35	0,08
ts-9c	3,13	3,18	0,05	3,25	0,12	3,35	0,22	3,23	0,10
ts-10c	2,23	2,54	0,31	2,61	0,38	2,32	0,09	2,43	0,20

^aCoMSIA 1 – CoMSIA стерни модел; ^bCoMSIA 2 – CoMSIA хидрофобни модел;

^bCoMSIA 3 – CoMSIA модел донора и акцептора водоничних веза.

3.4.6. ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D ФАРМАКОФОРЕ КОЈА ОПИСУЈЕ АНТИКОАГУЛАТИВНУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА 2a-h

Валидација студија молекулског доковања и 3-D QSAR студија надаље је вршена генерисањем статистички значајних модела 3-D фармакофора (Табела 3.15). Према опште прихваћеном ставу, 3-D фармакофора представља релативни просторни распоред функционалних група антагониста важних за активност.⁶⁷ Стога би 3-D фармакофора за одређени активни центар требала да буде заједничка за све антагонисте који га окупирају. Када се једном 3-D фармакофора идентификује, може се користити као критеријум селекције помоћу кога се за даљу биохемијску анализу одаберу само они антагонисти који испуњавају све структурне захтеве 3-D фармакофоре.

ТАБЕЛА 3.15. Статистички значајне информације и предиктивни капацитет за 10 најбољих хипотеза као резултат аутоматизованог генерисања 3-D фармакофоре базиране на структури активног центра рецептора.

Број хипотезе	Укупна вредност	Разлика вредности	RMS ^a	Корелација ^b	Особине ^b	Максимално преклапање
<i>Нуро1</i>	77,38	56,04	0,71	0,97	НВА, Ну	9,47
<i>Нуро2</i>	79,75	53,67	0,81	0,95	НВА, Ну	9,03
<i>Нуро3</i>	85,48	47,94	0,96	0,89	НВА, Ну	7,19
<i>Нуро4</i>	90,28	43,14	1,28	0,83	НВА, Ну	7,05
<i>Нуро5</i>	92,61	40,81	1,39	0,84	НВА, Ну	8,17
<i>Нуро6</i>	93,33	40,09	1,31	0,89	НВА, Ну	6,52
<i>Нуро7</i>	96,75	36,67	1,46	0,87	НВА, Ну	4,89
<i>Нуро8</i>	98,28	35,14	1,51	0,85	НВА, Ну	6,23
<i>Нуро9</i>	99,09	34,33	1,66	0,83	НВА, Ну	5,78
<i>Нуро10</i>	103,36	30,06	1,98	0,84	НВА, Ну	5,34

^aRMS, стандардна девијација између логаритамских вредности израчунатих и експерименталних активности; ^bКвадратни корелациони коефицијент линеарне регресионе анализе добијен из индекса геометријског преклапања. ^вНВА - акцептор водоничне везе; ^гНу – хидрофобна особина.

Квалитативни НирНор модели (Табела 3.15) генерисани су на основу поравнања најбоље докованих конформација свих једињења у тренинг сету.¹⁷⁹ Сврха модела била је да идентификује кључне хемијске особине неходне за испољавање антикоагулативне активности тестираних једињења. Антагонист **2f** био је референтно једињење. Статистички приказ генерисања фармакофорних модела приказан је у Табели 3.15.

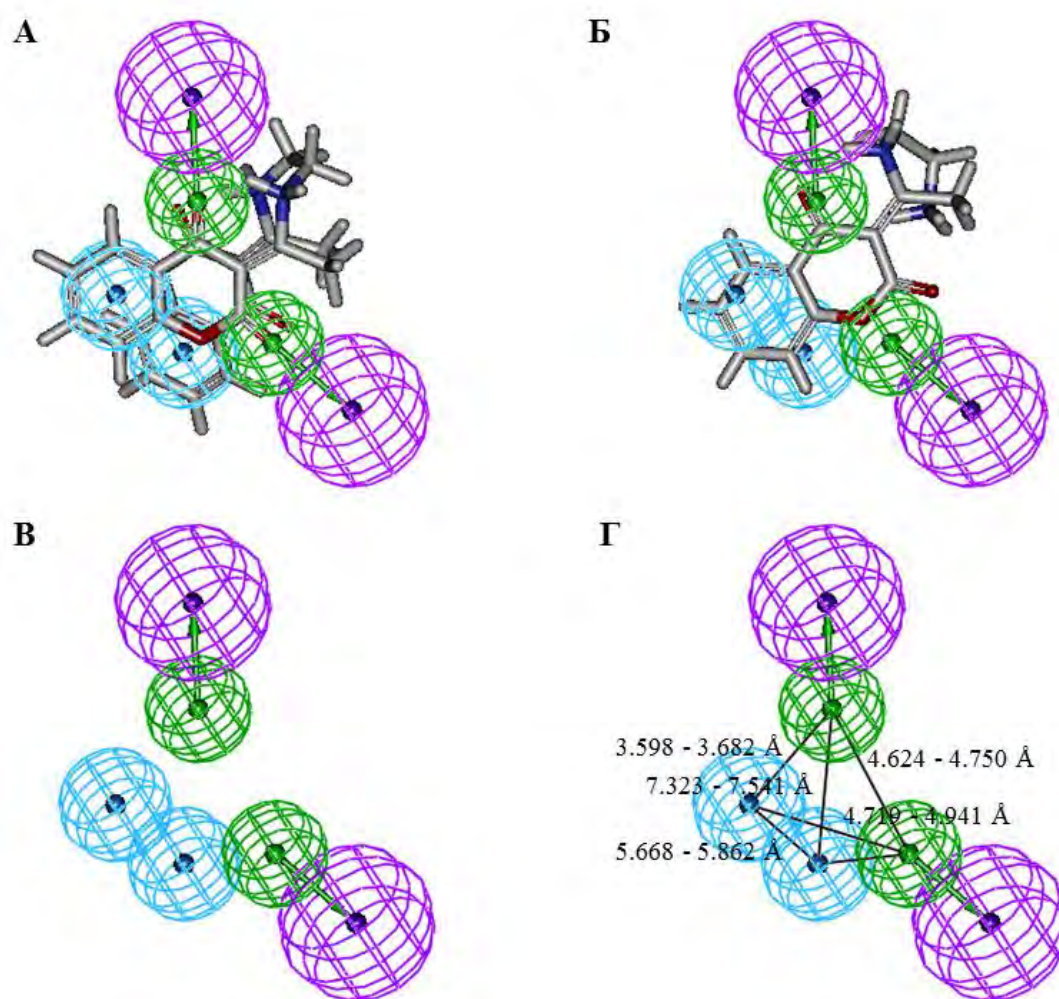
Квалитет добијеног 3-D фармакофорног модела процењује се на основу неколицине параметара. Први је фиксирана вредност модела (енг. fixed cost) која описује да ли се генерисане фармакофорне особине модела поклапају са експерименталним структурама молекула или не. Други параметар је вредност без значаја или корелациона вредност модела (енг. nullcost, correlation cost) односно најбоља вредност модела без фармакофорних особина која активност изражава тако да буде просечна вредност активности свих једињења тренинг сета. Укупна вредност (енг. total cost) требала би увек да буде што удаљенија од вредности без значаја и што приближнија фиксираној вредности. Разлика између корелационе вредности и укупне вредности модела користи се као разлика вредности. Још један од значајних параметара је и RMS фактор која указује на квалитет предвиђања активности тренинг сета и на корелациони коефицијент који се добија из линеарне регресионе анализе која произилази из индекса преклапања молекула у тренинг сету као и из укупне вредности модела. Ако разлика између корелационе вредности и фиксне вредности модела износи 40–60, модел има предикциону моћ од 70–90%; ако је разлика испод 40, модел нема предикциону моћ.

Тако, најбоља квантитативна хипотеза, *HypoGen* (Табела 3.15, Слика 3.20В и Слика 3.20Г), окарактерисана је са најнижом укупном вредношћу (77,38), највишом разликом вредности (56,06), најнижом RMS вредношћу (0,71) и најбољим корелационим коефицијентом (0,97). Фиксирана вредност и вредност без значаја износиле су 77,38 и 133,42. Параметри су указивали на високу предиктивну моћ модела.

На Слици 3.20 представљено је мапирање најбољег модела 3-D фармакофора у односу на **2f** и **2a**. Најбоља НирНор хипотеза, *Hypo1*, представљена је на Сликама 3.21А и 3.21Б, садржи четири особине које потентни антагонист *rVKORC1* мора да садржи: два акцептора водоничних веза (енг. hydrogen-bond acceptors, НВА) и два ароматичне хидрофобне функције (енг. hydrophobic aromatics, Ну). Квалитативни *Hypo1* модели за **2f** (Слика 3.20А) и **2a** (Слика 3.20Б) искоришћени су за квантификацију самог модела.

Особине хидрофобних интеракција (Ну) за **2f** (Слика 3.20А, плаве сфере) и **2a** (Слика 3.20Б, плаве сфере) кључне су фармакофорне особине за **2f** и **2a** и последица су стабилизације између ароматичних остатака деривата и *rTyr139*. Надаље, механизам антагонистичке активности антикоагуланта **2f** и **2a** окарактерисан је са две особине акцептора водоничне везе (НВА, зелене сфере) лоциране на карбонилној групи положаја С4 језгра хроман-2,4-диона, односно на лактонском карбонилу (**2f**, Слика

3.20А) или лактонском кисеонику пиронског прстена (**2a**, Слика 3.20Б). Предвиђање таквих особина нагласило је изузетну важност способности првог хроманског прстена **2f** или јединог хроманског прстена **2a** да прихвати протон са *r*Cys135, односно способности лактонског карбонила или лактонског кисеоника да прихвати водоничну везу са *r*Thr138. Генерисањем оваквог фармакофорног модела потврђене су све важне интеракције предвиђене молекулским доковањем и 3-D QSAR студијама.



Слика 3.20. Најбољи фармакофорни модел *Nuro1* преклопљен преко **2f** (А) и **2a** (Б), *NuroGen* фармакофорни модел *Nuro1* (В), 3-D просторна зависност и геометријски параметри *Nuro1* (Г). Фармакофорне особине су обојене различитим бојама: зелена – акцептор водоничне везе, љубичаста – донор водоничне везе; плава – хидрофобна ароматична функција.

Nuro1 модел надаље је коришћен за предвиђање активности осам једињења у тренинг сету. У Табели 3.16. приказане су експерименталне и израчунате pEC_{200}

вредности. Вредности rEC_{200} биле су коректно предвиђене, индицирајући висок квалитет *Hypol* модела.

ТАБЕЛА 3.16. Експерименталне и предвиђене вредности тренинг сета на основу *Hypol* фармакофорног модела.

Јед.	Вредност поклапања ^а	EC_{200}	Експ. rEC_{200} ^б	Пред. rEC_{200} ^в	Грешка	Експ. скала ^г	Предв. скала ^д
2a	7,46	3,98	2,40	2,41	+0,01	+++	+++
2b	3,31	4,18	2,38	2,36	-0,02	++	++
2c	5,44	4,23	2,37	2,34	-0,03	++	++
2d	3,72	5,43	2,26	2,35	+0,09	++	++
2e	4,12	8,93	2,05	2,22	+0,17	+	+
2f	8,12	3,88	2,41	2,42	+0,01	+++	+++
2g	3,92	3,31	2,48	2,53	+0,05	+	+
2h	4,12	6,06	2,22	2,27	+0,05	+	+

^аВредност поклапања указује колико добро се фармакофорне особине преклапају са хемијским особинама молекула. Вредност поклапања = коефицијент преклапања \times [максимална вредност (0.1 - SSE)] где је $SSE = (D/T)^2$, D = дислоцирање фармакофорне особине са очекиваног центра особине и T = радијус простирања сфере особине (толеранција), ^бЕкспериментална активност; ^вПредвиђена активност; ^гЕкспериментална скала активности: $rEC_{200} < 2,22 = +$ (слабо активна једињења); $2,22 < rEC_{200} < 2,40 = ++$ (умерено активна једињења); $rEC_{200} > 2,40 = +++$ (јако активна једињења). ^дПредвиђена скала активности: $rEC_{200} < 2,22 = +$ (слабо активна једињења); $2,22 < rEC_{200} < 2,40 = ++$ (умерено активна једињења); $rEC_{200} > 2,40 = +++$ (јако активна једињења).

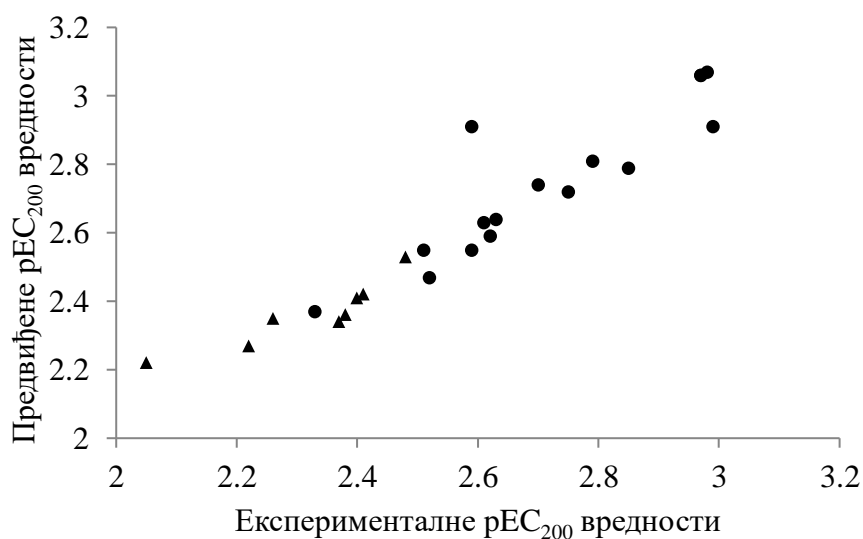
Валидација предиктивне моћи генерисаног 3-D фармакофорног модела извршена је помоћу претходно генерисаног тест сета сачињеног од деривата 4-хидроксикумарина. Квалитет регресионе анализа *Hypol* модела проверена је на 16 једињења, при чему је добијен коефицијент корелације од 0,910 између експерименталних и предвиђених активности, чиме је потврђена предиктивна моћ фармакофорног модела. Резултати су приказани у Табели 3.17 и на Слици 3.21.

Овим је и дефинитивно потврђен висок квалитет добијеног 3-D фармакофорног модела те се он као такав може користити у виртуелном скенирању нових антагониста *rVKORC1*. Мана модела је што је дефинисан на основу малог броја антагониста, али је први такве врсте па се може користити до унапређења са већим бројем антагониста.

ТАБЕЛА 3.17. Експерименталне и предвиђене вредности тест сета на основу *Huro1* фармакофорног модела.

Јед.	Вредност поклапања ^а	ЕС ₂₀₀	Експ. рЕС ₂₀₀ ^б	Пред. рЕС ₂₀₀ ^в	Грешка	Експ. Скала ^г	Предв. Скала ^д
ts-1	5,28	1,41	2,85	2,79	-0,06	+	+
ts-2b	6,62	2,62	2,79	2,81	+0,02	+++	+++
ts-3b	3,38	1,76	2,75	2,72	-0,03	+	+
ts-4b	4,53	2,01	2,70	2,74	+0,04	+	+
ts-6b	3,92	2,43	2,61	2,63	+0,02	+	+
ts-7b	3,36	2,54	2,59	2,55	-0,04	+	+
ts-8b	6,71	3,02	2,52	2,47	-0,05	+	+
ts-2c	4,71	2,31	2,63	2,64	+0,01	+	+
ts-3c	3,35	2,41	2,62	2,59	-0,03	+	+
ts-4c	3,43	1,04	2,59	2,91	+0,32	+++	+++
ts-5c	5,47	1,05	2,98	3,07	+0,09	+++	+++
ts-6c	4,57	3,01	2,97	3,06	+0,09	++	++
ts-7c	3,26	3,01	2,97	3,06	+0,06	++	++
ts-8c	4,61	3,12	2,51	2,55	+0,04	+	+
ts-9c	3,38	1,03	2,99	2,91	-0,08	+++	+++
ts-10c	4,51	3,71	2,33	2,37	+0,04	+	+

^аВредност поклапања указује колико добро се фармакоформе особине преклапају са хемијским особинама молекула. Вредност поклапања = коефицијент преклапања \times [максимална вредност (0,1 - SSE)] где је $SSE = (D/T)^2$, D = дислоцирање фармакофорне особине са очекиваног центра особине и T = радијус простирања сфере особине (толеранција), ^бЕкспериментална активност; ^вПредвиђена активност; ^гЕкспериментална скала активности: $rES_{200} < 2,22 = +$ (слабо активна једињења); $2,22 < rES_{200} < 2,40 = ++$ (умерено активна једињења); $rES_{200} > 2,40 = +++$ (јако активна једињења). ^дПредвиђена скала активности: $rES_{200} < 2,22 = +$ (слабо активна једињења); $2,22 < rES_{200} < 2,40 = ++$ (умерено активна једињења); $rES_{200} > 2,40 = +++$ (јако активна једињења).



Слика 3.21. График корелације између експерименталних и предвиђених рЕС₂₀₀ вредности тренинг сета (троуглови) и тест сета (кругови) добијен *Huro1* моделом.

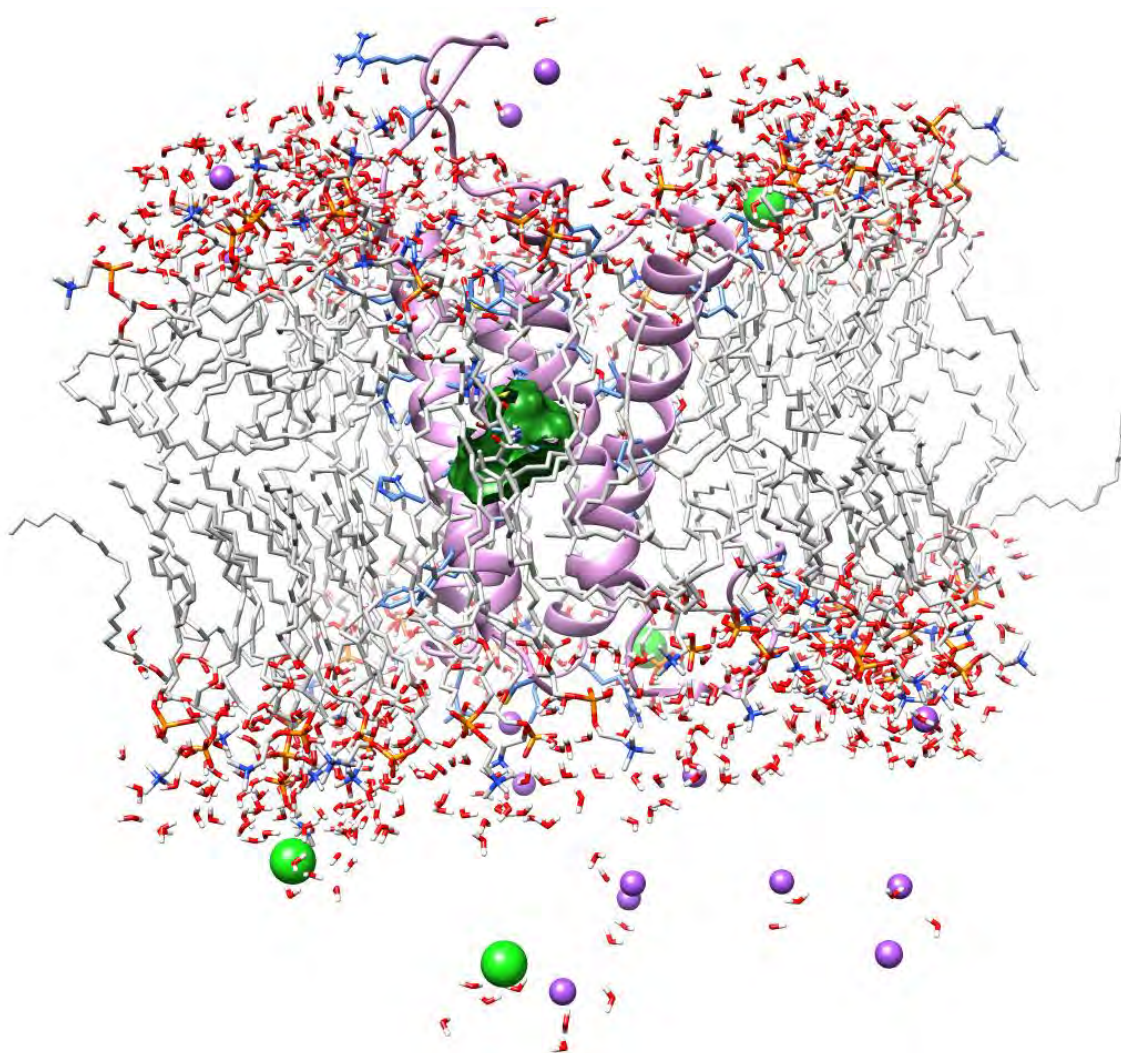
3.4.7. СТУДИЈЕ МОЛЕКУЛСКЕ ДИНАМИКЕ **2f** И **2a** У КОМПЛЕКСУ СА *r*VKORC1 КОЈЕ ОПИСУЈУ АНТАГОНИСТИЧКУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА

Финална потврда предложеног механизма антикоагулативне активности антагониста **2f** и **2a** добијена је након студија извршених молекулском динамиком. Молекулска динамика јесте молекулско-механичка метода сагледавања интеракција између антагониста и рецептора базирана на Њутновом закону кретања. Метода је по концепту идентична молекулском доковању, јер описује понашање антагониста на основу структуре активног центра рецептора, али надомешћује важан недостатак моделушког доковања, делимичну или апсолутну ригидност активног центра. Наиме, молекулском динамиком се постиже апсолутна флексибилност и рецептора и антагониста, те се њоме симулира индуковано прилагођавање. Експеримент молекулском динамиком обично траје 1,2 ns ($1,2 \cdot 10^{-9}$ sec) што је довољно да се изврши симулација једне антагонист-рецептор реакције.

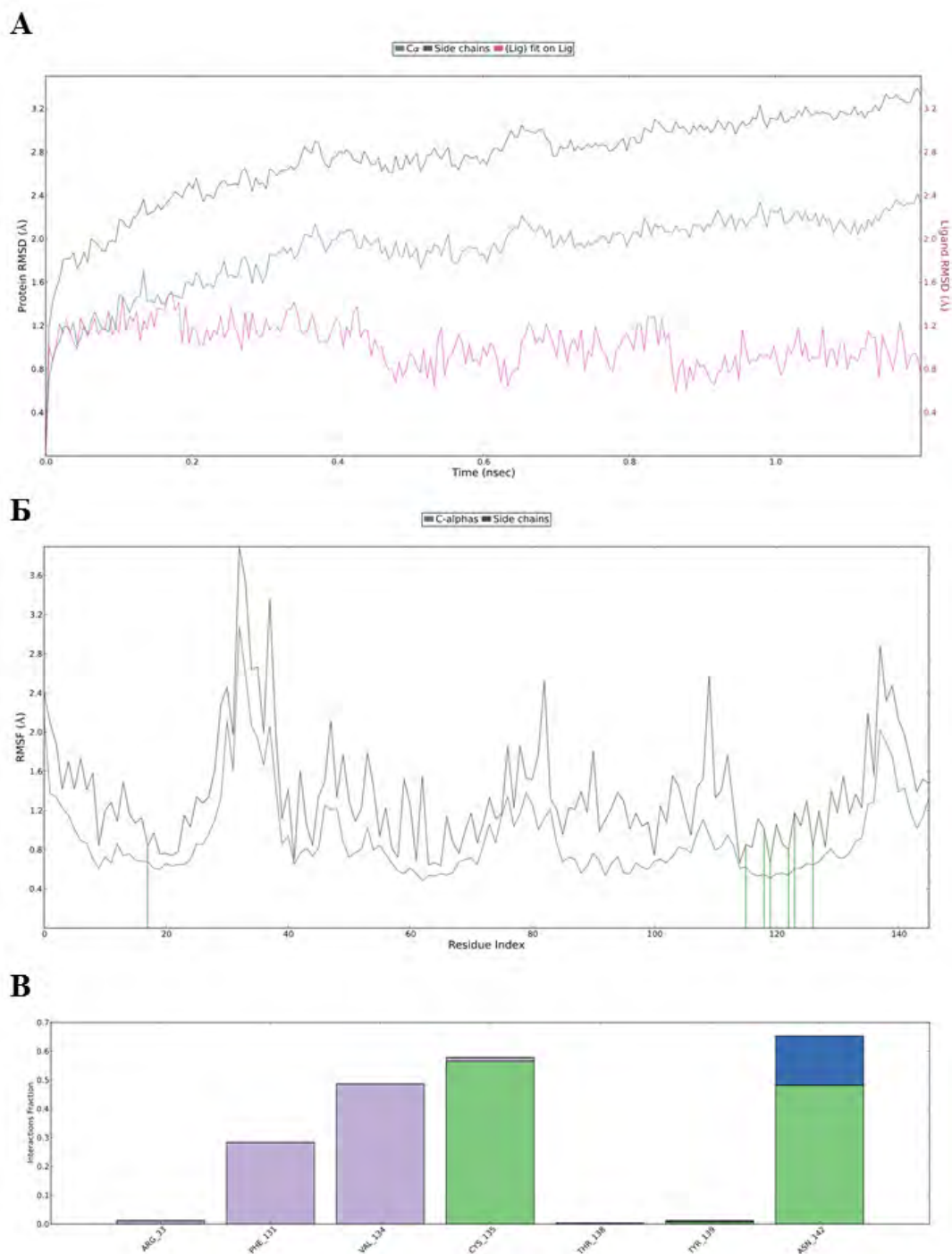
Обзиром да је *r*VKORC1 трансмембрански рецептор ендоплазматичног ретикулума јетре, комплекси **2f**-*r*VKORC1 и **2a**-*r*VKORC1, добијени молекулским доковањем, а на којима су извршене и 3-D QSAR и студије генерисања 3-D фармакофорног модела, позиционирани су у ћелијску мембрану, додати су молекули воде као медијума и извршена је неутрализација система јонима Na^+ или Cl^- (Слика 3.22).

Након генерисања **2f**-*r*VKORC1 комплекса, комплекс је постао стабилан након 230 ps ($230 \cdot 10^{-12}$ сек). Другим речима, антикоагулант **2f** остварио је стабилну интеракцију са активним центром *r*VKORC1 након свега 230 ps. Стабилност комплекса задржана је током целог периода симулације од 1,2 ns, при чему је разлика у положајима тешких атома у различитим конформацијама лиганда била свега 0,8 Å (Слика 3.23А). Ипак, на самом почетку анализе молекулском динамиком, након свега 20 ps, дошло је до драстичне конформационе промене **2f** унутар самог комплекса, не као последица интеракције антикоагуланта са *r*VKORC1, већ као последица интеракције са мембраном ендоплазматичног ретикулума јетре. Наиме, антикоагулант **2f** у интеракцији са мембраном достигао је линеарну структуру, готово паралелну са трансмембранским хеликсом *r*VKORC1. И поред промене конформације, први хроман-2,4-дионски прстен остварио је све интеракције са *r*Cys135, антиципиране помоћу генерисаних 3-D QSAR и 3-D фармакофорних студија. Обзиром на чињеницу да је дошло до конформационе промене, поставља се питање да ли су генерисане 3-D QSAR

и 3-D фармакофорне студије тачне? Становиште је да јесу, јер из експерименталних разлога, односно услед недостатка изолованог и пурификованог *rVKORC1*, није било могуће извршити ко-кристализацију било ког од тестираних деривата са испитиваном молекулском метом. Са тог аспекта, CoMFA и CoMSIA 3-D QSAR студије, као и 3-D фармакофорне студије, представљају идеалан алат за предвиђање интеракција антагониста, када природа правих интеракција са рецептором није позната. У случајевима када не постоји ко-кристализована структура рецептора у комплексу са антагонистом, потребно је користити што више метода које ће заједно дати увид у фармакологију антагониста.



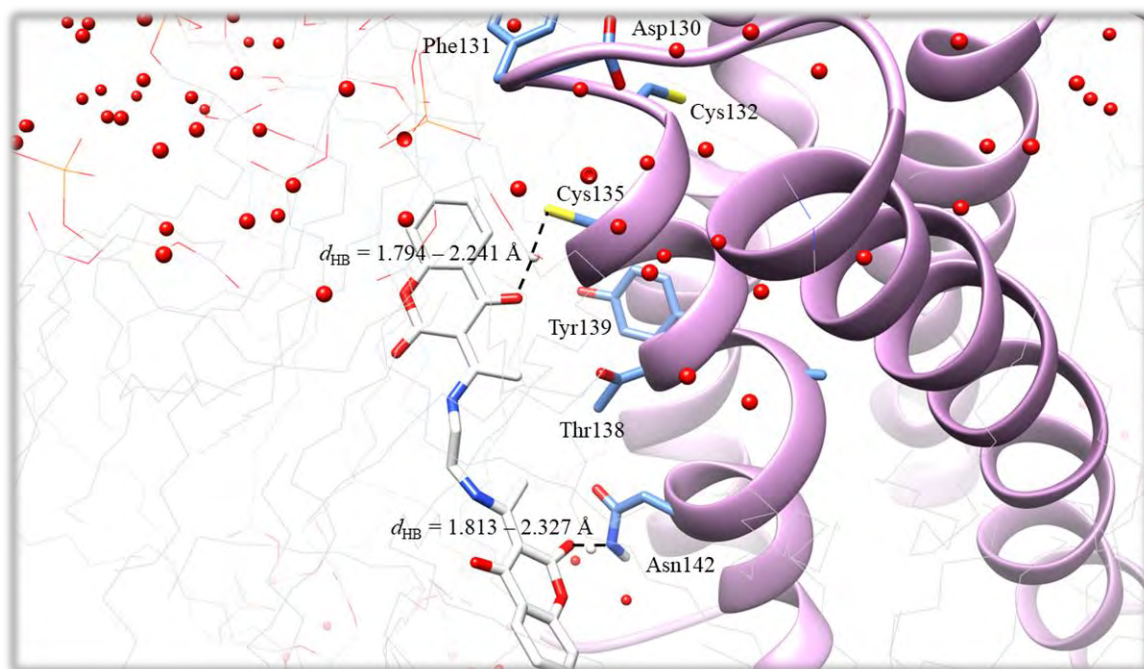
Слика 3.22. Комплекс **2f-rVKORC1** припремљен за молекулску динамику. Топологија *rVKORC1* представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2f** приказан је белом бојом окружен зеленом сфером, фосфолипидна мембрана приказана је сивом бојом, док је водена фаза приказана црвеном. Атоми натријума коришћени за неутрализацију система приказани су љубичастим сферама, атоми хлора коришћени за неутрализацију приказани су зеленим сферама.



Слика 3.23. (А) RMSD вредности *rVKORC1* у комплексу са **2f**. (Б) RMSF вредности *rVKORC1* у комплексу са **2f**. (В) Дијаграм интеракција **2f-rVKORC1** комплекса. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције а плаве траке водоничне мостове.

Као што је већ речено, постојање водоничне везе између првог хроман-2,4-дионског језгра антикоагуланта **2f** и аминокиселине *rCys135 rVKORC1*, за коју је студијама молекуског доковања (Слика 3.12А), CoMFA (Слика 3.17) и CoMSIA (Слика

3.18) 3-D QSAR студијама, као и 3-D фармакофорним студијама (Слика 3.20) претпостављено да је кључна у антикоагулативној активности најактивнијег деривата, доказано је након студија молекулске динамике (Слика 3.23Б и В). Тиме је и потврђен реверзибилни механизам антагонизма *rVKORC1* дериватом **2f** (Шема 3.2). Водонична веза између **2f** и *rCys135* *rVKORC1* успостављена је након 29 ps и била је стабилна током 68% времена симулације. Водонична веза је дакле била успостављена само 9 ps након конформационе промене антикоагуланта, што указује на то да је сама водонична веза јако фаворизирана од стране рецептора. Просечна дужина водоничне везе била је $d_{\text{HB}} = 1,794 - 2,241 \text{ \AA}$, чиме је она окарактерисана као јака водонична веза (Слика 3.24).

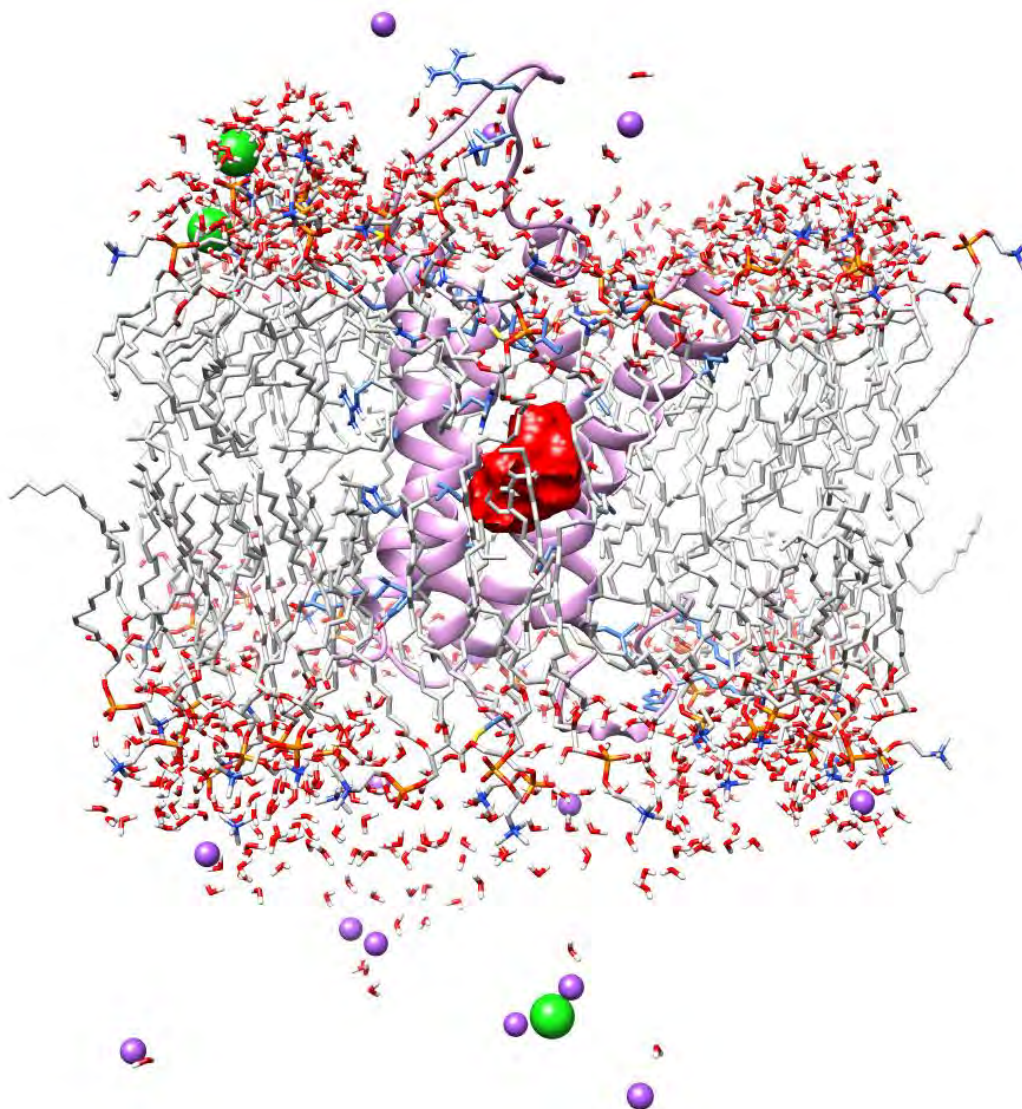


Слика 3.24. Приказ формирања водоничних веза између **2f** и *rVKORC1*. Топологија рецептора представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2f** приказан је белом бојом, фосфолипидна мембрана приказана је сивим линијама, док су атоми кисеоника из молекула воде приказани црвеном бојом. Ради једноставности приказа, представљени су само атоми водоника из водоничних веза између **2f** и *rCys135* и **2f** и *rAsn142*.

Интеракција која је предвиђена само молекулском динамиком, а која се испоставила као битна, била је водонична веза између амидног азота *rAsn142* и C2 карбонилног кисеоника другог језгра хроман-2,4-диона. Ова водонична веза успостављена је након свега 22 ps, још раније у односу на водоничну везу са *rCys135*, и остала је стабилна током 91% времена симулације. По типу је такође у питању јака водонична

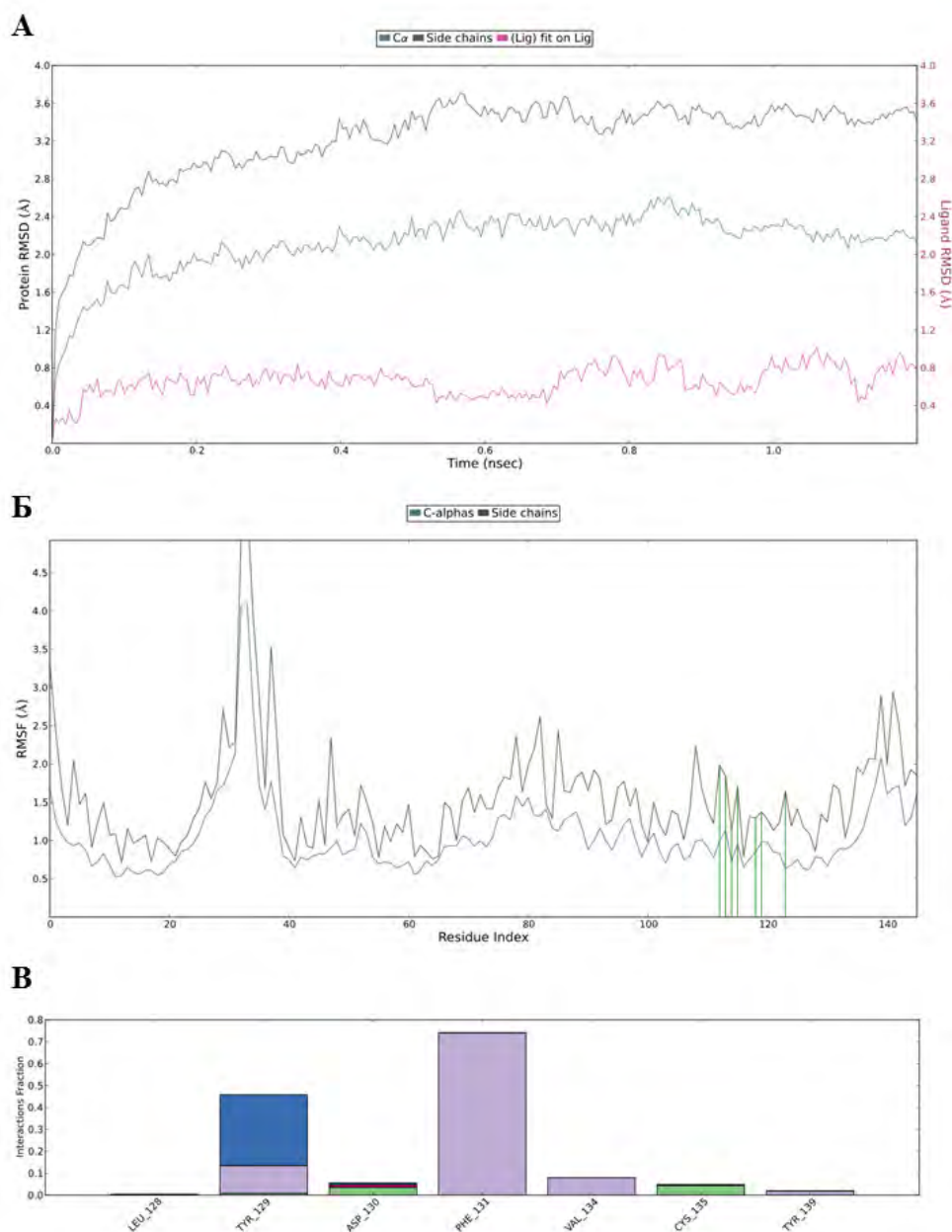
веза ($d_{\text{HВ}} = 1,813 - 2,327 \text{ \AA}$). Порекло ове водоничне везе може се једино објаснити индукованим прилагођавањем између антагониста и рецептора. Она свакако доприноси антикоагулативној активности деривата **2f** на нивоу стабилизације. Са детекцијом ове водоничне везе на индиректан је начин извршена валидација и саме хемијске синтезе овог деривата, јер је други хроман-2,4-дионски прстен пронашао своју фармакофорну функцију унутар активног центра рецептора.

Наравно, зарад припреме експеримента молекулске динамике, комплекс **2a**-*r*VKORC1 позициониран је у ћелијску мембрану, солватисан молекулима растварача и неутралисан јонима Na^+ или Cl^- (Слика 3.25).



Слика 3.25. Комплекс **2a**-*r*VKORC1 припремљен за молекулску динамику. Топологија *r*VKORC1 представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2a** приказан је белом бојом, црвеном сфером, фосфолипидна мембрана приказана је сивом бојом, док је водена фаза приказана црвеном бојом. Атоми натријума коришћени за неутрализацију система приказани су љубичастим сферама, атоми хлора зеленим сферама.

Након генерисања **2a**-*rVKORC1* комплекса, комплекс је постао стабилан након 170 ps ($170 \cdot 10^{-12}$ сек). Стабилност комплекса задржана је током целог периода симулације од 1,2 ns, при чему је разлика у положајима тешких атома у различитим конформацијама лиганда била свега 0,6 Å (Слика 3.26А).



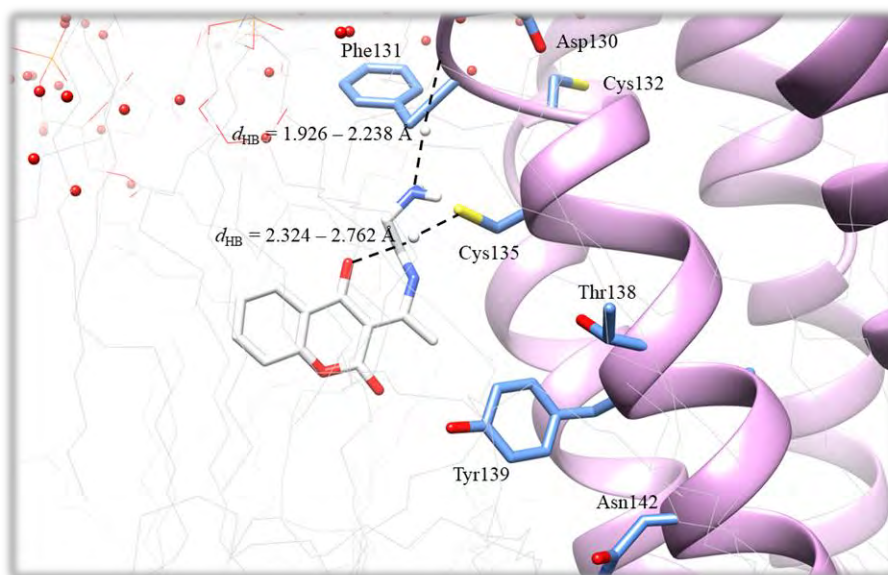
Слика 3.26. (А) RMSD вредности *rVKORC1* у комплексу са **2a**. (Б) RMSF вредности *rVKORC1* у комплексу са **2a**. (В) Дијаграм интеракција **2a**-*rVKORC1* комплекса. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.

По времену успостављања стабилности комплекса, као и по степену конформационих промена самог антагониста, може се рећи да је комплекс **2a**-

*r*VKORC1 нешто стабилнији од **2f**-*r*VKORC1 комплекса. Антагонист **2a** такође је на почетку анализе (након 17 ps) подлегао конформационој промени, не тако драстичној у односу на **2f**, овога пута као последица интеракције антикоагуланта са *r*VKORC1 и мембраном ендоплазматичног ретикулума јетре.

Аналогно са антикоагулантом **2f**, постојање водоничне везе хроман-2,4-дионског језгра антикоагуланта **2a** и аминокиселине *r*Cys135 *r*VKORC1, за коју је студијама молекуског доковања (Слика 3.12Б), CoMFA (Слика 3.17) и CoMSIA (Слика 3.18) 3-D QSAR студијама, као и 3-D фармакофорним студијама (Слика 3.20) претпостављено да је кључна у антикоагулативној активности овог деривата, доказано је и након студија молекуларске динамике (Слике 3.26Б и 3.26В). Тиме је и потврђен реверзibilни механизам антагонизма *r*VKORC1 дериватом **2a** (Шема 3.2).

Водонична веза између **2a** и *r*Cys135 *r*VKORC1 успостављена је након 28 ps и била је стабилна током 64% времена симулације. Водонична веза била је успостављена само 9 ps након конформационе промене антикоагуланта, што указује на то да је сама водонична веза јако фаворизована од стране рецептора. Просечна дужина водоничне везе била је $d_{\text{HБ}} = 2,324 - 2,762 \text{ \AA}$ чиме је она окарактерисана као умерено јака водонична веза (Слика 3.27).



Слика 3.27. Приказ формирања водоничних веза између **2a** и *r*VKORC1. Топологија рецептора представљена је љубичастом, аминокиселине су приказане плавом, антагонист **2a** приказан је белом бојом, фосфолипидна мембрана приказана је сивим линијама, док су атоми кисеоника из молекула воде приказани црвеном бојом. Ради једноставности приказа, представљени су само атоми водоника из водоничних веза између **2a** и *r*Cys135, и **2a** и карбонилног кисеоника пептидне везе између *r*Asp130 и *r*Phe131.

Разлика у дужини водоничних веза са *rCys135* унутар **2f**-*rVKORC1* и **2a**-*rVKORC1* комплекса могла би бити један од узрока повећане антикоагулативне активности деривата **2f** у односу на **2a** (Табеле 3.5 и 3.6). Интеракција која је предвиђена само молекулском динамиком, а која се испоставила као битна, била је водонична веза између карбонилног кисеоника пептидне везе између *rAsp130* и *rPhe131* и терминалног, позитивно наелектрисаног, азота етилендиамина **2a**. Ова водонична веза је успостављена након свега 10 ps, још раније у односу на водоничну везу са *rCys135*. У питању је јака водонична веза ($d_{\text{HВ}} = 1,926 - 2,238 \text{ \AA}$) која је стабилна током 94% времена симулације. Поменута водонична веза свакако доприноси антикоагулативној активности деривата **2a** на нивоу стабилизације са рецептором, те је детекцијом специфичне водоничне везе на индиректан начин извршена валидација и саме хемијске синтезе овог деривата, јер је и етилендиамински фрагмент пронашао своју фармакофору функцију унутар активног центра рецептора.

Студијама молекулске динамике недвосмислено је потврђен реверзибилни механизам антикоагулативне активности деривата **2f** и **2a**, чиме су најактивнији деривати на нивоу хематологије потпуно окарактерисани са биохемијског и фармаколошког аспекта.

3.5. ПРОЦЕНА УТИЦАЈА АДМИНИСТРАЦИЈЕ ДЕРИВАТА **2a-h** НА ГЕНОМ

3.5.1. ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ДНК У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ДЕРИВАТА **2a-h**

По испитивању и потврђивању антикоагулативне активности деривата **2a-h** интраперитонеалном администрацијом *in vivo*, процењен је и утицај деривата на геном јетре и бубрега (Табела 3.18).⁷⁵ Први параметар којим је процењено оштећење ДНК након администрације ксенобиотика био је просечни моменат репа, тј. проценат нарушавања ДНК на нивоу кватернерне структуре, односно хромозома, те терцијарне структуре, односно структуре суперувијања, изражен након формирања репа комете. Други параметар био је проценат денатурисане структуре суперувијања ДНК у репу комете.

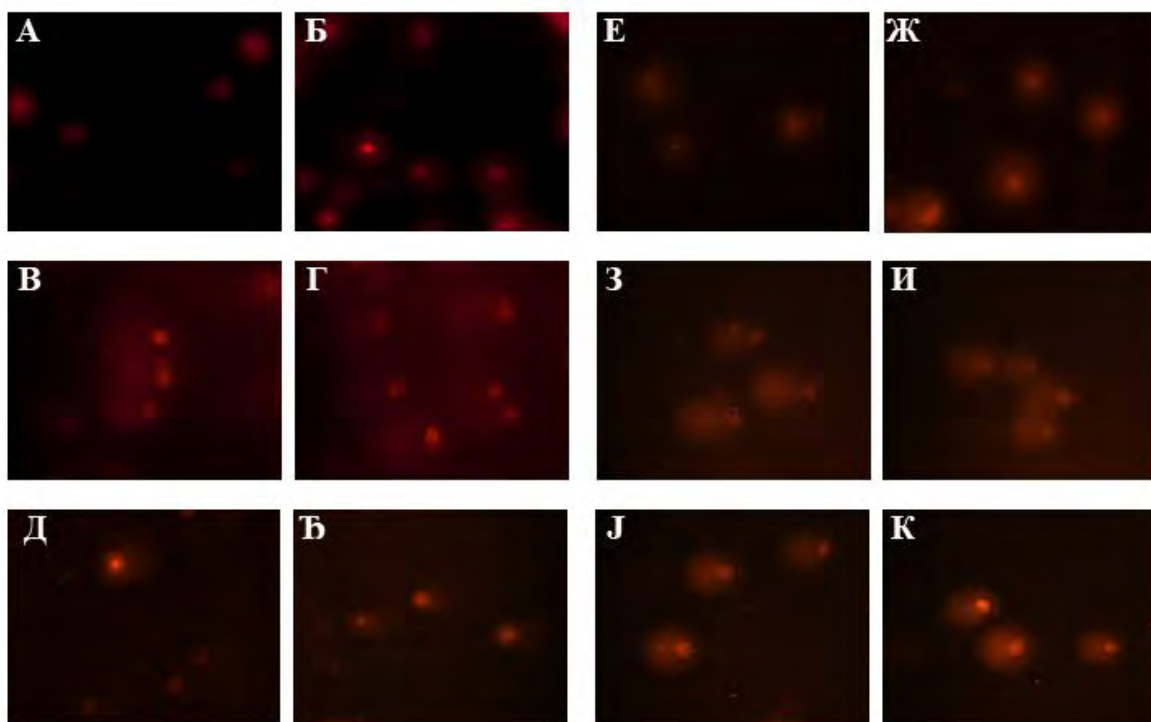
ТАБЕЛА 3.18. Параметри комет теста након седмодневне интраперитонеалне апликације деривата **2a-h** на одрасле пацове соја Wistar.

Јед.	МОМЕНАТ РЕПА		МОМЕНАТ РЕПА	
	ЈЕТРА	% ДНК У РЕПУ	БУБРЕЗИ	% ДНК У РЕПУ
С ^б	2,83±2,20 ^{†а}	7,41±1,01 [†]	2,04±0,32 [†]	6,81±0,64 [†]
ЕМС ^в	19,12±0,72 [*]	27,42±1,08 [*]	17,51±1,01 [*]	20,82±1,04 [*]
2a	3,10±1,41 [†]	8,62±0,62 [†]	2,93±0,51 [†]	7,51±0,63 [†]
2b	2,92±3,51 [†]	7,93±1,81 [†]	2,64±0,63 [†]	7,33±0,61 [†]
2c	7,73±0,65 ^{†*}	9,82±1,12 ^{†*}	6,32±1,04 ^{†*}	8,04±0,92 ^{†*}
2d	5,51±2,44 ^{†*}	9,52±1,04 ^{†*}	6,02±0,82 ^{†*}	7,92±0,84 ^{†*}
2e	17,02±0,53 ^{†*}	16,82±1,23 ^{†*}	14,52±0,92 ^{†*}	15,45±0,34 ^{†*}
2f	2,42±0,79 [†]	6,81±0,50 [†]	2,11±0,54 [†]	6,52±0,26 [†]
2g	13,03±2,02 ^{†*}	10,34±1,07 ^{†*}	13,83±0,35 ^{†*}	8,51±0,24 ^{†*}
2h	15,06±1,16 ^{†*}	11,02±2,47 ^{†*}	13,41±0,71 ^{†*}	11,02±0,74 ^{†*}

^аСредње вредности три независна експеримента, n = 5 пацова у групи. ^бС - Негативна контрола. ^вЕМС - етил метансулфонат. ^{*}p < 0,05 поређено са негативном контролом. [†]p < 0,05 поређено са ЕМС-ом.

Оштећена ДНК која су изазвала једињења **2a**, **2b**, **2c** и **2d** а која су квантификована у облику комета, приказана су на Слици 3.28. Денатурација кватернерне и терцијарне структуре ДНК, изазвана од стране деривата **2e**, **2f**, **2g** и **2h**, потврђена настанком комета, приказана је на Слици 3.29. Оштећења су процењена на нивоу јетре, јер се у ендоплазматичном ретикулуму хепатоцита и одвија антикоагу-

лативна активност тестираних деривата, односно бубрега, јер се екскреција деривата извршава урином.

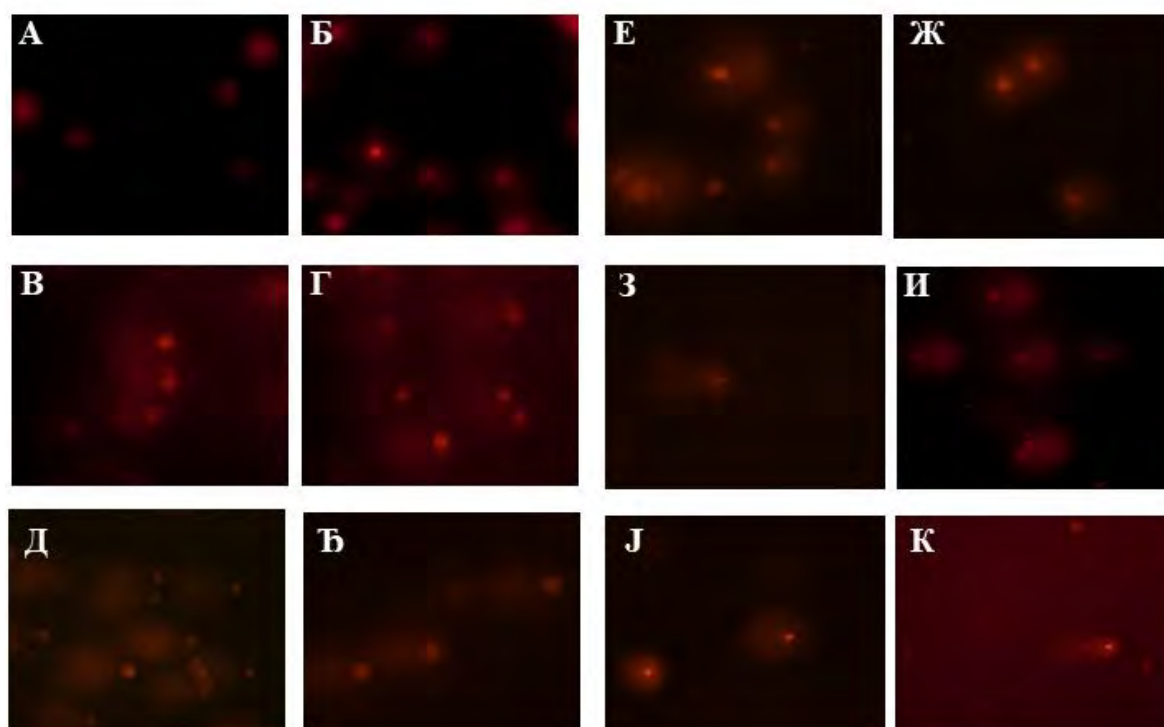


Слика 3.28. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри и бубрезима након бојења са етидијум бромидом. Нетретиране животиње (А-јетра и В-бубрези), животиње третиране ЕМС-ом (В-јетра и Г-бубрези), **2a**-третиране животиње (Д-јетра и Ђ-бубрези), **2b**-третиране животиње (Е-јетра и Ж-бубрези), **2c**-третиране животиње (З-јетра и И-бубрези) и **2d**-третиране животиње (Ј-јетра и К-бубрези).

У поређењу са негативном контролом (Табела 3.18, Сlike 3.28А и Б, и 3.29А и Б), вредности параметара генотоксичности добијене након администрације деривата **2a-h** биле су ниже у односу на вредности за ЕМС ($p < 0,05$). ЕМС је, као доказани мутаген и позитивна контрола, изазвао и најзначајније оштећење ДНК (Табела 3.18, Сlike 3.28 В и Г, и 3.29В и Г). Од испитиваних једињења, иницијатори значајног оштећења ДНК била су једињења **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h**, чиме је доказан њихов генотоксични ефекат.

Са друге стране, једињења **2a**, **2b** и **2f** нису изазвала раскидање α -хеликса ДНК унутар структуре суперувијања јер су добијене вредности испитиваних параметара биле сличне вредностима за негативну контролу (Табела 3.18). Стога су једињења **2a**, **2b** и **2f** даље испитивана као потенцијални антигенотоксични агенси, односно даље је

испитивана њихова способност да умање генотоксични ефекат ЕМС-а. Приказани резултати су екстерна потврда да се једињења **2a** и **2f** као антикоагуланти у наведеној концентрацији могу аплицирати без бојазни да ће доћи до структурних промена на нивоу генома. Овај резултат веома је важан, јер се приликом дефинисања неког једињења са изразитом активношћу често занемари његов утицај на геном. Ипак, обзиром на чињеницу да се антикоагуланти *in vivo* не аплицирају интраперитонеално, већ орално, било је неопходно извршити и процену оштећења ДНК након апликације *per os*.



Слика 3.29. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри и бубрезима након бојења са етидијум бромидом. Нетретиране животиње (**А**-јетра и **Б**-бубрези), животиње третиране ЕМС-ом (**В**-јетра и **Г**-бубрези), **2e**-третиране животиње (**Д**-јетра и **Ђ**-бубрези), **2f**-третиране животиње (**Е**-јетра и **Ж**-бубрези), **2g**-третиране животиње (**З**-јетра и **И**-бубрези) и **2h**-третиране животиње (**Ј**-јетра и **К**-бубрези).

3.5.2. АНТИГЕНОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА **2a**, **2b** и **2f** У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН ИНТРАПЕРИТОНЕАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА

Дистрибуција различитих класа комета, укупни скор комета и проценат редукованог оштећења у јетри и бубрезима пацова измерени након интраперитонеалне

администрације једињења **2a**, **2b** и **2f** пре ЕМС-а, представљени су у Табели 3.19. Према укупном скору комета, значајне разлике у индукцији оштећења ДНК забележене су између групе третиране ЕМС-ом (Слика 3.30В) и контролне групе (Слика 3.30А). Са друге стране, након претретмана дериватима **2a** (Слика 3.30Д), **2b** (Слика 3.30Е) и **2f** (Слика 3.30З), дистрибуција класа комета указала је на минимално оштећење ћелије (класе 1 и 2) и мање изражено оштећење у виду класе 3. Статистички значајна редукција оштећења ДНК је забележена након апликације **2b** (86,93%), **2f** (77,23%) и **2a** (64,52%).

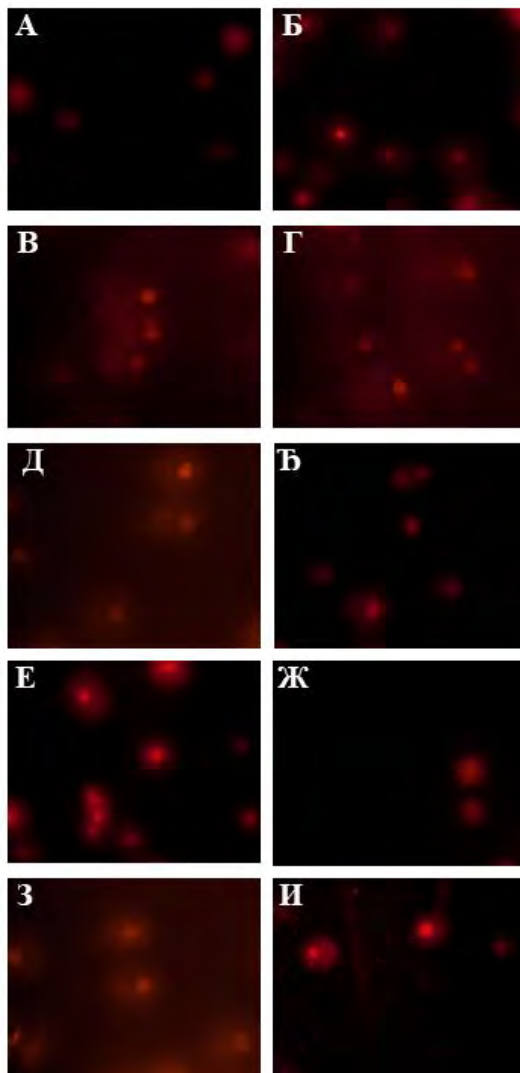
ТАБЕЛА 3.19. Детекција ДНК оштећења помоћу комет теста у јетри и бубрезима пацова након интраперитонеалног претретмана дериватима **2a**, **2b** и **2f**.

ОРГАН ТРЕТМАН	КЛАСЕ КОМЕТА					УС ^а	% P ^б
	0	1	2	3	4		
ЈЕТРА							
С ^в	71,82±0,33 ^а	27,73±0,71	0,22±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	28,12±0,46 [†]	-
ЕМС ^г	0,00±0,00	59,23±1,02	24,23±0,32	9,72±0,22	6,92±0,73	164,32±0,73 [*]	-
2a +ЕМС ^д	52,13±0,42	24,22±0,65	18,83±0,36	4,93±0,48	0,00±0,00	76,52±0,52 [†]	64,52
2b +ЕМС ^ђ	65,63±1,63	24,53±1,08	8,24±0,93	1,63±0,11	0,00±0,00	45,92±0,72 [†]	86,93
2f +ЕМС ^е	57,14±0,52	28,81±0,93	11,91±0,77	2,21±0,33	0,00±0,00	59,24±0,63 [†]	77,23
БУБРЕЗИ							
С ^в	79,81±1,33 ^а	19,72±0,73	0,52±1,01	0,00±0,00	0,00±0,00	20,73±1,02	-
ЕМС ^г	0,00±0,00	67,72±0,24	20,73±0,18	7,22±0,02	4,43±0,31	148,32±1,52 [*]	-
2a +ЕМС ^д	62,52±2,12	17,53±0,91	14,94±1,35	4,72±0,73	0,00±0,00	61,43±2,55 [†]	68,14
2b +ЕМС ^ђ	76,04±0,75	14,92±0,86	8,12±0,93	1,02±0,24	0,00±0,00	34,19±1,02 [†]	89,52
2f +ЕМС ^е	71,52±0,56	18,74±0,62	8,81±0,31	1,01±0,24	0,92±0,16	47,03±1,21 [†]	82,50

^аСредње вредности три независна експеримента, n = 5 пацова у групи. ^бПроцент редукције ^вС – Негативна контрола. ^гЕМС – етил метансулфонат, 300 mg/kg телесне тежине; ^д**2a** (2 mg/kg телесне тежине) + ЕМС (300 mg/kg телесне тежине); ^ђ**2b** (2 mg/kg телесне тежине) + ЕМС (300 mg/kg телесне тежине); ^е**2f** (2 mg/kg телесне тежине) + ЕМС (300 mg/kg телесне тежине); * p < 0,05 поређено са негативном контролом; †p < 0,05 поређено са групом третираном ЕМС-ом.

Оштећења ДНК у бубрезима приказана су у Табели 3.19. Забележен је значајни пораст (p < 0,05) ДНК оштећења изазваних ЕМС-ом у поређењу са негативном контролом, јер је овај алкилујући агенс утицао на појаву 3. и 4. класе комета (Слика 3.30Г). Претретман једињењима **2a**, **2b** и **2f** значајно је редуковао одговарајуће скорове комета (p < 0,05). Класа комета 0 је била најзаступљенија претретманом дериватом **2b** (Слика 3.30Ж), а класа 1 забележена је у узорцима третираним са **2f** (Слика 3.30И). Након претретмана дериватом **2a** (Слика 3.30Ђ) забележено је оштећење ДНК у виду класа 1, 2 и 3. Тако може се рећи да је редукција ДНК оштећења најизраженија у

групама третираним дериватима **2b** (89,52%) и **2f** (82,50%), а мање изражена у групи третираној дериватом **2a** (68,14%).



Слика 3.30. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри и бубрезима након бојења са етидијум бромидом. Нетретиране животиње (**А**-јетра и **Б**-бубрези), животиње третиране ЕМС-ом (**В**-јетра и **Г**-бубрези), животиње третиране дериватом **2a** и ЕМС-ом (**Д**-јетра и **Ђ**-бубрези), животиње третиране дериватом **2b** и ЕМС-ом (**Е**-јетра и **Ж**-бубрези) и животиње третиране дериватом **2f** и ЕМС-ом (**З**-јетра и **И**-бубрези).

3.5.3. ПРОЦЕНА НИВОА ОШТЕЋЕЊА ДНК У ЈЕТРИ, БУБРЕЗИМА И КОСНОЈ СРЖИ НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА **2a** и **2f**

Након дефинисања генотоксичности деривата по интраперитонеалној апликацији, генотоксични утицај орално аплицираних деривата **2a** и **2f** испитан је такође помоћу комет теста и то на узорцима ткива јетре, бубрега и косне сржи.

Резултати комет теста приказани су у Табели 3.20, у виду дистрибуције различитих класа комета, укупног скорa, и учесталости ћелија са кометом у различитим органима.

ТАБЕЛА 3.20. Дистрибуција класа комета, укупног скорa, и учесталости ћелија са кометом у јетри, бубрезима и косној сржи након седмодневног континуираног оралног третмана пацова соја Wistar дериватима **2a** и **2f** у концентрацији од 20 mg/kg телесне тежине.

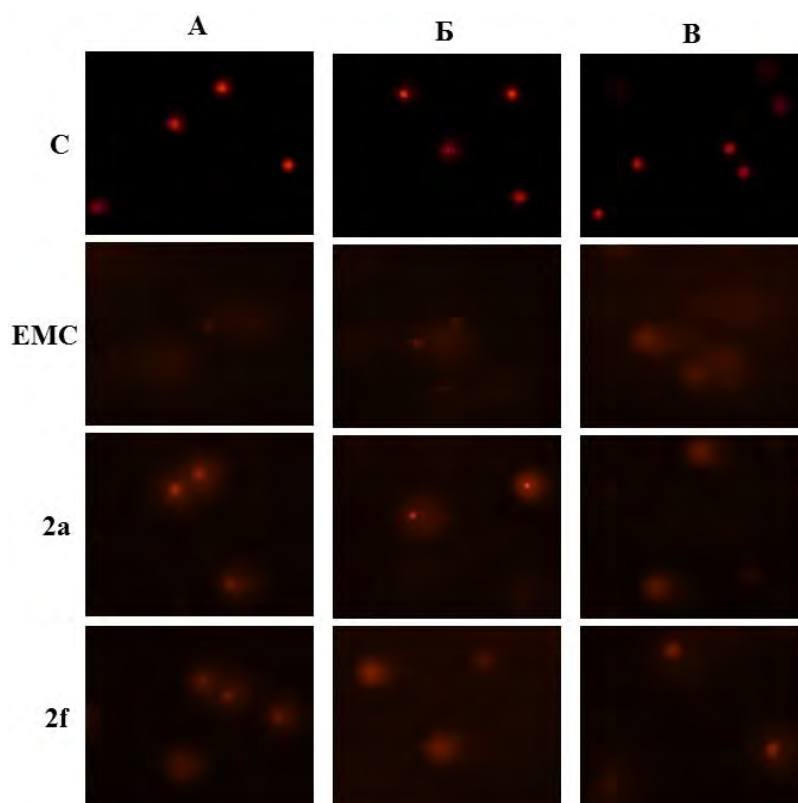
ОРГАН ТРЕТМАН	КЛАСЕ КОМЕТА					УС ^б	ЋК ^б
	0	1	2	3	4		
^в Ј							
2a	73,1±0,23 ^а	20,5±0,30	3,7±0,40	1,1±0,23	1,6±1,01	37,6±1,30 ^{†*}	26,90 ^{†*}
2f	74,2±0,30	21,6±1,40	2,8±0,72	1,4±0,00	0,0±0,00	31,4±1,80 ^{†*}	25,80 ^{†*}
ЕМС	54,0±0,60	35,3±1,02	5,2±1,10	2,1±0,72	3,4±1,20	65,6±0,80 [*]	46,00 [*]
С	87,8±0,20	12,2±0,80	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	12,2±0,80	12,20
^г Б							
2a	81,25±0,51	18,7±0,12	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	18,7±0,12 ^{†*}	18,75 ^{†*}
2f	91,7±0,30	8,3±0,20	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	8,3±0,20 [†]	8,30 [†]
ЕМС	59,2±0,23	37,1±0,30	2,3±1,20	1,4±0,71	0,0±0,00	45,9±1,01 [*]	40,80 [*]
С	93,9±0,50	6,1±0,70	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	6,1±0,70	6,10
^д КС							
2a	88,9±1,20	11,1±0,12	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	11,1±0,12 [†]	11,10 [†]
2f	90,1±0,34	9,9±0,70	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	9,9±0,71 [†]	9,90 [†]
ЕМС	63,7±0,70	33,1±0,20	3,2±1,03	0,0±0,00	0,0±0,00	39,5±1,90 [*]	36,30 [*]
С	93,3±0,20	6,7±0,42	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	6,7±0,40	6,70

^аСредње вредности три независна експеримента, n = 5 пацова у групи; ^бУкупни скор; ^вЋелије са кометом; ^гЈетра; ^дБубрези; ^дКосна срж; * p < 0,05 поређено са негативном контролом; [†]p < 0,05 поређено са ЕМС-ом.

Комете које карактеришу генотоксични потенцијал једињења **2a** и **2f** приказане су на Слици 3.31. Приликом анализе узорака ткива јетре, бубрега и косне сржи, оштећење забележено код негативне контроле класификовано је у категорије 0 и 1, без промена које припадају другој, трећој и четвртој категорији (Слика 3.31 А, Б и В). Код позитивне контроле, оштећење ДНК је обухватило све категорије, док су посебно забележене промене које припадају 2, 3 и 4 категорији (Слика 3.31 А, Б и В). Поред тога, вредност укупног скорa (УС) значајно је порасла у односу на негативну контролу (p < 0,05) у свим ткивима. Највиша вредност израчуната је за узорке јетре (УС = 65,6), затим бубрега (УС = 45,9) и косне сржи (УС = 39,5), што указује да су најозбиљнија оштећења ДНК забележена на ћелијама јетре.

Дериват **2f** није индуковао значајнија оштећења код узорака бубрега и косне сржи (Слика 3.31 Б и В). Ако се посматрају само вредности укупног скорa, дериват **2a**

није индуковао значајније промене на ћелијама косне сржи (Слика 3.31 В). Међутим, код узорака јетре животиња третираних дериватима **2a** и **2f**, забележен је пораст укупног скорa (УС = 37,6 за **2a** и УС = 31,4 за **2f**). Ове вредности незнатно су више у односу на негативну контролу и оштећење је мање изражено у односу на узорке који су третирани ЕМС-ом. Упркос порасту оштећења у узорцима јетре, резултати указују да испитивани деривати не испољавају генотоксичност, па су подвргнути анализама њиховог антигенотоксичног потенцијала.



Слика 3.31. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри (А), бубрезима (Б) и косној сржи (В) након бојења са етидијум бромидом.

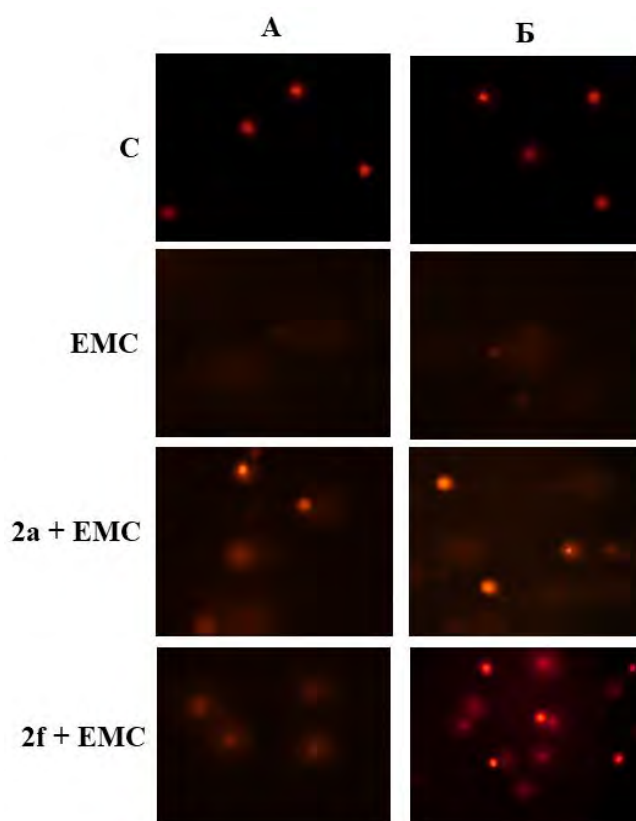
3.5.4. АНТИГЕНОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА **2a** И **2f** У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА НАКОН ОРАЛНЕ АПЛИКАЦИЈЕ ЈЕДИЊЕЊА

Након оралног третмана животиња дериватима **2a** и **2f** пре ЕМС-а, анализирана је дистрибуција различитих класа комета, укупни скор комета и проценат редукованог оштећења у јетри и бубрезима пацова (Табела 3.21, Слика 3.32). Према добијеним вредностима, најзначајније разлике се уочавају између група третираних ЕМС-ом и контролне групе.

ТАБЕЛА 3.21. Детекција ДНК оштећења помоћу комет теста у јетри и бубрезима пацова након оралног претретмана дериватима **2a** и **2f**.

ОРГАН ТРЕТМАН	КЛАСЕ КОМЕТА					УС ^б	% Р ^б
	0	1	2	3	4		
ЈЕТРА							
С ^г	65,44±0,15 ^а	24,11±0,26	0,25±0,16	0,00±0,00	0,00±0,00	30,55±0,17 [†]	-
ЕМС ^д	0,00±0,00	65,29±0,99	20,55±0,85	11,47±0,35	9,69±1,05	160,43±1,55 [*]	-
2a +ЕМС ^б	50,99±0,31	28,47±0,14	21,25±0,17	5,48±0,96	0,00±0,00	74,06±0,66 [†]	65,25
2f +ЕМС ^в	59,04±0,36	31,36±0,78	13,23±0,65	3,99±0,42	0,00±0,00	57,65±0,23 [†]	76,32
БУБРЕЗИ							
С ^г	77,58±0,93 ^а	22,54±0,58	0,44±0,63	0,00±0,00	0,00±0,00	25,79±0,97	-
ЕМС ^д	0,00±0,00	72,13±0,44	25,14±0,33	6,14±0,28	5,18±0,25	144,42±1,32 [*]	-
2a +ЕМС ^б	61,79±0,48	11,96±0,52	13,47±1,15	5,78±0,25	0,00±0,00	62,96±1,52 [†]	70,26
2f +ЕМС ^в	68,63±0,69	20,14±0,98	10,32±0,22	1,47±0,08	0,15±0,01	49,54±0,89 [†]	81,65

^аСредње вредности три независна експеримента, n = 5 пацова у групи. ^бУкупан скор; ^вПроцент редукције; ^гС-Негативна контрола. ^дЕМС – етил метансулфонат, 300 mg/kg телесне тежине; ^б**2a** (20 mg/kg телесне тежине) + ЕМС (300 mg/kg телесне тежине); ^в**2f** (20 mg/kg телесне тежине) + ЕМС (300 mg/kg телесне тежине); ^{*}p < 0,05 поређено са негативном контролом; [†]p < 0,05 поређено са групом третираном ЕМС-ом.



Слика 3.32. Дистрибуција "комета" у различите класе на основу степена оштећења у јетри (А) и бубрезима (Б) након бојења са етидијум бромидом.

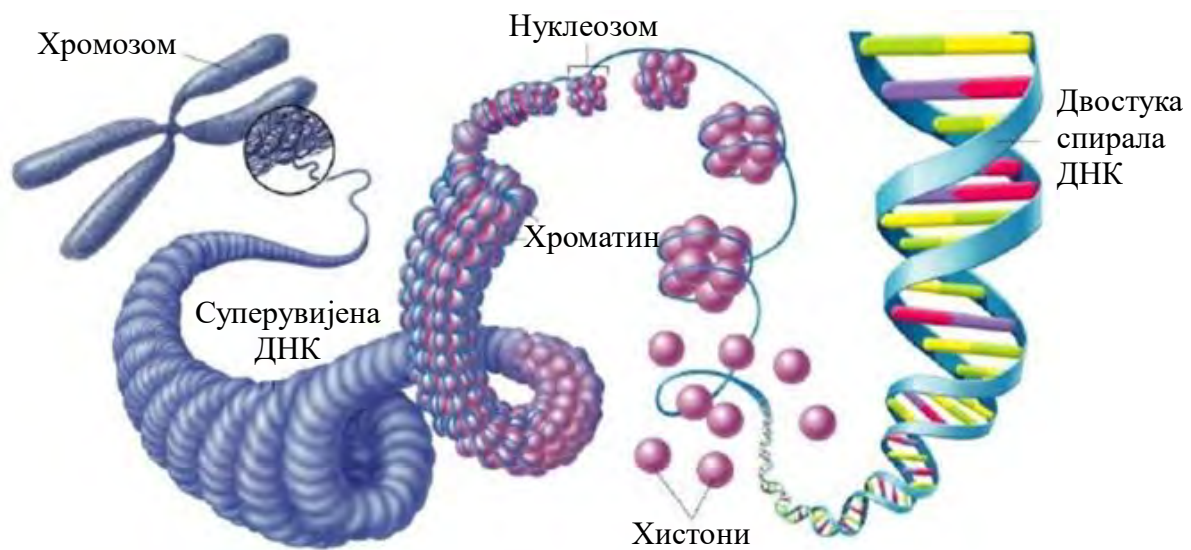
Код група животиња третираних дериватима **2a** и **2f**, па ЕМС-ом, уочава се појава 1. и 2. класе комета и минимална учесталост класе 3, док код групе третиране ЕМС-ом, прва класа није заступљена, а све остале јесу. У присуству деривата **2a** и **2f** забележена је значајна редукција оштећења ДНК (65,25% за **2a** и 76,32% за **2f**).

Оштећења ДНК у бубрезима приказана су у Табели 3.21 и на Слици 3.32. Забележен је сличан тренд као и у узорцима јетре пацова орално третираних дериватима **2a** и **2f** у концентрацији 20 mg/kg телесне тежине. Претретман једињењима **2a** и **2f** значајно је редуковао оштећења ДНК, и то 70,26% у присуству деривата **2a**, и 81,65% деривата **2f**.

3.5.5. ФИЗИОЛОШКИ И ФАРМАКОЛОШКИ АСПЕКТИ ГЕНОТОКСИЧНЕ И АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a-h У ЈЕТРИ И БУБРЕЗИМА

Обзиром на чињеницу да су комет тестом деривати **2a**, **2b** и **2f** дефинисани као антигенотоксични агенси, одговор на питање на који начин деривати редукују настанак комете изазван ЕМС-ом тражен је у интеракцији хроман-2,4-диона и алкилирајућег агенса са топоизомеразом II α (енг. Topoisomerase II α , TopII α), ензимом који катализује раскидање двоструке спирале ДНК приликом релаксације структуре суперувијања ДНК.

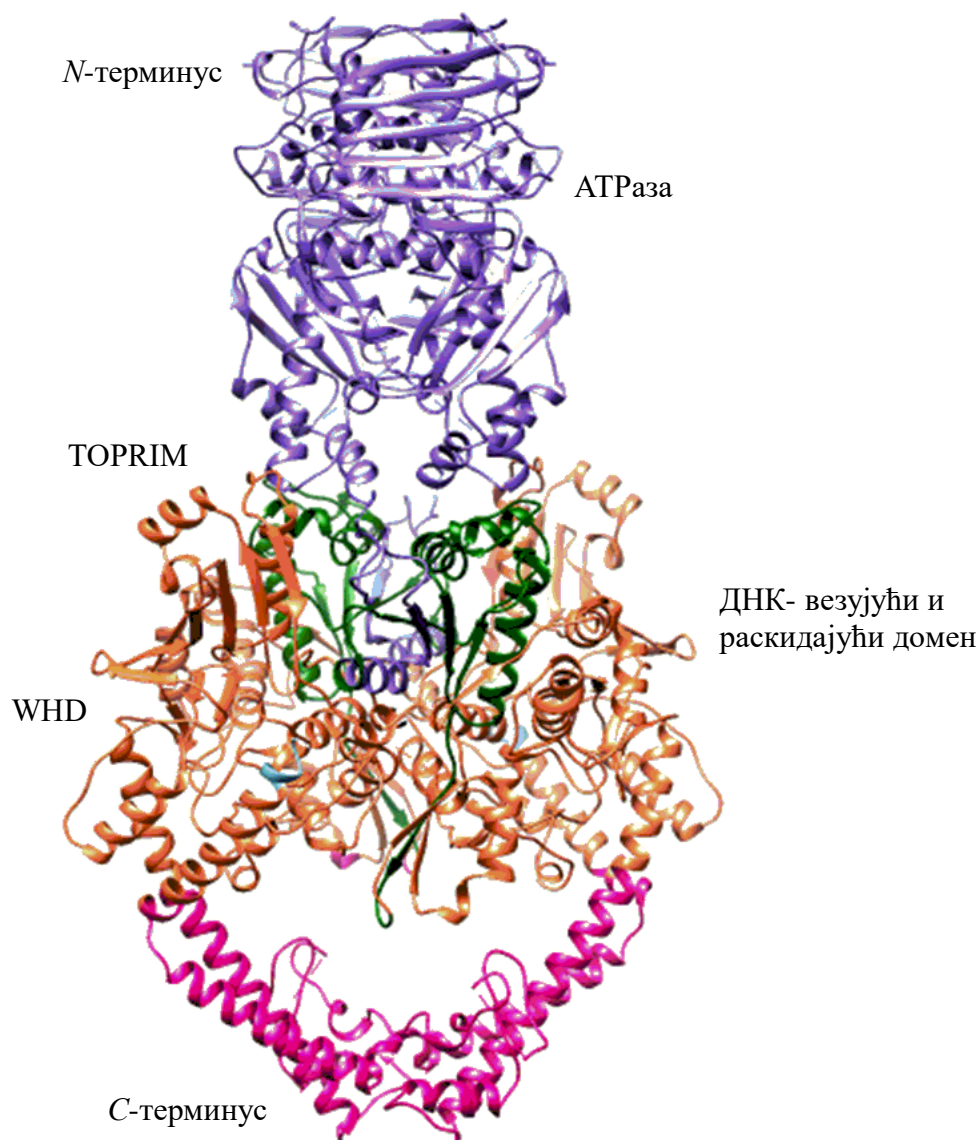
Формирање комета последица је привременог раскидања једног или два ланца ДНК које се одвија током релаксације нативне или оштећене суперувијене ДНК.¹³¹ Релаксација суперувијене ДНК непрестано се одвија током живота ћелије. На Слици 3.33. приказана је организација макромолекула ДНК почевши од секундарне структуре, односно двоструке спирале настале повезивањем пуринских и пиримидинских база, које улазе у састав нуклеотида, водоничним везама, преко терцијарне структуре, тј. нуклеозома као формација насталих обмотавањем ланца ДНК око хистона (протеина), хроматина (виши ниво организације нуклеозома), суперувијене ДНК, и на крају кватернерне структуре, хромозома, који улазе у једро ћелије.



Слика 3.33. Организација ДНК унутар једра ћелије.

Ензими који су укључени у процесе раскидања и поновног спајања ланца ДНК, односно у регулисање топологије ДНК током процеса транскрипције, репликације, рекомбинације, катенације и декатенације су топоизомеразе. У зависности од тога да ли се врши раскидање једног или два ланца ДНК, ови ензими се могу поделити на топоизомеразе I и II, где су топоизомеразе I укључене у процес хидролизе фосфодиестарских веза једног ланца ДНК, а топоизомеразе II регулишу процес хидролизе фосфодиестарских веза обају ланца ДНК.¹⁸⁰ Топоизомеразе II неопходне су за одвијање нормалних физиолошких процеса ћелија еукариота и квасаца, док тип I није неопходан за физиологију ових организама.¹⁸¹ Тип II топоизомераза даље се може поделити на II α и II β , које се разликују по структури и активности. Топоизомераза II α је хомодимер који катализује денатурацију двоструке спирале ДНК, где се енергија за одвијање овог процеса добија хидролизом АТР-а.¹⁸² Генерално, топоизомераза II α има главну улогу код раздвајања хромозома и репликације, док је топоизомераза II β хетеродимер и укључена је у регулацију процеса транскрипције.¹⁴⁰ Стога се и сам механизам настанка комета може објаснити познавањем структуре топоизомеразе II α (Слика 3.34) и интеракцијама које се остварују између ензима, ДНК и агенса чија се генотоксична активност испитује.

Топоизомераза II α састоји се од три независна, али за активност неопходна, субрегиона који се називају *N*-терминус, ДНК-везујући и раскидајући домен, и *C*-терминус.¹⁴⁰ Овако организована топоизомераза II α представља димер (Слика 3.34).

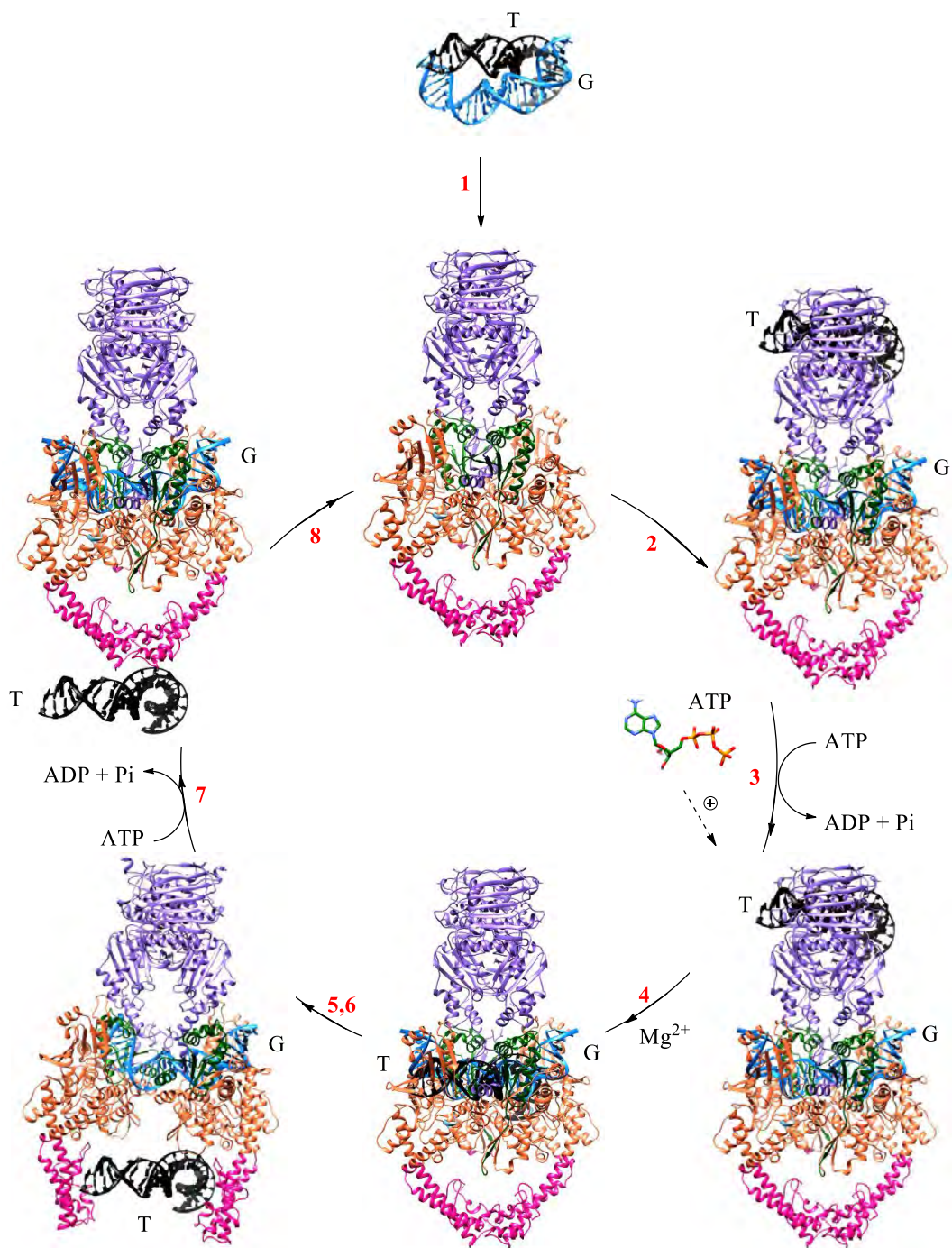


Слика 3.34. Кристална структура топоизомеразе II α .

У структури сваког од *N*-терминуса налази се по један регион АТРаза у коме се врши везивање АТР-а и његова хидролиза. Хидролизом молекула АТР-а добија се метаболичка енергија којом се омогућавају физиолошки процеси попут раскидања двоструког ланца ДНК и његовог поновног спајања. Интеракција АТРаза са АТР-ом индукује димеризацију мономера топоизомеразе II α или њихово раздвајање. На тај начин *N*-терминус добија улогу *N*-капије кроз коју пролази структура суперувивања ДНК.¹⁴¹ Регион где се врши везивање и раскидање суперувиване ДНК састоји се од TOPRIM (енг. TOPOisomerase/PRIMase) региона, који садржи један или два јона Mg²⁺ који су укључени у механизам хидролизе фосфодиестарских веза двоструке спирале ДНК ланца, односно WHD (енг. winged-helix domain) области, која у себи садржи

тирозин из активног центра, аминокиселину која врши хидролизу двоструке спирале. Оба ова региона укључена су у формирање ДНК-капије. На крају, *C*-терминус представља *C*-капију.¹⁴⁰

ДНК топоизомеразе контролишу топологију ДНК, на нивоу суперувојнице, што се остварује механизмом предоченим на Слици 3.35.¹⁸³

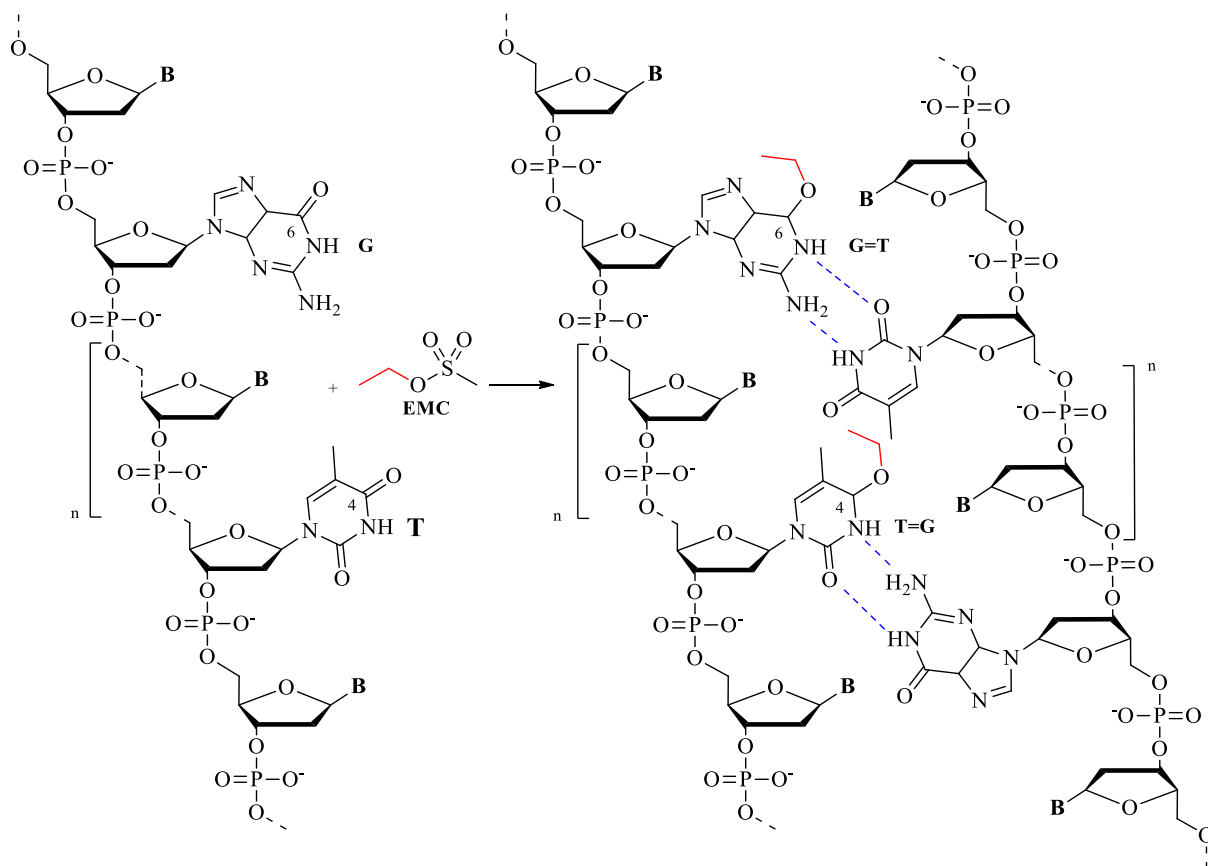


Слика 3.35. Кораци у хидролизи фосфодиестарских веза *G*-сегмента ДНК и пролазак *T*-сегмента кроз топоизомеразу IIα.

На почетку самог процеса (Слика 3.35, корак 1) структура суперувијања ДНК прилази *N*-капији која се отвара и прихвата је. Део ланца суперувојнице ДНК, означен као G-сегмент (енг. Gate segment), везује се за топоизомеразу $\Pi\alpha$ у ДНК везујућем и раскидајућем региону (Слика 3.35, корак 2), остваривањем интеракције између тирозина и фосфатног остатка ДНК, док други део суперувојнице, Т-сегмент (енг. Transport segment) тренутно остаје унутар *N*-капије. Хидролизом једног молекула АТР добија се метаболичка енергија за раскидање фосфодиестарских веза унутар G-сегмента (Слика 3.35, корак 3) након чега Т-сегмент пролази кроз *N*-капију и долази до TOPRIM и WHD домена (Слика 3.35, корак 4). По хидролизи G-сегмента (Слика 3.35, корак 5) долази до проласка Т-сегмента кроз G-сегмент (Слика 3.35, корак 6) и *S*-капије. Након проласка Т-сегмента, долази до хидролизе још једног молекула АТР-а (Слика 3.35, корак 7) који рестаурира топоизомеразу $\Pi\alpha$ и даје енергију за поновно успостављање фосфодиестарских веза унутар G-сегмента, односно религацију (Слика 3.35, корак 8). Након религације, G-сегмент напушта топоизомеразу $\Pi\alpha$.

Претходно описани процес детектује се и комет тестом, јер комете ДНК нису ништа друго до хидролизоване G-сегменти ДНК. ЕМС као алкилујући агенс управо и врши алкиловање гуанина и тимина унутар G-сегмента, при чему настају аберације, односно лезије, типа O^6 -етилгуанина и O^4 -етилтимина (Шема 3.5). Ове лезије су нарочито опасне јер током репликације могу узроковати неприродно спаривање база типа G=T, које у процесу транскрипције и транслације као мутације могу изазвати неприродну биосинтезу протеина, односно канцер.

Из претходног се може закључити да једињења **2a-h** поред антикоагулативног, могу имати и антиканцерогени ефекат спречавањем алкилације ДНК, па је циљ био утврдити на који начин једињења остварују интеракције са топоизомеразом $\Pi\alpha$. Након поделе испитиваних деривата као генотокосичних и антигенотоксичних агенаса, потребно је било испитати да ли деривати остварују интеракцију са ДНК, топоизомеразом $\Pi\alpha$ -ДНК бинарним комплексом, или само са ензимом, или су пак потенцијални инхибитори АТРаза. Стога су извршени експерименти на сваком од сегмената топоизомеразе $\Pi\alpha$ у циљу одређивања фармакологије деривата као генотоксичних или антигенотоксичних агенаса.



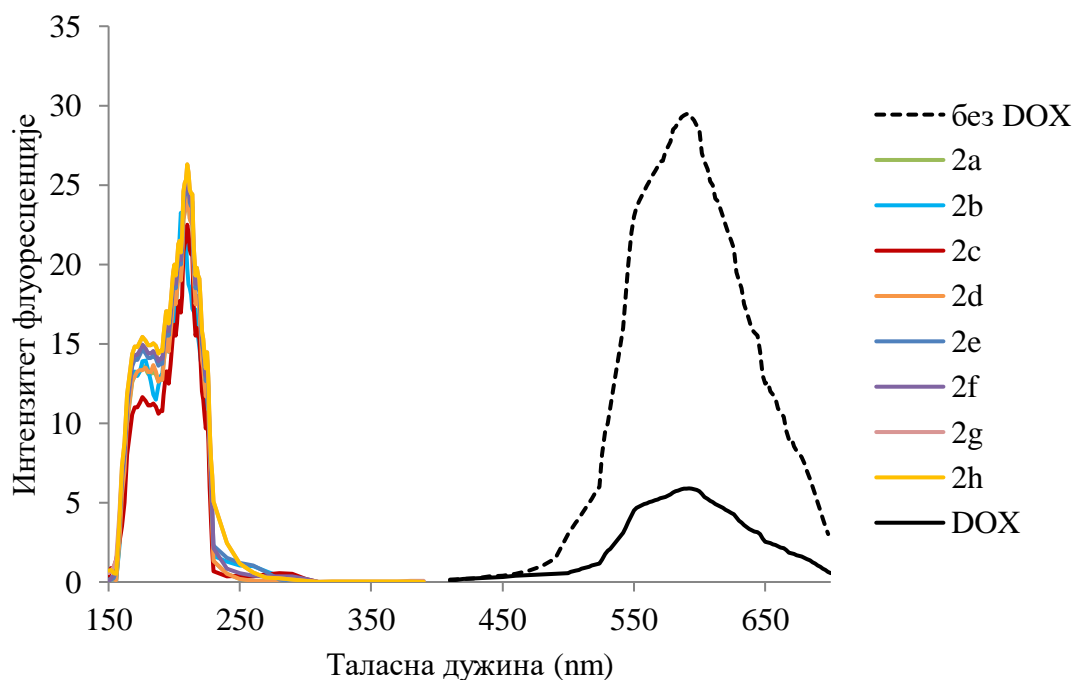
Шема 3.5. Алкилирајући ефекат ЕМС-а и настанак мутација унутар ДНК.

3.5.5.1. ИНТЕРАКЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h СА ТОРП α ТОКОМ КАТЕНАЦИЈЕ ДНК

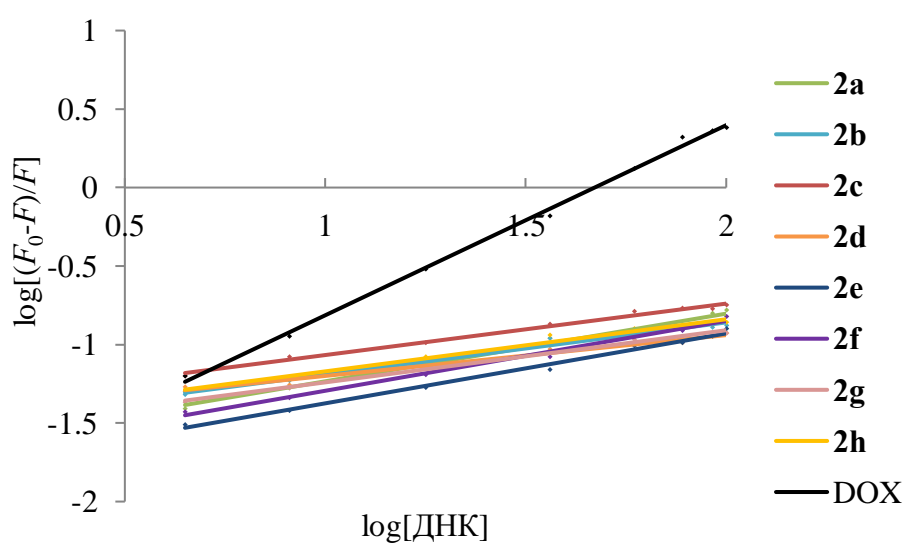
Када неки антиканцерогени агенс интеркалира ДНК, смањује се интензитет флуоресценције насталог комплекса. Стога је вршено упоређивање интеркалирајућег потенцијала деривата **2a-h** са доксорубицином (DOX) као клиничким антиканцерогеним агенсом (хемотерапеутиком) са интеркалирајућим механизмом деловања. Интензитет флуоресценције комплекса деривата **2a-h** са ДНК је праћен на 205 nm, док је систем DOX-ДНК праћен на 592 nm (Слика 3.36).^{138,184}

Поређењем спектралних података утврђено је да нема промене интензитета флуоресценције након интеракције деривата хроман-2,4-диона са ДНК, што указује да се деривати не везују за ДНК и не показују интеркалирајући потенцијал. Са друге стране, као што је и очекивано, забележено је значајно смањење интензитета флуоресценције између слободног и везаног доксорубицина, што потврђује његову већ познату интеркалациону способност (Слика 3.36). Број молекула везаног интерка-

латора по молекулу ДНК (n), израчунат је из једначине $\log[(F_0-F)/F] = \log K_s + n \log[\text{ДНК}]$ (јед. 2.52, Експериментални део). Према нагибу праве са Сlike 3.37, просечно 1,21 молекула доксорубицина везано је за ДНК, док је за деривате **2a-h** n у рангу од 0,3 до 0,5, указујући да нема интеркалације.



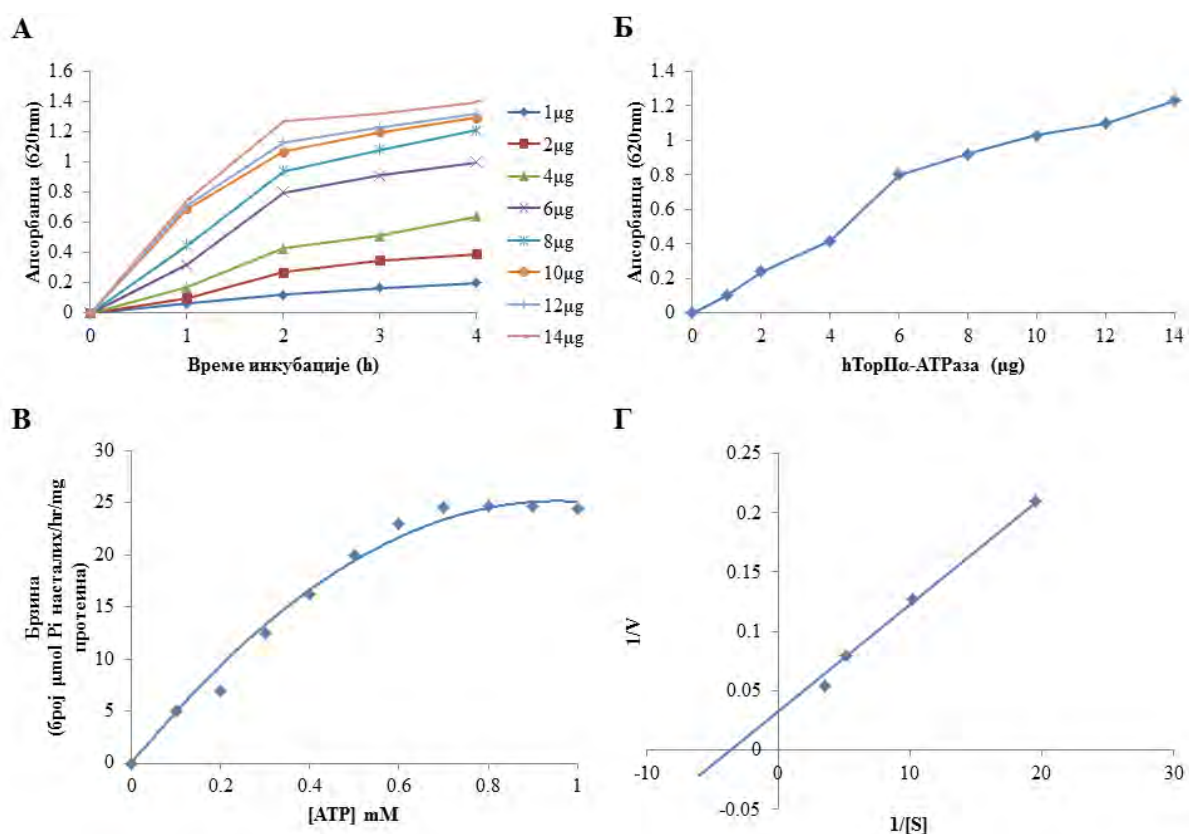
Слика 3.36. Флуоресцентни емисиони спектри система **2a-h**-ДНК и доксорубицин-ДНК у раствору 10 mM Tris-HCl пуфера на pH 7,4 и 25°C.



Слика 3.37. График зависности $\log[(F_0-F)/F]$ од $\log[\text{ДНК}]$ за рачунање броја везаних молекула (n) по молекулу ДНК.

3.5.5.2. ИНТЕРАКЦИЈЕ ДЕРИВАТА 2a-h СА hАТРАЗА ДОМЕНОМ hТОРШ α

Сагласно закључку да деривати **2a-h** не врше интеркалацију ДНК, логичан корак у даљим испитивањима био је разјашњавање да ли испитивани деривати као потенцијални инхибитори АТРаза домена, током вршења генотоксичне или антигенотоксичне активности, инхибирају хидролизу АТР-а? У поступку дефинисања инхибиторног потенцијала деривата **2a-h** коришћена је пречишћена рекомбинована хумана ТорШ α која садржи АТРаза домен, те је најпре испитана способност рекомбинованог ензима да хидролизује АТР. Након добијања резултата који потврђују да је каталитичка активност рекомбинованог ензима слична каталитичкој активности природне хумане АТРаза, потврђено је да је рекомбинована хумана ТорШ α одговарајућа мета за испитивање инхибиторног потенцијала деривата **2a-h** на АТРази (Слика 3.38).¹⁸⁵

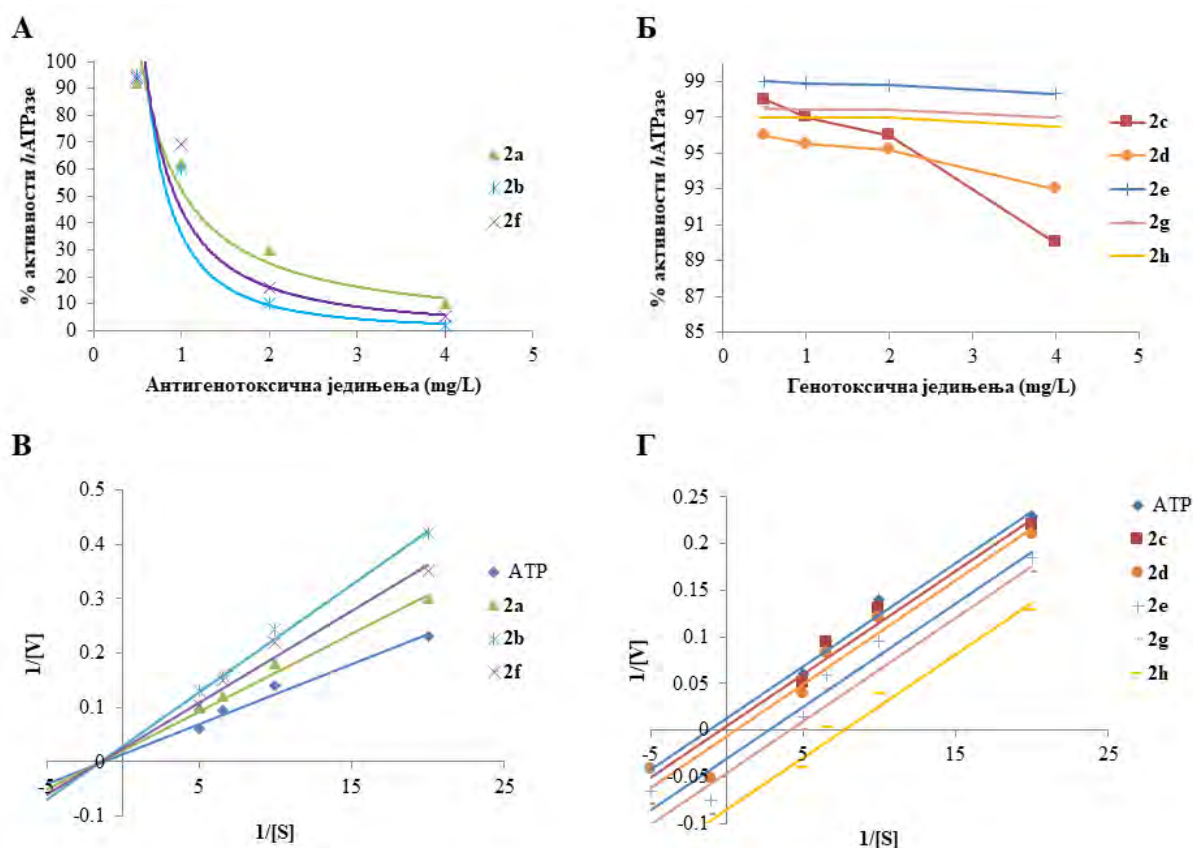


Слика 3.38. (А) Активност hАТРаза области у хуманој ТорШ α одређена помоћу малахит зелено теста у функцији од времена и протеина. (Б) Подаци са графика (А) приказани као однос активности хумане ТорШ α -АТРаза области и протеина у току 2 h. (В) Каталитичка активност пречишћеног АТР-везујућег домена хумане ТорШ α према Michaelis-Menten-овој једначини. (Г) Lineweaver-Burk-ов дијаграм односа реципрчних вредности (1/V) и (1/S).

Ензимском кинетиком израчуната брзина хидролизе АТР-а, извршене у различитим временским интервалима (1-4 h), показала је да је пречишћена АТР-а каталитички активна и да подлеже Michaelis-Menten кинетици (Слика 3.38А). Тако, у периоду од два сата, забележена је линеарност у хидролизи молекула АТР, услед ослобађања фосфата (Слика 3.38Б). Средња вредност Michaelis-Menten-ове константе реакције била је $K_m = 314,23 \pm 13,80 \mu\text{M}$, док је максимална брзина хидролизе АТР-а износила $V_{\text{max}} = 34,52 \pm 1,67 \mu\text{M}/\text{min}$ (Слике 3.38В и Г).

3.5.5.3. ИНХИБИЦИЈА АКТИВНОСТИ *h*АТРАЗЕ КАО СТРУКТУРНОГ КОНСТИТУЕНТА *h*ТОРП-а ДЕРИВАТИМА 2a-h

Да би се утврдила физиолошки активна концентрација и начин инхибиције *h*АТРАзе дериватима **2a-h**, праћен је проценат смањења активности ензима у зависности од аплициране концентрације инхибитора (Слика 3.39).



Слика 3.39. Крива зависности инхибиције активности *h*АТРАзе дериватима (А) **2b**, **2a** и **2f**; (Б) **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h**. Однос реципрочних вредности $1/V$ и $1/S$ у присуству деривата (В) **2b**, **2a** и **2f**; (Г) **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h**.

Приликом кинетичких студија примењена је концентрација деривата **2a-h** од 2 mg/L, што је пандан концентрацији од 2 mg/kg телесне масе пацова Wistar соја, која је коришћена за испитивање антикоагулативне активности интраперитонеалном апликацијом. Није било потребе користити концентрацију од 20 mg/L (20 mg/kg) која је коришћена током дефинисања антикоагулативне активности након оралне апликације, јер би се применом веће концентрације само повећала брзина каталитичке активности АТРаза али би кинетички ефекат остао исти.

Запажено је да антигенотоксични деривати **2b**, **2a** и **2f** инхибирају *h*АТРаза комплетно (Слика 3.39А), док генотоксични деривати **2e**, **2g** и **2h** у концентрацији од 2 mg/L не врше инхибицију (Слика 3.39Б). Најниже IC_{50} вредности забележене су код деривата **2b** ($0,98 \pm 0,21$ mg/L), **2f** ($1,01 \pm 0,62$ mg/L) и **2a** ($1,24 \pm 0,41$ mg/L). По одређивању IC_{50} вредности, израчунате су и привидне вредности Michaelis-Menten-ове константе, K_m^{app} , односно привидна максимална брзина, V_{max}^{app} , у циљу разоткривања врсте инхибиције. Тако, за деривате **2b**, **2f** и **2a** израчунате K_m^{app} вредности биле су $373,32 \pm 0,17$, $352,76 \pm 0,28$ и $337,14 \pm 0,64$ μ M, док је V_{max}^{app} вредност за све деривате износила $35,49 \pm 1,92$ μ M/min. Пошто су вредности константе K_m^{app} расле у присуству антигенотоксичних деривата, а V_{max}^{app} остала слична вредности добијеној за АТР-*h*АТРаза комплекс, закључено је да се **2b**, **2f** и **2a** понашају као компетитивни инхибитори *h*АТРаза и *r*АТРаза (Слика 3.38В) те као такви испољавају антигенотоксичну активност. Остали деривати не поседују инхибициони потенцијал, те се као такви понашају као генотоксични агенси (Слика 3.38Г).

3.5.5.4. ПРЕТПОСТАВЉЕНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ ЕМС-А И ДЕРИВАТА 2a-h СА *r*ТОРII α

Да би се разумео механизам деловања деривата **2a-h** као инхибитора *r*АТРаза, а обзиром на чињеницу да је експеримент изведен на експерименталним животињама из Wistar соја, постојала је потреба за конструисањем хомологог модела ТорII α пацова (*r*ТорII α) на коме би се молекулским моделирањем дефинисале интеракције испитиваних деривата **2a-h** са *r*АТРаза доменом. Кристална структура *r*ТорII α још увек није доступна на PDB бази података. Успешним хомологим моделовањем добијена је структура *r*ТорII α која садржи 1526 аминокиселина (UniProt код P4156) и поређењем примарне структуре *r*ТорII α са секвенцом људске ТорII α (UniProt код P11388, 1531 аминокиселина),¹⁸⁶ утврђено је да секвенца *r*1-430 обухвата *N*-терминус, *r*431-572

TOPRIM област, $r573-1172$ ДНК-везујући и раскидајући регион, док остатак структуре чини област C -терминуса (Слика 3.34). За аминокиселине $rGlu459$, $rAsp539$, $rAsp541$ и $rAsp543$ координативно је везан јон Mg^{2+} , а $rTyr803$ је каталитичка аминокиселина која врши раскидање двоструке спирале. Модел је комплетиран са 30-бр двоструким олигонуклеотидом везаним за ДНК-везујући и раскидајући регион.

Генерисаним хомологим моделом најпре је објашњен механизам настанка комета након интеракције ЕМС-а са ДНК пацова. Тако, $rTopII\alpha$ може везати и раскинути двоструку спиралу ДНК означену као G -сегмент, затим извршити транспорт T -сегмента кроз расцеп (Слика 3.35).¹⁸⁰ ЕМС се као алкилујући агенс може везати за оба сегмента суперувијања ДНК пре интеракције са ензимом, па је претпостављено да оба сегмента, rG -ЕМС и rT -ЕМС, могу бити изложена дејству $rTopII\alpha$. Уколико би се извршило алкиловање, дошло би до цепања rG -ЕМС сегмента у ДНК-везујућем и раскидајућем домену помоћу $rTyr803$, у АТР зависној реакцији. Након хидролизе фосфодиестарских веза унутар rG -ЕМС долази до проласка rT -ЕМС фрагмента суперувијања кроз ДНК-везујући и раскидајући регион. У нормалним условима, цепање $rTopII\alpha$ - G -ЕМС би било краткотрајно. Ипак, хидролиза rG -ЕМС сегмента, односно формирање комета, може се забележити пошто $pH > 13$ омогућава раздвајање хидролизованых ДНК ланаца.¹⁸⁷ Након проласка rT -ЕМС сегмента, други молекул АТР-а се хидролизује и rG -ЕМС сегмент се обнавља.

Литературни подаци говоре да деривати **2a-h**, као хинони, могу инхибирати хидролизу АТР-а непосредно пре религације ДНК пацова и тако стабилизувати комету насталу услед присуства ЕМС-а, односно испољавати генотоксичну активност.¹⁸⁵ Ипак, контрадикторно понашање једињења **2a**, **2b** и **2f** као антигенотоксичних агенса сугерише да ова једињења спречавају стабилизацију насталих комета, односно инхибирају хидролизу АТР-а пре самог формирања $rTopII\alpha$ - G -ЕМС комплекса. Сходно томе, иницијална претпоставка била је да се након апликације **2a**, **2b** и **2f** пацовској топоизомерази $II\alpha$ ускраћује чак и енергија која омогућава ензиму да врши трансфер rG -ЕМС и rT -ЕМС фрагмента до ДНК-везујућег и раскидајућег региона. Како према постојећој литератури не постоје депоноване кристалне структуре **2a**, **2b** и **2f** или ЕМС-а са ензимом, молекулско доковање и молекулска динамика сматране су методама корисним да предвиде везивање и понашање свих једињења унутар $rTopII\alpha$. Пошто је $rTopII\alpha$ идентичан хомодимер, све студије моделовања су изведене на једној субјединици.

3.3.5.5. РЕПРОДУКЦИЈА КО-КРИСТАЛИЗОВАНИХ СТРУКТУРА ИНХИБИТОРА h ТОРII α

Како би се дефинисао најбољи програм/скоринг функција за предвиђање биоактивних конформација тестираних деривата хроман-2,4-диона унутар пацовске топоизомеразе II α , најпре је извршена валидација репродукције кристалних структура инхибитора хумане топоизомеразе II α , ко-кристализованих унутар региона АТРазае и региона везивања и раскидања ДНК (Табела 3.22, Слика 3.40).

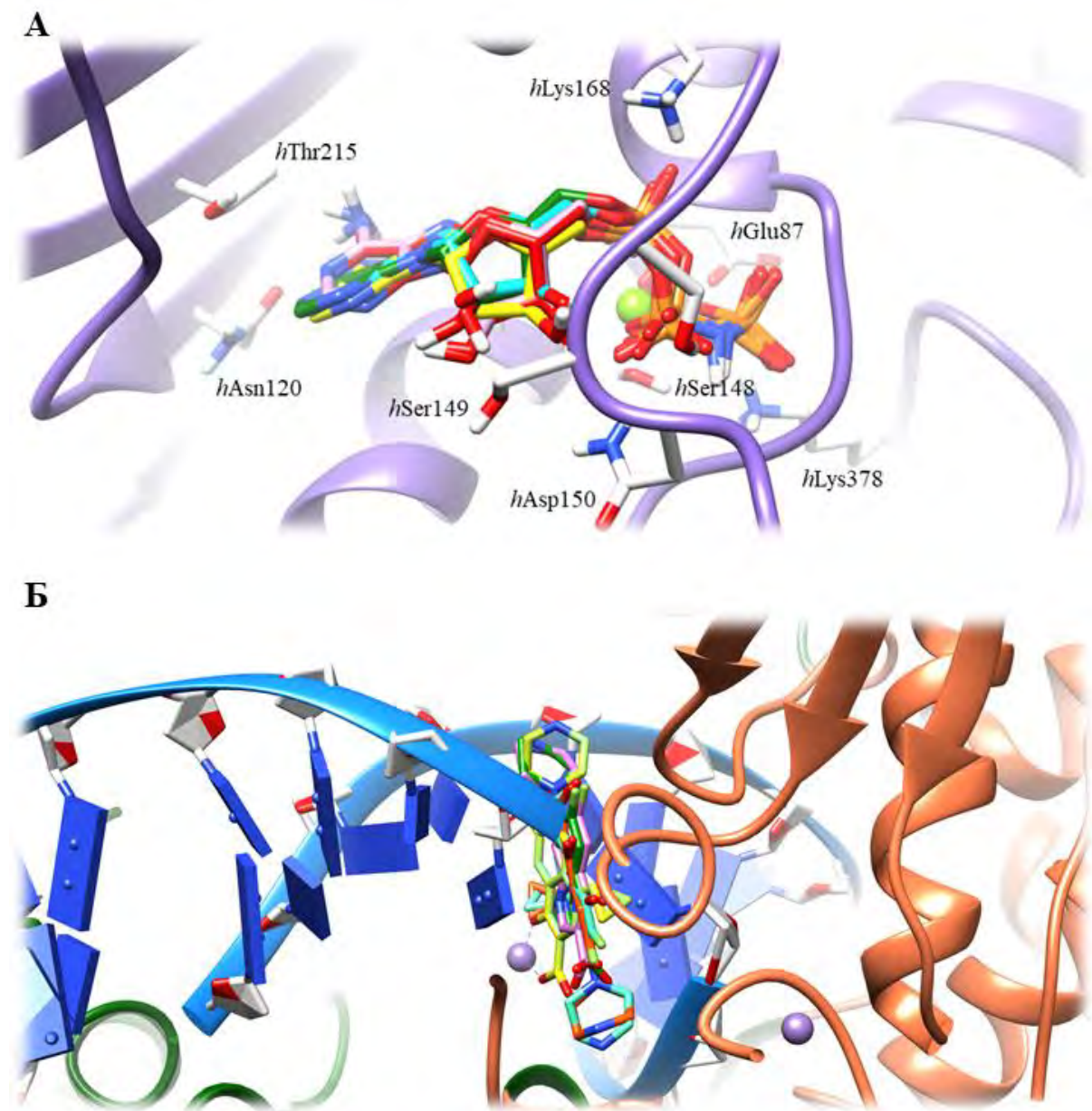
Унутар региона АТРазае извршена је репродукција ко-кристализованих структура АМРРNP-а (PDB кодови 1PVG, 1ZXM, 1ZXN, 4GFH и 4R1F) са циљем да се нађе скоринг функција која ће предвидети биоактивне конформације АТР-а и једињења **2a-h** унутар r ТОРII α као генотоксичних или антигенотоксичних агенаса. Са друге стране, репродукцијом ко-кристализованих структура региона везивања и раскидања ДНК (PDB кодови 2XCT, 3L4J, 3LK4, 4BUL и 4PLB), добијен је начин предвиђања биоактивне конформације ЕМС-а као алкилујућег агенса. Репродукције ко-кристализованих структура извршене су поновним доковањем експерименталних конформација, поновним доковањем насумичних конформација, унакрсним доковањем експерименталних конформација и унакрсним доковањем насумичних конформација.

На основу RMSD вредности из Табеле 3.22 утврђено је да скоринг функција програма AutoDock Vina извршила репродукцију ко-кристализованих структура са највећом тачношћу, па је овај програм примењен за даља испитивања.

ТАБЕЛА 3.22. Примена молекулског доковања у репродукцији ко-кристализованих инхибитора *rTopII α* у региону *rATPазе* и региону везивања и раскидања ДНК.

ЛИГАНД	AUToDOCK		VINA	DOCK6	AUToDOCK		VINA	DOCK6
	НД ^а	НК ^б			НД ^а	НК ^б		
РЕГИОН АТРАЗЕ								
	Поновно доковање експерименталне конформације (rmsd Å)				Поновно доковање насумичне конформације (rmsd Å)			
1PVG	1,534	1,575	1,088	1,132	0,994	1,021	0,852	1,231
1ZXМ	1,025	1,112	0,450	1,425	1,352	1,442	1,365	1,453
1ZXN	0,871	0,921	0,661	0,723	0,911	0,927	0,923	0,926
4GFH	0,995	0,998	0,524	0,562	1,324	1,342	1,223	0,775
4R1F	2,023	2,113	3,027	1,245	3,021	3,332	3,473	1,425
	Унакрсно доковање експерименталне конформације (rmsd Å)				Унакрсно доковање насумичне конформације (rmsd Å)			
1PVG	1,738	1,824	1,425	1,563	1,823	1,924	1,557	1,662
1ZXМ	2,143	2,225	1,893	1,936	2,341	2,435	2,412	2,014
1ZXN	2,927	3,032	3,727	2,756	3,102	3,014	2,214	2,556
4GFH	2,112	2,226	1,831	1,903	2,224	2,443	1,983	1,997
4R1F	2,236	2,574	2,526	2,656	2,425	2,365	2,567	2,776
РЕГИОН ВЕЗИВАЊА И РАСКИДАЊА ДНК								
	Поновно доковање експерименталне конформације (rmsd Å)				Поновно доковање насумичне конформације (rmsd Å)			
2ХСТ	2,124	2,314	1,841	1,724	2,742	2,414	1,942	1,831
3L4J	1,947	2,556	1,181	1,668	1,983	2,782	1,223	1,768
3LK4	2,425	2,862	1,262	1,993	2,956	2,892	1,312	1,671
4BUL	1,512	2,553	1,423	1,534	1,782	2,662	1,475	1,924
4PLB	1,886	2,101	1,426	1,925	1,924	2,201	1,487	2,102
	Унакрсно доковање експерименталне конформације (rmsd Å)				Унакрсно доковање насумичне конформације (rmsd Å)			
2ХСТ	2,282	2,514	1,892	1,895	2,478	2,314	1,723	1,892
3L4J	2,425	2,782	1,523	1,983	1,998	2,556	1,242	1,783
3LK4	2,984	2,983	1,783	2,314	2,672	2,953	1,834	1,984
4BUL	1,779	2,662	1,523	1,672	1,892	2,903	1,824	1,984
4PLB	1,902	2,886	1,997	2,536	1,902	2,228	1,523	1,775

^аНД - најбоље докована конформација; ^бНК - конформација најбољег кластера.



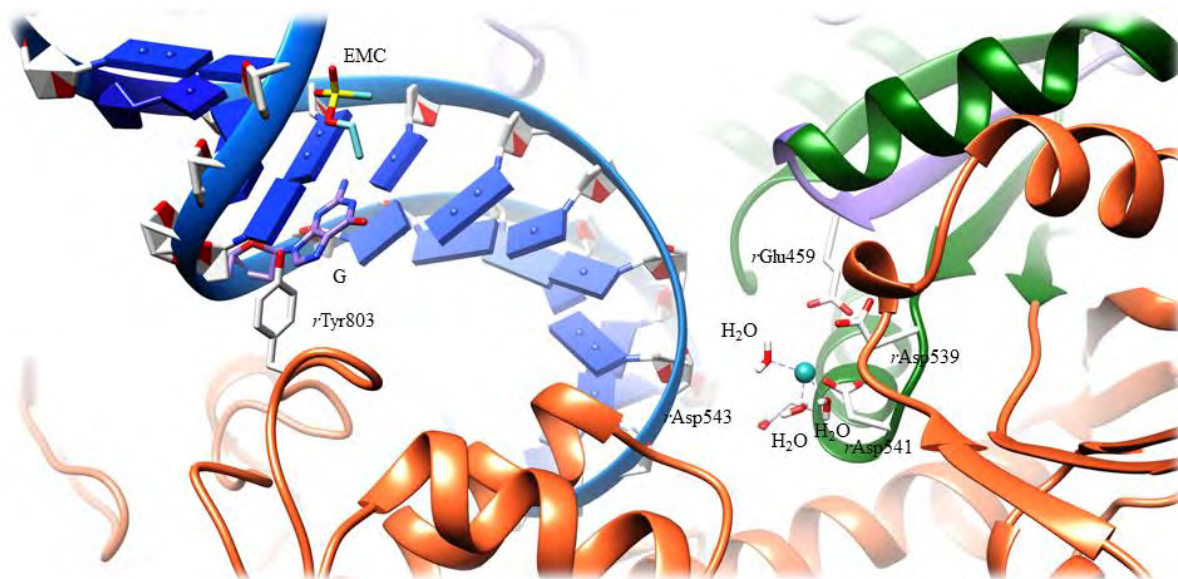
Слика 3.40. (А) Примена доковања за репродукцију ко-кристализоване структуре АМРРNP у активном центру људске TopII α (PDB код: 1ZXM). Кристализовани лиганд је обојен тамно зеленом бојом, поновно доковани у плаво, моделовани поновно доковани у розе, унакрсно доковани у жуто, моделовани унакрсно доковани у црвено. Активни центар АТРаза је обојен у љубичасто, док су каталитичке аминокиселине представљене белом бојом, Mg²⁺ јон је обојен зеленом бојом. (Б) Примена доковања за репродукцију конформације инхибитора унутар региона везивања и раскидања ДНК (PDB код: 2XCT). Кристализовани лиганд је обележен жутом бојом, поновно доковани зеленом, моделирани поновно доковани розом, унакрсно доковани плавом, моделовани унакрсно доковани наранџастом бојом. TOPRIM област *S. aureus* је обојена тамно зеленом бојом, док је регион везивања и раскидања ДНК обојен корално црвеном бојом. Јон Mg²⁺ је означен зеленом бојом.

3.5.5.6. МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ЕМС-А – ДНК ОШТЕЋЕЊЕ ИЗАЗВАНО АЛКИЛИРАЈУЋИМ АГЕНСОМ

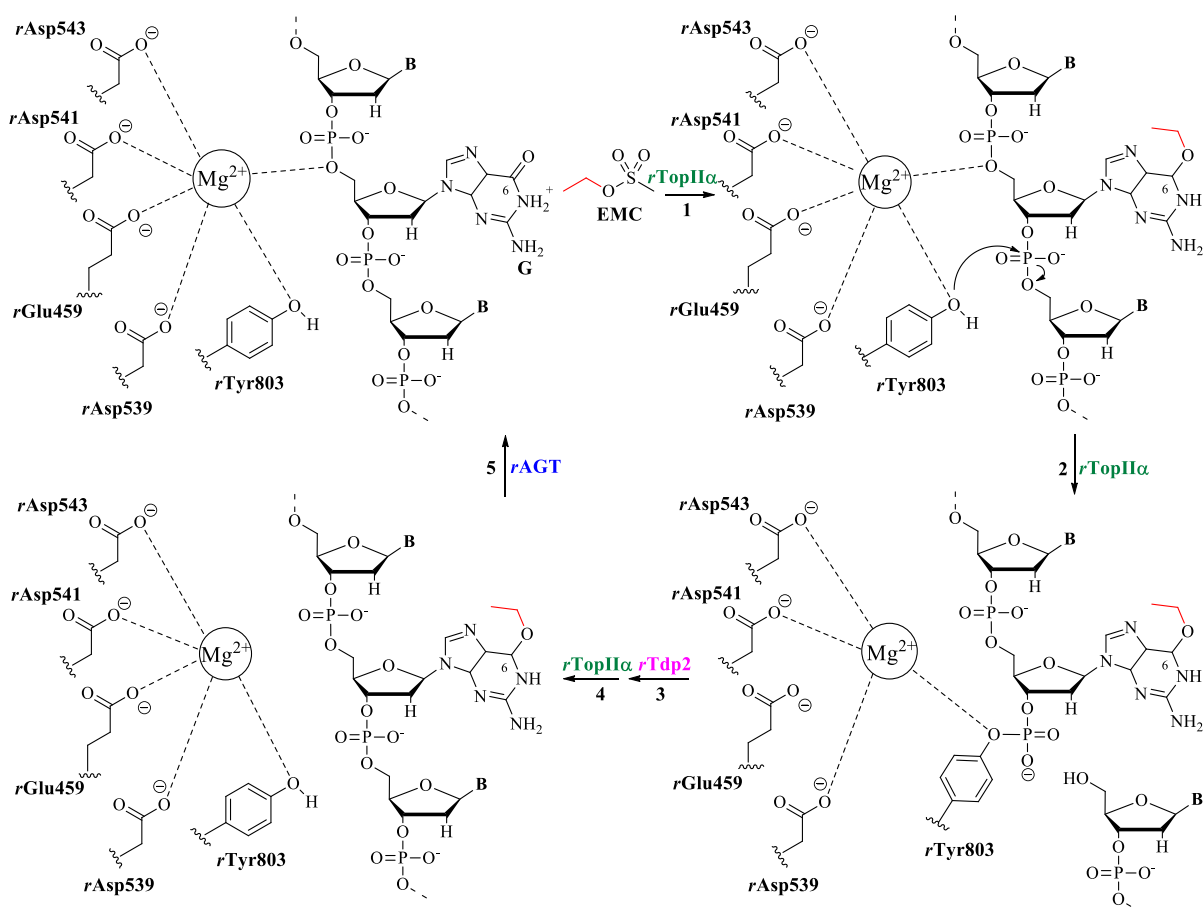
Већ је претходно подробно објашњено да ЕМС као алкилујући агенс врши алкиловање гуанина и тимина унутар G-сегмента, при чему настају аберације, односно лезије, типа O^6 -етилгуанина и O^4 -етилтимина (Шема 3.4) те да ове лезије у процесу религације могу узроковати спаривање база типа G=T које у процесу транскрипције и translације као мутације могу изазвати неприродну биосинтезу протеина односно канцер. Теоријски аспекти алкиловања ДНК етил метансулфонатом као алкилујућим агенсом примењени су и на студије молекулског доковања, где је помоћу биоактивне конформације добијене скоринг функцијом програма AutoDock Vina у потпуности објашњен механизам алкиловања секундарне структуре ДНК (Слика 3.41 и Шема 3.6).

На Слици 3.41 представљен је молекул ЕМС-а унутар двоструког хеликса ДНК пацова. Етил група алкилујућег агенса налази се у близини rGO^6 и $rTyr803$, позиционирана довољно близу нуклеотида ($d = 2,888 \text{ \AA}$) да би се могао извршити трансфер на остатак гуанина и даље формирао O^6 -етилгуанин (Шема 3.6, реакција 1). Ниска вредност енергије везивања ЕМС-а за ДНК ($\Delta G = -8,36 \text{ kcal/mol}$) потврђује да је докована конформација уствари биоактивна. Штетно дејство ЕМС-а на ДНК уочено је након електрофилног алкиловања гуанина O^6 (Шема 3.6). Резултат реакције јесте настанак O^6 -етилгуанина, лезије која не може да формира физиолошке интра-молекулске водоничне везе са комплементарном базом, већ током репликације гради неприродне G=T и T=G парове што доводи до стварања мутагених токсичних канцерогених ефеката.¹⁸⁸

По формирању rGO^6 -етилгуанина (лезије унутар G-ДНК), предуслов за настанак комета јесте раскидање фосфодиестарске везе нуклеофилним нападом $rTyr803$ (Шема 3.6, реакција 2). Ову реакцију омогућава јон магнезијума који координативно стабилизује саму лезију. Уколико постоји метаболичка енергија која омогућава пролаз rT -ДНК кроз привремено раскинути rG -ДНК, процес ће се електрофоретски детектовати као комета. Уколико је пак метаболичка енергија ускраћења, ензим тирозил-ДНК фосфодиестераза (енг. tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2, Tdp2) заједно са $rTopII\alpha$ врши религацију rG -ДНК (Шема 3.6, реакције 3 и 4), да би потом била извршена репарација rGO^6 -етилгуанина каталитичким деловањем rO^6 -алкилгуанин ДНК алкилтрансферазе (енг. O^6 -alkylguanine DNA alkyltransferase, AGT) (Шема 3.6, реакција 5).



Слика 3.41. Молекулско доковање EMC-а (угљеникови атоми су представљени светло плавом бојом) на G-сегменту ДНК пацова (тамно плави ланац). Гуанин је представљен љубичастом бојом, *r*WHD област је означена коралном бојом, *r*TOPRIM област зеленом бојом. Аминокиселине обе области су означене белом бојом.

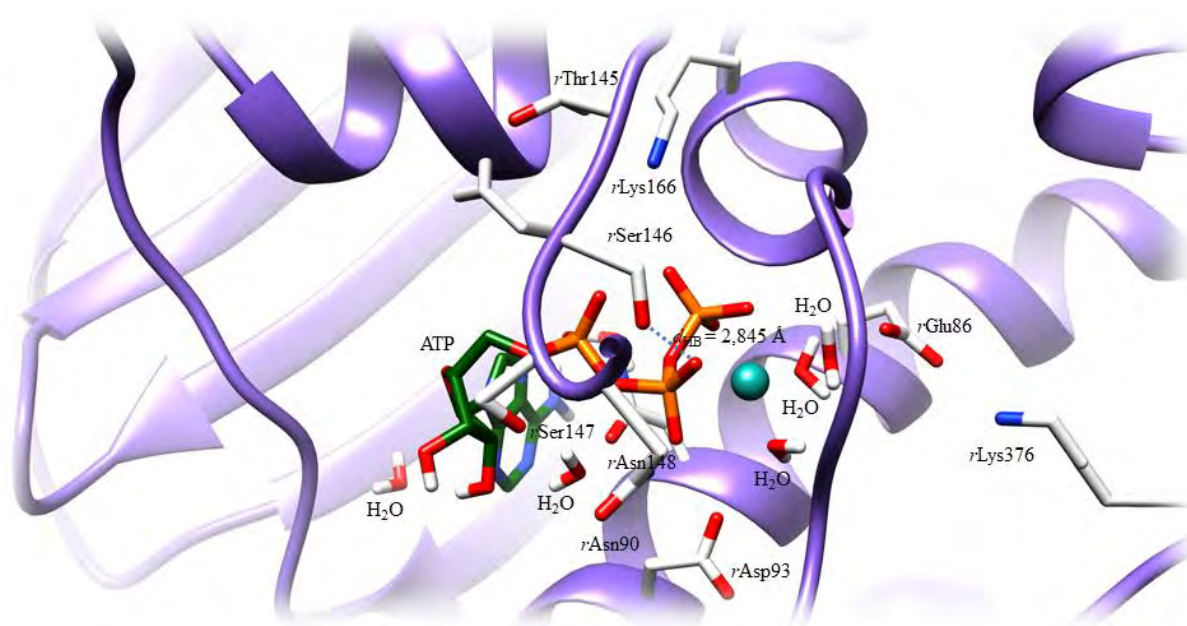


Шема 3.6. Предложени механизам привременог раздвајања *r*G-EMC катализованог *r*TopII α (кораци 1 и 2), религација *r*G-EMC катализована ензимом *r*Tdp2 (кораци 3 и 4) и репарација G-сегмента катализована ензимом AGT (корак 5).

Анализом претходних разматрања следи да антигенотоксични агенси **2a**, **2b** и **2f** ускраћују метаболичку енергију за пролазак *r*T-ДНК кроз привремено раскинути *r*G-ДНК, те се њиховом администрацијом спречава настанак комета. Генотоксични агенси требао би да дозволе хидролизу молекула АТР и да се процес хидролизе манифестује појавом комета. Све изречене претпоставке подвргнуте су испитивању молекулским моделирањем.

3.5.5.7. МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ АТР-А – НАСТАНАК КОМЕТА

С обзиром да не постоје доступне ко-кристализоване структуре АТР-*r*ТорIIа комплекса, молекул АТР-а докован је у активном центру *r*АТРазе како би се дефинисао механизам настанка метаболичке енергије за формирање комета (Слика 3.42).



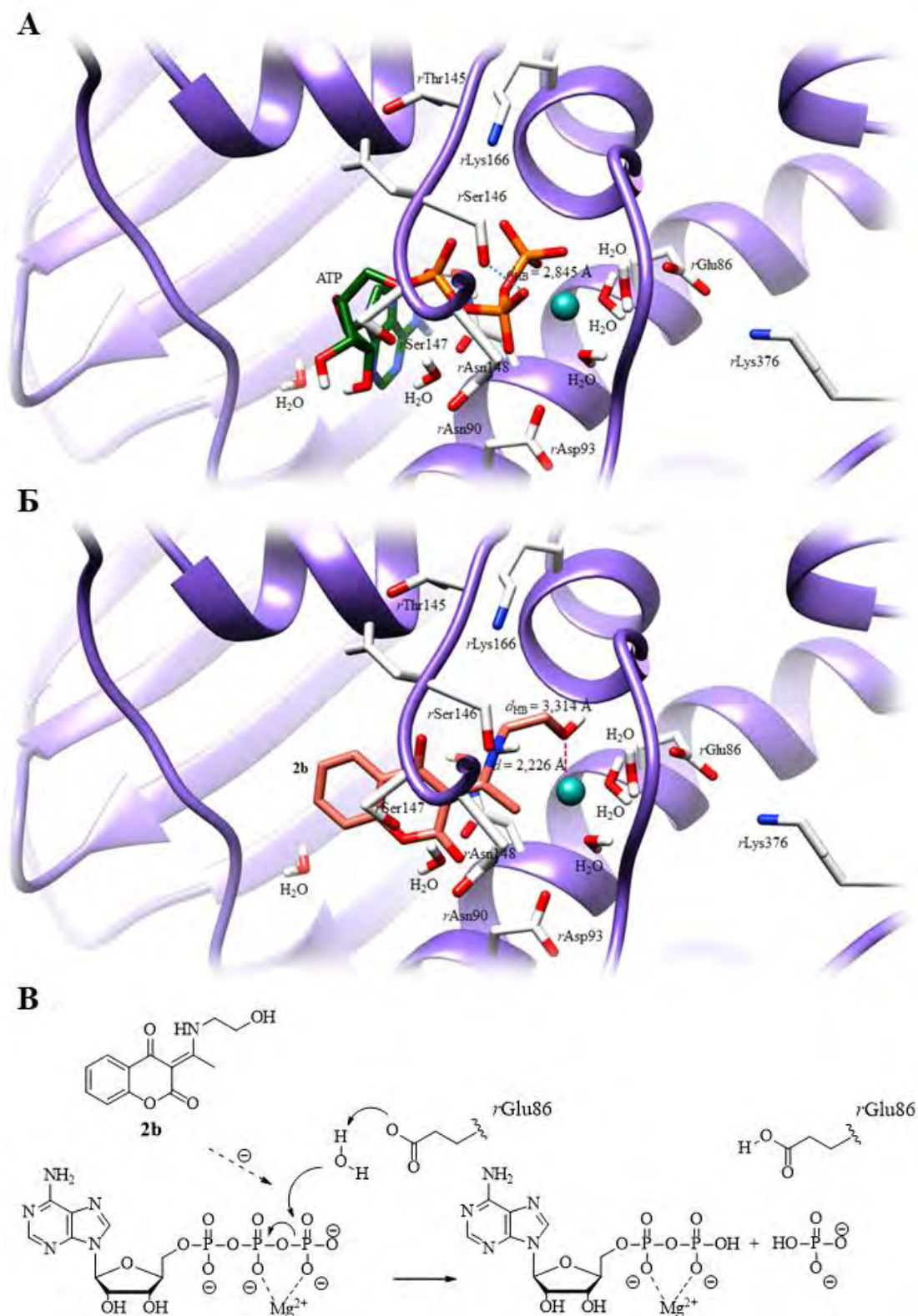
Слика 3.42. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом.

Докована конформација АТР-а упоређена је са АМППН-ом (аденозин 5'-(β,γ -имидо)трифосфат-ом), након чега је потврђено да представља добру валидацију примене доковања.¹⁴¹ Тако, прстен аденина налази се у близини *r*Asn118 и водоничним мостовима је стабилизован са *r*Asn120, *r*Thr213 и *r*Tyr32' из другог протомера. Прстен рибозе усмерен је ка електростатичким интеракцијама са аминокиселинама *r*Ser147 и

*r*Asn148. Фосфодиестарски мост стабилизован је на следећи начин: *r*Lys166 и амидни азот *r*Asn90 остварују интеракције са α -фосфатом, *r*Ser146 донира водоничну везу β -фосфату ($d_{\text{НВ}} = 2,845 \text{ \AA}$), док је *r*Lys376 укључен у грађење моста са γ -фосфатом који стабилизује прелазно стање хидролизе АТР-а. Јон Mg^{2+} из активног центра, који формира октаедарски комплекс са *r*Asn90 и два молекула воде, такође остварује интеракцију са фосфодиестарским мостом. Каталитичка аминокиселина *r*Glu86 гради водоничну везу са једним молекулом воде координисаним са Mg^{2+} јоном, који се може даље активирати за процес хидролизе АТР-а и обезбедити неопходну енергију за формирање и разлагање ковалентног фосфо-тирозин G-ЕМС интермедијера (Шема 3.6, корак 2) или религацију (Шема 3.6, кораци 3 и 4).

3.5.5.8. МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА **2a**, **2b** и **2f** – УВИД У МЕХАНИЗАМ АНТИГЕНОТОКСИЧНОСТИ

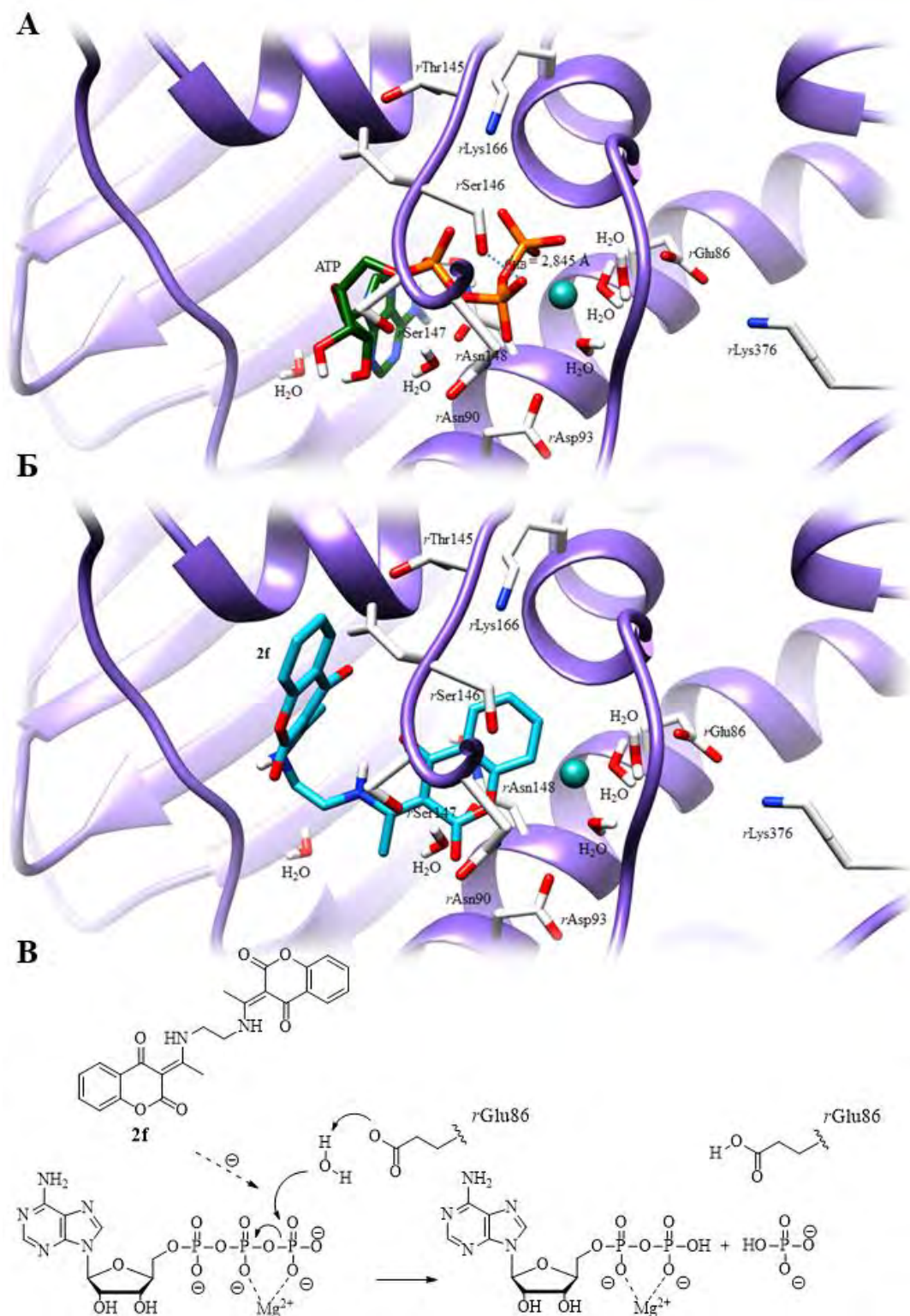
Ефекат ЕМС-а неутрализован је након администрације деривата **2a**, **2b** и **2f**, али је, на супрот томе, повећан у присуству осталих хроман-2,4-диона. Према најбоље докованој конформацији (Слика 3.43Б) најактивније антигенотоксично једињење, **2b**, лоцирано је у близини каталитичке аминокиселине *r*Glu86. У поређењу са АТР-ом, хроман-2,4-дионски прстен једињења **2b** заузима конформацију која је са аспекта релативних координата упоредива са прстеном рибозе, док је лактонски кисеоник усмерен ка хидроксилним групама аминокиселина *r*Ser147 и *r*Asn148. Лактонски карбонил у близини *r*Asn90 представља баријеру за везивање α -фосфата. Затим, *r*Ser146 гради средње јаку водоничну везу ($d_{\text{НВ}} = 3,314 \text{ \AA}$) са аминокиселином етилендиаминског моста и ова интеракција спречава везивање аминокиселине за β -фосфат. Хидроксилна група једињења **2b** координована је за Mg^{2+} јон ($d = 2,226 \text{ \AA}$), потпуно заузима регион близу *r*Glu86 и на тај начин спречава везивање γ -фосфата и хидролизу (Слика 3.43В).



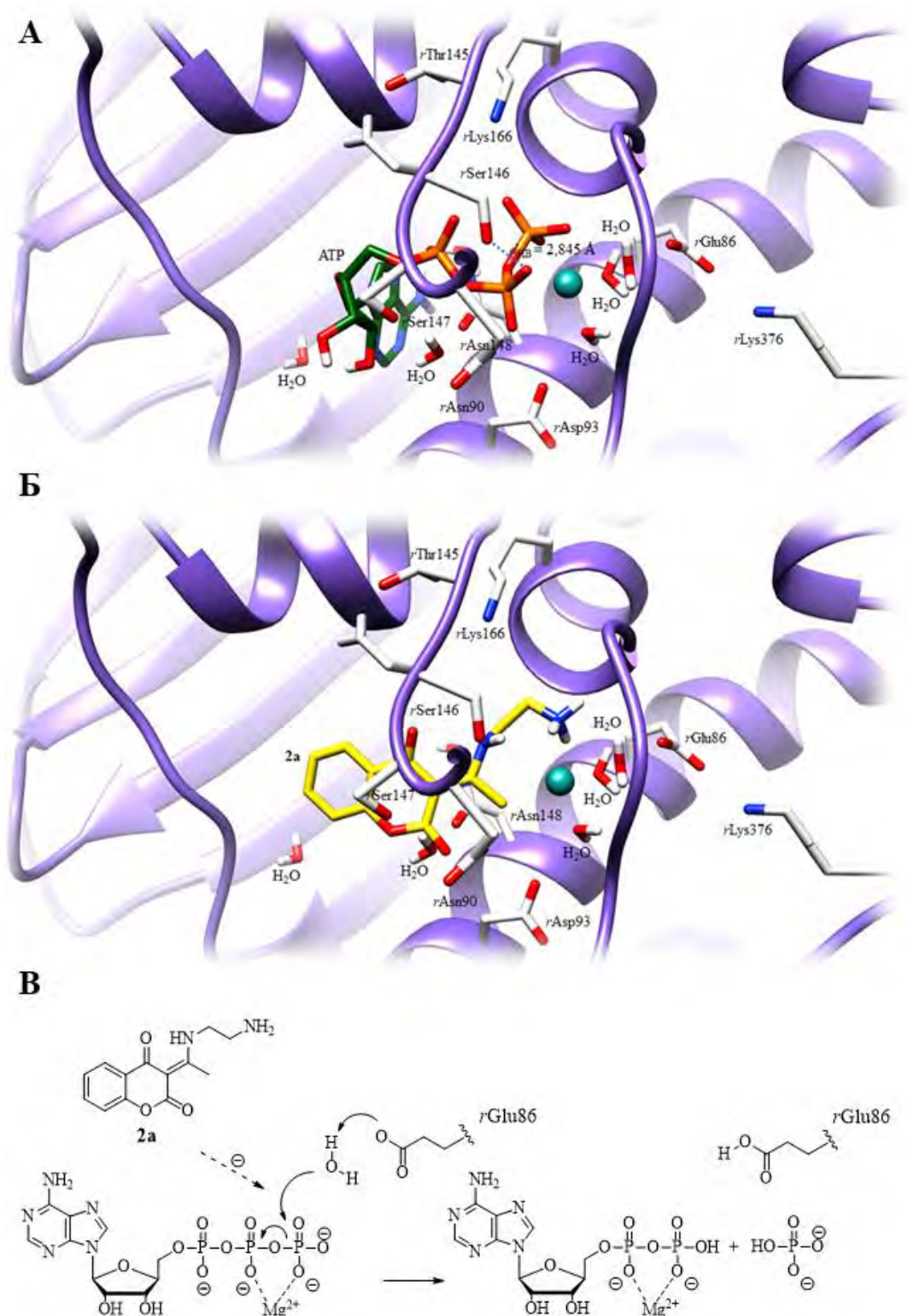
Слика 3.43. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} је представљен зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2b** (угљеникови атоми су представљени светло црвеном бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2b**.

Конформација другог по активности једињења **2f** (Слика 3.44Б) разликује се у односу на конформацију једињења **2b**, што је и очекивано обзиром на чињеницу да је **2f** димер сачињен од два хроман-2,4-дионска језгра повезана етилендиаминским мостом. Тако, први хромански прстен заузима регион у коме се налазе α -, β - и γ -фосфатне групе, са фенил групом хроманског језгра у близини *r*Glu86. Лактонски карбонил окренут је ка аминокиселинама *r*Asn90 и *r*Asn148. На структуру првог прстена наставља се етилендиамински мост за који је везан други хромански прстен. Други прстен постављен је нормално у односу на први и простире се у смеру супротном од оријентације аденина. На основу биоактивне конформације **2f**, закључује се да положај првог прстена у активном центру, близу *r*Glu86, такође омета хидролизу АТФ-а (Слика 3.44В).

Конформација деривата **2a** (Слика 3.45Б) слична је конформацији **2b**, али је разлика у томе што је терминална амино група деривата **2a** усмерена ка аминокиселини *r*Glu86. Секундарна амино група, која се налази у близини хинонског језгра, стабилизована је водоничном везом са *r*Ser146 ($d_{\text{НВ}} = 3,375 \text{ \AA}$). Ова интеракција омогућава позиционирање терцијарне амино групе ка γ -фосфату и на тај начин спречава хидролизу АТФ-а (Слика 3.45В).



Слика 3.44. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} је представљен зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2f** (угљеникови атоми су представљени плавом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2f**.



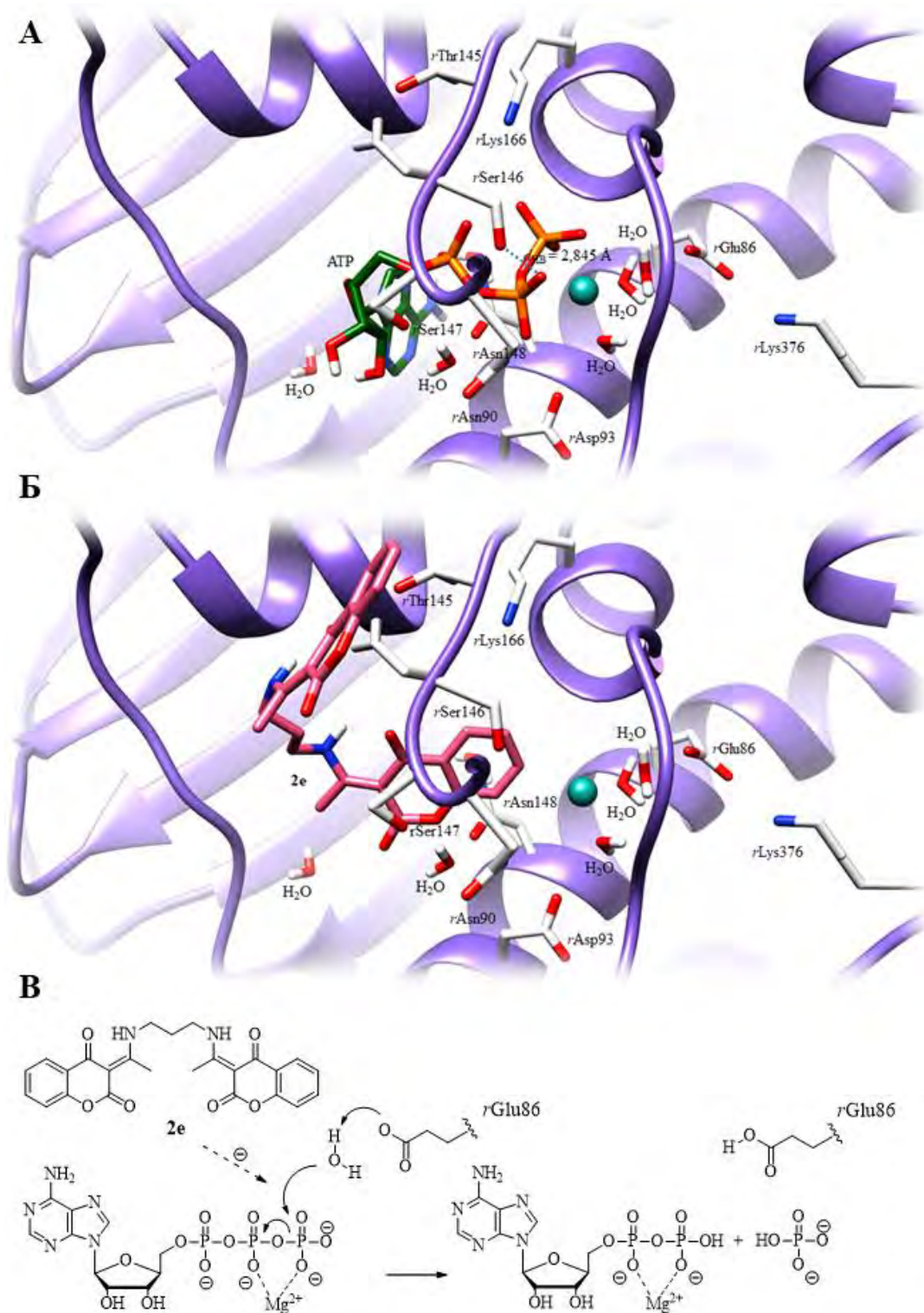
Слика 3.45. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2a** (угљеникови атоми су представљени жутом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2a**.

3.5.5.9. МОЛЕКУЛСКО ДОКОВАЊЕ ДЕРИВАТА **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h** - УВИД У МЕХАНИЗАМ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ

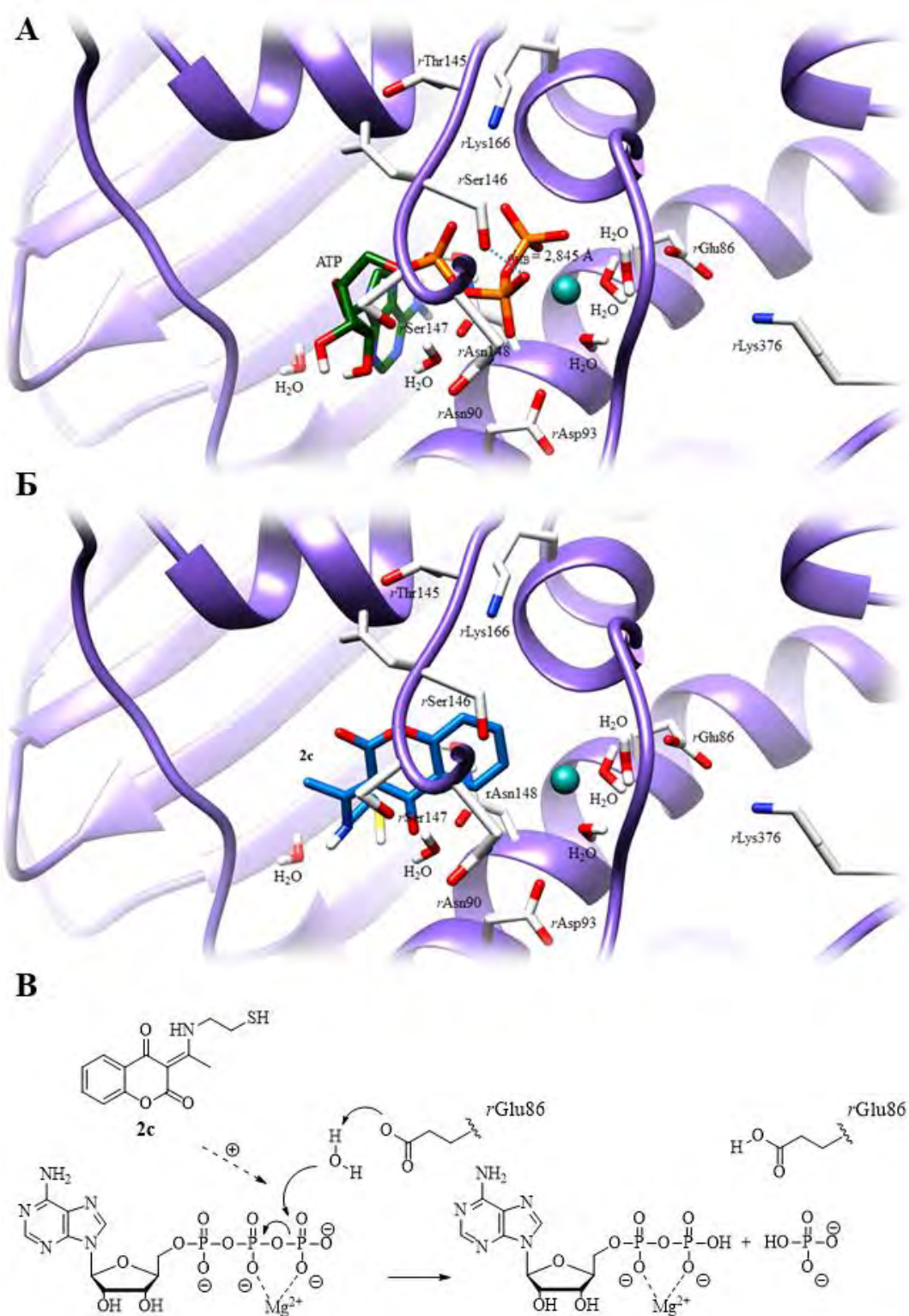
Увидом у резултате доковања дефинисан је механизам којим преостали деривати изазивају генотоксичност (Слике 3.46 до 3.50). Дериват **2e** (Слика 3.46) изазива највеће оштећење. Његова структура слична је структури деривата **2f** и зато заузима сличан просторни распоред (Слика 3.44Б). Ипак, у односу на **2f**, читав молекул је удаљен од јона Mg^{2+} и *rGlu86* за додатних 1,145 Å услед присуства волуминознијег пропилендиаминског моста. Ова, наизглед мала структурна промена доста утиче на просторни распоред једињења, па γ -фосфатна група АТР-а остаје слободна, те се хидролиза може несметано одвијати (Слика 3.44В).

Конформација деривата **2c** (Слика 3.47Б) са најнижом енергијом је, у односу на позу деривата **2b** (Слика 3.43Б) окренута хоризонтално за 180°. Због тога карбонилна група на положају 4 остварује електростатичке интеракције са аминокиселинама *rSer147* и *rAsn148*. Остатак *N*-аминоетантиола делимично заузима простор у коме се налази аденински прстен молекула АТР-а. Стога је читав хроман-2,4-дионски прстен удаљен од јона Mg^{2+} и *rGlu86*, те заузима само простор у коме се налази β -фосфат АТР-а. Таквом конформацијом **2c** не утиче на конформацију γ -фосфата АТР-а, односно не омета хидролизу АТР-а (Слика 3.47В). На сличан начин свој генотоксични потенцијал испољава и дериват **2d** (Слика 3.48).

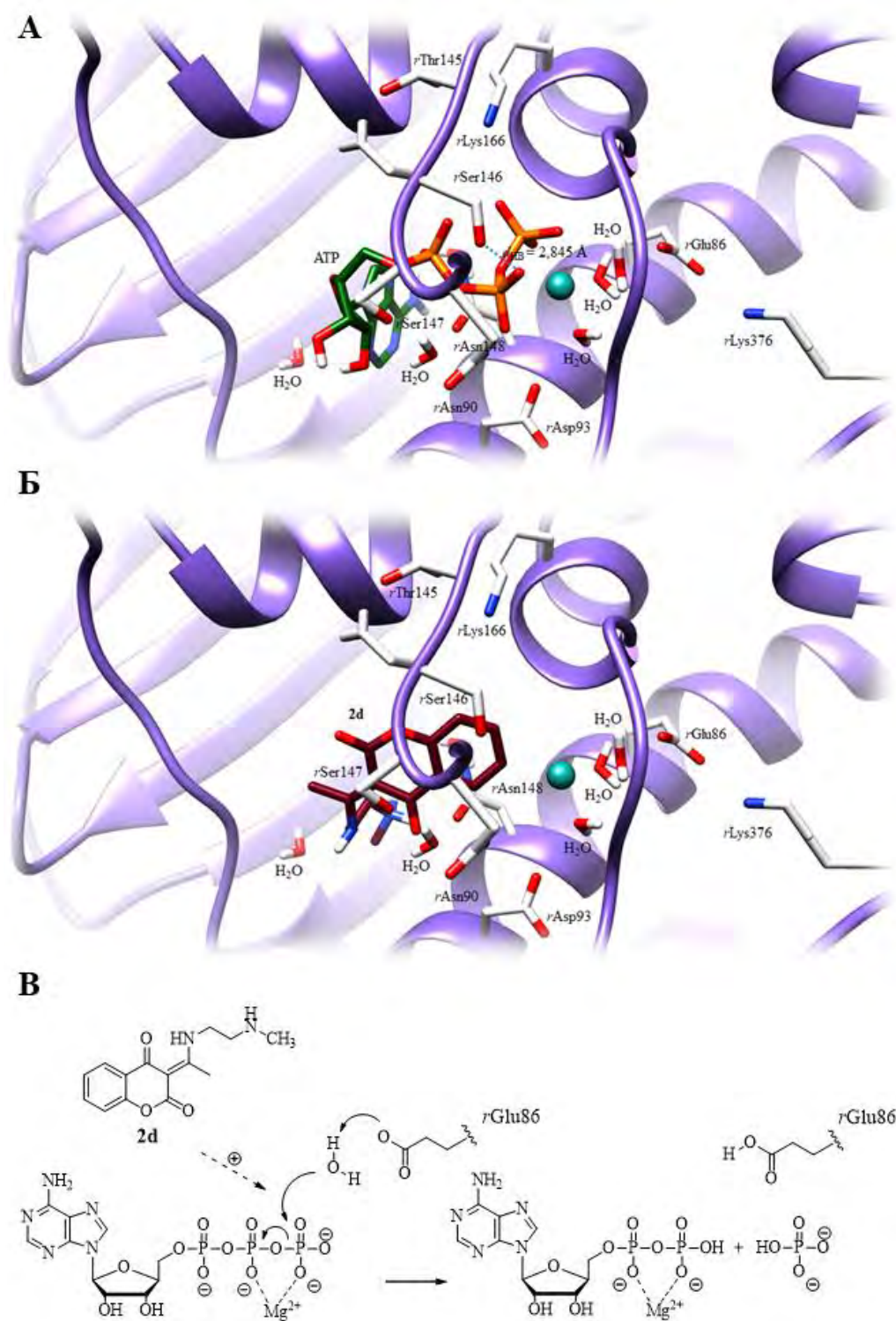
Прстен 4-хидроксикумарина деривата **2g** (Слика 3.49Б) заузима упоредиву конформацију у простору са конформацијом првог хроман-2,4-дионског прстена **2e** (Слика 3.46Б). Тако, лактонски карбонилни угљеник кумаринског језгра лоциран је у близини *rSer147*, док је комплетан остатак диамида сумпорне киселине на положају С3 оријентисан даље од каталитичке аминокиселине, па не може бити укључен у превенцију хидролизе АТР-а (Слика 3.49В). Са друге стране, једињење **2h** (Слика 3.50Б) је димер 4-хидроксикумарина, базиран управо на мосту који чини диамид сумпорне киселине. Упркос интеракцијама које остварује лактонски кисеоник са *rSer147*, односно хидроксилна група на положају С4 кумаринског језгра са *rLys165*, овај дериват је такође генотоксични агенс. Суперпонирање биоактивних конформација **2h** и **2f** открило је да је прво језгро 4-хидроксикумарина **2h** у односу на прво језгро хроман-2,4-диона **2f** ротирано за 45° услед чега је фенил група 4-хидроксикумарина сувише далеко од γ -фосфата АТР, па нема могућности за стерно блокирање хидролизе (Слика 3.50В).



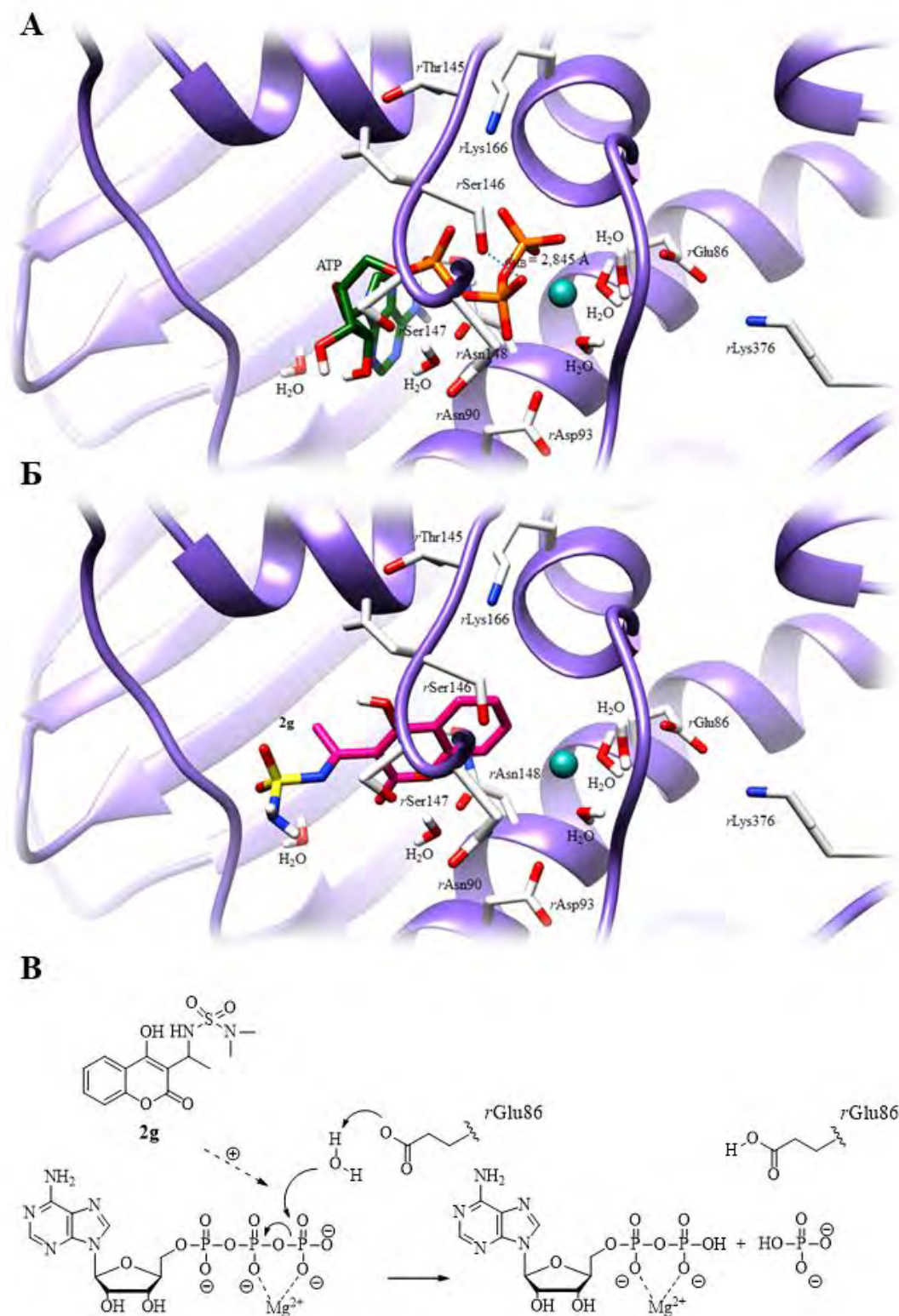
Слика 3.46. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2e** (угљеникови атоми су означени розом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2e**.



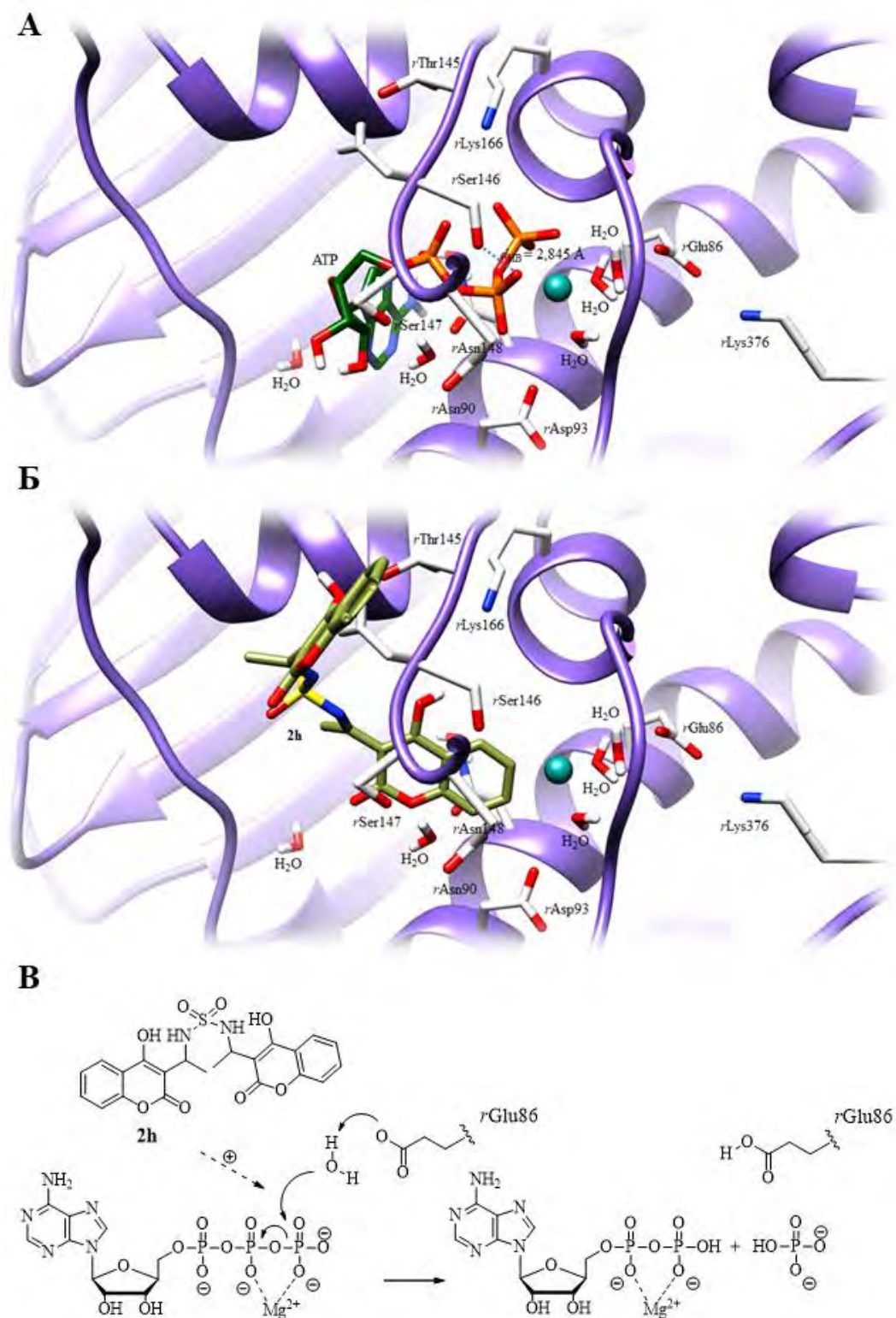
Слика 3.47. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2c** (угљеникови атоми су означени плавом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2c**.



Слика 3.48. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2d** (угљеникови атоми су означени тамно црвеном бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2d**.



Слика 3.49. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРаза (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРаза су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2g** (угљеникови атоми су означени розом бојом) у активном центру *r*АТРаза. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2g**.



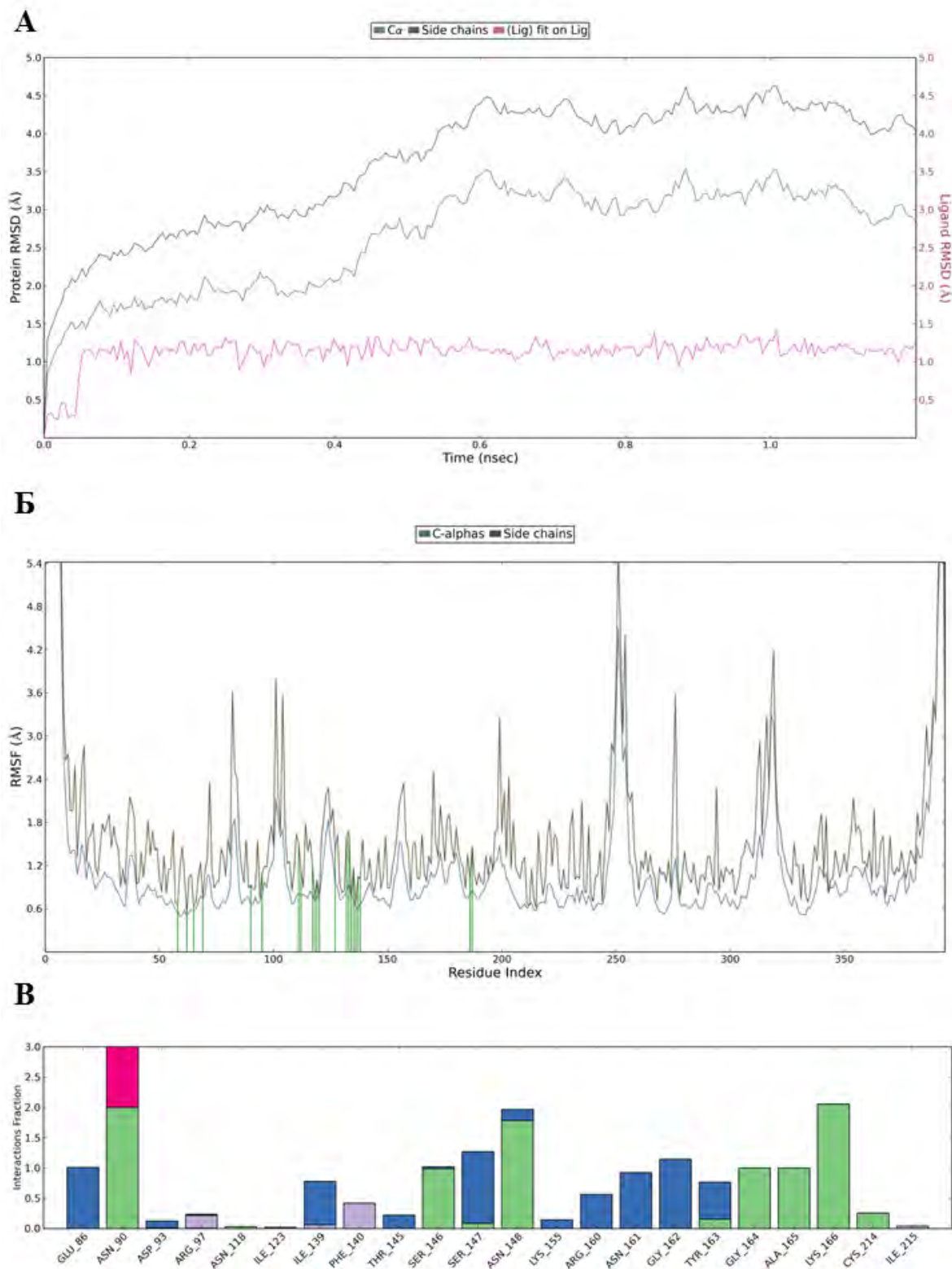
Слика 3.50. (А) Молекулско доковање АТР-а (угљеникови атоми су означени тамно зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе (протеински ланац је означен љубичастом бојом). Аминокиселине *r*АТРазе су представљене белом бојом, а јон Mg^{2+} зеленом бојом. (Б) Молекулско доковање деривата **2h** (угљеникови атоми су означени маслинасто зеленом бојом) у активном центру *r*АТРазе. (В) Предложени механизам хидролизе АТР-а и инхибиције у присуству деривата **2h**.

3.5.5.10. МОЛЕКУЛСКА ДИНАМИКА 2a-, 2b- и 2f-АТР-*rTopII*α КОМПЛЕКСА – ЗАШТО НИЈЕ ДОШЛО ДО РАЗВОЈА КОМЕТА?

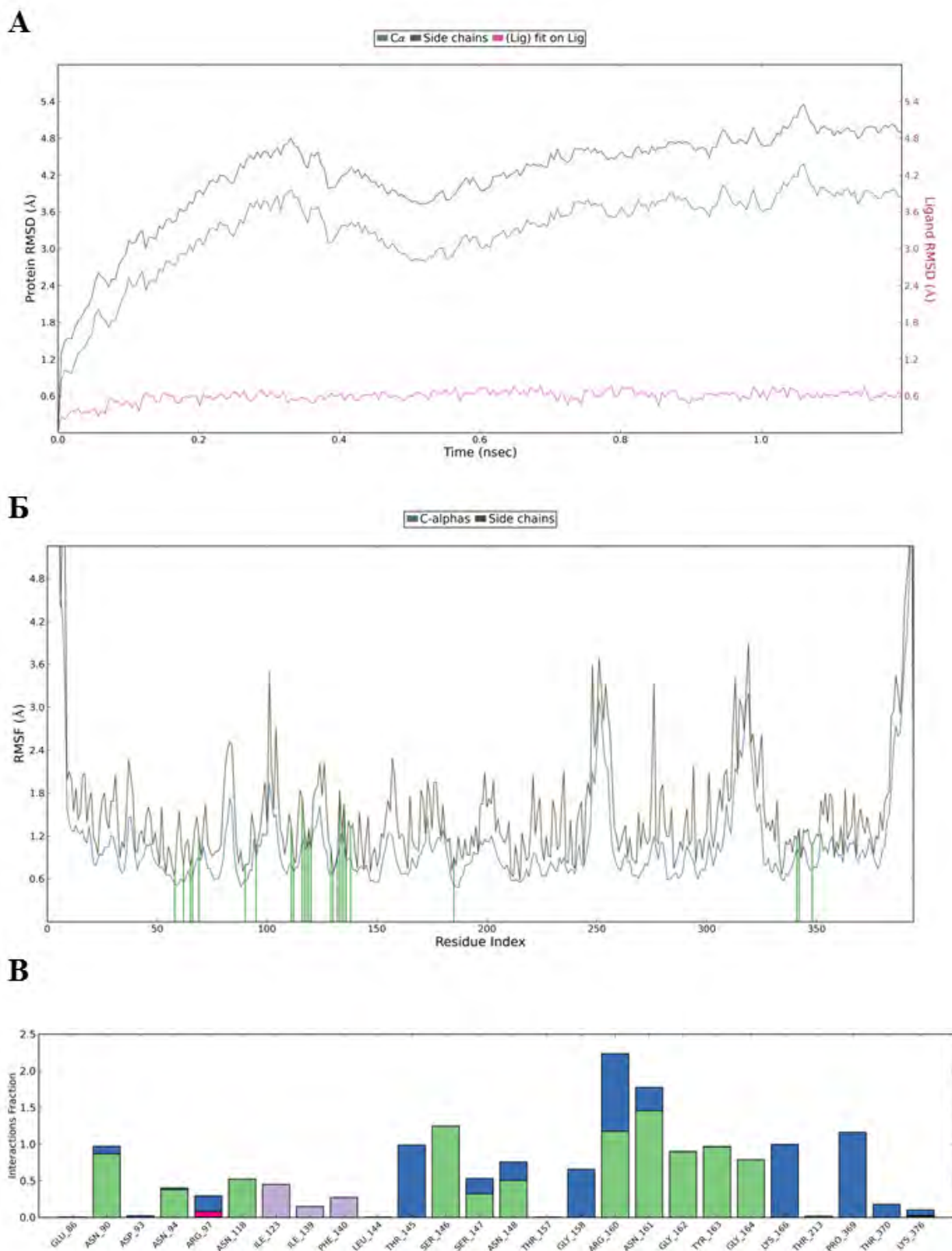
У циљу потврђивања интеракција остварених између АТР-а, испитиваних једињења и ензима, извршена је молекулска динамика комплекса испитиваних једињења са *rTopII*α у присуству АТР-а. Такође, АТР-*rATP*аза комплекс подвргнут је молекулској динамици, да би се потврдила способност ензима да изврши хидролизу овог коензима. Тако, на основу RMSD (Root Mean Square Deviation) вредности, стабилизација АТР-*rATP*аза комплекса почиње од 0,59 ns и остаје стабилна након 0,6 ns током читавог периода симулације од 1,2 ns (Слика 3.51А). Коензим остварује интеракције са свим предвиђеним аминокиселинама у области од 0,668 Å (интеракција са *rGlu86*) до 1,632 Å (Слика 3.51Б) према RMSF (Root Mean Square Fluctuations) вредностима. Хидролиза γ -фосфата АТР-а одвија се киселинско-базним механизмом, катализом у присуству једног молекула воде, где се као каталитичка аминокиселина, односно база у реакцији, појављује *rGlu86*, што је приказано на дијаграму контаката између протеина и лиганда (Слика 3.51В, Филм 1, Прилог 2). Током симулације реакције молекулском динамиком дужина водоничне везе између γ -фосфата и каталитичког молекула воде кретала се у опсегу од 1,560 до 1,860 Å, док је одговарајуће растојање између воде и *rGlu86* било у опсегу од 1,690 до 2,370 Å. Остварене водоничне везе биле су стабилне преко 90% симулационог времена од 1,2 ns. Постојање овакве мреже водоничних веза омогућава хидролизу молекула АТР-а и енергију која се користи за раскидање G-ЕМС двоструке спирале.

Са друге стране, понашање молекула АТР у активном центру у присуству деривата **2a**, **2b** и **2f** дало је јасан увид због чега није дошло до развоја комета када су аплицирана ова једињења. Тако, комплекс **2b**-АТР-*rATP*аза био је стабилан након 0,69 ns према RMSD (Слика 3.52А) и RMSF вредностима (опсег од 0,557 до 1,236 Å; Слика 3.52Б). Током симулације примећено је потпуно одсуство интеракција између АТР-а и *rGlu86* (Слика 3.52В) чиме је потвђена способност **2b** да спречи хидролизу АТР-а. Хидроксилна група **2b**, која је координована за јон Mg^{2+} и од њега просечно удаљена 2,226 Å, везује се за γ -фосфат електростатичким интеракцијама (Филм 2, Прилог 2). Терминална фосфатна група АТР-а такође је везана за Mg^{2+} јон, али је доста удаљена од *rGlu86*, обзиром на измерено растојање од 5,420 Å. Подсећања ради, укупно АТР-*rGlu86* растојање износи од 3,250 до 4,230 Å, на основу чега се закључује да у

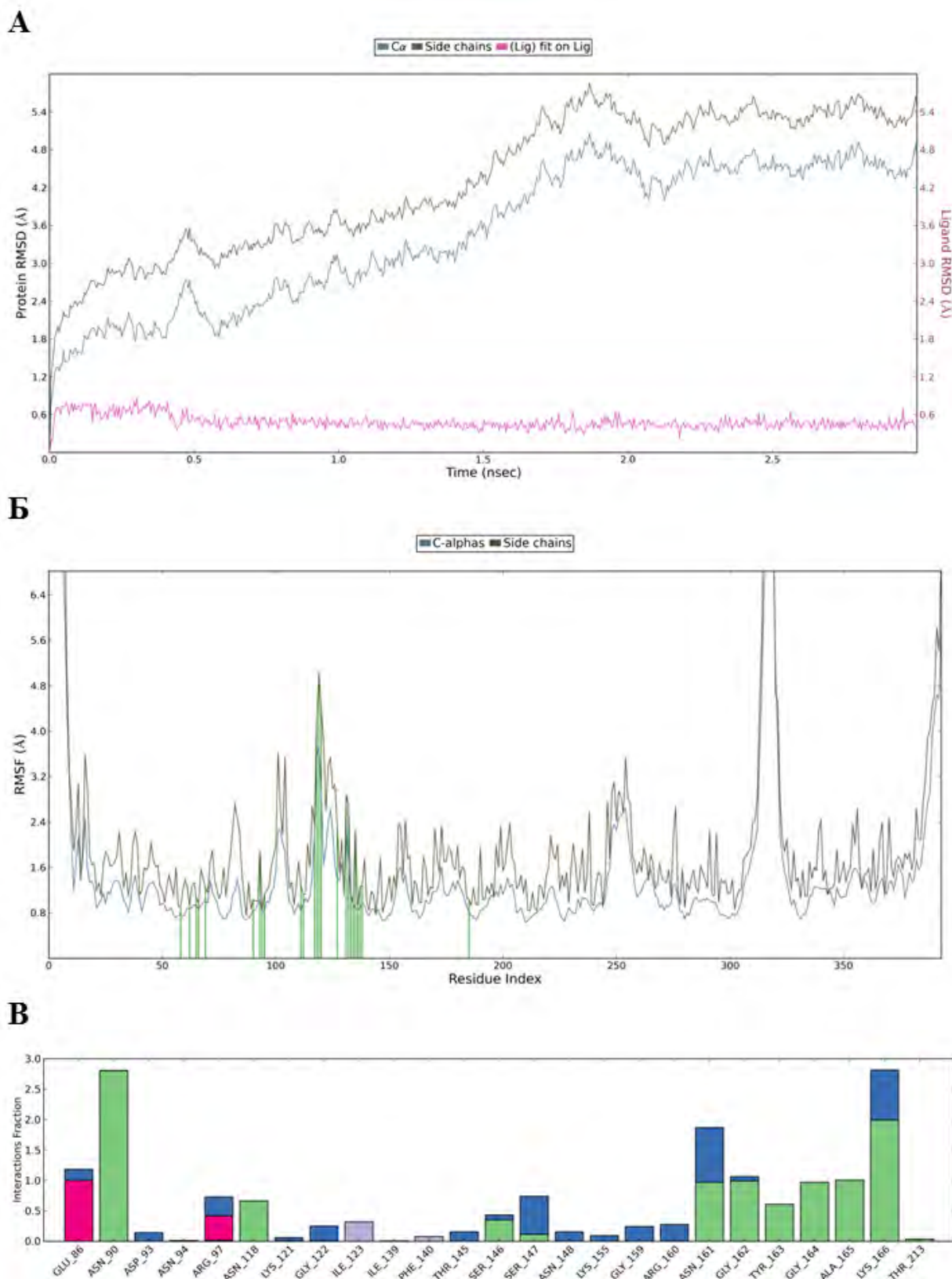
присуству **2b** не постоји директна АТР-Н₂О-*r*Glu86 интеракција и АТР не може бити хидролизован.



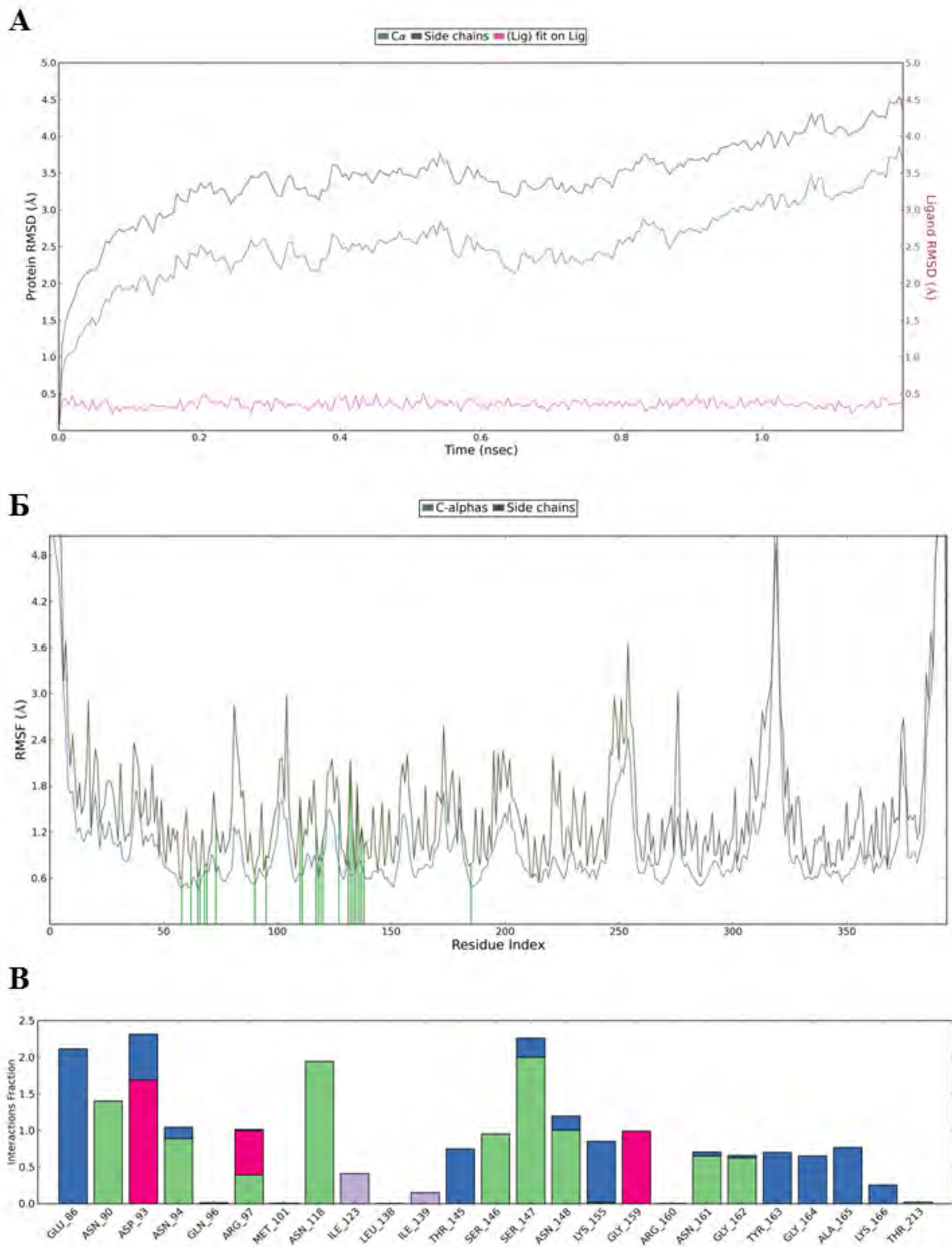
Слика 3.51. (А) RMSD вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ом. (Б) RMSF вредности *r*ТорIIа комплекса са АТР-ом. (В) АТР-*r*ТорIIа дијаграм интеракција. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције, а плаве траке водоничне мостове.



Слика 3.52. (A) RMSD вредности *rTopIIa* комплекса са АТФ-ом у присуству **2b**. (Б) RMSF вредности *rTopIIa* комплекса са АТФ-ому присуству **2b**. (В) АТФ-*rTopIIa* дијаграм интеракција у присуству **2b**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције, а плаве траке водоничне мостове.



Слика 3.53. (А) RMSD вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2f**. (Б) RMSF вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2f**. (В) АТР-*rTopIIa* дијаграм интеракција у присуству **2f**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.



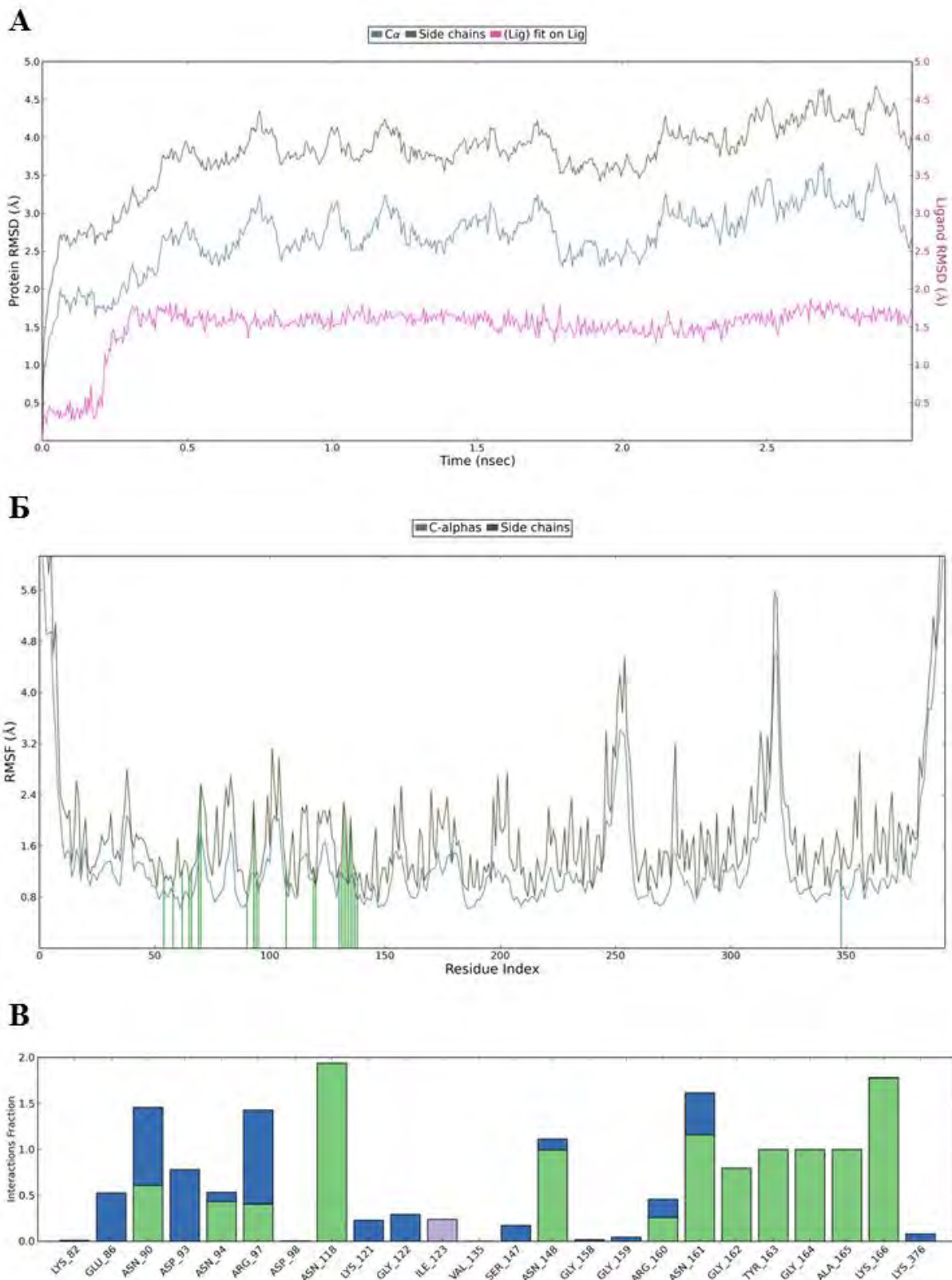
Слика 3.54. (А) RMSD вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2a**. (Б) RMSF вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2a**. (В) АТР-*rTopIIa* дијаграм интеракција у присуству **2a**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.

Симулација комплекса **2f**-АТР-*r*АТРаза морала је бити продужена до 3,0 ns јер моделовани систем није довољно конвергирао, односно није био довољно стабилан након 1,2 ns. Комплекс је постао стабилан тек након 2,20 ns (Слика 3.53А), где су лиганд-ензим интеракције измерене у опсегу од 0,551 до 2,376 Å (Слика 3.53Б). Сам молекул **2f** је током симулације у периоду од 0,14 до 0,35 ns променио своју конформацију у готово линеарну, која је постала значајно удаљена од *r*Glu86, усмерена кроз прстен рибозе молекула АТР (Филм 3, Прилог 2) што у великој мери утиче на кретање коензима. Промена конформације **2f** настала је као последица флексибилног индукованог прилагођавања молекула активном центру *r*АТРаза. Оваква екстремна конформациона промена доводи до одвлачења АТР-а од *r*Glu86 чиме се онемогућава његова хидролиза. Услед поменуте конформационе промене, γ -фосфатна група АТР-а бива удаљена 4,336 Å од најближег молекула воде, а имајући у виду да је растојање између каталитичког молекула воде и *r*Glu86 2,701 Å, закључује се да не постоји могућност настанка γ -P-АТР- H_2O -*r*Glu86 везе и да нема хидролизе (Слика 3.53В).

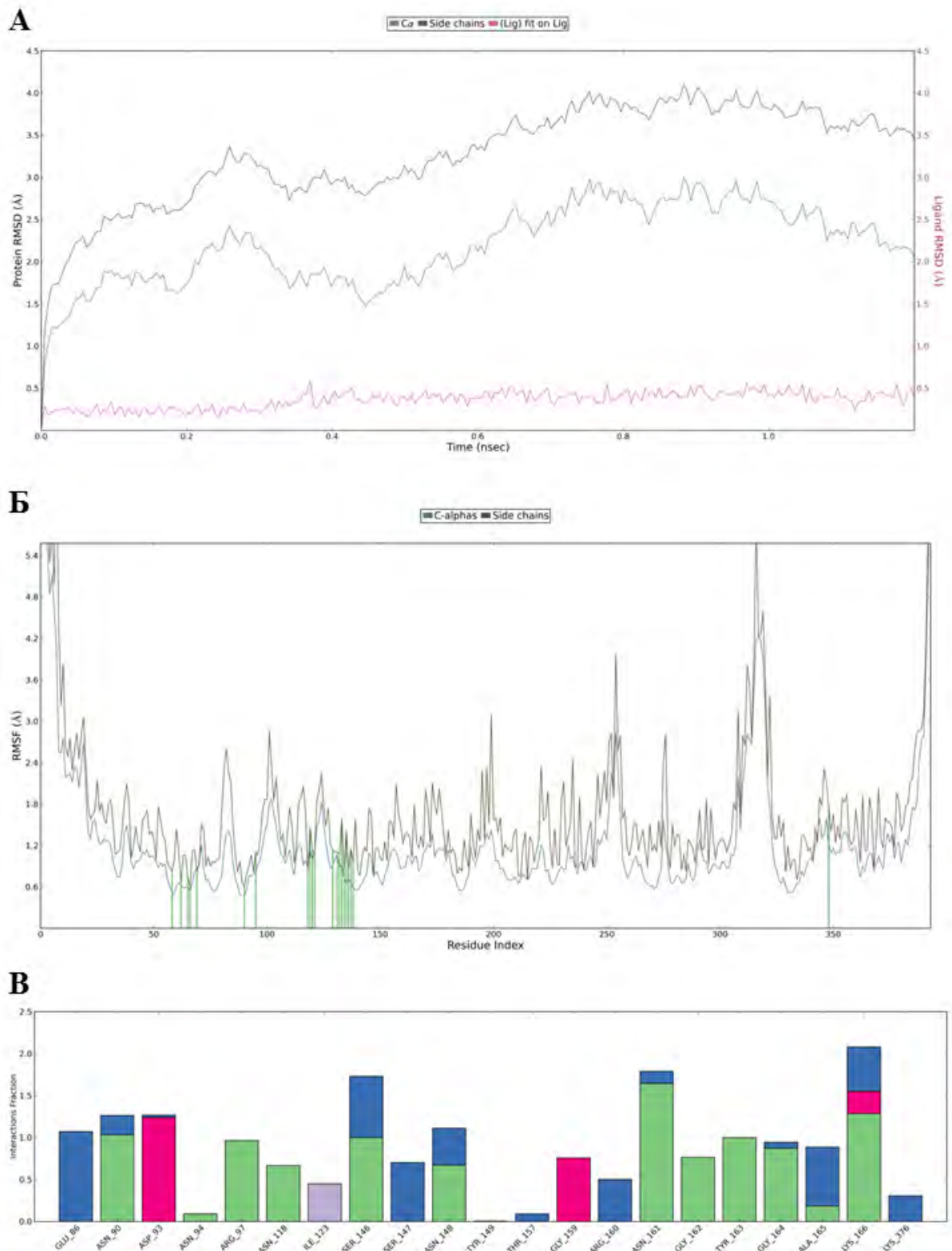
Код равнотежног комплекса **2a**-АТР-*r*АТРаза (Слике 3.54А и 3.54Б), конформација деривата **2a** промењена је у односу на биоактивну конформацију добијену молекулским доковањем, јер је терцијарна терминална аминокиселинска група удаљена од *r*Glu86 и усмерена ка *r*Thr145, при чему се врши стабилизација јаком водоничном везом, дужине 2,428 Å (Филм 4, Прилог 2). Терминална аминокиселинска група стога остварује електростатичке интеракције са γ -фосфатом АТР-а, који сада може дисосовати у присуству каталитичког молекула воде. Захваљујући томе, молекул АТР-а хидролизован је у 50% случајева, што се може објаснити појавом комета класе 3 у узорцима који садрже дериват **2a**. Још једна баријера формирању АТР- H_2O -*r*Glu86 моста јесте метил група деривата **2a** која је позиционирана између γ -фосфата АТР-а и каталитичког молекула воде (Слика 3.54В).

3.5.5.11. МОЛЕКУЛСКА ДИНАМИКА 2c-, 2d-, 2e-, 2g- и 2h-АТР-*r*ТОРIIа КОМПЛЕКСА – ЗАШТО ЈЕ ДОШЛО ДО РАЗВОЈА КОМЕТА?

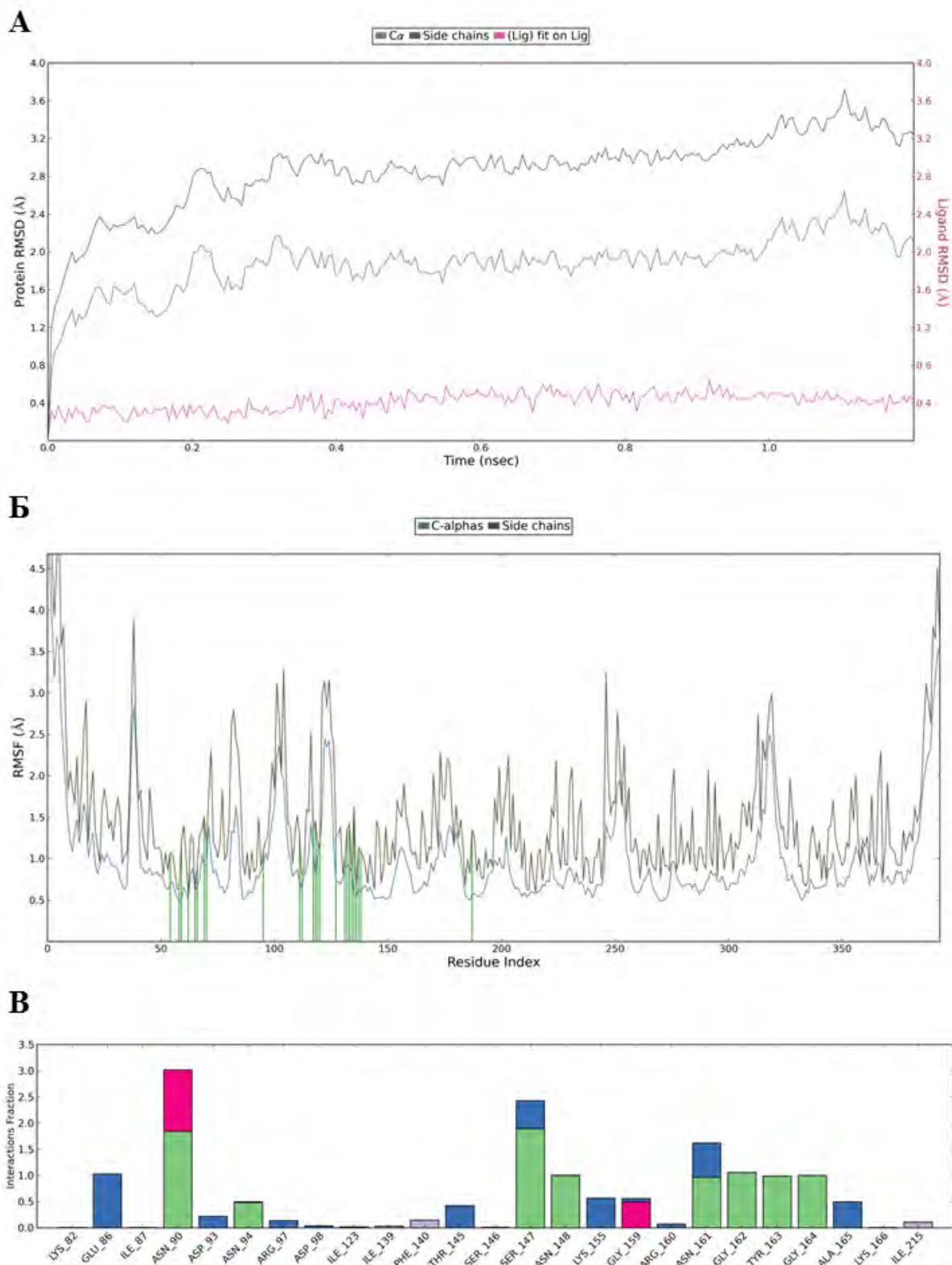
Студије молекулске динамике са успехом су објасниле и фармакологију генотоксичне активности испитиваних деривата, чиме је њихов генотоксични потенцијал са аспекта механизма заокружен (Слике 3.55 до 3.59).



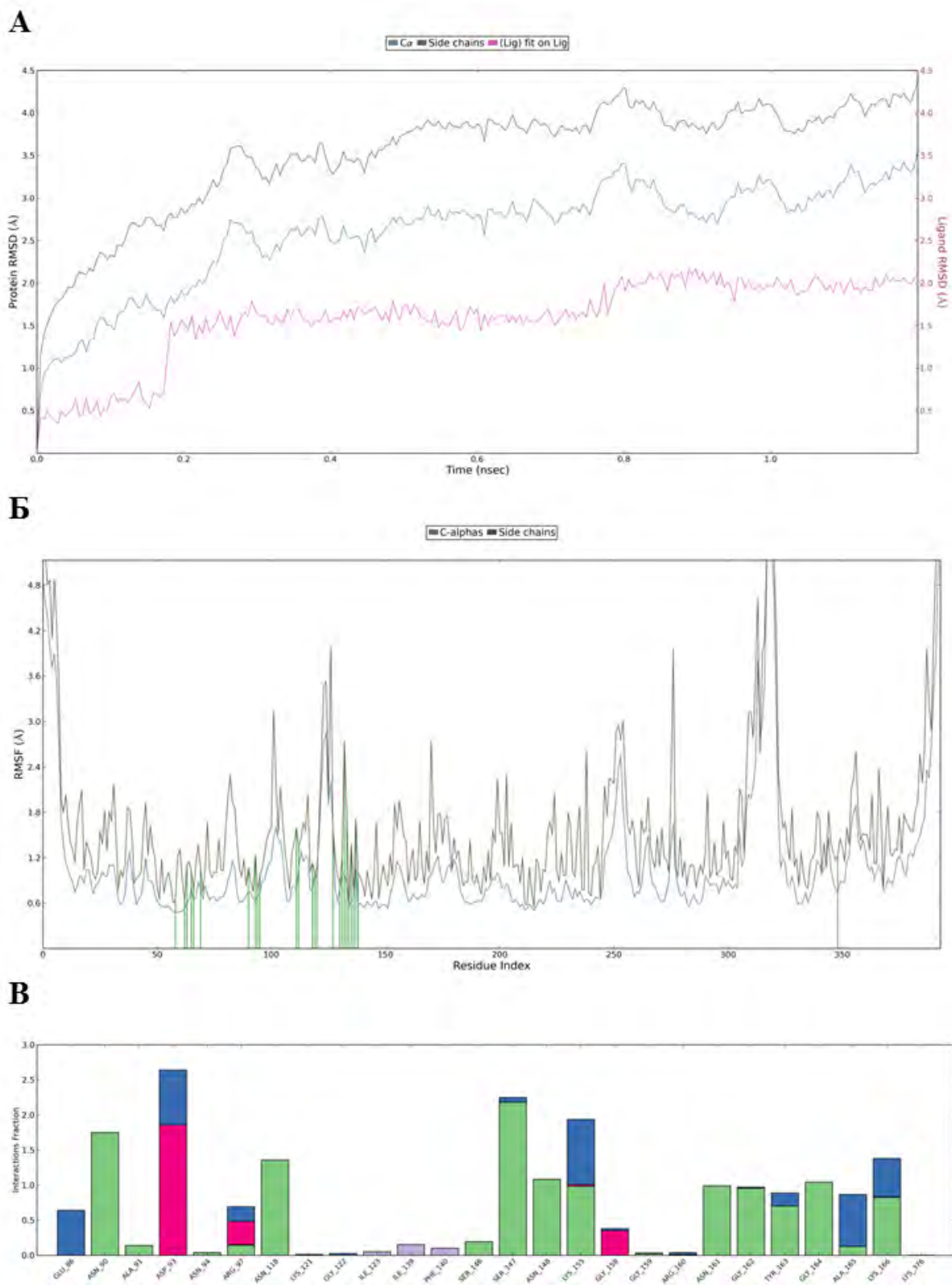
Слика 3.55. (А) RMSD вредности *rTopIIa* комплекса са АТФ-ом у присуству **2e**. (Б) RMSF вредности *rTopIIa* комплекса са АТФ-ом у присуству **2e**. (В) АТФ-*rTopIIa* дијаграм интеракција у присуству **2e**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.



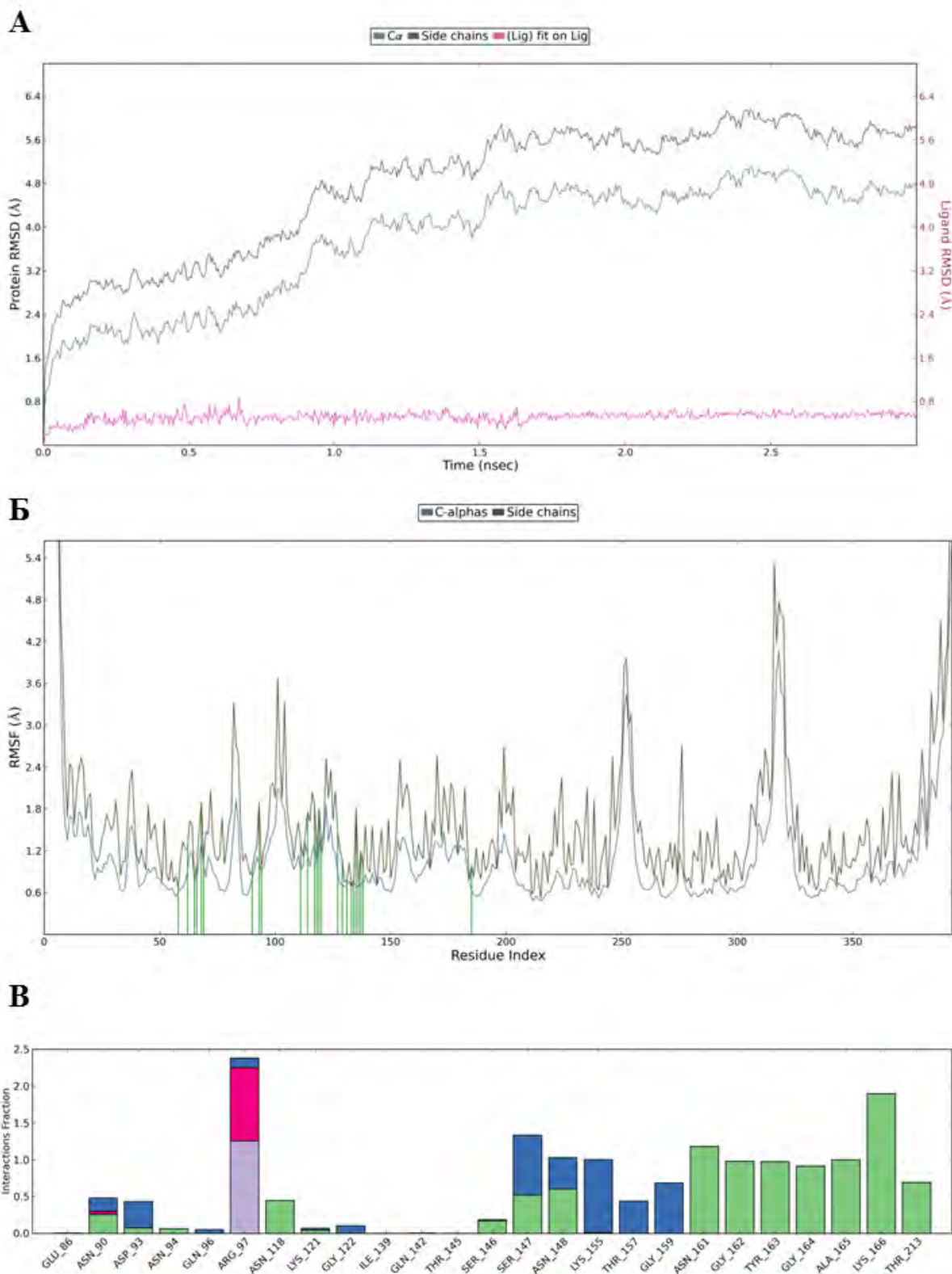
Слика 3.56. (А) RMSD вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2c**. (Б) RMSF вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2c**. (В) АТР-*rTopIIa* дијаграм интеракција у присуству **2c**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.



Слика 3.57. (А) RMSD вредности r TopIIa комплекса са АТР-ом у присуству **2d**. (Б) RMSF вредности r TopIIa комплекса са АТР-ом у присуству **2d**. (В) АТР- r TopIIa дијаграм интеракција у присуству **2d**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.



Слика 3.58. (А) RMSD вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2g**. (Б) RMSF вредности *rTopIIa* комплекса са АТР-ом у присуству **2g**. (В) АТР-*rTopIIa* дијаграм интеракција у присуству **2g**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.



Слика 3.59. (А) RMSD вредности *rTorII α* комплекса са АТФ-ом у присуству **2h**. (Б) RMSF вредности *rTorII α* комплекса са АТФ-ом у присуству **2h**. (В) АТФ-*rTorII α* дијаграм интеракција у присуству **2h**. Зелене траке представљају водоничне везе, љубичасте хидрофобне интеракције, розе јонске интеракције а плаве траке водоничне мостове.

Комплекс **2e**-*r*АТРаза (Слика 3.55А и 3.55Б) такође је стабилизован након 3,0 ns, а анализа резултата помогла је да се разуме генотоксична активност овог деривата. Као и код **2f** (Слика 3.53), структура **2e** дислоцирана је у односу на оригиналну доковану конформацију. Међутим, конформациона промена није толико драстична, те прстен хроман-2,4-диона, који је иницијално био лоциран у близини *r*Glu86, сада прекрива α -фосфат АМР-а. На тај начин ово једињење омогућава да се ипак изврши формирање АТР-Н₂О-*r*Glu86 мреже (Слика 3.55В), те се и дешава хидролиза молекула АТР у току 76% времена симулације (Филм 4, Прилог 2). Током хидролизе, растојање између γ -фосфата АТР-а и *r*Glu86 износило је од 3,15 до 4,31 Å. На сличан начин се понаша и дериват **2h** (Слика 3.59).

Остали деривати, **2c** (Слика 3.56), **2d** (Слика 3.57) и **2g** (Слика 3.58), током процеса молекулске динамике задржали су своје иницијалне конформације добијене молекулским доковањем и били су довољно стабилни да испоље генотоксично деловање. Као што је и предвиђено студијама молекулског доковања, ова једињења дозвољавају хидролизу АТР-а и на тај начин стабилизују G-ЕМС комплекс.

Једињење **2c** изабрано је као представник јер показује сличну активност као и **2d** и **2g**. Комплекс овог једињења био је стабилан након 0,9 ns (Слика 3.56А и Б), а потврда његове генотоксичности јесте постојање водоничних веза унутар АТР-Н₂О-*r*Glu86 мреже (Слика 3.56В, Филм 5), чиме је доказано да ово једињење омогућава хидролизу АТР-а.

3.5.5.12. ДЕКОМПОЗИЦИЈА СЛОБОДНЕ ЕНЕРГИЈЕ ВЕЗИВАЊА ДЕРИВАТА 2a-h ЗА *r*АТРАЗУ

Добијене вредности параметара везивања АТР у присуству или одсуству хроман-2,4-дион инхибитора (Табела 3.23) добро предвиђају могућност хидролизе коензима у активном центру *r*АТРаза. Тако, ниска вредност енергије везивања АТР-а ($\Delta G_{\text{bind}} = -41,24 \text{ kcal/mol}$) указује на то да је коензим слабије стабилизован у активном центру, што омогућава хидролизу. Ипак, присуство антигенотоксичних деривата **2a**, **2b** и **2f** утиче на повећање енергије везивања и ентропије, што указује да у присуству антигенотоксичних агенаса АТР теже успоставља своју биоактивну конформацију. Такође, високе вредности енергије солватације указују да су **2a**, **2b** и **2f** добро стабилизирани у АТР-*r*ТорII α комплексу и да АТР не може савладати баријеру која настаје у присуству антигенотоксичних деривата, па тако нема ни хидролизе. Остали

деривати утичу на додатно смањење енергије везивања, ентропије и енергије солватације система АТР-*r*ТорII α , па се хидролиза коензима несметано одвија.

ТАБЕЛА 3.23. Слободне енергије везивања и индивидуални енергетски услови АТР-*r*ТорII α комплекса са различитим инхибиторима.

Комплекс	$\Delta E_{\text{ele}}^{\text{a}}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{\text{vdw}}^{\text{b}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{solv}}^{\text{b}}$ (kcal/mol)	$-T\Delta S^{\text{r}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{bind}}^{\text{d}}$ (kcal/mol)
АТР- <i>r</i> ТорII α	-53,21±0,31	-17,07±0,63	7,78±0,43	-21,26±0,24	-41,24±0,34
2a -АТР- <i>r</i> ТорII α	-44,89±0,41	-17,79±0,46	8,82±0,52	-14,32±0,32	-39,54±0,22
2b -АТР- <i>r</i> ТорII α	-39,26±0,46	-17,56±0,61	8,86±0,72	-17,24±0,15	-30,72±0,25
2c -АТР- <i>r</i> ТорII α	-51,06±0,52	-21,28±0,05	6,25±0,36	-23,53±0,73	-42,56±0,25
2d -АТР- <i>r</i> ТорII α	-53,24±0,35	-19,09±0,02	5,73±0,69	-22,34±0,32	-44,24±0,76
2e -АТР- <i>r</i> ТорII α	-52,98±0,63	-20,15±0,05	6,36±0,15	-21,53±1,23	-45,24±0,28
2f -АТР- <i>r</i> ТорII α	-41,84±0,47	-21,76±0,73	8,13±0,52	-18,23±0,98	-37,24±0,24
2g -АТР- <i>r</i> ТорII α	-51,32±0,62	-30,08±0,02	6,92±0,47	-26,24±0,25	-48,24±0,25
2h -АТР- <i>r</i> ТорII α	-52,79±0,49	-26,11±0,46	5,35±0,41	-28,31±0,76	-45,24±0,34

^a ΔE_{ele} – Допринос слободне енергије електростичких интеракција; ^b ΔE_{vdw} – Допринос слободне енергије van der Waals-ових интеракција; ^b ΔG_{solv} – Допринос слободне енергије солватације; ^r ΔS – Промена ентропије; ^d ΔG_{bind} – Предвиђене вредности слободне енергије везивања.

Према резултатима приказаним у Табели 3.23, током хидролизе АТР-а преовлађују електростатичке интеракције ($\Delta E_{\text{ele}} = -53,21$ kcal/mol), што је разумљиво јер су бројне водоничне везе и електростатичке интеракције укључене у процес хидролизе. Ипак, најзначајније електростатичке интеракције се не остварују након интеракције деривата **2a**, **2b** и **2f** са АТР-*r*ТорII α комплексом ($\Delta E_{\text{ele}} = -44,89$ kcal/mol, -39,26 kcal/mol, -41,84 kcal/mol), највероватније због спречавања изградње АТР-Н₂О-*r*Glu86 мреже.

3.5.5.13. МЕХАНИЗАМ АНТИГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2a, 2b и 2f и ГЕНОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ДЕРИВАТА 2c, 2d, 2e, 2g и 2h

Резултати спроведених есеја допринели су разумевању на који начин ЕМС испољава своје генотоксично дејство, а деривати **2a**, **2b** и **2f** своје антигенотоксично дејство на нивоу *r*ТорII α . Активност *r*ТорII α иницирана је након структурне модификације G- и T-сегмената ДНК у присуству ЕМС-а, при чему настаје O⁶-етилгуанин као лезија (Слика 3.60, корак 1). По модификацији сегмената, N-терминални домен у отвореној конформацији (Слика 3.60, корак 2)¹⁸⁹ дозвољава G-

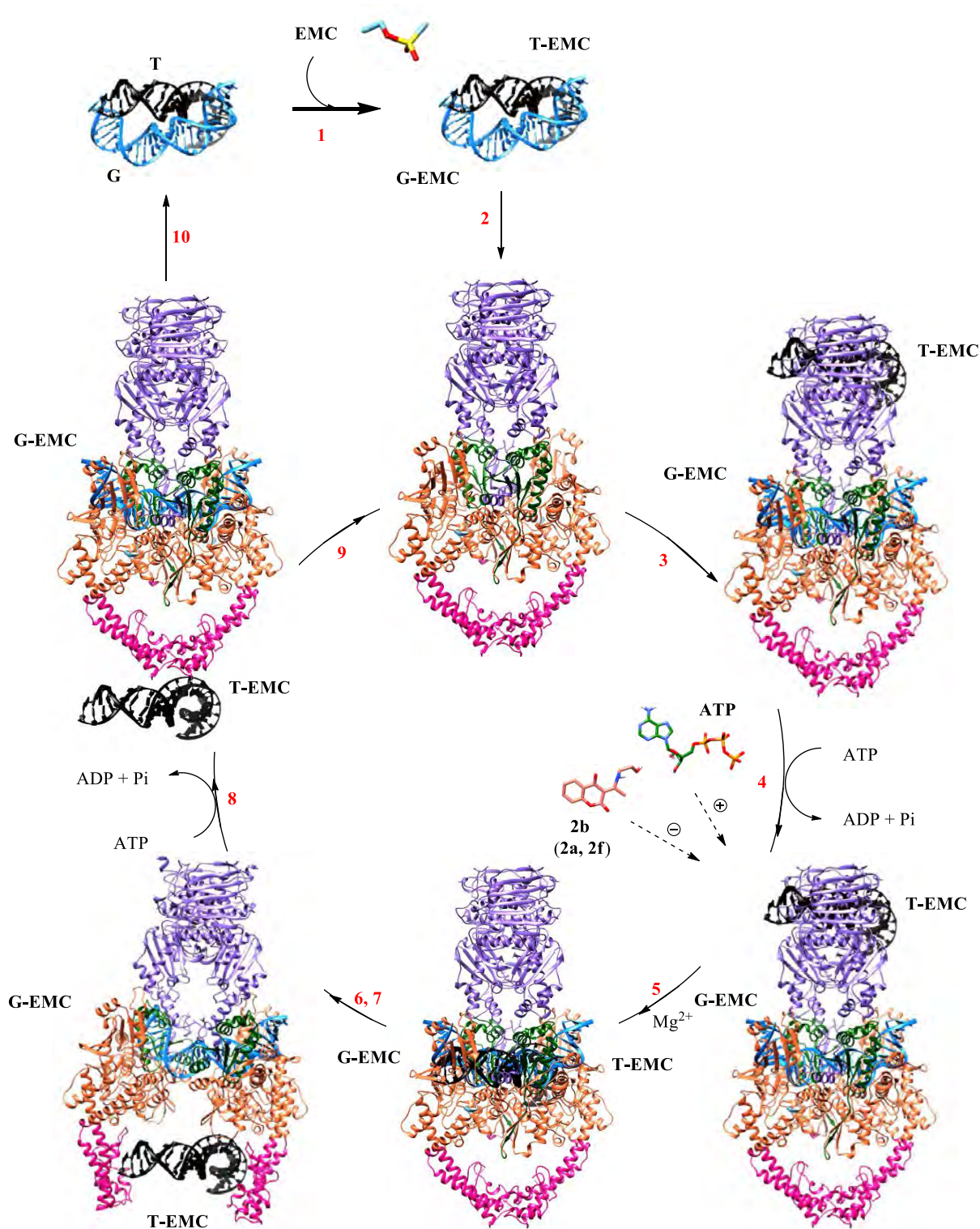
ЕМС сегменту да се инкорпорира унутар ДНК-везујућег и раскидајућег региона, док Т-ЕМС остаје лоциран унутар *r*АТРаза (Слика 3.60, корак 3).¹⁹⁰ Тада се *r*АТРаза домен привремено ротира за приближно 90°, што доводи до димеризације и везивања Т-ЕМС сегмента.¹⁸⁹ Пошто су оба ДНК сегмента везана у АТРаза домену, један молекул АТР-а улази у активни центар и закључава димеризовани АТРаза домен.¹⁸³

У делу циклуса који не укључује везивање **2a**, **2b** и **2f** (Слика 3.60, корак 4), молекул АТР-а бива хидролизован помоћу H₂O-*r*Glu86 мреже.¹⁴¹ АТР не само да омогућава везивање Т-ЕМС и раскидање G-ЕМС сегмента, већ је иницијатор и отварања ДНК-капије.¹⁴⁰ Уколико хидролиза АТР-а није инхибирана, фосфодиестарска веза унутар G-ЕМС сегмента бива стабилизована јоном Mg²⁺ (Слика 3.60, корак 5, Шема 3.6, корак 2).¹⁹¹ Комета се заправо формира након конформационог померања *r*Tyr803, који је у нормалним условима преко 50 Å удаљен од G-ЕМС сегмента.¹⁴⁶ Каталитичка аминокиселина позиционира се на растојању од приближно 6 Å од фосфодиестарске везе. Када се *r*Tyr803 приближи G-ЕМС сегменту (Шема 3.6, корак 2), она напада фосфодиестарку везу са 5'-краја, раскида је и формира фосфо-тирозин интермедијер.¹⁸⁰ На тај начин је омогућено неприродно спаривање O⁶-етилгуанина током процеса ДНК репликације.¹⁸⁸

Сада може доћи до проласка Т-ЕМС сегмента кроз раскинути G-ЕМС хеликс (Слика 3.60, корак 6).¹⁴⁶ За пролазак је потребно да се целокупни Т-ЕМС сегмент ротира за ~ 45° како би се поставио под углом од 90° у односу на G-ЕМС.¹⁸⁹ Док G-ЕМС сегмент подстиче отварање C-капије, *r*Tyr803-G-ЕМС комплекс индукује затварање ове капије, па је тако C-капија затворена пре доласка Т-ЕМС сегмента.¹⁹⁰ Хватање Т-ЕМС сегмента у шупљини између ДНК капије и C-капије подстиче даље отварање и излазак Т-ЕМС-а из *r*TopIIα (Слика 3.60, корак 7).¹⁹⁰ C-капија се затим затвара реверсном ротацијом од 45° АТРаза димера, за коју је потребна енергија друге хидролизе АТР-а (Слика 3.60, корак 8), након чега се поново успоставља почетна структура ензима (Слика 3.60, корак 9).¹⁸⁹ Истовремено, *r*Tyr803-G-ЕМС комплекс је раскинут, структура хеликса је обновљена помоћу ензима тирозил-ДНК фосфодиестеразе 2, Tdp2 (Шема 3.6, корак 3) и G-ЕМС сегмент је отпуштен ван *r*TopIIα (Слика 3.60, корак 10 и Шема 3.6, корак 4).¹⁹²

Једињења **2a**, **2b** и **2f** инхибирају хидролизу АТР-а потребну за физиолошку функцију ензима *r*TopIIα. Ипак, поставља се питање, да ли су ова једињења отрови *r*TopIIα? Резултати ових истраживања показали су да нису. Када би једињења била отрови *r*TopIIα, дошло би до додатне стабилизације *r*TopIIα-G-ЕМС раскидајућег

комплекса и инхибиције религације ДНК пацова, што би се могло квантификовати настанком комета.¹⁹³



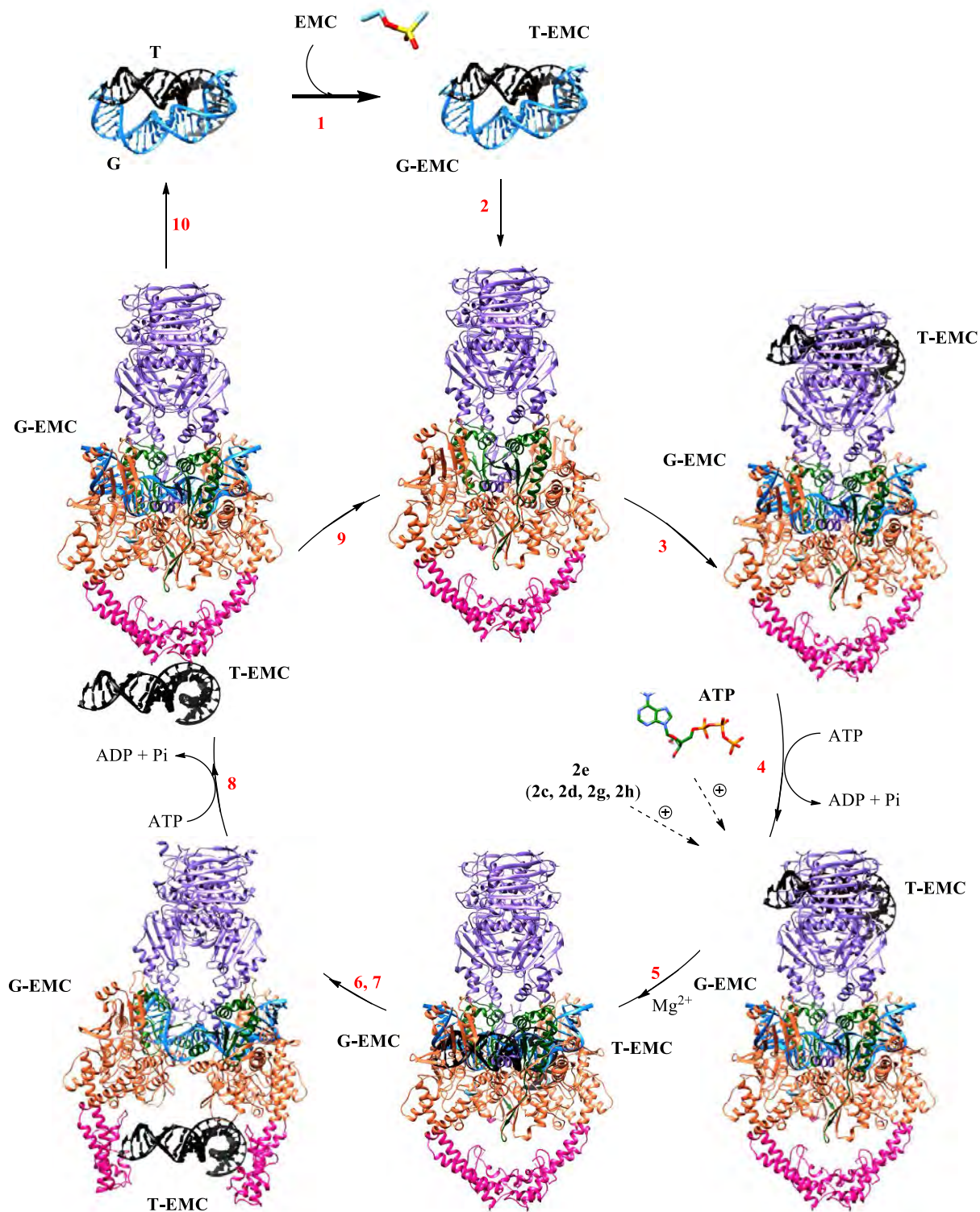
Слика 3.60. Предложени ток катализе *rTopIIa* започет EMC-ом и инхибиран дериватима 2a, 2b и 2f. T-сегмент је означен црном бојом, G-сегмент плавом бојом, N-терминус *rTopIIa* домена љубичастом бојом, TOPRIM област зеленом бојом, WHD корално црвеном бојом, C-капија пинк бојом.

Једини разумљив закључак је да се **2a**, **2b** и **2f** понашају слично мербарону, односно једињењима која се не везују за ДНК, а хидролизу АТР-а инхибирају пре уласка Т-ЕМС сегмента (Слика 3.60, корак 4).¹⁹⁴ Пошто нема интеракције са G-сегментом пре алкилације да би се спречило везивање ЕМС-а, ускраћује се енергија за везивање двоструке спирале ДНК (Слика 3.60, корак 4) и стога спречава настанак оштећења ДНК.¹⁸⁵ Када **2a**, **2b** и **2f** инхибирају хидролизу (Слика 3.60, кораци 5-7), нема дисоцијације G-ЕМС фосфодиестарске везе у присуству *r*Тур803, пролазак Т-ЕМС сегмента је спречен и комете се не стварају. Тада, G-ЕМС и Т-ЕМС сегменти остају заробљени унутар *r*ТорIIа. Настале *O*⁶-етилгуанин лезије, присутне у G-ЕМС и Т-ЕМС сегментима, могу се правилно обновити у присуству *O*⁶-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазе, АГТ (Шема 3.6, корак 2), ускраћујући све шансе за формирање неприродне G=T и T=G водоничне везе.¹⁹⁵ На крају, обновљени G- и Т-сегменти су одбачени од стране *r*ТорIIа.

Са друге стране, генотоксична једињења **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h** не инхибирају хидролизу АТР-а и на тај начин подстичу *r*ТорIIа да се понаша као физиолошки отров. Ова једињења додатно стабилизују *r*ТорIIа-G-ЕМС раскидајући комплекс (Слика 3.61, корак 4) и инхибирају религацију ДНК пацова (Слика 3.61, корак 8), што се и бележи настанком комета.¹⁹³ Пацовска ТорIIа тада постаје антиканцерогени агенс, јер се даљи процес репликације зауставља. Тада, G-ЕМС и Т-ЕМС сегменти такође остају заробљени унутар *r*ТорIIа и могу се репарирати на већ описани начин.

Добијени резултати указују на то да деривати **2a** и **2f**, чија је антикоагулативна активност у концентрацији од 2 mg/kg претходно потврђена, могу бити подвргнути даљим клиничким испитивањима, без опасности да ће утицати на оштећење ДНК након третмана. Дериват **2b**, који не испољава антикоагулативну активност, може се примењивати у антиканцерогеној терапији (у концентрацији 2 mg/kg), као суплемент који контролише процес алкилације и ублажава генотоксично дејство антиканцерогених агенаса.

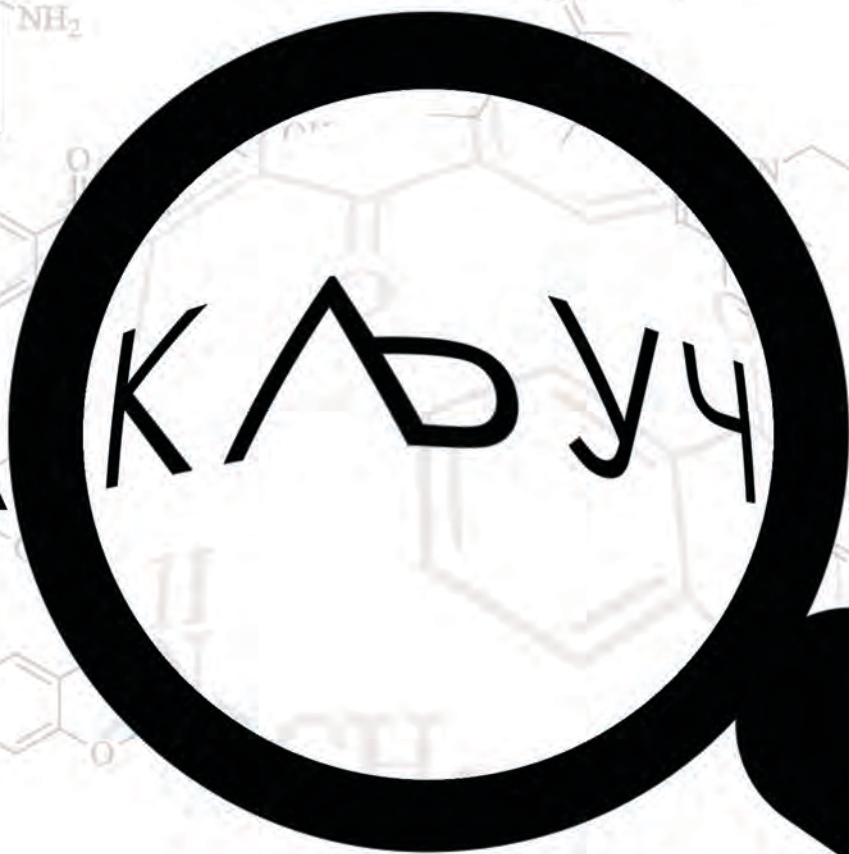
Овим исцрпним експерименталним захватима завршена су претклиничка испитивања серије синтетисаних деривата хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина као антикоагуланата *in vivo*.



Слика 3.61. Предложени ток катализе γ TорПа започет EMC-ом и индукован једињењима 2c, 2d, 2e, 2g и 2h. Т-сегмент је означен црном бојом, G-сегмент плавом бојом, N-терминус γ TорПа домена љубичастом бојом, TOPRIM област зеленом бојом, WHD корално црвеном бојом, C-капија пинк бојом.

4

3 А К В У Ч А К



Предмет испитивања у оквиру приложене докторске дисертације био је дефинисање антикоагулативне активности осам новосинтетисаних деривата хроман-2,4-диона и 4-хидроксикумарина, означених са **2a-h**. Сходно експерименталним резултатима, закључено је да антикоагулативна активност тестираних антагониста витамина К у многоме зависи од фармакокинетичких особина антагониста, проистеклих из интеракције са серумским албумином. Од свих тестираних једињења, једино су за деривате **2a** и **2f** израчунате вредности тачака независних концентрација приближне варфарину, што је указало да се везивање антикоагуланта и деривата **2a** и **2f** за серумски албумин одвија на сличан начин, те да се ова два једињења могу издвојити од осталих као потенцијални антикоагуланти *in vivo*. Ови нови антикоагуланти, након транспорта серумским албумином до ендоплазматичног ретикулима јетре, антагонирају VKORC1. Транспорт једињења **2a** и **2f** помоћу албумина врши се на идентичан начин као и код варфарина, што је потврђено упоређивањем апсорпционих максимума UV-Vis спектра и конформација молекула у ПА субдомену. Ипак, **2a** и **2f** јаче су везани за протеин него варфарин, што се може закључити на основу израчунате константе дисоцијације и афинитета везивања, услед чега долази до смањења концентрације слободних антикоагуланта у крвној плазми и значајно се смањује ризик од унутрашњег крварења.

Након основне евалуације ADMETox особина, констатовано је да **2a** и **2f** поседују повољна претклиничка својства да би се користили као лекови.

Испитивањем антикоагулативне активности у *in vivo* условима, након интраперитонеалног третмана лабораторијских животиња из Wistar соја једињењима **2a-h**, у три различите концентрације (0,5, 1 и 2 mg/kg телесне масе), као потенцијални антикоагуланти *in vivo* издвојили су се деривати **2a** и **2f**, обзиром на висок ниво показане активности у концентрацији од 2 mg/kg телесне масе. Протромбинско време за ове деривате износило је 90 секунди, за **2a**, односно 130 секунди, за **2f**. Издвојени деривати потом су тестирани и као орални антикоагуланти на лабораторијским животињама, у концентрацији од 20 mg/kg телесне тежине, када је третман изведен седам дана узастопно. На основу измерених вредности за протромбинско време, оба једињења показала су добар потенцијал у антагонирању циклуса коагулације крви. Протромбинско време једињења **2a** било је 56,63 секунди, док је за **2f** измерено 60,08 секунди. Добијене INR вредности у распону од 2 до 3 јесу клинички прихватљиве и

препоручују испитивана једињења као лекови приликом лечења атријалне фибрилације, венске тромбозе и механичких срчаних залитета.

Студијама молекулског моделирања на нивоу хомологог модела *Rattus norvegicus* VKORC1 (*r*VKORC1) расветљен је механизам антикоагулативне активности деривата **2a** и **2f**. Тако, молекулским доковањем деривата у активном центру *r*VKORC1 омогућен је јасан увид у структурне аспекте неопходне за активност који су касније потврђени генерисањем CoMFA и CoMSIA 3-D QSAR студија, те 3-D фармакофорним моделом. Сходно експерименталним резултатима, деривати **2a** и **2f** испољавају антикоагулативну активност као реверзибилни антагонисти *r*VKORC1. Из дефинисаних биоактивних конформација може се закључити да **2a** и **2f** своју антикоагулативну активност испољавају након кључне интеракције са аминокиселином из активног центра *r*VKORC1, *r*Cys135, као акцептори водоничне везе, прихватањем протона са сулфхидрилне групе са *r*Cys135. Као акцептор водоничне везе нотира се карбонилни кисеоник на положају C4 хроман-2,4-дионског језгра деривата. Трансфер протона са *r*Cys135 на C4 карбонилни кисеоник хроман-2,4-дионског језгра потврђен је молекулским доковањем, формирањем одговарајуће водоничне везе, затим CoMFA и CoMSIA PLS-кофицијентима, НВА особиним унутар 3-D фармакофорног модела и молекулском динамиком. По редукцији положаја C4 хроман-2,4-дионског језгра, могућа је спонтана интрамолекулска таутомерија до 4-хидроксикумарина и екскреција деривата путем урина већ утврђеним фазама метаболизма. Остала једињења не могу да се редукују овим механизмом, те стога не испољавају антикоагулативну активност. Поред тога, заједнички хроман-2,4-дионски прстен деривата **2f** и **2a** успоставља јаке хидрофобне интеракције са ароматичним језгром *r*Tyr139. Додатна стабилизација деривата **2f** у активном центру огледа се у томе што је *r*Tyr139 позициониран између два хроман-2,4-дионска језгра услед повољног просторног распореда етилендиаминског моста. Описане хидрофобне интеракције такође су потврђене и CoMFA и CoMSIA PLS-кофицијентима, Ну особиним унутар 3-D фармакофорног модела и молекулском динамиком. Додатно, студијама молекулске динамике симулиран је процес генерисања комплекса између деривата **2f** и **2a** и *r*VKORC1 у ћелијској мембрани ендоплазматског ретикулума јетре. Оваквим видом конформационе анализе потврђено је присуство водоничне везе са *r*Cys135 која је кључна за антикоагулативну активност **2f** и **2a**, али је констатовано и формирање веома стабилне водоничне везе између амидног азота *r*Asn142 и C2

карбонилног кисеоника другог језгра хроман-2,4-диона деривата **2f**. Формирање друге водоничне везе може допринети разумевању бољег антикоагулативног потенцијала **2f** у односу на **2a**.

По дефинисању фармакологије испитиваних деривата као антикоагуланата *in vivo*, процењена је токсичност након интраперитонеалног и оралног третмана дериватима **2a-h**, одређивањем степена оштећења јетре и бубрега. Процена оштећења виталних органа извршена је испитивањем биохемијских параметара из серума, попут каталитичке активности ензима аспартат трансминазе (AST), аланин трансминазе (ALT) и алкалне фосфатазе (ALP), концентрације укупних билирубина, односно антиоксидативних параметара, концентрације редукованог глутатиона (GSH), каталитичких активности каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD), и концентрације тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS). Токсиколошке анализе, након интраперитонеалног и оралног третмана лабораторијских животиња потврдиле су да једињења у клиничким условима не изазивају оштећења ткива.

Одсуство значајнијег оштећења на узорцима ткива јетре и бубрега третираним дериватима **2a** и **2f** потврђено је и хистопатолошким анализама. У односу на варфарин, промене на ткивима третираним **2a** и **2f** знатно су мањег интензитета и огледају се у виду инфилтрације лимфоцита, леукоцита и макрофага и минималне фокалне некрозе.

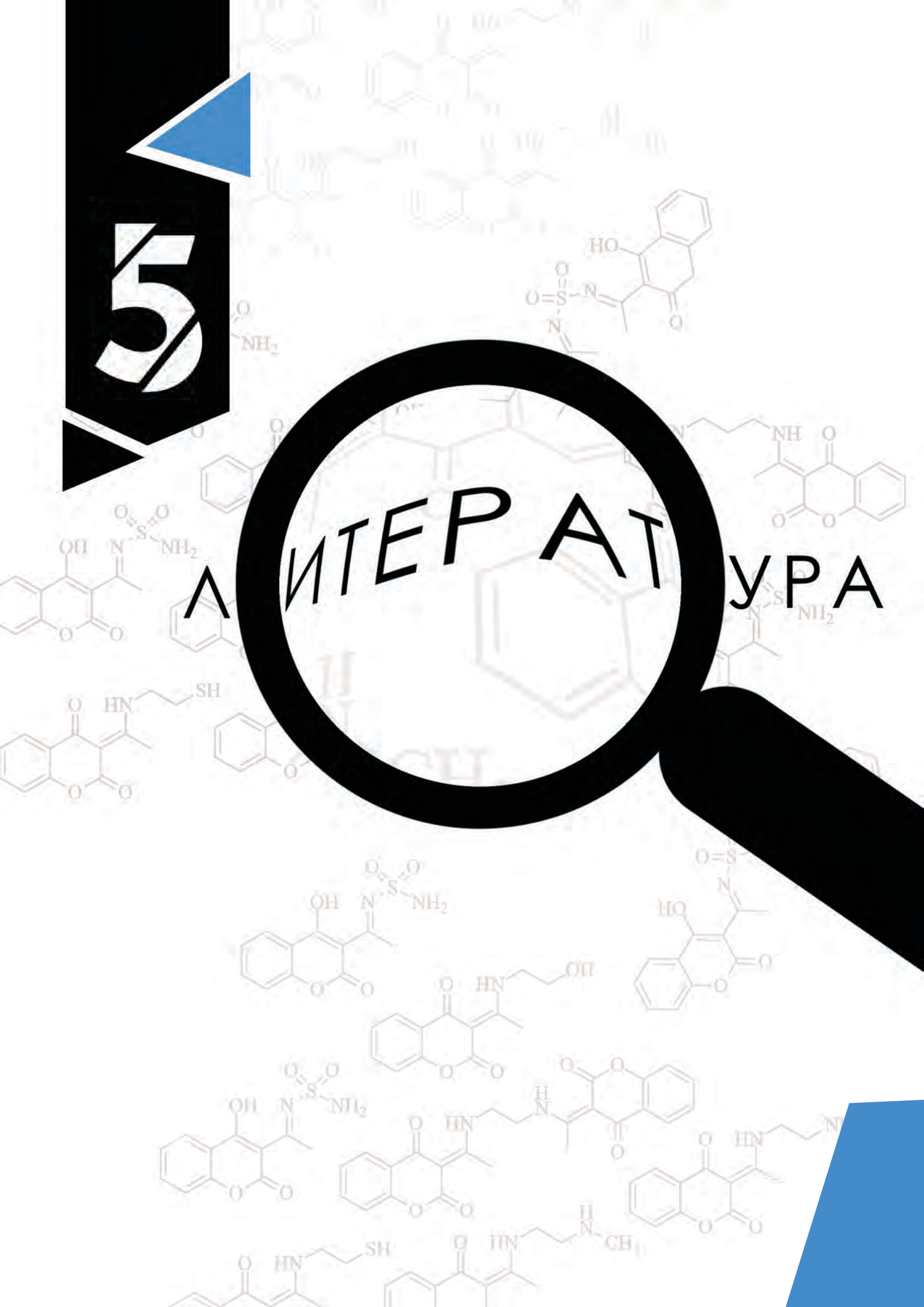
Финална процена токсиколошког профила деривата извршена је на нивоу генома јетре и бубрега, применом комет теста. Од свих тестираних деривата, издвојили су се **2a**, **2b** и **2f** као агенси који нису изазвали оштећења ДНК. Они су даље подвргнути испитивањима антигенотоксичног потенцијала у односу на ЕМС, као доказани мутаген. Како је претретманом дериватима **2a**, **2b** и **2f** дошло до редукције укупног скорa комета насталих дејством ЕМС-а, тако се ови деривати могу сматрати антигенотоксичним агенсима. Ови деривати испољавају свој антигенотоксични ефекат као инхибитори АТРаза субдомена унутар *Rattus norvegicus* Топоизомеразе IIa (*rTopIIa*). Механизам антигенотоксичности потврђен је студијама молекулског доковања и молекулске динамике, те израчунавањем слободне енергије везивања деривата **2a-h** за *r*АТРазу. Сходно испољеној антигенотоксичној активности, доказано је да се једињења **2a** и **2f** могу подвргнути даљим клиничким испитивањима без опасности да ће изазвати оштећења ДНК. Са друге стране, **2b** као једињење без антикоагулативне активности, али са антигенотоксичним ефектом може се користити у

антиканцер терапији алкилирајућим агенсима као контролор степена алкилације. Остала једињења са генотоксичним ефектом **2c**, **2d**, **2e**, **2g** и **2h** такође се могу користити у антиканцер терапији као агенси који активирају цитотоксично деловање ензима *rTopII α* и на тај начин спречавају репликацију, транскрипцију и транслацију, односно последичну биосинтезу протеина ћелија тумора.

Главни резултат екперименталног рада у оквиру израде приложене докторске дисертације јесте представљање широј научној заједници два нова физиолошки активна једињења **2a** и **2f**, који показују изразити потенцијал да након клиничких испитивања постану лекови у хематологији. Опсежне претклиничке студије окарактерисале су фармаколошки и токсиколошки профил ових деривата. У поређењу са клиничким антикоагулантом, варфарином, ова једињења показала су знатно повољнија фармаколошка својства у *in vitro-in vivo-in silico* условима, те се с правом могу сматрати кандидатима за будуће клиничке студије.

5

АНТИТЕРАПІЯ



1. Koračević, D., Bjelaković, G., Đorđević, V. B., Nikolić, J., Pavlović, D. D. *Biohemija* (Savremena administracija, Beograd, 2006).
2. Frelin, C. *Am. Heart J.* **121**, 958–960 (1991).
3. Wieloch, M. *Oral Anticoagulation Treatment in Atrial Fibrillation* (Lund University, 2011).
4. Petrović, M., Dopsaj, V. Rajić, M. *Laboratorijska hematologija* (2002).
5. Kanmura, Y., Itoh, T., Kuriyama, H. *Circ. Res.* **60**, (1987).
6. Huang, Y., Cui, L. J., Dou, Y. H., Wang, Y. L. *Chinese Pharmacol. Bull.* **24**, 1192–1195 (2008).
7. Kahn, M. L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M. J., Ishihara, H., Coughlin, S. R. *J. Clin. Invest.* **103**, 879–87 (1999).
8. Harlos, K., Martin, D. M. A., O'Brien, D. P., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Polikarpov, I., Miller, A., Tuddenham, E. G. D., Boys, C. W. G. *Nature* **370**, 662–666 (1994).
9. Oldenburg, J., Genotype-phenotype Association Studies in Clinically Well-characterised Patients with Inherited Bleeding Disorders, *Cardiovascular Diseases* 1–2.
10. Toso, R., Pinotti, M., High, K. A., Pollak, E. S. Bernardi, F. A. *Biochem. J.* **363**, 411–416 (2002).
11. Banner, D. W. D'Arcy, A., Chène, C., Winkler, F. K., Guha, A. Konigsberg, W. H., Nemerson, Y., Kirchhofer, D. *Nature* **380**, 41–46 (1996).
12. Venkateswarlu, D., Perera, L., Darden, T., Pedersen, L. G. *Biophys. J.* **82**, 1190–1206 (2002).
13. Pathak, M., Wilmann, P., Awford, J., Hamad, C. Li, B. K., Fischer, P. M., Dreveny, I., Dekker, L. V., Emsley, J. *J. Thromb. Haemost.* **13**, 580–591 (2015).
14. Emsley, J., Mcewan, P. A., Gailani, D. *Blood* **115**, 2569–2577 (2010).
15. Huang, M., Furie, B. C., Furie, B. *J. Biol. Chem.* **279**, 14338–14346 (2004).
16. Stoilova-Mcphie, S., Lynch, G. C., Ludtke, S., Pettitt, B. M. *Biopolymers* **99**, 448–459 (2013).
17. Wood, J. P., Silveira, J. R., Maille, N. M., Haynes, L. M., Tracy, P. B. *Blood* **117**, 1710–1718 (2011).

18. Macedo-Ribeiro, S., Bode, W., Huber, R., Quinn-Allen, M. A., Kim, S. W., Ortel, T. L., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Stubbs, M. T., Kane W. H., Fuentes-Prior P. *Nature* **402**, 434–439 (1999).
19. Pozzi, N., Chen, Z., Gohara, D. W., Niu, W., Heyduk, T., Di Cera. E., *J. Biol. Chem.* **288**, 22734–22744 (2013).
20. Yang, Z., Mochalkin, I., Doolittle, R. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14156–61 (2000).
21. Kollman, J. M., Pandi, L., Sawaya, M. R., Riley, M., Doolittle, R. F. *Biochemistry* **48**, 3877–3886 (2009).
22. Komáromi, I., Bagoly, Z., Muszbek, L. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 9–20 (2011).
23. Thomas, A., Biswas, A., Ivaskevicius, V., Oldenburg, J. *Mol. Genet. Genomic Med.* **3**, 258–271 (2015).
24. Biswas, A., Thomas, A., Bevans, C. G., Ivaskevicius, V., Oldenburg, J. *Hum. Mutat.* **34**, 1490–1500 (2013).
25. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry*. (McGraw-Hill Companies, 2003).
26. Furie, B., Furie, B. C. *Blood* **75**, 1753–62 (1990).
27. Suttie, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 459–477 (1985).
28. Little, J. W. New oral anticoagulants: will they replace warfarin? *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **113**, 575–580 (2012).
29. Hirsh, J., Dalen, J. E., Anderson, D. R., Poller, L., Bussey, H., Ansell, J., Deykin, D., Brandt, J. T. *Chest* **114**, 445S–469S (1998).
30. Tie, J., Wu, S. M., Jin, D., Nicchitta, C. V., Stafford, D. W. *Blood* **96**, 973–8 (2000).
31. Wu, S. M., Cheung, W. F., Frazier, D., Stafford, D. W. *Science* **254**, 1634–6 (1991).
32. Li, T., Chang, C. Y., Jin, D. Y., Lin, P. J., Khvorova, A., Stafford, D. W. *Nature* **427**, 541–544 (2004).
33. Rost, S., Fregin, A., Hünerberg, M., Bevans, C. G., Müller, C. R., Oldenburg, J. *Thromb. Haemost.* **94**, 780–6 (2005).
34. Li, W., Schulman, S., Dutton, R. J., Boyd, D., Beckwith, J., Rapoport, T. A. *Nature* **463**, 507–512 (2010).
35. Goodstadt, L., Ponting, C. P. *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 289–292 (2004).

36. Liu, S., Cheng, W., Grider, R. F., Shen, G., Li, W. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
37. Jin, D. Y., Tie, J. K., Stafford, D. W. *Biochemistry* **46**, 7279–7283 (2007).
38. Du, J.-J., Zhan, C.-Y., Lu, Y., Cui, H.-R., Wang, X.-Y. *Front. Plant Sci.* **6**, 238 (2015).
39. Yang, X.-J. Cui, H. R., Yu, Z. B., Du, J. J., Xu, J. N., Wang, X. Y. *Protein Pept. Lett.* **22**, 81–6 (2015).
40. Tie, J.-K., Nicchitta, C., von Heijne, G., Stafford, D. W. *J. Biol. Chem.* **280**, 16410–16416 (2005).
41. Tie, J. K., Jin, D. Y., Stafford, D. W. *J. Biol. Chem.* **287**, 33945–33955 (2012).
42. Schulman, S., Wang, B., Li, W., Rapoport, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15027–15032 (2010).
43. Robertson, H. M. *Genetics* **168**, 1077–1080 (2004).
44. Oldenburg, J., Müller, C. R., Rost, S., Watzka, M., Bevans, C. G. *Hamostaseologie* **34**, 143–159 (2014).
45. Rishavy, M. A., Usabalieva, A., Hallgren, K. W., Berkner, K. L. *J. Biol. Chem.* **286**, 7267–7278 (2011).
46. Tie, J.-K., Jin, D.-Y., Stafford, D. W. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 329–338 (2012).
47. Wajih, N., Hutson, S. M., Wallin, R. *J. Biol. Chem.* **282**, 2626–2635 (2007).
48. Wu, S., Tie, J.-K., Stafford, D. W., Pedersen, L. G. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 112–4 (2014).
49. Mladenović, M., Mihailović, M., Bogojević, D., Vuković, N., Sukdolak, S., Matić, S., Nićiforović, N., Mihailović, V., Mašković, P., Vrvić, M. M., Solujić, S. *Eur. J. Med. Chem.* **54**, 144–158 (2012).
50. Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M. C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M. J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., Pilbout, S., Schneider, M. *Nucleic Acids Res.* **31**, 365–70 (2003).
51. Dowd, P., Hershline, R., Ham, S. W., Naganathan, S. *Science (80-.)*. **269**, 1684–1691 (1995).
52. Dowd, P., Ham, S. W., Geib, S. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7734–7743 (1991).
53. Ham, S. W., Dowd, P. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1660–1661 (1990).
54. Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5939–5941 (1981).

55. Thijssen, H. H., Janssen, Y. P., Vervoort, L. T. *Biochem. J.* **297** (Pt 2), 277–80 (1994).
56. Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Twine, S., East, M., Curry, S. *J. Biol. Chem.* **276**, 22804–22809 (2001).
57. Karlsson, B. C. G., Rosengren, A. M., Andersson, P. O., Nicholls, I. A. *J. Phys. Chem. B.* **111**, 10520–10528 (2007).
58. Tie, J. K., Stafford, D. W. *Vitamins and Hormones* **78**, 103–130 (2008).
59. Fasco, M. J., Principe, L. M., Walsh, W. A., Friedman, P. A. *Biochemistry* **22**, 5655–5660 (1983).
60. Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5421–5423 (1980).
61. Thijssen, H. H. W., Janssen, Y. P. G., Vervoort, L. T. M. *Biochem. J.* **297**, 277–280 (1994).
62. Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5939–5941 (1981).
63. Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C., Watzka, M. *Vitamins and Hormones* **78**, 35–62 (2008).
64. Fasco, M. J., Principe, L. M. *J. Biol. Chem.* **257**, 4894–4901 (1982).
65. Gebauer, M. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2414–2420 (2007).
66. Bevans, C. G. Krettler, C., Reinhart, C., Tran, H., Koßmann, K., Watzka, M., Oldenburg, J. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 4202–4210 (2013).
67. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry* (Oxford, University press, 2009).
68. Dewick, P. M. *Medicinal natural products A biosynthetic approach* (John Wiley & Sons, 2001).
69. Liang, C. Jiang, H., Zhou, Z., Lei, D., Xue, Y., Yao, Q. *Molecules* **17**, 14146–14158 (2012).
70. Jashari, A. Imeri, F., Ballazhi, L., Shabani, A., Mikhova, B., Dräger, G., Popovski, E., Huwiler, A. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 2655–2661 (2014).
71. Mohamed, F. K. Soliman, A. Y., Abdel-Motaleb, R. M., Abdel-Rahman, R. M., Abdel-Mohsen, A. M., Fouda, M. M. G., Al Deyab, S. S., Mohamed, A. S. *Life Sci. J.* **10**, 840–845 (2013).

72. Cagide, F. Silva, T., Reis, J., Gaspar, A., Borges, F., Gomes, L. R., Low, J. N. *Chem. Commun.* **51**, 2832–2835 (2015).
73. Adhami, H. R., Lutz, J., Kählig, H., Zehl, M., Krenn, L. *Sci. Pharm.* **81**, 793–805 (2013).
74. Abdou, M. M., El-Saeed, R. A., Bondock, S. *Arab. J. Chem.* (2015).
75. Stanković, N., Mladenović, M., Mihailović, M., Arambašić, J., Uskoković, A., Stanković, V., Mihailović, V., Katanić, J., Matić, S., Solujić, S., Vuković, N., Sukdolak, S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **55**, (2014).
76. Małecka, M., Grabowski, S. J., Budzisz, E. *Chem. Phys.* **297**, 235–244 (2004).
77. Budzisz, E., Brzezinska, E., Krajewska, U., Rozalski, M. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 597–603 (2003).
78. Sukdolak, S., Solujić, S., Manojlović, N., Krstić, L. J. *Chemical Papers-Slovak Academy of Sciences* **59**, 37–40 (2005).
79. Li, Q. Yang, W-y., Qu, L-l., Qi, H-Y., Huang, Y., Zhang, Z. *J. Spectrosc.* **2014**, (2014).
80. Patel, D., Rahman, S., Savva, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 858–863 (2013).
81. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680 (1994).
82. Burke, T. G., Mi, Z. *J. Med. Chem.* **37**, 40–6 (1994).
83. Sivakumar, B., Thakur, R., Kunadharaju, S., Savva, M. *Curr. Phys. Chem.* **1**, 140–151 (2011).
84. Yang, F. Bian, C., Zhu, L., Zhao, G., Huang, Z., Huang, M. *J. Struct. Biol.* **157**, 348–355 (2007).
85. Olsen, H., Andersen, A., Nordbö, A., Kongsgaard, U. E., Börner, O. P. *BMC Clin. Pharmacol.* **4**, (2004).
86. Borgå, O., Borgå, B. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **25**, 63–77 (1997).
87. Wong, Y. W., Davis, P. J. *J. Chromatogr.* **469**, 281–91 (1989).
88. Scatchard, G. T. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 (1949).
89. Goldstein, A., Aronow, L., Kalman, S. M. *Molecular mechanisms of drug action, in: Principles of Drug Action.* (Jonh Wiley & Sons Inc, 1974).

90. Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Twine, S., East, M., Curry, S. *J. Biol. Chem.* **276**, 22804–9 (2001).
91. Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpa, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., Curry, S. *J. Mol. Biol.* **353**, 38–52 (2005).
92. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D.M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
93. Case, D. A., Darde, T. A., Cheatham III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Merz, K. M., Pearlman, D. A., Crowley, M., Walker, R. C., Zhang, W., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Wong, K. F., Paesani, F., Wu, X., Brozell, S., Ts, M., D. H., Schafmeister, C., Ross, W. S., Kollman, P. A. *Amber 9. (Univ. California, San Francisco, 2006)*.
94. Morris, G. M. Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
95. Trott, O., Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2010).
96. Lang, P. T. Brozell, S. R., Mukherjee, S., Pettersen, E. F., Meng, E. C., Thomas, V., Rizzo, R. C., Case, D. A., James, T. L., Kuntz, I. D. *RNA* **15**, 1219–1230 (2009).
97. Ferrin, T. E., Huang, C. C., Jarvis, L. E., Langridge, R. *J. Mol. Graph.* **6**, 13–27 (1988).
98. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., Ferrin, T. E. *J. Mol. Biol.* **161**, 269–288 (1982).
99. Bolognesi, M. L., Andrisano, V., Bartolini, M., Banzi, R., Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **48**, 24–27 (2005).
100. DesJarlais, R. L. Sheridan, R. P., Seibel, G. L., Dixon, J. S., Kuntz, I. D., Venkataraghavan, R. *J. Med. Chem.* **31**, 722–729 (1988).
101. Ewing, T. J. A., Makino, S., Skillman, A. G., Kuntz, I. D. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **15**, 411–428 (2001).
102. Hollick, J. J., Rigoreau, L. J., Cano-Soumillac, C., Cockcroft, X., Curtin, N. J., Frigerio, M., Golding, B. T., Guiard, S., Hardcastle, I. R., Hickson, I. Hummersone, M. G., Menear, K. A., Martin, N. M., Matthews, I., Newell, D. R., Ord, R., Richardson. C. J., Smith, G. C., Griffin, R. J. *J. Med. Chem.* **50**, 1958–1972 (2007).
103. Warren, J. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **71**, 497–503 (2011).
104. Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L. *Mutagenesis* **19**, 51–59 (2004).

105. Zhang, Y., Liu, H., Jiao, Y., Yuan, H., Wang, F., Lu, S., Yao, S., Ke, Z., Tai, W., Jiang, Y., Chen, Y., Lu, T. *Mol. Divers.* **16**, 787–802 (2012).
106. Kataranovski, M., Živanović, J., Vranković, J., Mirkov, I., Kataranovski, D. *Arch. Biol. Sci* **59**, 53–54 (2007).
107. Quick, A. J., Stanley-Brown, M., Bancroft, F. W. *Am. J. Med. Sci.* **190**, 501–511 (1935).
108. Bergmeyer, H. U., Horder, M., Moss, D. W. P. *Clinical Chemistry* **24**, 720–721 (1978).
109. Bergmeyer, H. U. *Clin. Chim. Acta* **105**, 147–154 (1980).
110. Bergmeyer, H. U., Hørder, M. *Clin. Chim. Acta* **105**, 147–172 (1980).
111. Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Clerc-Renaud, P., Ferrero, C., Féraud, G., Franck, P., Gella, F., Hoelzel, W., Jørgensen, P., Kanno, T., Kessner, A., Klauke, R., Kristiansen, N., Lessinger, J., Linsinger, T., Misaki, H., Panteghini, M., Pauwels, J., Schimmel, H., Vialle, A., Weidemann, G., Siekmann, L. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, 734–738 (2002).
112. Jendrassik, L., Gróf, P. *Biochem. Zeitschrift.* **297**, 82–89 (1938).
113. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. *Anal. Biochem.* **95**, 351–358 (1979).
114. Goth, L. *Clin. Chim. Acta* **196**, 143–151 (1991).
115. Misra, H. P., Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **247**, 3170–3175 (1972).
116. Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77 (1959).
117. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. *J. Biol. Chemistry* **193**, 265–275 (1951).
118. Coakes, S. J., Steed, L., Price, J. *SPSS: Analysis Without Anguish; version 15.0 for Windows. SPSS for Windows 270* (2008).
119. Chothia, C., Lesk, A. M. *EMBO J.* **5**, 823–6 (1986).
120. Kopp, J., Schwede, T. *Nucleic Acids Res.* **32**, D230-4 (2004).
121. Laskowski, R. A., MacArthur, M. A., Moss, D. S., Thornton, J. M. *J. App. Cryst* **26**, 283–291 (1993).
122. Pedretti, A., Villa, L., Vistoli, G. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **18**, 167–173 (2004).

123. Zhang, Y., Sham, Y. Y., Rajamani, R., Gao, J., Portoghese, P. S. *ChemBioChem* **6**, 853–859 (2005).
124. Mohamadi, F., Richards, N. G. J., Guida, W. C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T., Still, W. C. *J. Comput. Chem.* **11**, 440–467 (1990).
125. Ragno, R., Simeoni, S., Rotili, D., Caroli, A., Botta, G., Brosch, G., Massa, S., Mai, A. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 621–632 (2008).
126. Wolber, G., Langer, T. *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 160–169 (2005).
127. Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **339**, 37–59 (1995).
128. Anderson, D., Yu, T. W., McGregor, D. B. *Mutagenesis* **13**, 539–555 (1998).
129. Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E., Banath, J. P. *Radiat. Res.* **122**, 86 (1990).
130. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191 (1988).
131. Cotelle, S., Féraud, J. F. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **34**, 246–255 (1999).
132. Матић, С. *Докторска дисертација* (Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, 2014).
133. Oshida, K., Iwanaga, E., Miyamoto-Kuramitsu, K., Miyamoto, Y. *J. Toxicol. Sci.* **33**, 515–524 (2008).
134. Sekihashi, K., Yamamoto, A., Matsumura, Y., Ueno, S., Watanabe-Akanuma, M., Kassie, F., Knasmüller, S., Tsuda, S., Sasaki, Y. F. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **517**, 53–75 (2002).
135. Collins, A. R. *Mol. Biotechnol.* **26**, 249–261 (2004).
136. Manoharan, K., Banerjee, M. R. *Cell Biol. Int. Rep.* **9**, 783–789 (1985).
137. Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F., Brockman, H. E. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **238**, 57–85 (1990).
138. Agudelo, D., Bourassa, P., Bérubé, G., Tajmir-Riahi, H. A. *Int. J. Biol. Macromol.* **66**, 144–150 (2014).
139. Rowlands, M. G. Newbatt, Y. M., Prodromou, C., Pearl, L. H., Workman, P., Aherne, W. *Anal. Biochem.* **327**, 176–183 (2004).

140. Wendorff, T. J., Schmidt, B. H., Heslop, P., Austin, C. A., Berger, J. M. *J. Mol. Biol.* **424**, 109–124 (2012).
141. Wei, H., Ruthenburg, A. J., Bechis, S. K., Verdine, G. L. *J. Biol. Chem.* **280**, 37041–37047 (2005).
142. Classen, S., Olland, S., Berger, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10629–10634 (2003).
143. Schmidt, B. H., Osheroff, N., Berger, J. M. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1147–1154 (2012).
144. Stanger, F. V., Dehio, C., Schirmer, T. *PLoS One* **9**, (2014).
145. Bax, B. D., Chan, P. F., Eggleston, D. S., Fosberry, A., Gentry, D. R., Gorrec, F., Giordano, I., Hann, M. M., Hennessy, A., Hibbs, M., Huang, J., Jones, E., Jones, J., Brown, K. K., Lewis, C. J., May, E.W., Saunders, M. R., Singh, O., Spitzfaden, C. E., Shen, C., Shillings, A., Theobald, A. J., Wohlkonig, A., Pearson, N. D., Gwynn, M. N. *Nature* **466**, 935–940 (2010).
146. Schmidt, B. H., Burgin, A. B., Deweese, J. E., Osheroff, N., Berger, J. M. *Nature* **465**, 641–644 (2010).
147. Miles, T. J., Hennessy, A. J., Bax, B., Brooks, G., Brown, B. S., Brown, P., Cailleau, N., Chen, D., Dabbs, S., Davies, D. T., Esken, J. M., Giordano, I., Hoover, J. L., Huang, J., Jones, G. E., Sukmar, S. K., Spitzfaden, C., Markwell, R. E., Minthorn, E. A., Rittenhouse, S., Gwynn, M. N., Pearson, N. D. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **23**, 5437–5441 (2013).
148. Singh, S. B., Kaelin, D. E., Wu, J., Miesel, L., Tan, C. M., Meinke, P. T., Olsen, D., Lagrutta, A., Bradley, P., Lu, J., Patel, S., Rickert, K. W., Smith, R. F., Soisson, S., Wei, C., Fukuda, H., Kishii, R., Takei, M., Fukuda, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 609–614 (2014).
149. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, G. T., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
150. Martí-Renom, M., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Sali, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291–325 (2000).
151. Van Dijk, M., Bonvin, A. M. J. *J. Nucleic Acids Res.* **37**, (2009).
152. Musmuca, I., Caroli, A., Mai, A., Kaushik-Basu, N., Arora, P., Ragno, R. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 662–676 (2010).

153. Hayes, J. M., Skamnaki, V. T., Archontis, G., Lamprakis, C., Sarrou, J., Bischler, N., Skaltsounis, A. L., Zographos, S. E., Oikonomakos, N. G. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **79**, 703–719 (2011).
154. Rodríguez, S. A., Nazareno, M. A., Baumgartner, M. T. *Bioorganic Med. Chem.* **19**, 6233–6238 (2011).
155. Satyanarayana, V. S. V., Sreevani, P., Sivakumar, A., Vijayakumar, V. *Arkivoc* **2008**, 221–233 (2008).
156. Karali, N., Kocabalkanli, A., Gürsoy, A., Ateş, O. *Farmaco* **57**, 589–93 (2002).
157. Reddy, N. S., Mallireddigari, M. R., Cosenza, S., Gumireddy, K., Bell, S. C., Reddy, E. P., Reddy, M. V. R. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **14**, 4093–4097 (2004).
158. Au, N., Rettie, A. E. *Drug Metabolism Reviews* **40**, 355–375 (2008).
159. Khoobi, M., Foroumadi, A., Emami, S., Safavi, M., Dehghan, G., Alizadeh, B. H., Ramazani, A., Ardestani, S. K., Shafiee, A. *Chem. Biol. Drug Des.* **78**, 580–586 (2011).
160. Lagerstedt, C. I., Fagher, B. O., Olsson, C. G., Öqvist, B. W., Albrechtsson, U. *Lancet* **326**, 515–518 (1985).
161. Kastiris, P. L., Foroumadi, A., Emami, S., Safavi, M., Dehghan, G., Alizadeh, B. H., Ramazani, A., Ardestani, S. K., Shafiee, A. *J. R. Soc. Interface* **10**, 20120835 (2013).
162. Jaffer, A., Bragg, L. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* **70**, 361–371 (2003).
163. Lukas, G., Brindle, S. D., Greengard, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **178**, 562–564 (1971).
164. Singh, N. P. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **455**, 111–127 (2000).
165. B.C., T. *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals* (Taylor and Francis, 1999).
166. Marschall, H. U., Wagner, M., Zollner, G., Fickert, P., Diczfalusy, U., Gumhold, J., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Benthin, L., Grundström, R., Gustafsson, U., Sahlin, S., Einarsson, C., Trauner, M. *Gastroenterology* **129**, 476–485 (2005).
167. Nalpas, B., Vassault, A., Charpin, S., Lacour, B., Berthelot, P. *Hepatology* **6**, 608–614 (1986).
168. Kaplan, M. M., Righetti, A. *IJ. Clin. Invest.* **49**, 508–516 (1970).
169. Manokaran, S., Jaswanth, A., Sengottuvelu, S., Nandhakumar, J., Duraisamy, R., Karthikeyan, D. *Res. J. Pharm. Technol.* **1**, 398–401 (2008).

170. Killard, A. J., O’Kennedy, R., Bogan, D. P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1585–1590 (1996).
171. Lassègue, B., Griendling, K. K. *American Journal of Hypertension* **17**, 852–860 (2004).
172. McIntosh, L. J., Trush, M. A., Troncoso, J. C. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 183–190 (1997).
173. Festa, F., Aglitti, T., Duranti, G., Ricordy, R., Perticone, P., Cozzi, R. *Anticancer Res.* **21**, 3903–3908 (2001).
174. Scholz, R. W., Graham, K. S., Gumprecht, E., Reddy, C. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **570**, 514–517 (1989).
175. Zhuo, X., Zhao, W., Zheng, J., Humphreys, W. G., Shu, Y. Z., Zhu, M. *Chem. Biol. Interact.* **181**, 227–235 (2009).
176. Milton, N. G. N. *Open Enzym. Inhib. J.* **1**, 34–41 (2008).
177. Aitken, R. J., Harkiss, D., Buckingham, D. W. *Mol. Reprod. Dev.* **35**, 302–315 (1993).
178. Schowen, K. B., Limbach, H. H., Denisov, G. S., Schowen, R. L. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1458**, 43–62 (2000).
179. Sakkiah, S., Thangapandian, S., John, S., Kwon, Y. J., Lee, K. W. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 2132–2140 (2010).
180. Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. Marchand, C. *Chemistry and Biology* **17**, 421–433 (2010).
181. Yanagida, M., Sternglanz, R. *DNA topology and its biological effects.* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, 1990).
182. Laberge, R.-M., Boissonneault, G. *Biol. Reprod.* **73**, 289–296 (2005).
183. Stuchinskaya, T., Mitchenall, L. A., Schoeffler, A. J., Corbett, K. D., Berger, J. M., Bates, A. D., Maxwell, A. *J. Mol. Biol.* **385**, 1397–1408 (2009).
184. Stanković, N., Mladenović, M., Matić, S., Stanić, S., Stanković, V., Mihailović, M., Mihailović, V., Katanić, J., Boroja, T., Vuković, N., Sukdolak, S. *Chem. Biol. Interact.* **227**, (2015).
185. Gurbani, D., Kukshal, V., Laubenthal, J., Kumar, A., Pandey, A., Tripathi, S., Arora, A., Jain, S. K., Ramachandran, R., Anderson, D., Dhawan, A. *Toxicol. Sci.* **126**, 372–390 (2012).

186. Sng, J.-H., Heaton, V. J., Bell, M., Maini, P., Austin, C. A., Fisher, L. M. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1444**, 395–406 (1999).
187. Collins, A. R. Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Stetina, R. *Mutagenesis* **23**, 143–151 (2008).
188. Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. Gelbart, W. M. *An Introduction to Genetic Analysis* (W.H. Freeman, 2000).
189. Laponogov, I., Veselkov, D. A., Crevel, I. M., Pan, X.S., Fisher, L. M., Sanderson, M. R. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9911–9923 (2013).
190. Graille, M. Cladière, L., Durand, D., Lecointe, F., Gadelle, D., Quevillon-Cheruel, S., Vachette, P., Forterre, P., van Tilbeurgh, H. *Structure* **16**, 360–370 (2008).
191. Dewese, J. E., Osheroff, N. *Metallomics* **2**, 450–9 (2010).
192. Gao, R., Huang, S. N., Marchand, C., Pommier, Y. *J. Biol. Chem.* **287**, 30842–52 (2012).
193. Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnström, G. *Mutat. Res. - DNA Repair* **363**, 89–96 (1996).
194. Nitiss, J. L. *Nature Reviews Cancer* **9**, 338–350 (2009).
195. Mladenović, M., Matić, S., Stanić, S., Solujić, S., Mihailović, V., Stanković, N., Katanić, J. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 1376–1396 (2013).

Извори слика преузетих са интернета:

- i <https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/blood-vessel-structure-and-function/>
- ii [http://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147\(06\)00289-6](http://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147(06)00289-6)
- iii <https://flylib.com/books/en/2.953.1.39/1/>
- iv <https://www.hindawi.com/journals/iji/2011/367284/fig1/>
- v <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=358§ionid=39835939>
- vi <https://www.bioscience.org/2001/v6/d/sun/fulltext.php?bframe=figures.htm>
- vii <https://oncohemakey.com/the-blood-coagulation-factors-and-inhibitors-their-primary-structure-complementary-dnas-genes-and-expression/>
- viii <http://www.bloodjournal.org/content/117/5/1710?sso-checked=true>
- ix <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519311001767>
- x <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/8/5313/htm>
- xi <https://www.semanticscholar.org/paper/Human-VKORC1-mutations-cause-variable-degrees-of-4-Czogalla-Biswas/6679c8f766ae63d08824ab31d1b8b14b3741ad89>

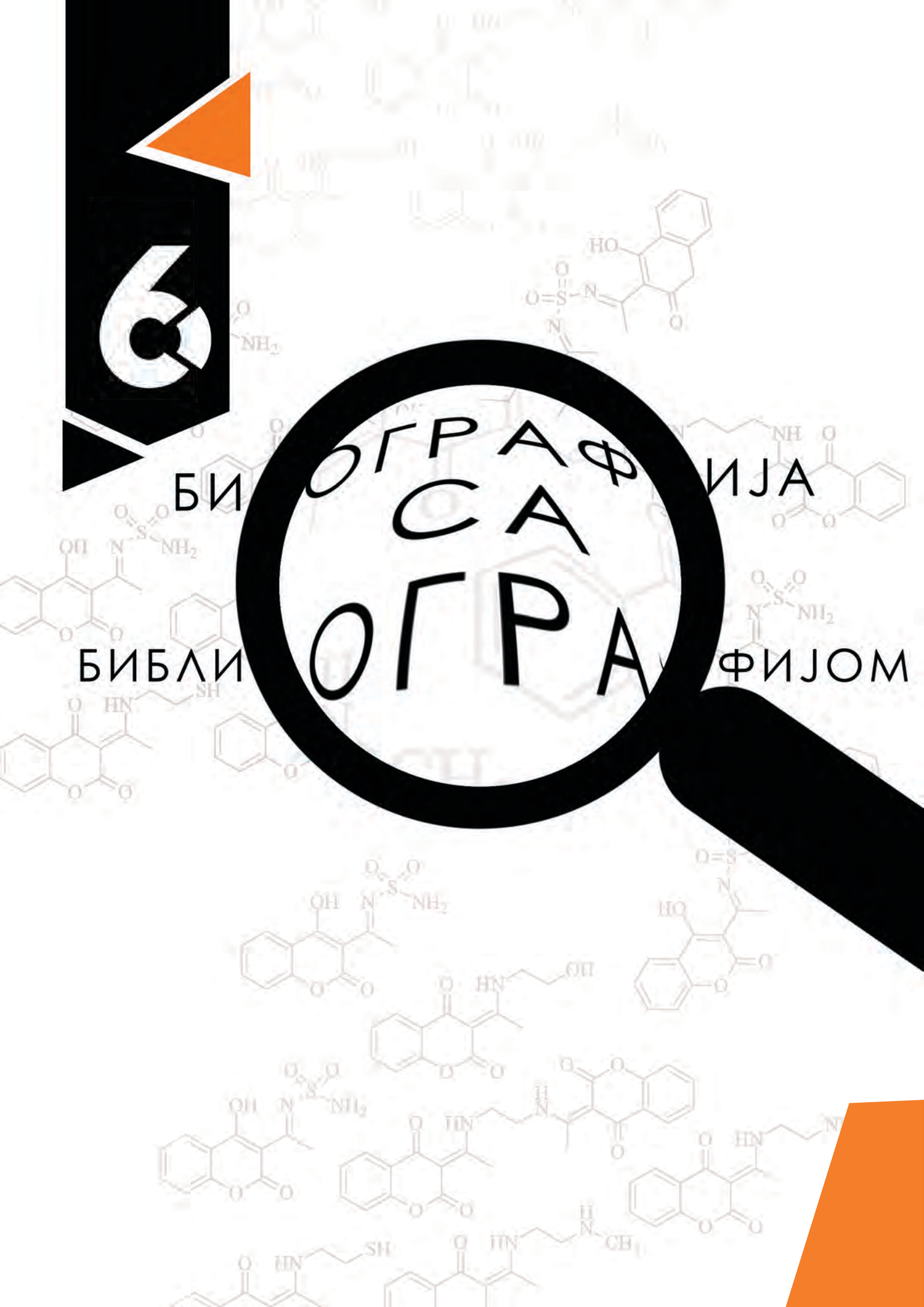


БИОГРАФИЈА

БИБЛИ

ОГР

ФИЈОМ





Невена Станковић рођена је 27.02.1987. године у Пожаревцу. Основну школу „Иво Лола Рибар“ и Гимназију у Великом Градишту завршила је са одличним успехом, и била је носилац Вукове дипломе. Природно-математички факултет у Крагујевцу, смер Хемија, уписала је школске 2006/2007 године, где је и дипломирала 2011. године са просечном оценом 9,31. Школске 2011/2012 године уписала је докторске академске студије хемије - смер Биохемија на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, под менторством доцента др Милана Младеновића.

У истраживачко звање истраживач-приправник, за ужу научну област Биохемија, на Институту за хемију Природно-математичког факултета изабрана је 04.04.2012. године. Од 11.06.2012. године Невена Станковић засновала је радни однос са Природно-математичким факултетом у Крагујевцу, као истраживач-приправник на пројекту Министарства просвете и науке Републике Србије, број III43004. На седници Наставно-научног већа факултета од 07.11.2013. године Невена Станковић изабрана је у научно звање истраживач-сарадник, за научну област хемија, на Институту за хемију. 27.12.2017. године изабрана је за асистента на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Такође, Невена Станковић је у периоду од 2013. до 2015. године учествовала у реализацији пројекта међународне билатералне сарадње између Републике Србије и Републике Италије под називом: “Ligand-based and structure-based design of novel coumarin derivatives as MAO A and MAO B inhibitors”.

У досадашњем периоду Невена Станковић је ангажована у настави на предметима Хемија природних производа, Биохемија, Биохемија ћелије, Биохемија 2 са ензимологијом, Изоловање и идентификација природних производа на Институтима за хемију и биологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, односно Биофармација на Медицинском факултету у Крагујевцу. Коаутор је збирке задатака под називом „Практични проблеми хемије природних производа“ која је по одлуци Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Крагујевцу прихваћена као званични уџбеник Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Невена Станковић је у току досадашњих студија и рада показала изразити смисао за бављење научно-истраживачким радом у области биохемије и медицинске хемије као аутор три научна рада са SCI листе који чине научни садржај докторске дисертације кандидата. Такође, Невена Станковић је коаутор и у 14 научних радова и 34 саопштења на скуповима од међународног и домаћег значаја.

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЧАСОПИСИМА МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА

1. S. Radenkovic, S. Markovic, R. Kuc, **N. Stanković**, The diradical character of polyacenequinododimethides, *Monatshefte Fur Chemie* 142 (2011) 1013-1019.

M22

IF₂₀₁₁=1.532 (Chemistry, Multidisciplinary 69/154)

ISSN: 0026-9247

DOI: 10.1007/s00706-011-0557-8

2. M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, V. Mihailović, **N. Stanković**, J. Katanić, Combining molecular docking and 3-D pharmacophore generation to enclose the *in vivo* antigenotoxic activity of naturally occurring aromatic compounds: myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid, *Biochemical Pharmacology* 86 (2013) 1376-1396.

M21a

IF₂₀₁₃ = 4.650 (Pharmacology & Pharmacy 25/256)

ISSN: 0006-2952

DOI:10.1016/j.bcp.2013.08.018

3. V. Mihailović, S. Matić, D. Mišić, S. Solujić, S. Stanić, J. Katanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, Chemical composition, antioxidant and antigenotoxic activities of different fractions of *Gentiana asclepiadea* L. roots extract, *EXCLI Journal* 12 (2013) 807-823.

M23

IF₂₀₁₃ = 0.728 (Biology 63/85)

ISSN: 1611-2156

4. S. Matić, S. Stanić, D. Bogojević, M. Vidaković, N. Grdović, S. Dinić, S. Solujić, M. Mladenović, **N. Stanković**, M. Mihailović, Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 755 (2013) 81-89.

M22

IF₂₀₁₃ = 2.481 (Toxicology 42/87)

ISSN: 1383-5718

DOI:10.1016/j.mrgtox.2013.03.011

5. S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, **N. Stanković**, M. Mladenović, V. Mihailović, Protective role of methanol extracts of *Gentiana asclepiadea* L. and *G-cruciata* L. against genotoxic damage induced by ethyl methanesulfonate, *Genetika* 45 (2013) 329-340.

M23

IF₂₀₁₃ = 0.492 (Genetics & Heredity 156/165)

ISSN: 0534-0012

DOI: 10.2298/GENSR1302329M

6. **N. Stanković**, M. Mladenović, M. Mihailović, J. Arambašić, A. Uskoković, V. Stanković, V. Mihailović, J. Katanić, S. Matić, S. Solujić, N. Vuković, S. Sukdolak, Synthesis and toxicological studies of *in vivo* anticoagulant activity of novel 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2*H*-chromen-2-ones combined with a structure-based 3-D pharmacophore model, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 55 (2014) 20-35.

M21

IF₂₀₁₄=3.350 (Pharmacology & Pharmacy 66/255)

ISSN: 0928-0987

DOI: 10.1016/j.ejps.2014.01.004

7. V. Mihailović, J. Katanić, D. Mišić, V. Stanković, M. Mihailović, A. Uskoković, J. Arambašić, S. Solujić, M. Mladenović, **N. Stanković**, Hepatoprotective effects of secoiridoid-rich extracts from *Gentiana cruciata* L. against carbon tetrachloride induced liver damage in rats, *Food & Function* 5 (2014) 1795-1803.

M21

IF₂₀₁₄ = 2.791 (Food Science & Technology 17/122)

ISSN: 2042-6496

DOI: 10.1039/c4fo00088a

8. **N. Stanković**, M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, V. Stanković, M. Mihailović, V. Mihailović, J. Katanić, T. Boroja, N. Vuković, S. Sukdolak, Serum albumin binding analysis and toxicological screening of novel chroman-2,4-diones as oral anticoagulants, *Chemico-Biological Interactions* 227 (2015) 18-31.

M22

IF₂₀₁₅ = 2.618 (Biochemistry & Molecular Biology 148/289)

ISSN 0009-2797

DOI: 10.1016/j.cbi.2014.12.005

9. V. Mihailović, D. Mišić, S. Matić, M. Mihailović, S. Stanić, M. Vrvić, J. Katanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, T. Boroja, M. Stanković, Comparative phytochemical analysis of *Gentiana cruciata* L. roots and aerial parts, and their biological activities, *Industrial Crops and Products* 73 (2015) 49-62.

M21a

IF₂₀₁₅ = 3.449 (Agronomy 6/83)

ISSN: 0926-6690

DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.04.013

10. J. Katanić, T. Boroja, **N. Stanković**, V. Mihailović, M. Mladenović, .amo Kreft, M. Vrvić, Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim, *Food & Function* 6 (2015) 1164-1175.

M21

IF₂₀₁₅ = 2.686 (Food Science & Technology 25/125)

ISSN: 2042-6496

DOI: 10.1039/c4fo01208a

11. J. Katanić, V. Mihailović, **N. Stanković**, T. Boroja, M. Mladenović, S. Solujić, M. Stanković, M. Vrvić, Dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.): Potential role as antioxidant and antimicrobial agent, *EXCLI Journal* 14 (2015) 1-20.

M22

IF₂₀₁₅ = 1.292 (Biology 46/86)

ISSN: 1611-2156

DOI: 10.17179/excli2014-479

12. M. Mladenović, **N. Stanković**, S. Matić, S. Stanić, M. Mihailović, V. Mihailović, J. Katanić, T. Boroja, N. Vuković, Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize the *in vivo* DNA damage induced by alkylation through the inhibition of Topoisomerase II α : A story behind the molecular modeling approach, *Biochemical Pharmacology* 98 (2015) 243-266.

M21a

IF₂₀₁₅ = 5.091, 18/255, Pharmacology & Pharmacy

ISSN: 0006-2952

DOI: 10.1016/j.bcp.2015.08.106

13. J. Katanić, V. Mihailović, S. Matić, V. Stanković, **N. Stanković**, T. Boroja, M. Mladenović, S. Stanić, S. Kreft, M. Mihailović, The ameliorating effect of *Filipendula hexapetala* extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin, *Journal of Functional Foods* 18 (2015) 198-212.

M21a

IF₂₀₁₅ = 3.973 (Food Science & Technology 8/125)

ISSN: 1756-4646

DOI: 10.1016/j.jff.2015.07.004

14. S. Matić, J. Katanić, S. Stanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, V. Mihailović, T. Boroja, *In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts, *Journal of Ethnopharmacology* 174 (2015) 287-292.

M21

IF₂₀₁₅ = 3.055 (Plant Sciences 36/209)

ISSN: 0378-8741

DOI: 10.1016/j.jep.2015.08.025

15. N. Đorđević, S. Matić, S. Simić, S. Stanić, V. Mihailović, **N. Stanković**, V. Stanković, A. Ćirić, Impact of the toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats *in vivo*, *Environmental Science and Pollution Research* 24 (2017) 14259–14272.

M22

IF₂₀₁₆ = 2.741 (Environmental Sciences 79/229)

ISSN: 0944-1344

DOI: 10.1007/s11356-017-8940-6

16. B. Arsic, J. Barber, A. Ćikoš, M. Mladenovic, N. Stankovic, P. Novak, 16-Membered Macrolide Antibiotics: a Review, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Accepted manuscript (2017).

M21

IF₂₀₁₆ = 4.307 (Pharmacology & Pharmacy 35/257)

ISSN: 0944-1344

DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020

17. J. Katanić, S. Matić, Eva-Maria Pferschy-Wenzig, N. Kretschmer, T. Boroja, V. Mihailović, V. Stanković, **N. Stanković**, M. Mladenović, S. Stanić, M. Mihailović, R Bauer, Filipendula ulmaria extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: *In vivo* investigation and LC-MS analysis, *Food and Chemical Toxicology* 99 (2017) 86-102.

M21a

IF₂₀₁₆ = 3.778 (Food Science & Technology 8/130)

ISSN: 0278-6915

DOI: 10.1016/j.fct.2016.11.018

САОПШТЕЊА

1. S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, **N. Stanković**, M. Mladenović, V. Mihailović, Comparative analysis of the antigenotoxicity of five selected 4-hydroxy-2H-chromen-2-one derivatives: possible mechanism of action, *32nd Balkan Medical Week*, Niš, Serbia (2012) p. 65.

Нема ISBN броја

2. S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, **N. Stanković**, M. Mladenović, J. Katanić, V. Mihailović, Antigenotoxic and antioxidant properties of the methanolic extract obtained from the underground parts of *Gentiana cruciata*, *32nd Balkan Medical Week*, Niš, Serbia (2012) p. 80.

Нема ISBN броја

3. V. Mihailović, J. Katanić, M. Mihailović, K. Šipovac, V. Stanković, S. Solujić, M. Mladenović, **N. Stanković**, S. Matić, Hepatoprotective activity of methanolic extract of root of *Gentiana asclepiadea* L. in carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats, *32nd Balkan Medical Week*, Niš, Serbia (2012) p. 81.

Нема ISBN броја

4. S. Matić, S. Stanić, D. Bogojević, S. Solujić, M. Mladenović, **N. Stanković**, V. Mihailović, J. Katanić, M. Mihailović, Chemical composition, antioxidant and antigenotoxic activities of *Cotinus coggyria* stem extract, *1st International Conference on Plant Biology*, Subotica, Serbia (2013) p. 90-91.

ISBN 978-86-912591-2-9

5. V. Mihailović, J. Katanić, M. Mihailović, D. Mišić, S. Solujić, K. Šipovac, V. Stanković, M. Mladenović, **N. Stanković**, Secoiridoid content and hepatoprotective activity of *Gentiana cruciata* L. root extract, *1st International Conference on Plant Biology*, Subotica, Serbia (2013) p. 91-92.

ISBN 978-86-912591-2-9

6. J. Katanić, V. Mihailović, S. Solujić, M. Stanković, **N. Stanković**, S. Matić, M. Mladenović, Radical scavenger activity and chelating ability of *Filipendula hexapetala* Gilib. root extract, *1st International Conference on Plant Biology*, Subotica, Serbia, (2013) p. 93.

ISBN 978-86-912591-2-9

7. M. Mladenović, **N. Stanković**, V. Mihailović, J. Katanić, S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, Toxicological and receptor-based 3-D QSAR studies of *in vivo* anticoagulant activity of novel 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2*H*-chromen-2-ones, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, Belgrade, Serbia (2013) p. 107.

ISBN 978-86-7132-053-5

8. M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, V. Mihailović, **N. Stanković**, J. Katanić, Molecular docking provides understanding of the *in vivo* antigenotoxic activity of naturally occurring aromatic compounds: myrcetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid against ethyl methanesulfonate, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, Belgrade, Serbia (2013) p. 114.

ISBN 978-86-7132-053-5

9. V. Mihailović, D. Mišić, J. Katanić, M. Mihailović, S. Solujić, V. Stanković, M. Mladenović, **N. Stanković**, Phytochemical profiling by UHPLC-DAD/+HESI-MS/MS analyzes and hepatoprotective activity of *Gentiana cruciata* L. against CCl₄ induced liver injury in Wistar rats, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, Belgrade, Serbia (2013) p. 220.

ISBN 978-86-7132-053-5

10. J. Katanić, V. Mihailović, S. Solujić, **N. Stanković**, M. Mladenović, Protective effect of *Filipendula hexapetala* Gilib. root extract on lipid oxidation in different model systems, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, Belgrade, Serbia (2013) p. 234.

ISBN 978-86-7132-053-5

11. J. Katanić, V. Mihailović, **N. Stanković**, M. Mladenović, S. Solujić, M. Stanković, Antioksidativna aktivnost metanolskog ekstrakta korena biljke *Filipendula hexapetala* Gilib., Zbornik radova XVIII savetovanja o biotehnologiji (Agronomski fakultet, Čačak, 15-16. mart 2013.), Čačak, 2013, p. 471-476.

ISBN 978-86-87611-29-0

12. S. Matić, N. Đorđević, S. Stanić, S. Simić, **N. Stanković**, V. Mihailović, First report on genotoxicological assessment of the *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) from lake Aleksandrovac in Serbia, *V Congress of the Serbian Genetic Society*, Kladovo, Serbia (2014) p. 145.

ISBN: 978-86-87109-10-0

13. S. Matić, S. Stanić, **N. Stanković**, M. Mladenović, Genotoxic effect of (E)-3-(1-(2-aminoethylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione (2a) and (3E,3'E)-3,3'-(1,1'-(ethane-1,2-diylbis(azanediyl))bis(ethan-1-yl-1-ylidene))dichroman-2,4-dione (2f) exerted through the oral route, *V Congress of the Serbian Genetic Society*, Kladovo, Serbia (2014) p. 146.

ISBN: 978-86-87109-10-0

14. **N. Stanković**, M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, J. Katanić, V. Mihailović, T. Boroja, Assessment of genotoxicity of eight novel 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2H-chromen-2-ones, *V Congress of the Serbian Genetic Society*, Kladovo, Serbia (2014) p. 149.

ISBN: 978-86-87109-10-0

15. **N. Stanković**, S. Matić, S. Stanić, M. Mladenović, J. Katanić, V. Mihailović, T. Boroja, *In vivo* antigenotoxic role of three selected 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2H-chromen-2-ones on EMS-induced DNA damages in rat liver and kidneys, *V Congress of the Serbian Genetic Society*, Kladovo, Serbia (2014) p. 150.

ISBN: 978-86-87109-10-0

16. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, **N. Stanković**, M. Mladenović, Phenolic profile and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* L., *XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia (2014) p. 70.

ISBN: 978-9989-668-99-9

17. J. Katanić, V. Mihailović, T. Boroja, **N. Stanković**, M. Mladenović, Meadowsweet as underestimated food additive against lipid oxidation, *XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia (2014) p. 71.

ISBN: 978-9989-668-99-9

18. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, **N. Stanković**, M. Mladenović, *Alchemilla vulgaris* L. as a potential source of natural antioxidants, Zbornik radova XIX savetovanja o biotehnologiji (Agronomski fakultet, Čačak, 7-8. mart 2014.), Čačak, 2014, p. 233-237, on Serbian.

ISBN: 978-86-87611-31-3

19. J. Katanić, V. Mihailović, M. Koraćević-Maslak, **N. Stanković**, T. Boroja, M. Mladenović, Stability of dropwort root extract and its effect on lipid oxidation in meat, Zbornik radova XIX savetovanja o biotehnologiji (Agronomski fakultet, Čačak, 7-8. mart 2014.), Čačak, 2014, p. 239-244, on Serbian.

ISBN: 978-86-87611-31-3

20. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, M. Stanković, **N. Stanković**, M. Mladenović, Antibacterial activity of Lady's Mantle, *2st International Conference on Plant Biology, 21th Simposium of the Serbian Plant Physiology Society*, Petnica Science Center 17-20 June (2015) pp 3-3.

ISBN: 978-86-912591-3-6

21. J. Katanić, S. Matić, S. Stanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, V. Mihailović, T. Boroja, V. Maksimović, HPLC analysis and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula ulmaria* methanol extract, *2st International Conference on Plant Biology, 21th Simposium of the Serbian Plant Physiology Society*, Petnica Science Center 17-20 June (2015) pp 4-9.

ISBN: 978-86-912591-3-6

22. J. Katanić, V. Mihailović, S. Matić, E. Pferschy-Wenzig, R. Bauer, **N. Stanković**, T. Boroja, Nephroprotective effect of dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.) on cisplatin-induced toxicity in rats, *63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research* Budapest, Hungary (2015) p. 250.

Нема ISBN броја

23. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, *Satureja hortensis* L. as a potential antimicrobial agent, *2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf* (ICNPU 2015) Plovdiv, Bulgaria (2015) p. 123.

Нема ISBN броја

24. J. Katanić, S. Nikles, San-Po Pan, R. Bauer, V. Mihailović, T. Boroja, **N. Stanković**, M. Mladenović, Phenolic content and anti-inflammatory activity of uninvestigated *Stellaria holostea* methanolic extract, *III Symposium of biologists and ecologists of Republic of Srpska (SBERS 2015)*, 12-14. November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 115.

ISBN 978-99955-21-43-1

25. J. Katanić, S. Matić, S. Stanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, V. Mihailović, T. Boroja, *In vitro* protective effect of methanol extracts of *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* against hydroxyl radical-induced DNA damage, *III Symposium of biologists and ecologists of Republic of Srpska (SBERS 2015)*, 12-14. November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 116.

ISBN 978-99955-21-43-1

26. **N. Stanković**, M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, M. Mihailović, V. Mihailović, J. Katanić, T. Boroja, N. Vuković, Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize DNA alkylation damage *in vivo* on topIIa level: A story behind the molecular modeling approach, *III Symposium of biologists and ecologists of Republic of Srpska (SBERS 2015)*, 12-14. November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 118.

ISBN 978-99955-21-43-1

27. V. Mihailović, M. Koraćević-Maslak, J. Katanić, V. Maksimović, T. Boroja, M. Mladenović, **N. Stanković**, Phytochemical and antimicrobial activity evaluations of *Bergenia cordifolia* root extract, *III Symposium of biologists and ecologists of Republic of Srpska (SBERS 2015)*, 12-14. November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 119.

ISBN 978-99955-21-43-1

28. S. Matić, S. Stanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, Genotoxic effect of the *Cotinus coggygria* Scop. methanol extract on *Drosophila melanogaster*, *Zbornik radova XX savetovanja o biotehnologiji, Agronomski fakultet, Čačak (2015)* p. 353-358.

ISBN: 978-86-87611-35-1

29. J. Katanić, T. Boroja, V. Mihailović, S. Matić, **N. Stanković**, N. Mihović, M. Mladenović, V. Stanković, Protective effects of *Filipendula ulmaria* extracts on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016*, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 256-257.

Нема ISBN броја

30. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, V. Stanković, M. Mladenović, **N. Stanković**, N. Mihović, Nephroprotective effects of *Satureja hortensis* L. against cisplatin-induced toxicity, The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 268-269.

Нема ISBN броја

31. J. Katanić, T. Boroja, San-Po Pan, S. Nikles, R. Bauer, V. Mihailović, M. Mladenović, **N. Stanković**, N. Mihović, *Lunnaria annua* L. (annual honesty) as a new antioxidant and anti-inflammatory agent, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 82.

ISBN 978-9989-760-13-6

32. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, M. Mladenović, **N. Stanković**, N. Mihović, Hepatoprotective efficacy of summer savory against cisplatin-induced oxidative damage in rats, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 84.

ISBN 978-9989-760-13-6

33. V. Mihailović, M. Arsić, M. Stojadinović, S. Stajić, T. Boroja, J. Katanić, M. Mladenović, **N. Stanković**, Plodovi trnjine (*Prunus spinosa*) i gloga (*Crataegus laevigata*) kao potencijalni antioksidanti i njihova stabilnost u uslovima in vitro digestije, 53. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, 10-11. jun 2016, Kragujevac, str. 84.

ISBN 978-86-7132-061-0

34. N. Mihović, S. Matić, S. Stanić, **N. Stanković**, M. Mladenović, DNA conservation by hesteretin: the mechanism of inhibition of EMS-induced alkylation, 1st Congress of Molecular Biologist of Serbia (CoMBoS), Belgrade 2017, p. 59.

ISBN:978-86-7078-136-8

ДИДАКТИЧКА СРЕДСТВА

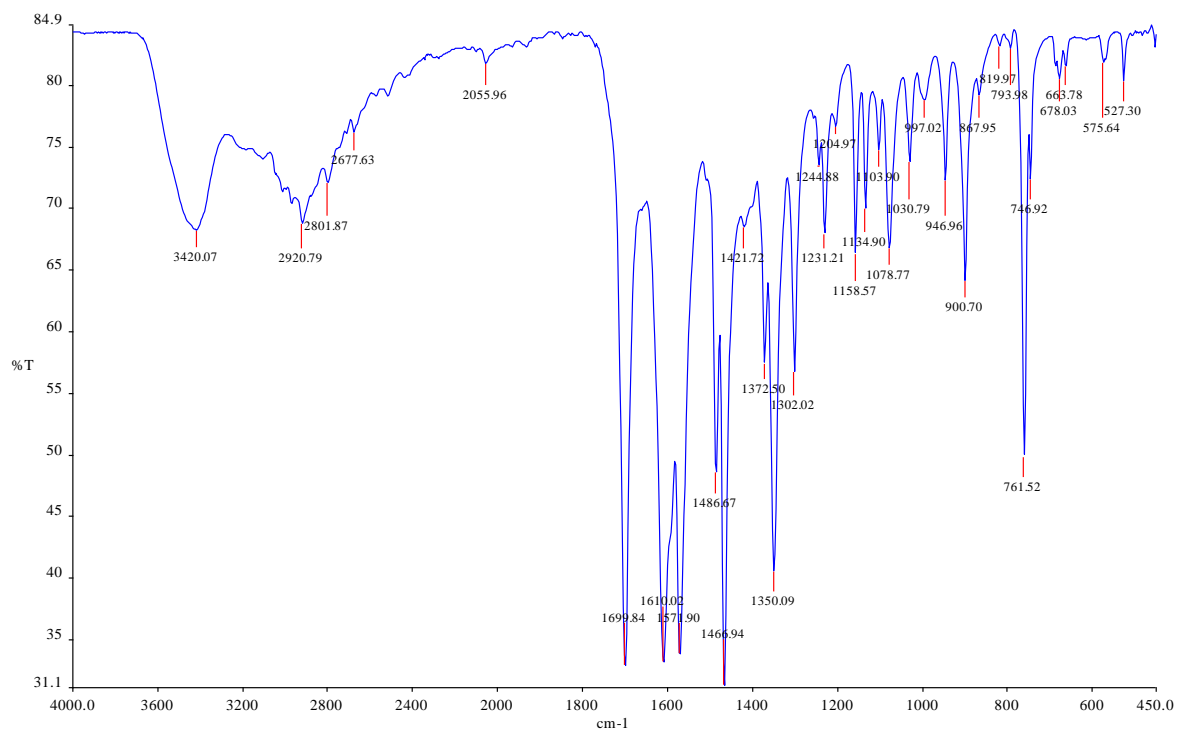
др М. Младеновић, **Н. Станковић**, Практични проблеми хемије природних производа, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, 2016.

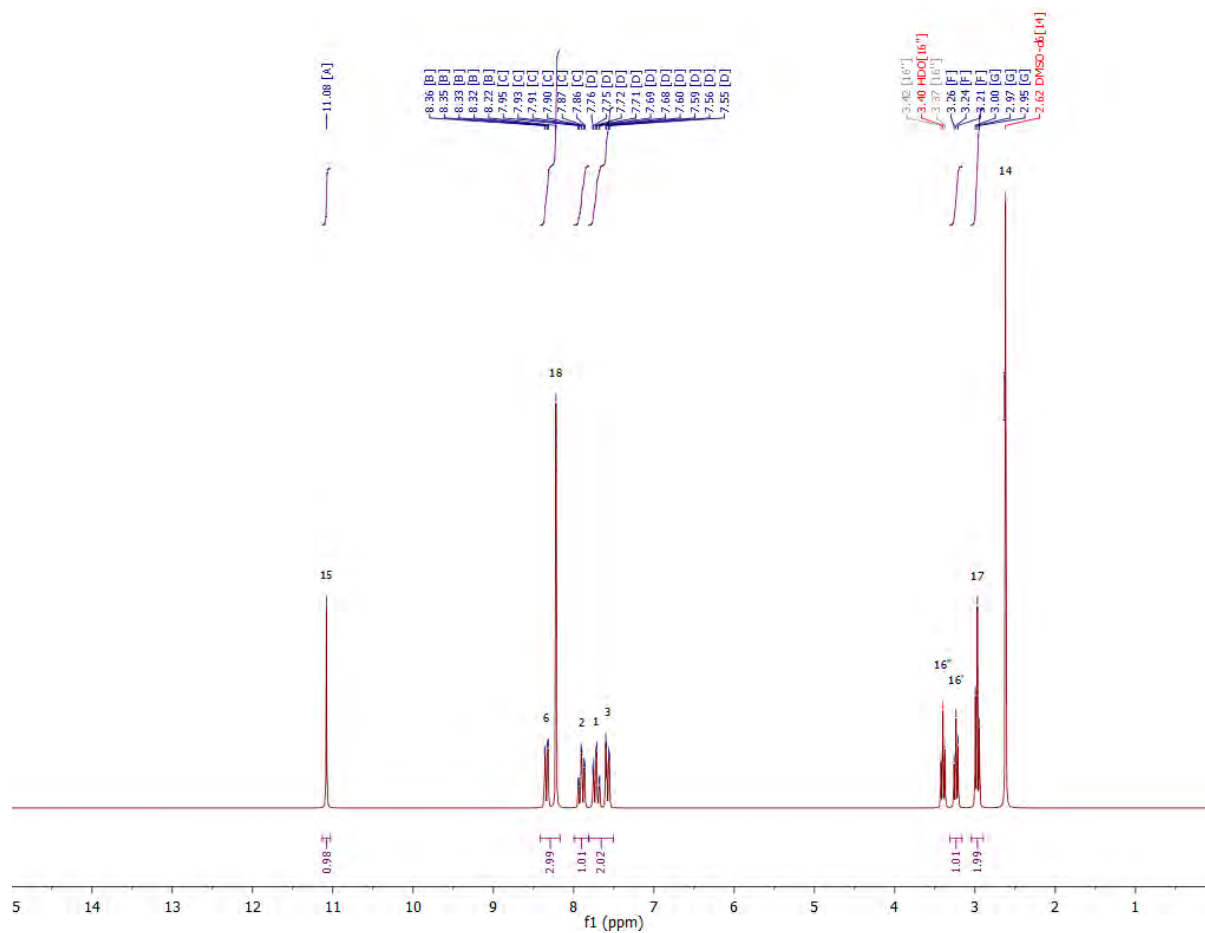
ISBN: 978-86-6009-041-8
COBISS.SR-ID 227682572



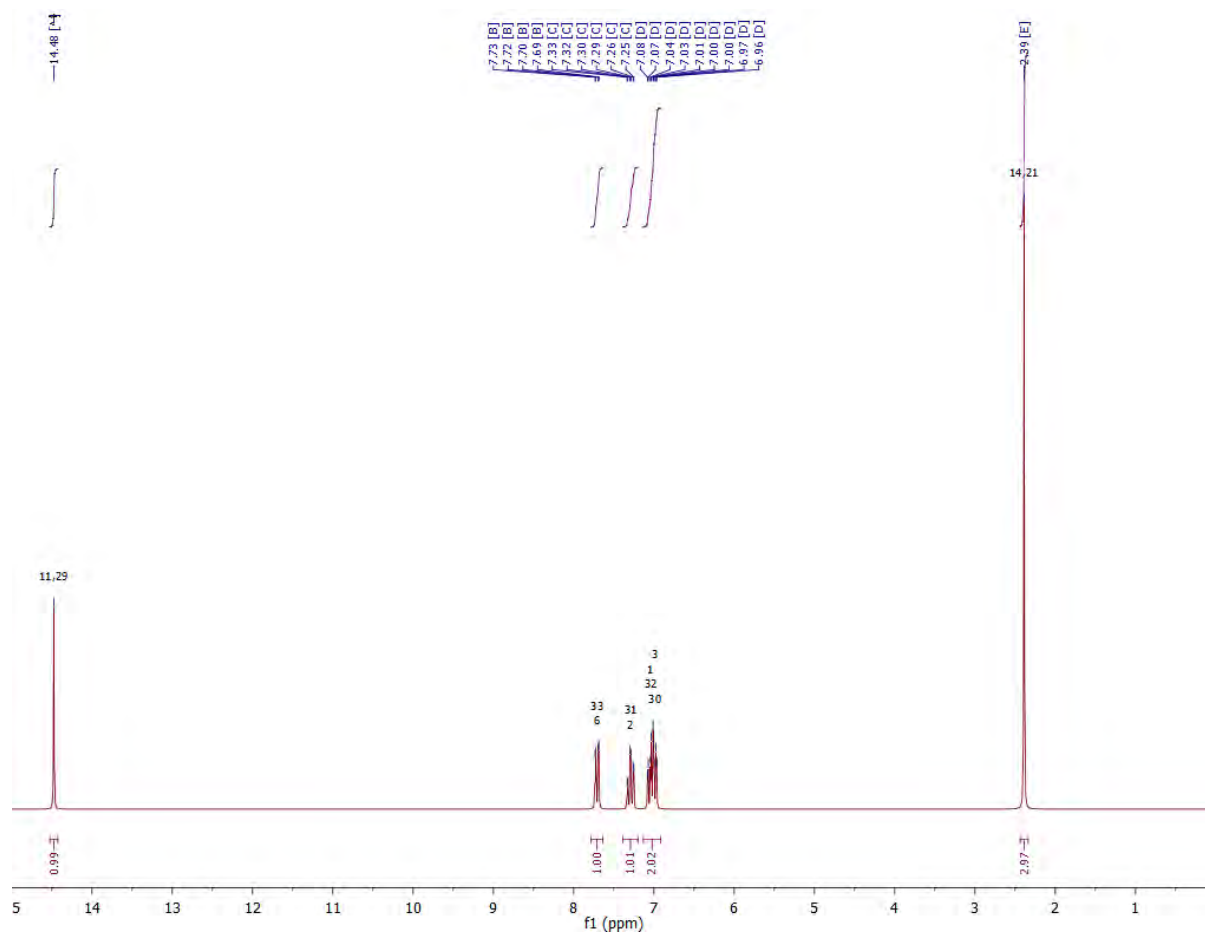
ПРИЛОЖИ

The image features a large magnifying glass with a black handle and frame, centered over the text 'ПРИЛОЖИ'. The background is a light gray field filled with various chemical structures, including substituted benzene rings, heterocyclic compounds, and functional groups like hydroxyl, amino, and sulfonamide groups. On the left side, there is a large black arrow pointing downwards, with a white number '7' inside it. The overall theme is scientific or chemical research.

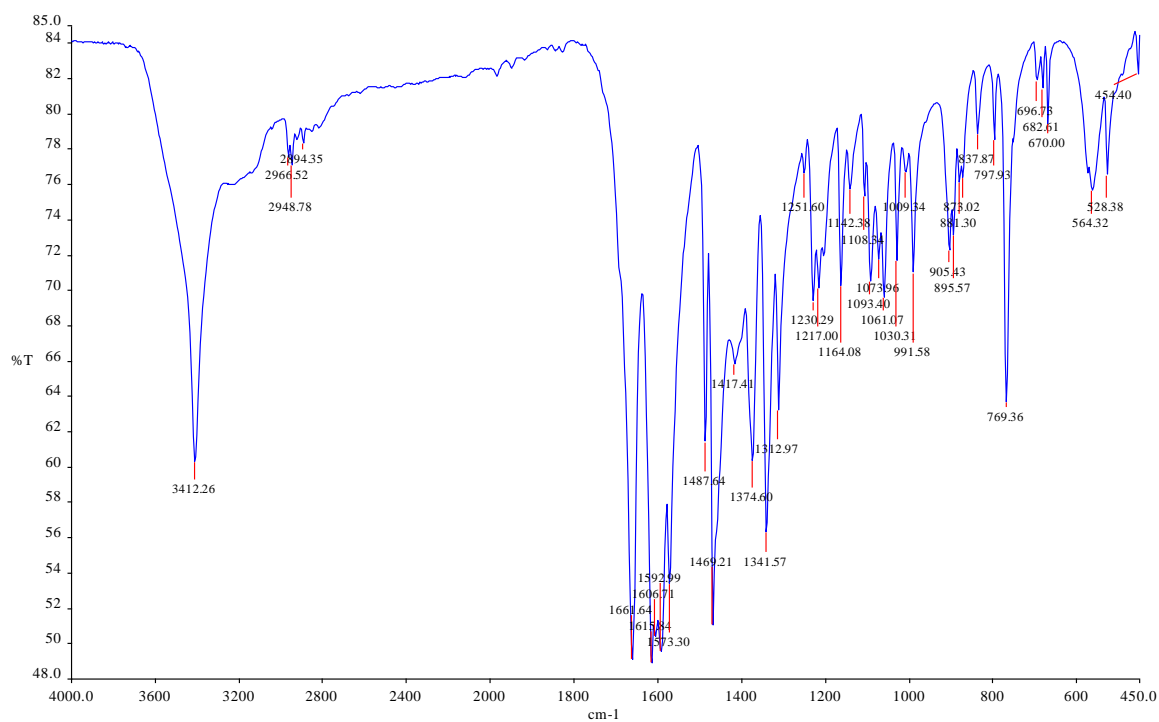
ПРИЛОГ 1. IR, ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри деривата **2a-h**Слика 1. IR спектар деривата **2a**.



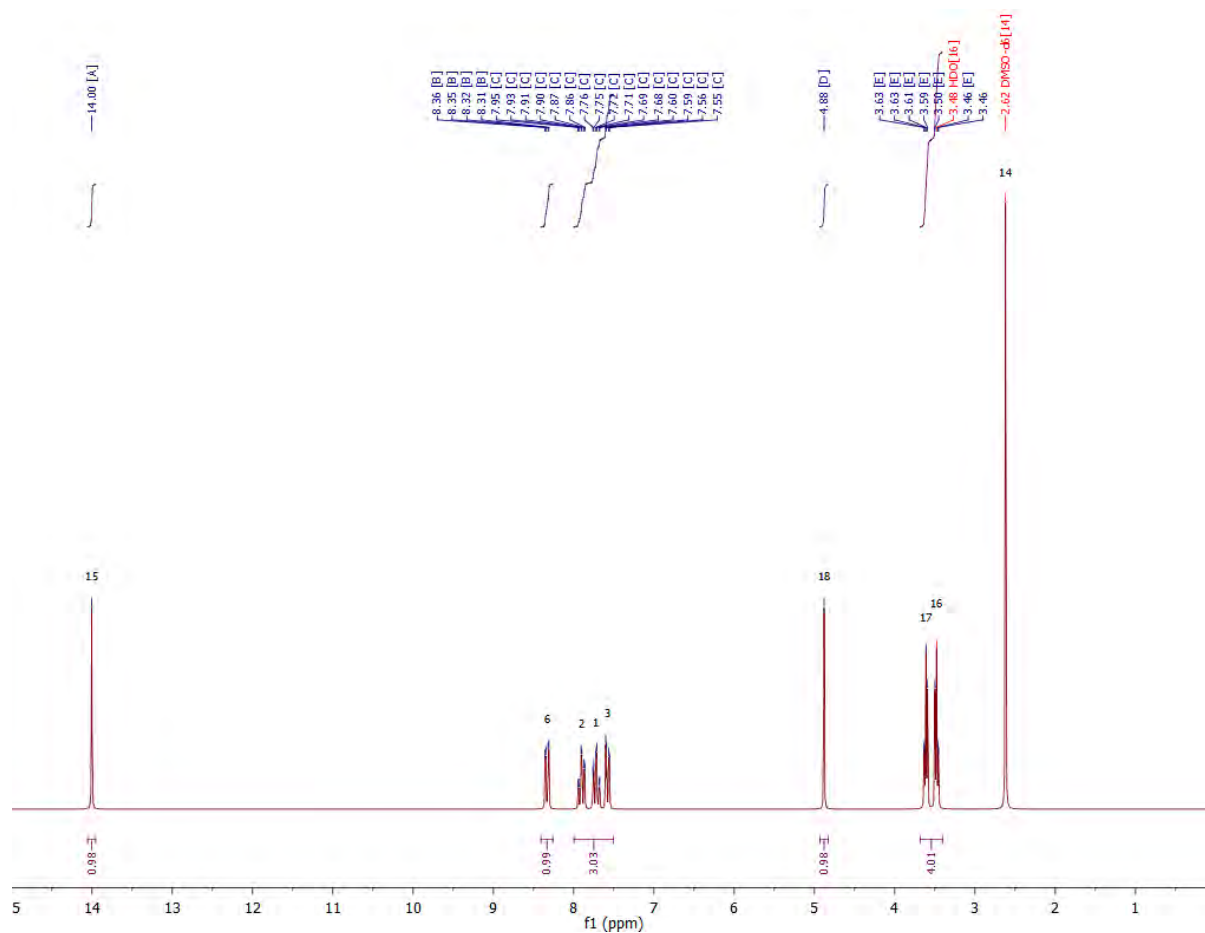
Слика 2. ^1H NMR спектар деривата **2a**.



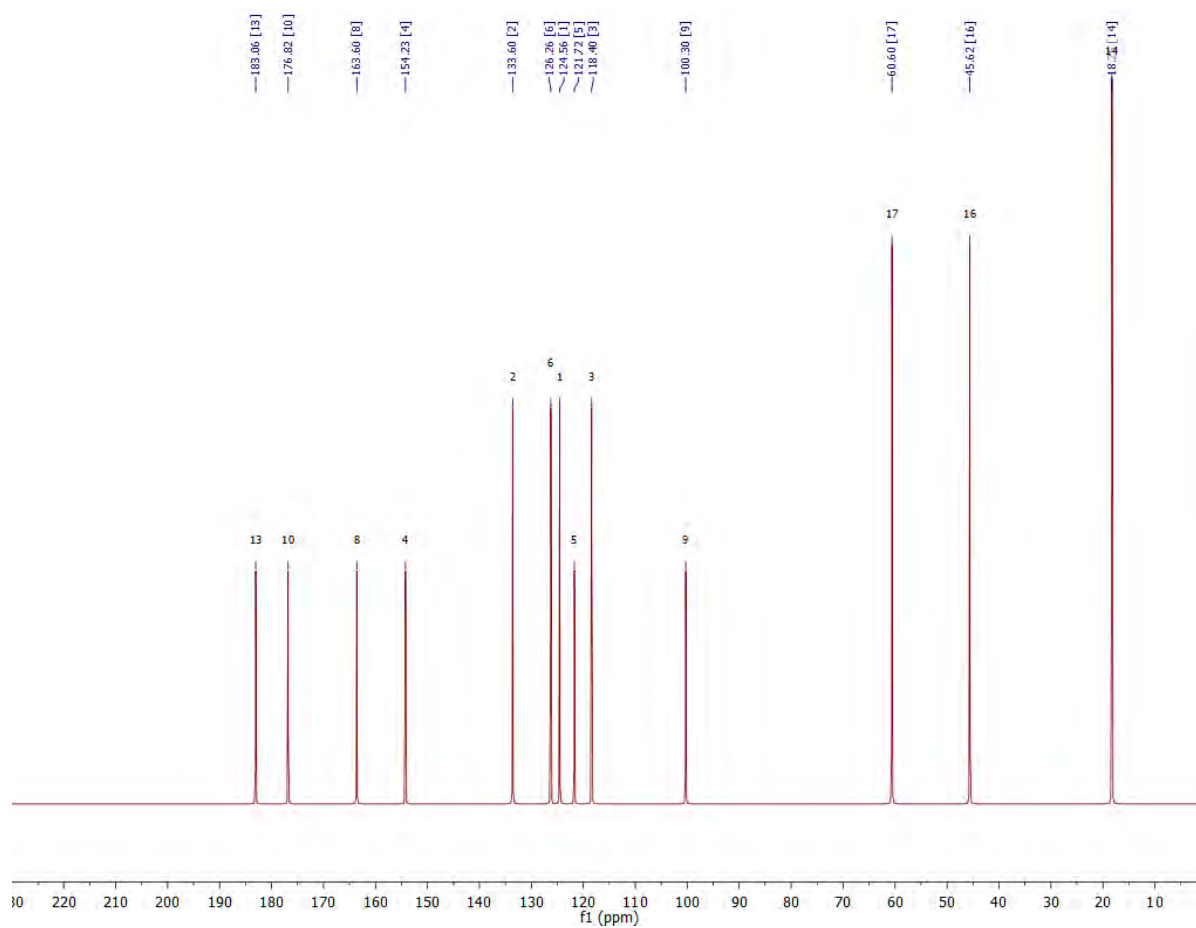
Слика 3. ^{13}C NMR спектар деривата 2а.



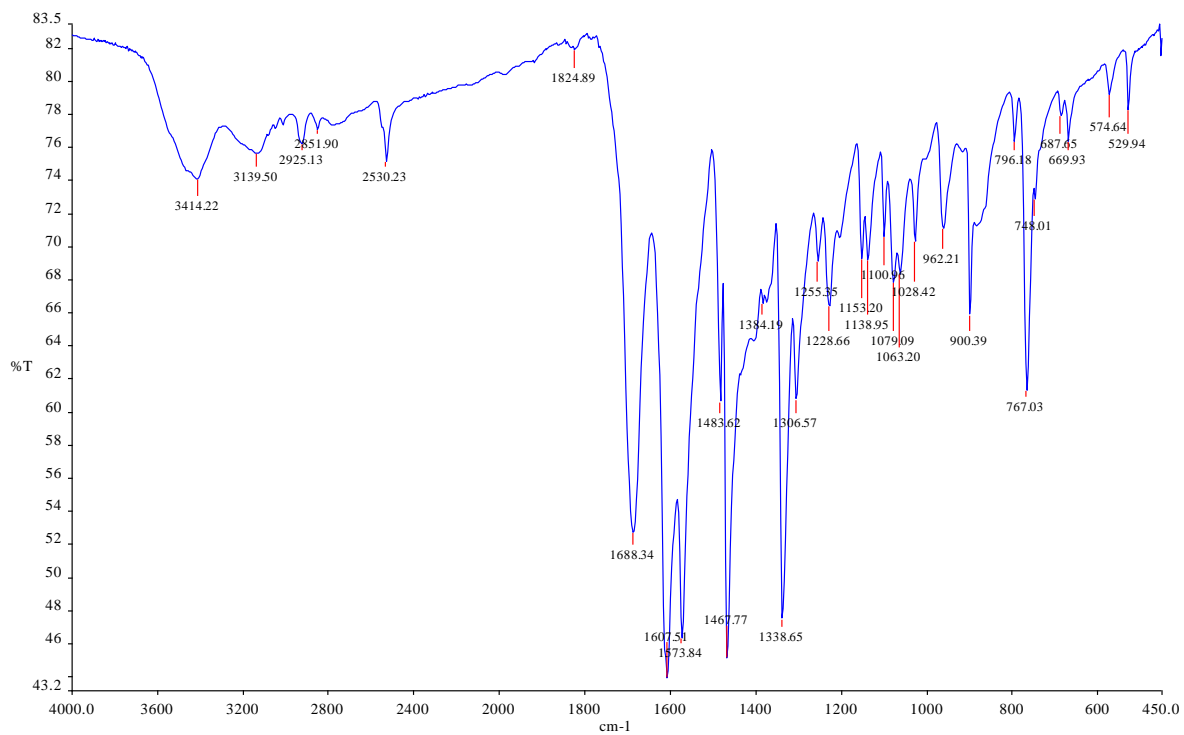
Слика 4. IR спектар деривата 2b.



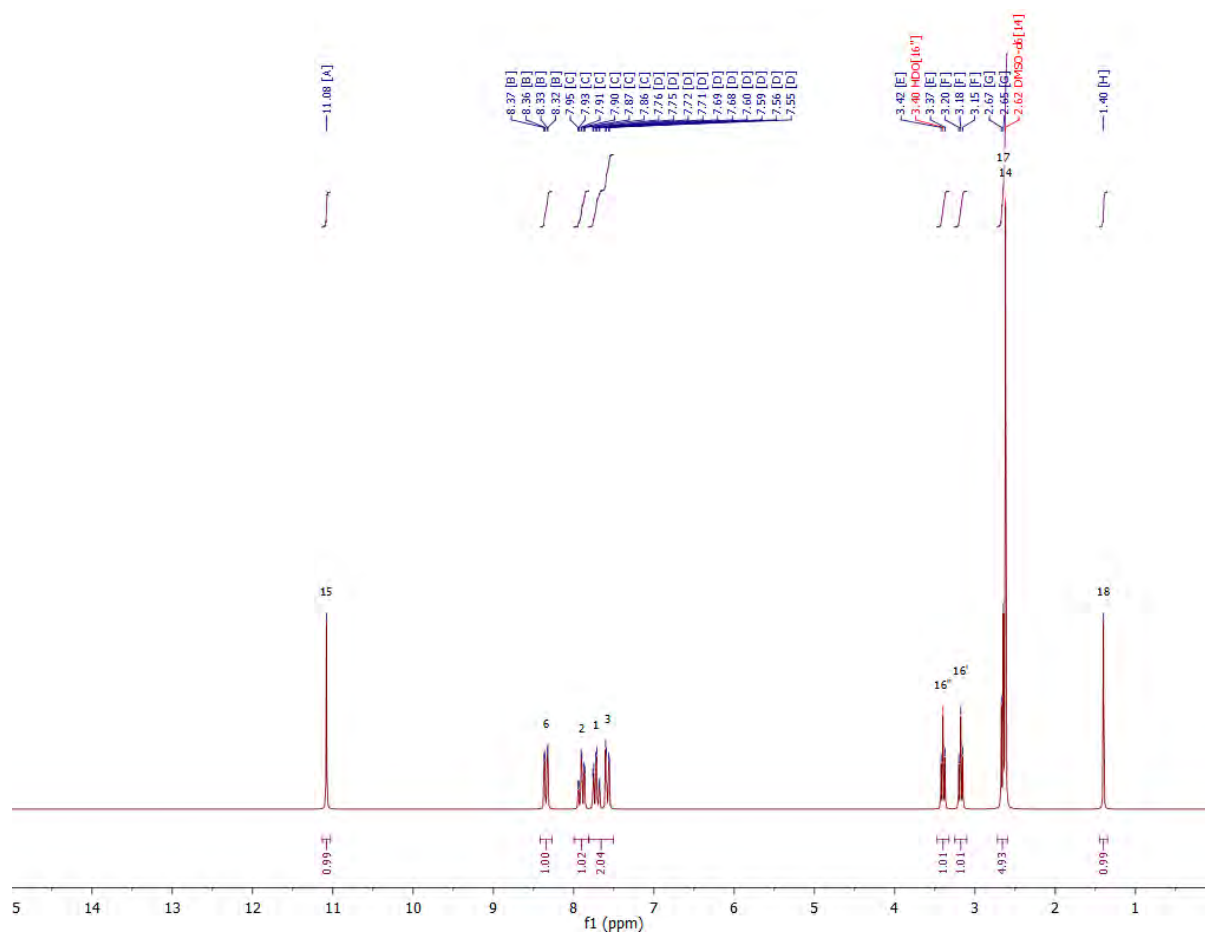
Слика 5. ¹H NMR спектар деривата **2b**.



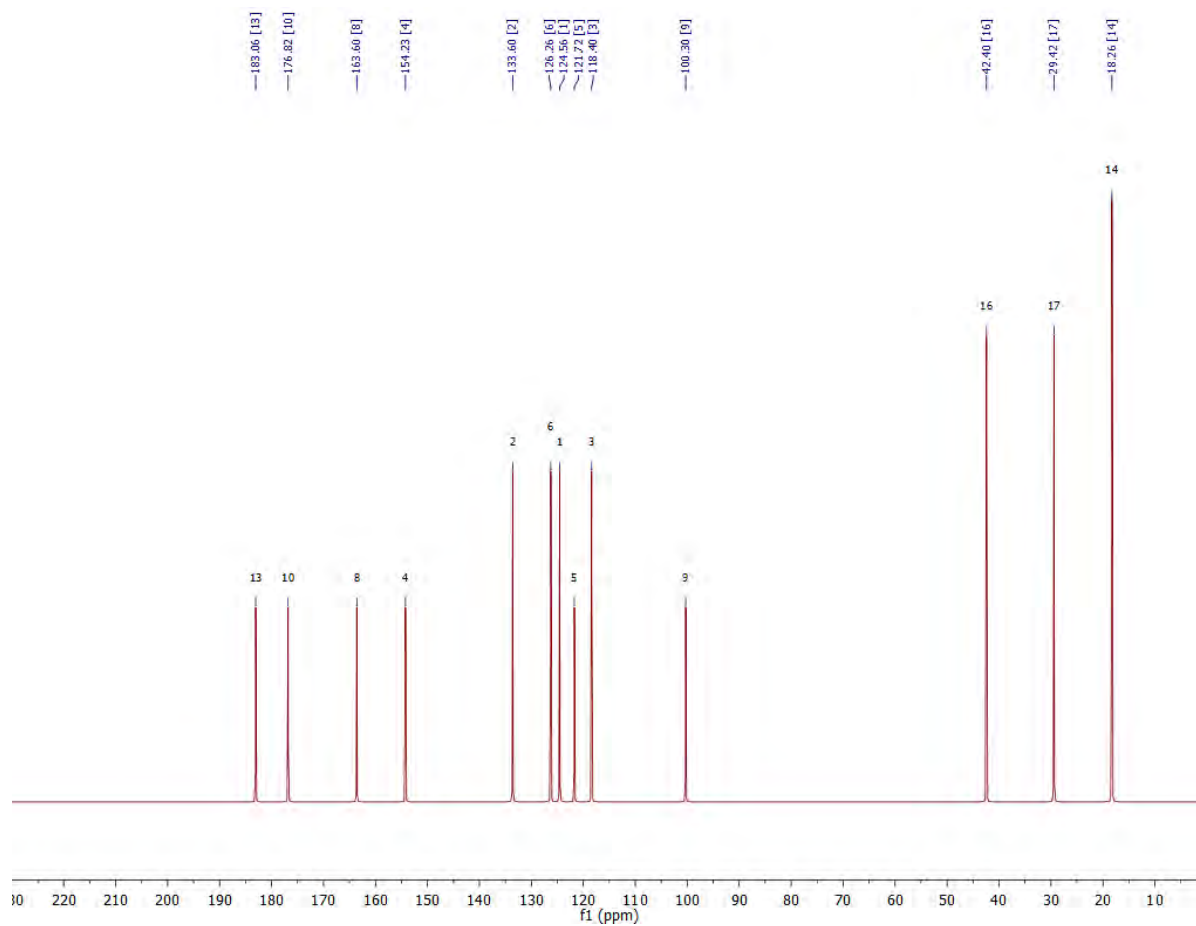
Слика 6. ^{13}C NMR спектар деривата **2b**.



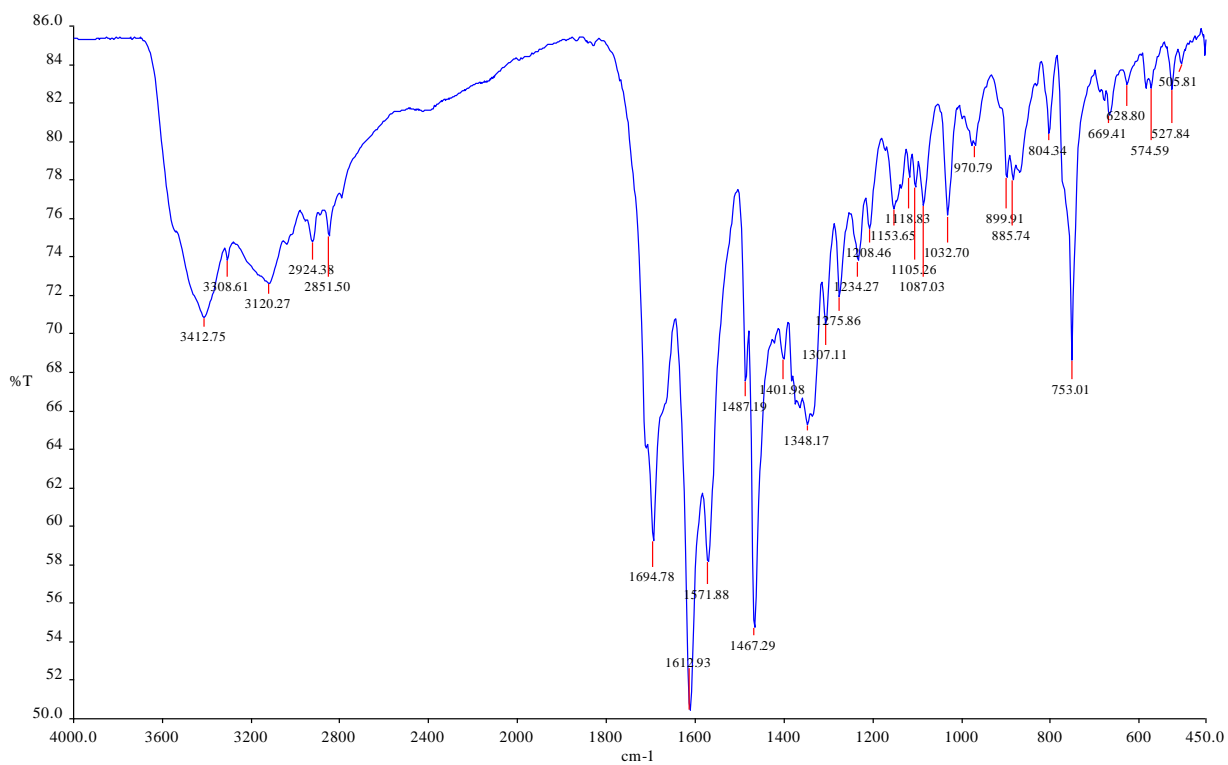
Слика 7. IR спектар деривата 2c.



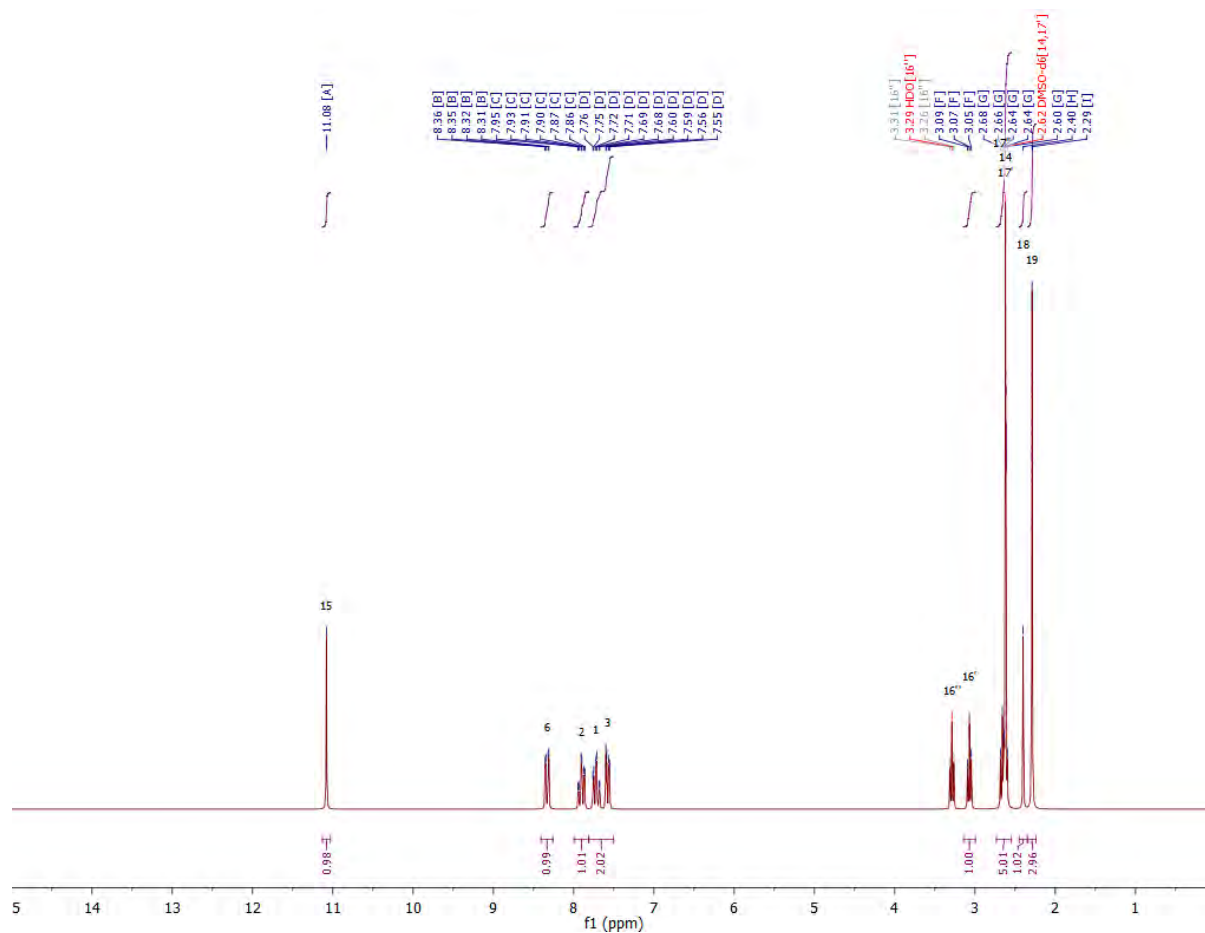
Слика 8. ^1H NMR спектар деривата 2c.



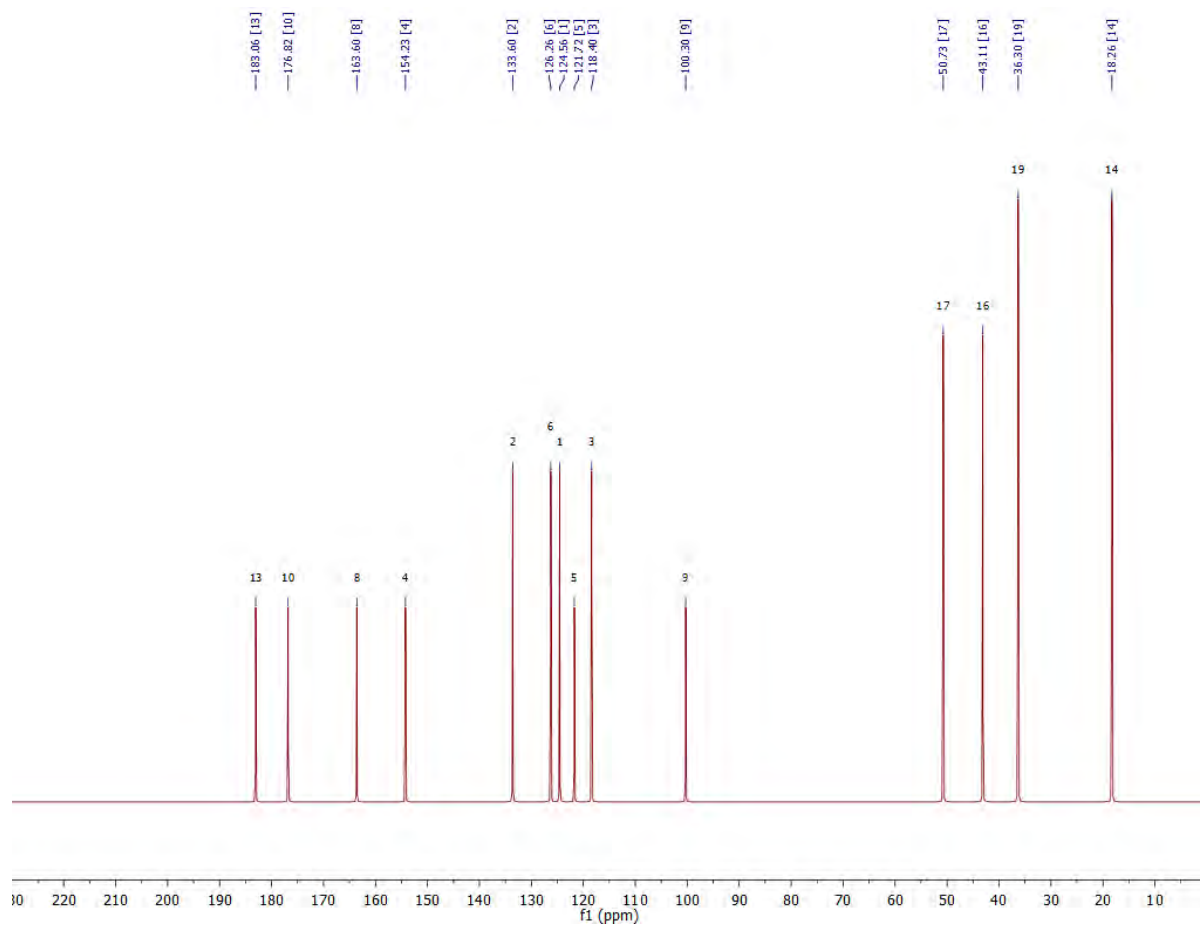
Слика 9. ^{13}C NMR спектар деривата 2c.



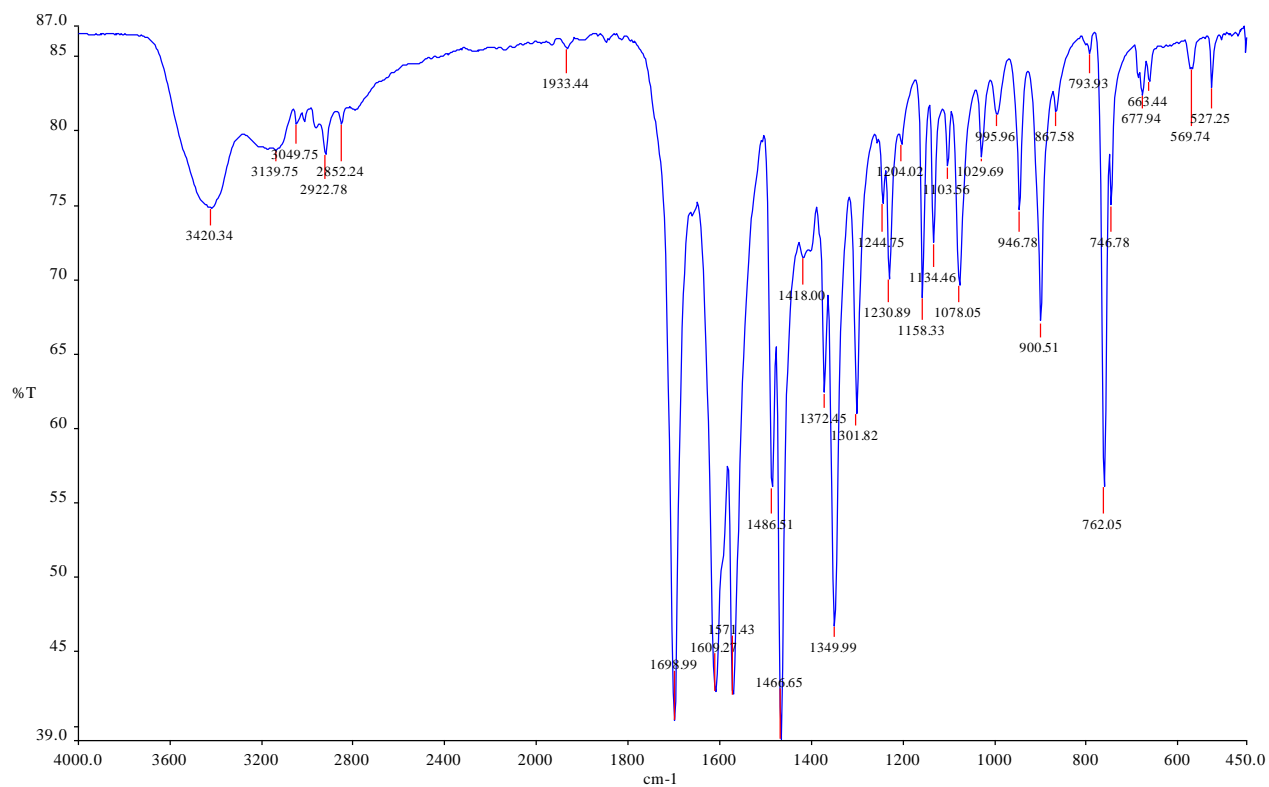
Слика 10. IR спектар деривата 2d.



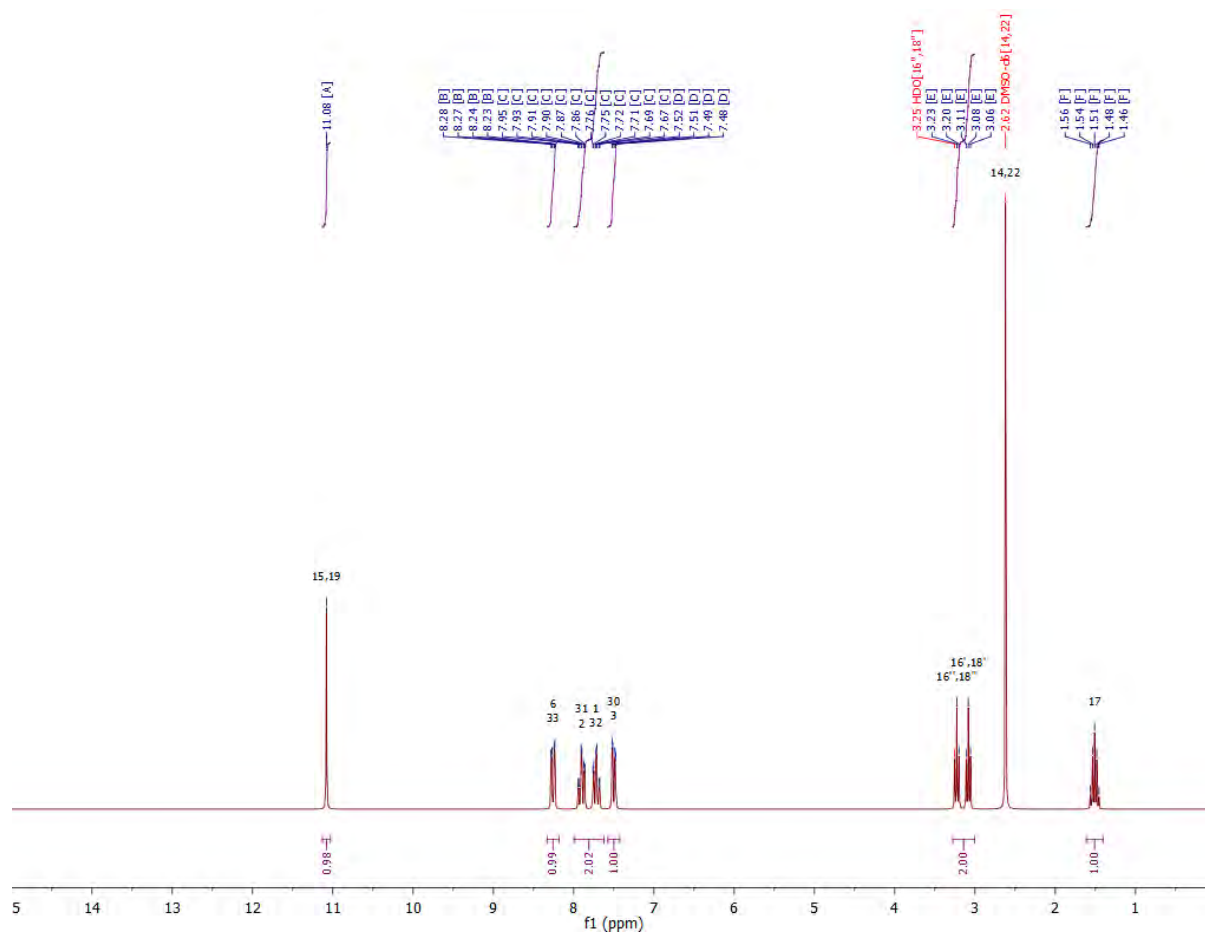
Слика 11. ^1H NMR спектар деривата **2d**.



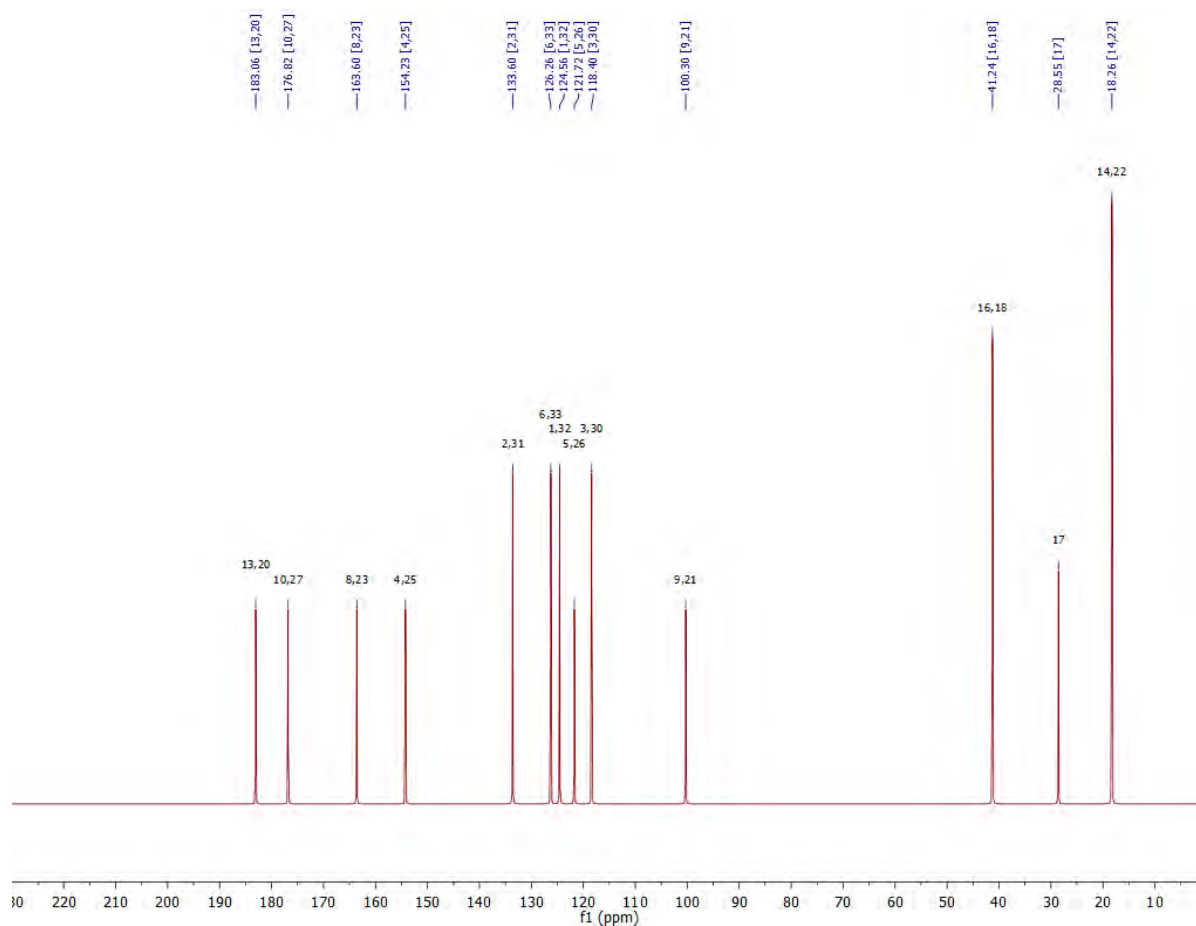
Слика 12. ^{13}C NMR спектар деривата **2d**.



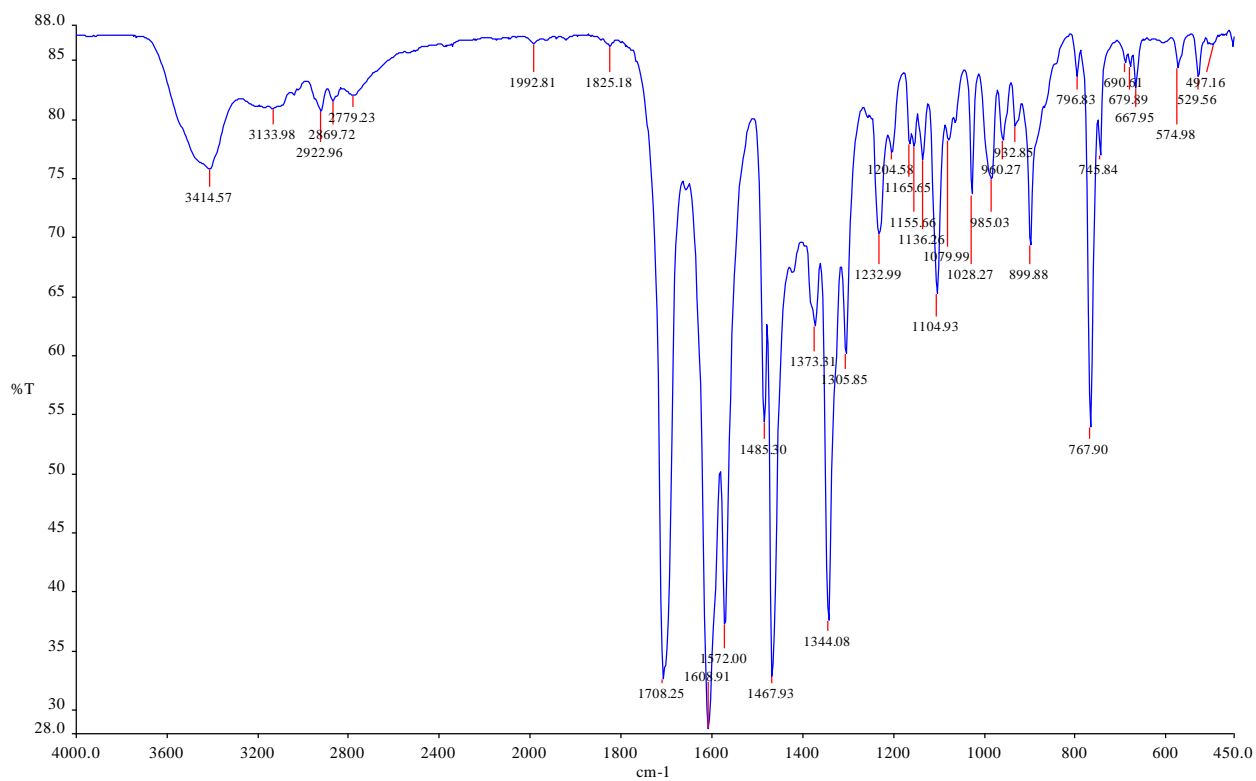
Слика 13. IR спектар деривата 2e.



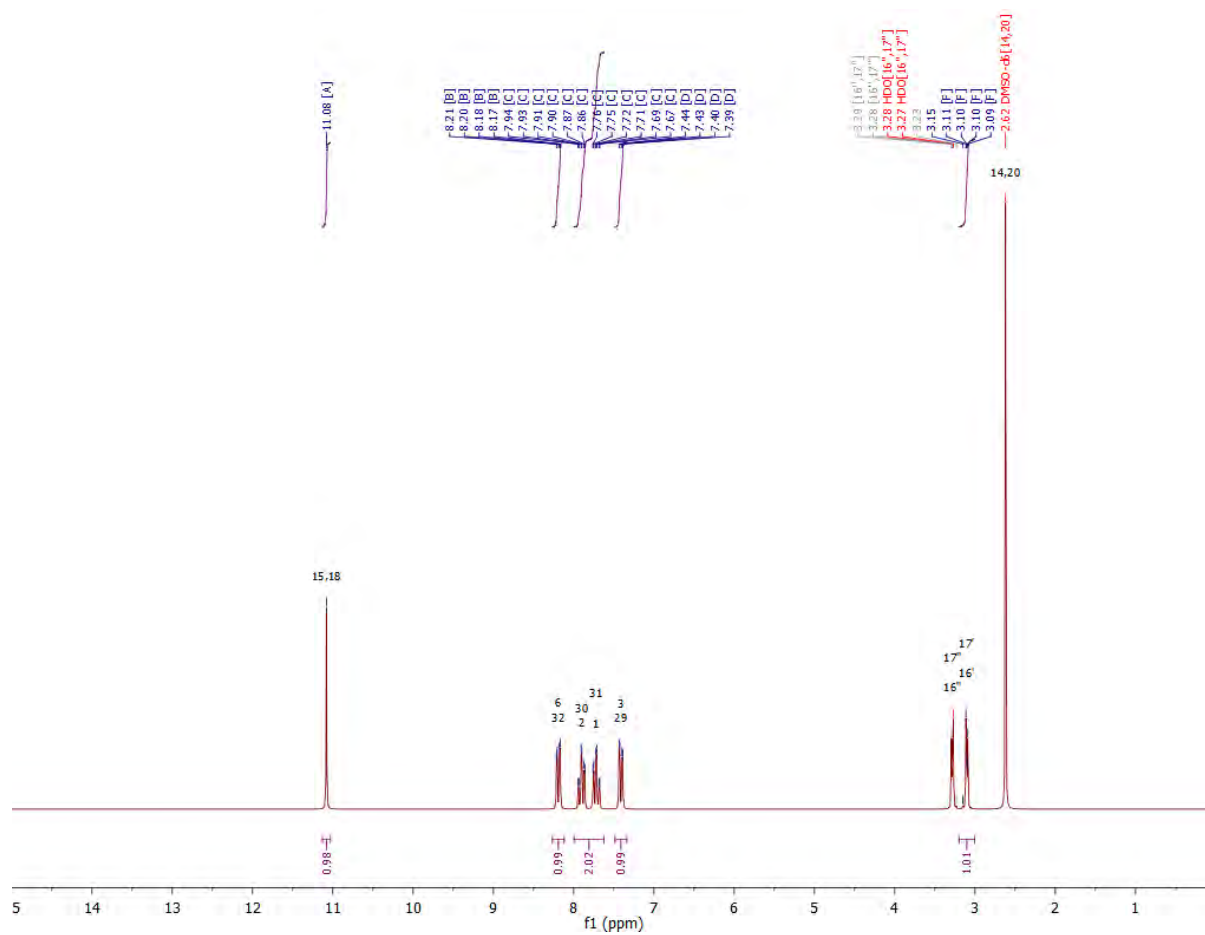
Слика 14. ^1H NMR спектар деривата 2e.



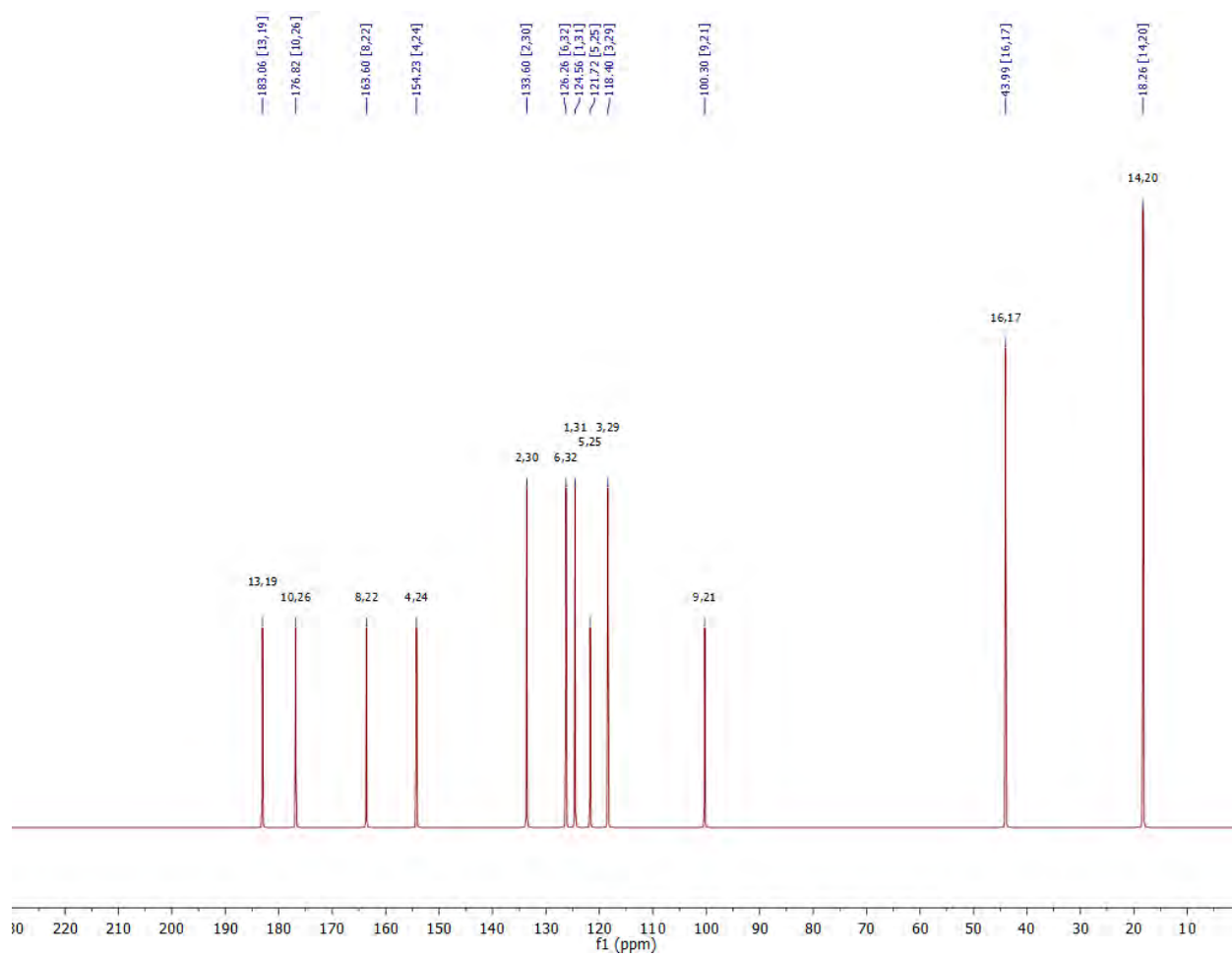
Слика 15. ^{13}C NMR спектар деривата 2e.



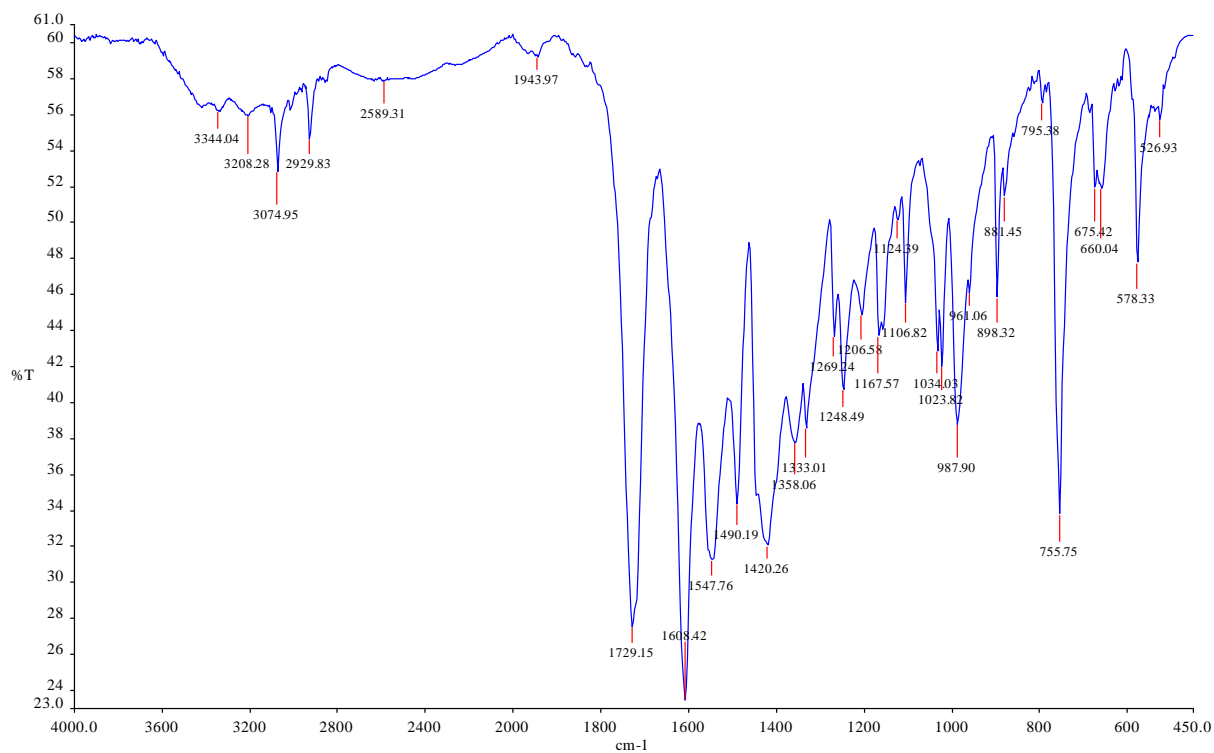
Слика 16. IR спектар деривата 2f.



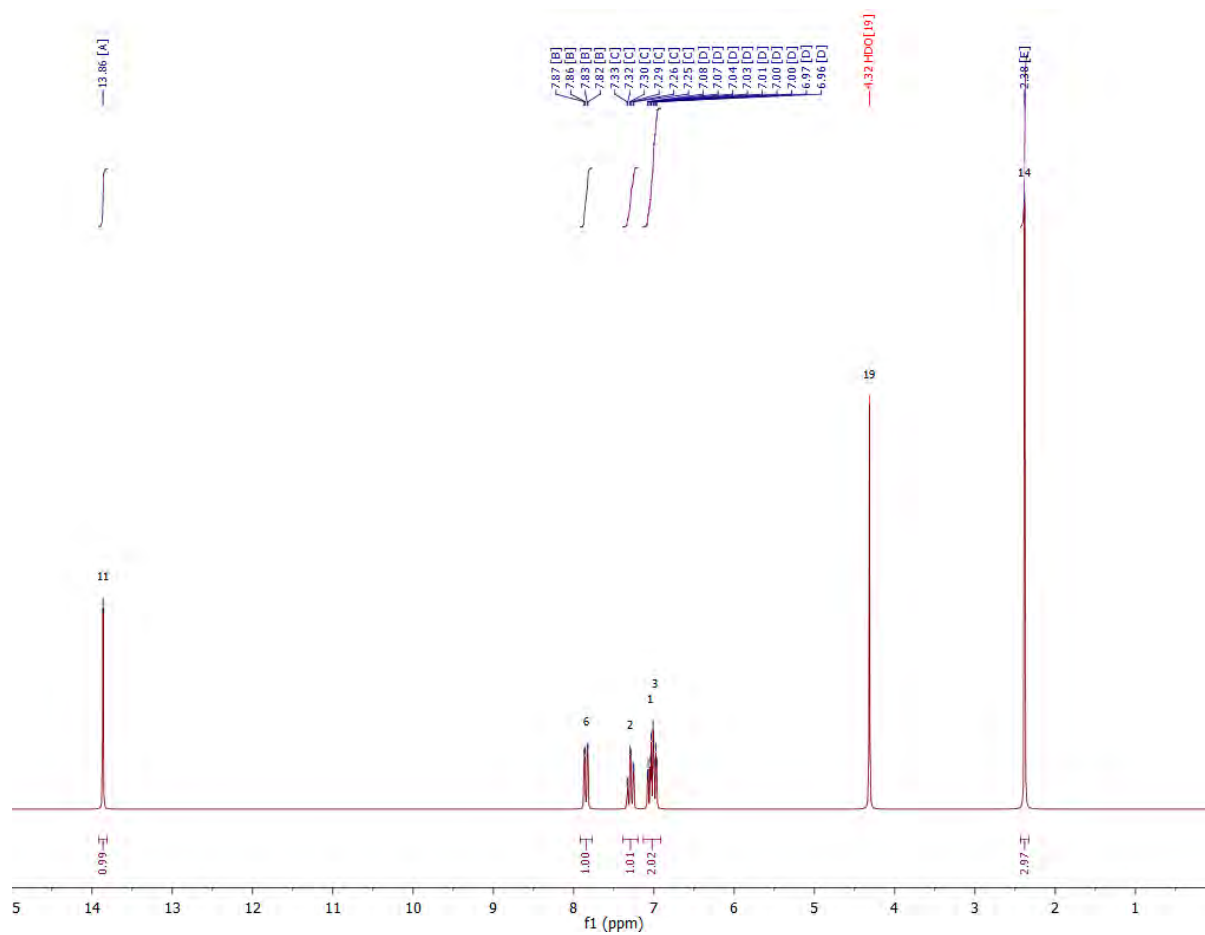
Слика 17. ¹H NMR спектар деривата **2f**.



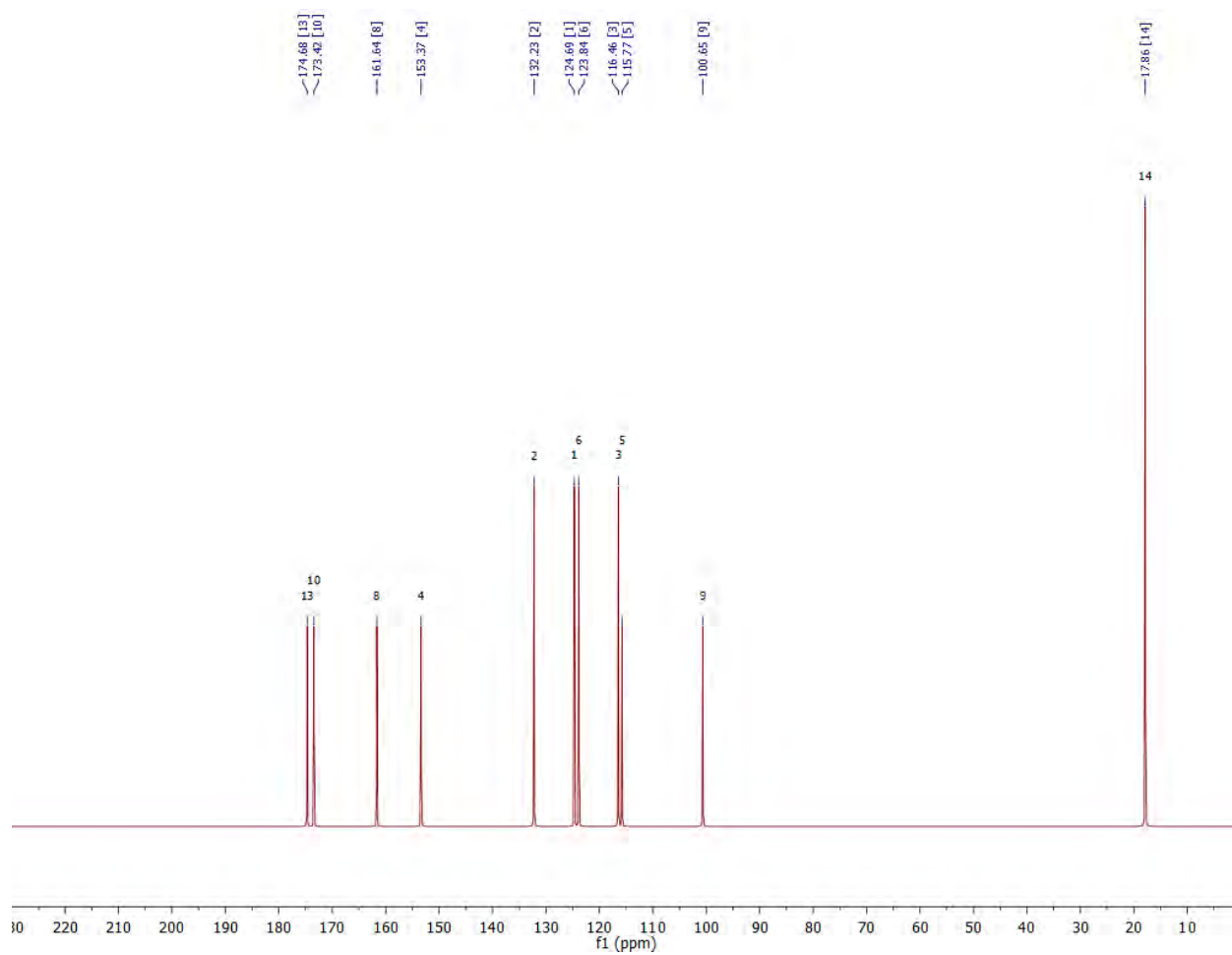
Слика 18. ^{13}C NMR спектар деривата **2f**.



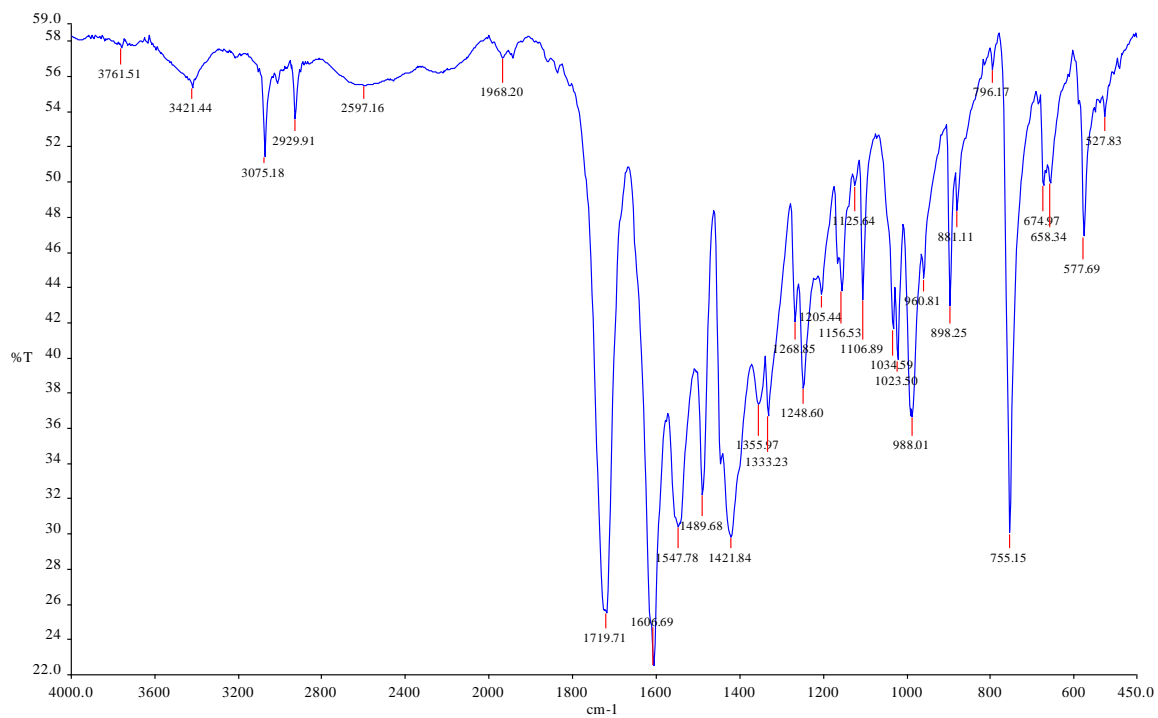
Слика 19. IR спектар деривата 2g.



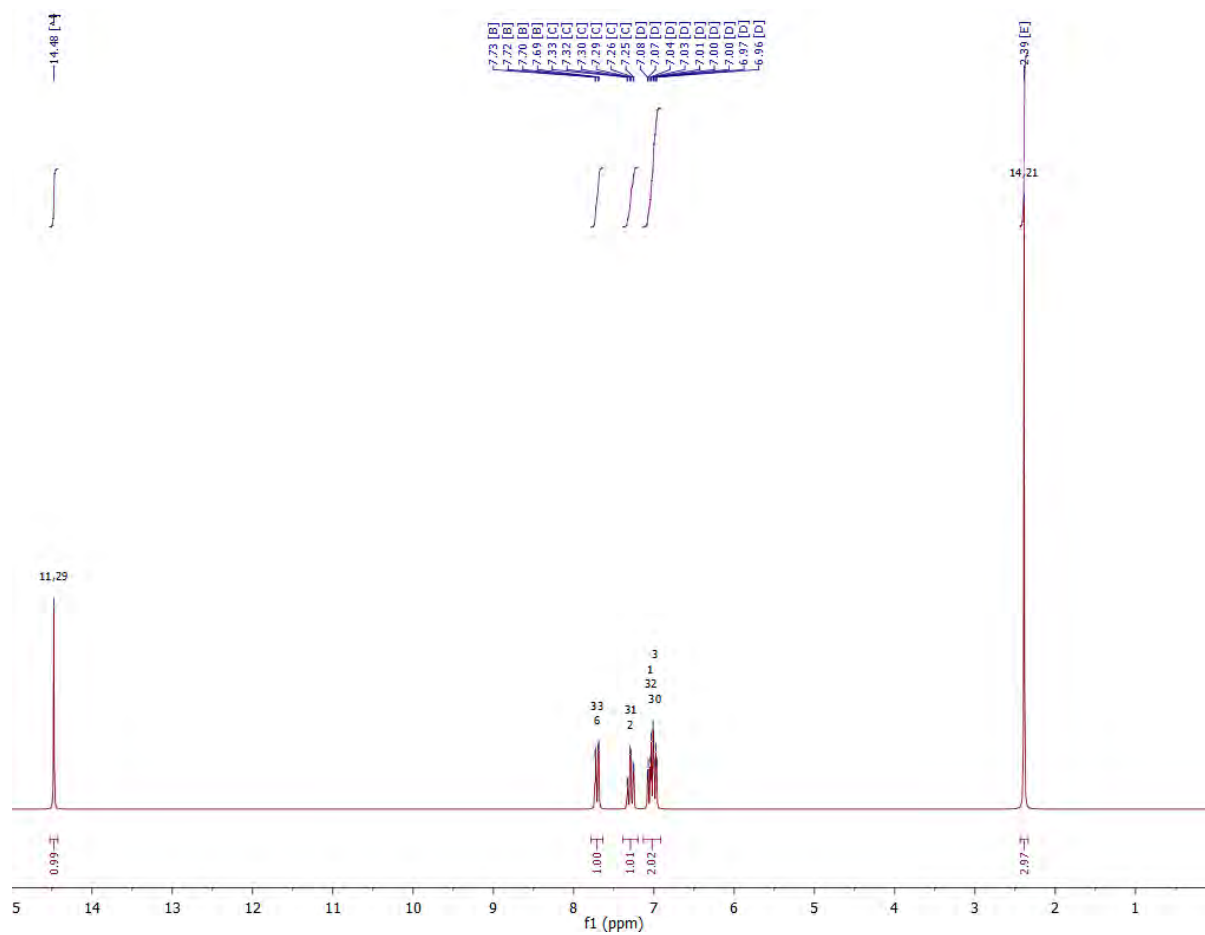
Слика 20. ¹H NMR спектар деривата **2g**.



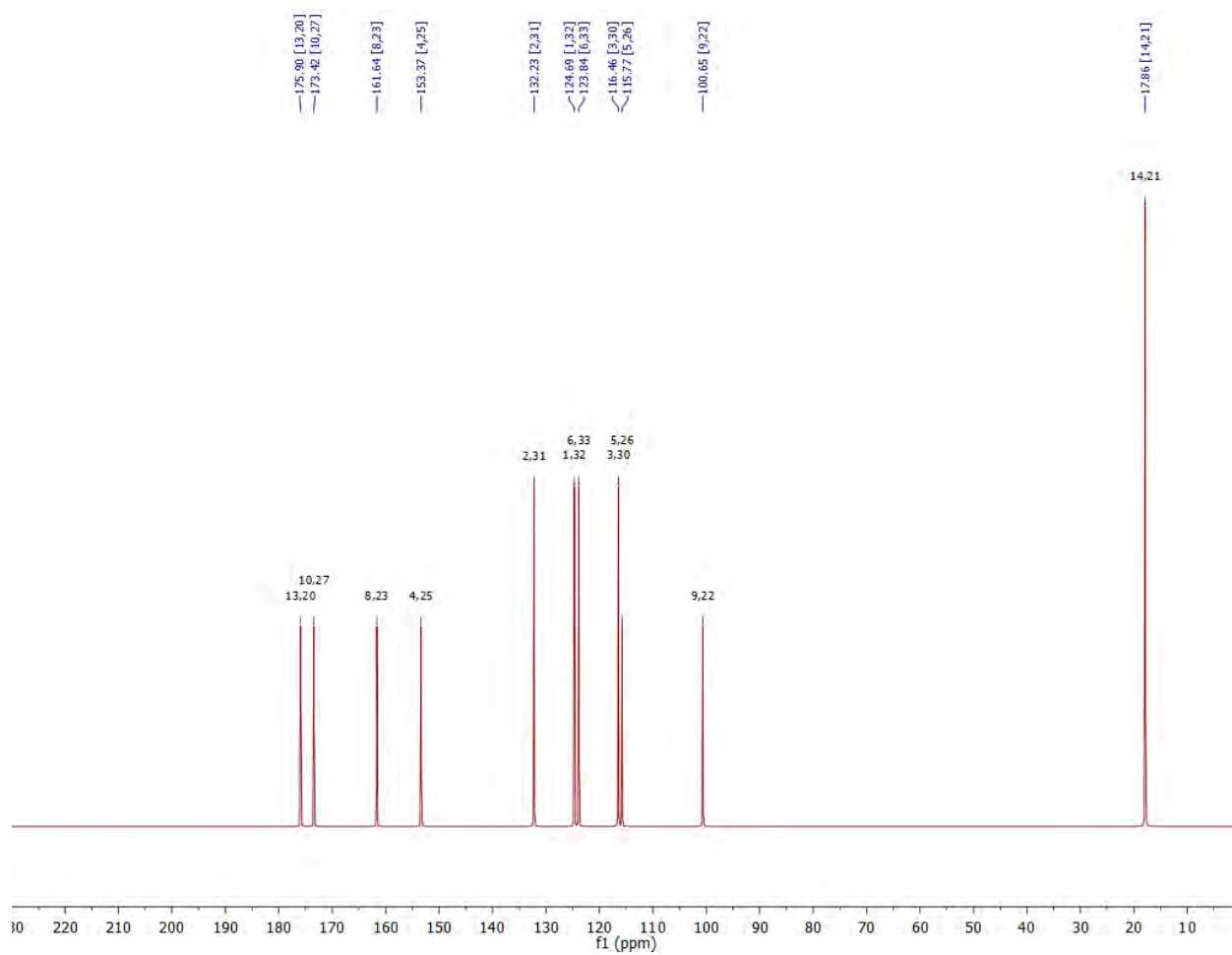
Слика 21. ^{13}C NMR спектар деривата **2g**.



Слика 22. IR спектар деривата 2h.



Слика 23. ^1H NMR спектар деривата **2h**.



Слика 24. ^{13}C NMR спектар деривата **2h**.

ПРИЛОГ 2. Филмови симулација молекулске динамике



Synthesis and toxicological studies of *in vivo* anticoagulant activity of novel 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2*H*-chromen-2-ones combined with a structure-based 3-D pharmacophore model



Nevena Stanković^{a,*}, Milan Mladenović^a, Mirjana Mihailović^b, Jelena Arambašić^b, Aleksandra Uskoković^b, Vesna Stanković^c, Vladimir Mihailović^a, Jelena Katanić^a, Sanja Matić^d, Slavica Solujić^a, Nenad Vuković^a, Slobodan Sukdolak^a

^a Kragujevac Center for Computational Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Department of Molecular Biology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Bulevar Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia

^c Institute of Pathology, Faculty of Medical Sciences, Svetozara Markovića 69, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^d Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2013

Received in revised form 13 January 2014

Accepted 15 January 2014

Available online 24 January 2014

Keywords:

Chroman-2,4-diones

Anticoagulant activity *in vivo*

Histopathology

Molecular docking

3-D pharmacophore

ABSTRACT

Eight synthesized 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2*H*-chromen-2-ones were evaluated as *in vivo* anticoagulants by *intraperitoneal* application to adult male Wistar rats in order to examine their pharmacological potential, evaluate their toxicity and propose the mechanism of action. Two of them, **2f** and **2a**, in concentration of 2 mg/kg of body weight, presented remarkable activity (PT = 130 s; PT = 90 s) upon seven days of continuous application. The results of rat serum and liver biochemical screening, as well those of histopathological studies, proved the compounds to be non-toxic. Activity of the compounds was further examined on the molecular level. Here, molecular docking studies were performed to position the compounds in relation to the active site of VKORC1 and determine the bioactive conformations. Docking results suggested a non-covalent mode of action during which the proton transfer occurs from Cys135 SH towards 4-carbonyl group of anticoagulant. All crucial interactions for anticoagulant activity were confirmed in generated structure-based 3-D pharmacophore model, consisted of hydrogen bond acceptor and hydrophobic aromatic features, and quantified by a best correlation coefficient of 0.97.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

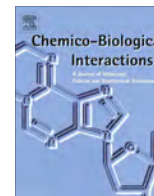
Among all well documented biological activities of coumarin compounds (Rodríguez et al., 2011; Satyanarayan et al., 2008; Karali et al., 2002; Natala et al., 2004), the anticoagulant activity of 4-hydroxycoumarins and related derivatives is of the greatest importance (Au and Rettie, 2008). As anticoagulants, 4-hydroxycoumarins act as competitive inhibitors of vitamin K-2,3-epoxide reductase subunit 1 (VKORC1), a liver endoplasmic reticulum protein with transmembrane topology (Oldenburg et al., 2007). They prevent the reduction of vitamin K-2,3-epoxide, which is formed at the end of the coagulation cycle, to vitamin K hydroquinone,

which begins the new cycle. Consequently, vitamin K-dependent synthesis of biologically active forms of clotting factors II (prothrombin), VII, IX, and X is temporarily blocked (Ridker et al., 2003). With the inhibition of prothrombin production there is a delay in the formation of thrombin from prothrombin known as prothrombin time, which is used as a measure of the ability of an anticoagulant to prolong the formation of blood clot. Patients suffering from venous thrombosis, pulmonary embolism, or heart attack (Hirsch et al., 2003) benefit from taking oral anticoagulants like warfarin. The treatment with anticoagulants includes continuous administration of compounds and constant monitoring of prothrombin time (Jaffer and Bragg, 2003).

Drugs like warfarin are transferred to the active site of VKORC1 by serum albumin in the open side chain form (Petitpas et al., 2001). Since there is still no available co-crystallized structure of

* Corresponding author. Tel.: +381 34336223; fax: +381 34335040.

E-mail address: nevenas@kg.ac.rs (N. Stanković).



Serum albumin binding analysis and toxicological screening of novel chroman-2,4-diones as oral anticoagulants



Nevena Stanković^{a,*}, Milan Mladenović^a, Sanja Matić^b, Snežana Stanić^b, Vesna Stanković^c, Mirjana Mihailović^d, Vladimir Mihailović^e, Jelena Katanić^e, Tatjana Boroja^e, Nenad Vuković^f, Slobodan Sukdolak^f

^aKragujevac Center for Computational Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia

^bDepartment of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia

^cInstitute of Pathology, Faculty of Medical Sciences, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia

^dDepartment of Molecular Biology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Bulevar Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia

^eBioactive Natural Products Investigation, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia

^fDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2014

Received in revised form 20 November 2014

Accepted 3 December 2014

Available online 12 December 2014

Keywords:

Chroman-2,4-diones

Anticoagulant activity *in vivo*

Serum albumin binding

Toxicology

Histopathology

Genotoxicity

ABSTRACT

Two chroman-2,4-dione derivatives, namely **2a** and **2f**, were tested as *in vivo* anticoagulants by seven days of continuous *per os* application to adult male Wistar rats in a concentration of 20 mg/kg of body weight. Derivatives were selected from a group of six previously *intraperitoneally* applied compounds on the basis of presenting remarkable activity in a concentration of 2 mg/kg of body weight. The derivatives **2a** and **2f** are VKORC1 inhibitors, and comparison of the absorption spectra, association, and dissociation constants suggested that the compounds will be bound to serum albumin in the same manner as warfarin is, leading to transfer towards the molecular target VKORC1. After oral administration, the compounds proved to be anticoagulants comparable with warfarin, inasmuch as the measured prothrombin times for **2a** and **2f** were 56.63 and 60.08 s, respectively. The INR values of **2a** and **2f** ranged from 2.6 to 2.8, recommending them as useful therapeutics in the treatment of patients suffering from thromboembolic events and atrial fibrillation. The high percentage of binding and high binding affinity of **2a** and **2f** towards serum albumin reduced the risk of induced internal bleeding. Several kinds of toxicity studies were performed to investigate whether or not **2a** and **2f** can cause pathological changes in the liver, kidneys, and DNA. The catalytic activity of serum enzymes, concentration and catalytic activity of liver and kidney oxidative stress markers and enzymes, respectively, as well as the observed hepatic and renal morphological changes indicated that the compounds in relation to warfarin induced irrelevant hepatic toxicity, no increment of necrosis, and inconsiderable oxidative damage in the liver and kidneys. Estimation of DNA damage using the comet assay confirmed that **2a** and **2f** caused no clinically significant genotoxicity. The higher activity and lower toxicity of **2f** recommended this compound as a better drug candidate than **2a**.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The 4-hydroxycoumarins are oral anticoagulants that are effective therapeutics in primary and secondary prevention of venous thromboembolism, systemic embolism, and atrial fibrillation. They are also prophylactically applied to patients suffering from acute myocardial infarction and stroke [1], and for the prevention of systemic embolism in high-risk patients with mitral stenosis [2].

Warfarin, as well as other 4-hydroxycoumarins, exerts anticoagulant activity as an inhibitor of vitamin K 2,3-epoxide reductase subunit 1 (VKORC1), a liver endoplasmic reticulum protein that catalyzes reduction of the vitamin K 2,3-epoxide formed upon the carboxylation of coagulation factors II, VII, IX, and X to the native hydroquinone form. For this reason, coumarin-based anticoagulants are known as vitamin K antagonists (VKAs) [3,4]. When this reduction is inhibited, the biosynthesis of active coagulation factors is prevented, leading to temporary interruption of the coagulation cascade. The most crucial step in the coagulation cascade is the conversion of factor II, known as prothrombin, to thrombin.

* Corresponding author. Tel.: +381 34336223; fax: +381 34335040.

E-mail address: nevenas@kg.ac.rs (N. Stanković).



Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize the in vivo DNA damage induced by alkylation through the inhibition of Topoisomerase II α : A story behind the molecular modeling approach



Milan Mladenović^{a,*}, Nevena Stanković^a, Sanja Matić^b, Snežana Stanić^b,
Mirjana Mihailović^c, Vladimir Mihailović^d, Jelena Katanić^d, Tatjana Boroja^d,
Nenad Vuković^e

^a Kragujevac Center for Computational Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, PO Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, PO Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Department of Molecular Biology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Bulevar Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia

^d Bioactive Natural Products Investigation, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, PO Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^e Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, PO Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2015

Accepted 24 August 2015

Available online 28 August 2015

Keywords:

Chroman-2,4-diones

Comet assay

Topoisomerase II α

Molecular docking

Molecular dynamics

ABSTRACT

Eight chroman-2,4-diones, namely **2a–h**, previously investigated as anticoagulants, of which **2a** and **2f** as the most active, were evaluated as in vivo genotoxic agents in Wistar rat livers and kidneys using the comet assay. Compounds **2a**, **2b**, and **2f** without genotoxic activity were applied prior to ethyl methanesulfonate (EMS) and diminished EMS-induced DNA damage according to the total score and percentage of reduction. EMS produce harmful O⁶-ethylguanine lesion which is incorporated in aberrant genotoxic G=T and T=G pairing after ATP-dependent DNA strand breaks have been catalyzed by rat Topoisomerase II α (rTopII α , EC 5.99.1.3). Therefore, the mechanism of **2a**, **2b**, and **2f** antigenotoxic activity was investigated on the enzyme level using molecular docking and molecular dynamics simulations insamuch as it had been determined that compounds do not intercalate DNA but instead inhibit the ATPase activity. Calculations predicted that compounds inhibit ATP hydrolysis before the DNA–EMS cleavage is being catalyzed by rTopII α , prevent EMS mutagenic and carcinogenic effects, and beside anticoagulant activity can even be applied in the cancer treatment to control the rate of anticancer alkylation drugs.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: **2a**, (E)-3-(1-(2-aminoethylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione; **2b**, (E)-3-(1-(2-hydroxyethylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione; **2c**, (E)-3-(1-(2-mercaptoethylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione; **2d**, (E)-3-(1-(2-(methylamino)ethylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione; **2e**, (3E,3'E)-3,3'-(1,1'-(propane-1,3-diylbis(azanediyl))bis(ethan-1-yl-ylidene))dichroman-2,4-dione; **2f**, (3E,3'E)-3,3'-(1,1'-(ethane-1,2-diylbis(azanediyl))bis(ethan-1-yl-ylidene))dichroman-2,4-dione; **2g**, N-[(1E)-1-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)ethylidene]aminosulfonamide; **2h**, 4-hydroxy-3-[(1E)-1-(((1E)-1-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3yl)ethylidene)sulfamoyl)imino]ethyl]-2H-chromen-2-one.

* Corresponding author. Fax: +381 34 335 040.

E-mail addresses: mmladenovic@kg.ac.rs (M. Mladenović), nevenas@kg.ac.rs (N. Stanković), sanjamatic@kg.ac.rs (S. Matić), stanic@kg.ac.rs (S. Stanić), mista@ibiss.bg.ac.rs (M. Mihailović), vladam@kg.ac.rs (V. Mihailović), jkatanic@kg.ac.rs (J. Katanić), tatjanaboroja@gmail.com (T. Boroja), nvukovic@kg.ac.rs (N. Vuković).

1. Introduction

Whenever a new compound with excellent activity, affinity and selectivity is discovered, there is a question whether or not it can become a drug candidate [1]. Even with desired ADMETox properties, the registration of pharmaceutical requires a comprehensive assessment of its genotoxic potential in vivo [2]. In the case of positive genotoxicity, mechanistic in vitro and in vivo studies are performed to elucidate the mechanisms of drug action. The comet assay, i.e. the single cell gel electrophoresis assay, detects a broad spectrum of DNA damages like DNA strand breaks, alkali-labile sites, DNA–DNA cross-links, and DNA–protein cross-links [3]. The test reveals damaged DNA fragments that migrate in the form of a comet-like tail behind the individual

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Станковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Фармакологија и токсиколошки профил новосинтетисаних деривата хроман-2,4-диона у функцији антикоагулативне активности *in vivo*

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 27.2.2018. године,

Невена Станковић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Станковић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Фармакологија и токсиколошки профил новосинтетисаних деривата хроман-2,4-диона у функцији антикоагулативне активности *in vivo*

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 27.2.2018. године,

Невена Становић

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>