

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena Z. Đorđević Aleksić

BIOLOŠKA AKTIVNOST ALKILTIO I ARILTIO
DERIVATA 2-*TERC*-BUTIL-1,4-BENZOHINONA

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena Z. Đorđević Aleksić

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALKYLTHIO AND
ARYLTHIO DERIVATIVES OF 2-*TERT*-BUTYL-
1,4-BENZOQUINONE

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

Mentori:

dr Branka Vuković-Gačić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Irena Novaković, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Centar za hemiju

Komisija:

dr Stefana Cvetković, docent,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Stoimir Kolarević, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Aleksandra Margetić, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Centar za hemiju

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Najveći deo ove doktorske disertacije urađen je na Katedri za Mikrobiologiju, Centru za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Određeni delovi rađeni su na Hemijskom fakultetu u saradnji sa Centrom za hemiju na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu; na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka Instituta za botaniku i Botaničku baštu „Jevremovac“ Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, kao i na Odseku za genetičku toksikologiju i biologiju raka na Nacionalnom institutu za biologiju, Univerziteta u Ljubljani.

Veliku zahvalnost dugujem mentorki, prof. dr Branki Vuković-Gačić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za celokupno preneto znanje tokom master i doktorskih studija. Hvala Vam na nesebičnoj pomoći, strpljenju, trudu, savetima, kao i vremenu koje ste uložili u moje akademsko sazrevanje. Takođe, hvala Vam na ukazanom poverenju u zajedničkom radu i svim pruženim prilikama za moje profesionalno usavršavanje.

Neizmernu zahvalnost dugujem mentorki dr Ireni Novaković, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, za celokupno angažovanje tokom mojih master i doktorskih studija. Hvala Vam na prenetom znanju iz hemije, koje je dalo ovoj disertaciji multidisciplinarnost i potrebnu širinu. Zahvaljujem se takođe na izuzetnom trudu i izdvojenom vremenu, naročito u završnim fazama izrade ove disertacije, koje su mi bile neprocenjivo značajne.

Veliku zahvalnost dugujem Dr Stoimiru Kolareviću, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beograd. Hvala Vam na svemu, čak i na onim sitnicama koje možda ni ne pamtite, a meni su izuzetno značile. Hvala Vam na svakom odgovoru, ukazanim prilikama za moju edukaciju i usavršavanje, iskustvu, neprocenjivim savetima, sugestijama i pomoći tokom rada u laboratoriji, ali i na terenu. Naročito sam zahvalna na to što sam u radu sa Vama zavolela posao kojim se danas bavim. Neizmernu zahvalnost dugujem i Vašoj supruzi, Margareti Kraćun-Kolarević, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, na toplim rečima, pažnji, pruženom znanju i svim savetima prilikom laboratorijskog i terenskog rada.

Zahvaljujem se dr Stefani Cvetković, docentu Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, kao i dr Aleksandri Margetić, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu. Hvala Vam na uloženom trudu, konstruktivnim savetima i sugestijama koje su veoma uticale na oblikovanje ove disertacije.

Najlepše hvala dr Karolini Sunjog i dr Jovani Kostić, koleginicama sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujem Vam na prenetom znanju tokom terenskog i laboratorijskog rada, savetima, sugestijama, nesebičnom trudu i posvećenosti. Zahvalnost dugujem i ostalim kolegama sa Odseka za biologiju i zaštitu kopnenih voda, Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu: dr Stefanu Skoriću, dr Željki Višnjić Jeftić, dr Marku Rakoviću, dr Dušanu Nikoliću, dr Mariji Smederevac-Lalić, dr Gorčinu Cvijanoviću, dr Milici Jaćimović, dr Zoranu Gačiću i dr Mirjani Lenhardt. Hvala Vam na svim savetima i pomoći u laboratorijskom i terenskom radu, prijateljskoj atmosferi prilikom rada, strpljenju i požrtvovanosti, kao i prenetoj ljubavi prema ihtiologiji i našim prelepim rekama. Dr Dušanu Nikoliću naročito hvala na pomoći prilikom organizacije dobijenih rezultata ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Bojani Žeguri, doc. dr Alji Štern, prof. dr Metki Filipič i ostalim kolegama sa Odseka za genetičku toksikologiju i biologiju raka, Nacionalnog instituta za biologiju Univerziteta u Ljubljani, na pomoći prilikom izvođenja γ H2AX testa i analize ćelijskog ciklusa na HepG2 ćelijama, kao i na pomoći pri statističkoj obradi dobijenih rezultata. Mnogo hvala

na izdvojenom vremenu, kao i na prenetom znanju i sjajnoj atmosferi prilikom rada i boravka u Vašoj laboratoriji. Dugujem zahvalnost i doc. dr Andreji Ramšak kao i njenim kolegama sa Morske biološke stanice Piran, Nacionalnog instituta za biologiju Univerziteta u Ljubljani na ukazanoj prilici za moje usavršavanje tokom doktorskih studija. Hvala Vam na nesebičnom zalaganju i prenetom znanju koje ima izuzetan značaj za razvoj moje profesionalne karijere.

Posebno se zahvaljujem dr Jovani Jovanović Marić, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, kao i njenim kolegama i Nini Tomić, istraživaču saradniku Instituta tehničkih nauka SANU. Jovana i Nina hvala vam pre svega na prijateljstvu ali i na podršci, na razmeni ideja i iskustava tokom našeg akademskog puta.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Mariani Oalđe Pavlović i prof. dr Sonji Duletić-Laušević sa Katedre za morfologiju i sistematiku biljaka Instituta za botaniku i Botaničku baštu „Jevremovac“ Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Hvala na velikoj pomoći prilikom eksperimentalnog ispitivanja antioksidativne i prooksidativne aktivnosti jedinjenja, dragocenim savetima, kao i prijateljskoj atmosferi u radu sa Vama.

Posebno se zahvaljujem profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu: prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević, prof. dr Slaviši Stankoviću, prof. dr Biljani Nikolić, prof. dr Tanji Berić i dr Dragani Mitić Čulafić, na pruženom znanju. Hvala dr Ivanu Nikoliću, Tei Ganić, dr Olji Medić, dr Bojani Vasilijević, dr Ivici Dimkiću, dr Tamari Janakiev, dr Stefani Vuletić i Tamari Ranković na prijatnoj atmosferi i pomoći prilikom zajedničkog rada u laboratoriji. Zahvaljujem i svojim dragim kolegama: dr Bojanu Iliću, dr Marini Jovanović, dr Bojanu Iliću, dr Marini Jovanović, dr Aleksandri Jelušić, Jeleni Milovanović na divnoj atmosferi koja je vladala tokom rada sa vama. Zahvaljujem se i Luki Gačiću na pomoći u prevođenju radova na engleski jezik, druženju i prijateljskoj atmosferi u zajedničkom radu.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na podršci, a posebno se zahvaljujem svom ocu koji mi je otkrio svet nauke još od najranijeg detinjstva.

Tata, hvala!

Biolška aktivnost alkiltio i ariltio derivata 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona

Sažetak

U ovoj disertaciji su sintetisana jedinjenja sa istom farmakoforom kao i biološki aktivna jedinjenja poreklom iz prirodnih proizvoda, alkiltio i ariltio derivati 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona – TBQ i ispitana je njihova biološka aktivnost.

Jedinjenja pokazuju dobar antioksidativni potencijal i dovode do produkcije slobodnih radikala, pri čemu se najviše ističe 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinon (derivat **4**), koji zajedno sa 2-*terc*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinonom (derivat **3**) pokazuje najjači antineurodegenerativni potencijal. Mikrodilucionim testom uočena je jača antimikrobna aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama, naročito prema *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. Svi derivati, osim 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinona (derivat **6**), pokazuju manju toksičnost od TBQ prema *Artemia salina*. MTT i MTS testom je uočeno da jedinjenja, generalno, pokazuju umeren citotoksični efekat prema humanim ćelijskim linijama dok je derivat **4** pokazao najjači efekat. Jedinjenja su pokazala jači efekat na inhibiciju migracije tumorske A549 ćelijske linije u odnosu na zdravu MRC-5 ćelijsku liniju. Genotoksična aktivnost jedinjenja primenom SOS/*umuC* testa na prokariotskom model sistemu nije uočena, niti je primećena interakcija sa plazmidnom DNK. Komet testom, na eukariotskim model sistemima, pokazano je da izabrane hemijske modifikacije pojačavaju genotoksični potencijal dok je derivat **4** pokazao najjači efekat, uključujući indukciju dvolančanih oštećenja DNK γ H2AX testom i značajno veće zaustavljanje ćelijskog ciklusa HepG2 ćelija u G₂/M fazi u odnosu na TBQ.

Analizom svih dobijenih rezultata, derivat **4** je pokazao najjaču biološku aktivnost.

Ključne reči: biološki aktivna jedinjenja, hinoni, TBQ, alkiltio i ariltio derivati, antimikrobna aktivnost, citotoksičnost, genotoksičnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija, Genotoksikologija

Biological activity of alkylthio and arylthio derivatives of 2-*tert*-butyl-1,4-benzoquinone

Abstract

In this dissertation, compounds with the same pharmacophore as well as biologically active compounds originating from natural products, alkylthio and arylthio derivatives of 2-*tert*-butyl-1,4-benzoquinone - TBQ, were synthesized, and their biological activity was examined.

The compounds have good antioxidant potential and lead to the production of free radicals, with 2-*tert*-butyl-5,6-(ethylenedithio)-1,4-benzoquinone (derivative **4**) standing out the most, along with 2-*tert*-butyl-5-(propylthio)-1,4-benzoquinone (derivative **3**), showing the strongest antineurodegenerative potential. A stronger antimicrobial activity against gram-positive bacteria, particularly *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, was observed through a microdilution test. All derivatives, except 2-*tert*-butyl-6-(phenylthiol)-1,4-benzoquinone (derivative **6**), exhibit lower toxicity than TBQ to *Artemia salina*. Using MTT and MTS assays, compounds generally have moderate cytotoxic effects on human cell lines, with derivative **4** showing the strongest effect. The compounds have demonstrated a stronger effect on inhibiting the migration of the tumor A549 cell line compared to the healthy MRC-5 cell line. No genotoxic activity of the compounds was observed using the SOS/*umuC* test on the prokaryotic model system, nor was there any interaction with plasmid DNA. On eukaryotic model systems, using the comet assay, selected chemical modifications enhance the genotoxic potential, with derivative **4** showing the strongest effect, including induction of double-strand DNA damage as assessed by the γ H2AX test, and significantly greater cell cycle arrest in the G₂/M phase in HepG2 cells compared to TBQ.

All obtained results reveal that derivative **4** exhibits the strongest biological activity.

Key words: biologically active compounds, quinones, TBQ, alkylthio and arylthio derivatives, antimicrobial activity, cytotoxicity, genotoxicity

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Microbiology, Genotoxicology

Lista skraćenica i oznaka korišćenih u radu:

4NQO – 4-nitrohinolin-1-oksid
5-FU – 5-fluorouracil
AChE – acetilholinesteraza
ALS – alkalno labilna mesta
AML – akutna mijeloidna leukemija
AO – akridin-oranž
APC – anti-H2AX pS139 antitela (engl. anti-H2AX-Phosphorylated (Ser139) Antibody)
Ara-A – aciklovir
Ara-C – citosar-U
ARC test – test toksičnosti na model organizmu *Artemia salina*
AsAc – askorbinska kiselina
ASMR – starosna standardizovana stopa mortaliteta (engl. Age standardized mortality rate)
ATC – anatomsko terapijska klasifikacija
ATM-kinaza – kinaza sa mutiranom ataksijom-telangiektazijom
ATP – adenzin-trifosfat
BHA – engl. Brain-Heart agar
BHI – engl. Brain-Heart infusion
CCF – zatvorena kružna forma plazmida
CFU – broj jedinica koje formiraju kolonije (engl. Colony Forming Unit)
CHK2 – kinaza kontrolne tačke ćelijskog ciklusa 2
CisPt – cisplatina
DMEM – engl. Dulbeccos modified Eagles medium
DMSO – dimetil-sulfoksid
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP – deoksinukleotid-trifosfat
DPBS – Dulbekov fiziološki rastvor puferovan sa fosfatom (engl. Dulbecco's phosphate-buffered saline)
DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DSBs – dvolančani prekidi DNK molekula (engl. DNA double-strand breaks)
EB – etidijum-bromid
Na-EDTA – dinatrijumova so etilendiamintetrasirćetne kiseline (engl. Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium Salt Dihydrate)
ETO – etopozid
FBS – fetalni goveđi serum
FDA – Uprava za hranu i lekove SAD (engl. Food and Drug Administration)
GA – galantamin
GSH – glutation
HIV – virus humane imunodeficijencije
IARC – Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer)
IL-2 – interleukin-2

IL-6 – interleukin-6
JECFA – Zajednički stručni komitet FAO/WHO za aditive u hrani (engl. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
LA – Luria Bertani Agar
LB – Luria Bertani bujon (engl. Luria Bertani Broth)
LDH-A – laktat-dehidrogenaza A
LMP – agarosa niske tačke topljenja (engl. Low melting point agarose)
MBK – minimalna baktericidna koncentracija
MHB – Mueller-Hinton bujon
MIK – minimalna inhibitorna koncentracija
MMAE – monometil auristatin E
MN – mikronukleus
MS – multipla skleroza
NBT reagens – nitroplavo-tetrazolijum-hlorid (engl. Nitro Blue Tetrazolium Chloride)
nlme – nelinearni model mešovityh efekata (engl. nonlinear mixed-effects)
NMP – agarosa normalne tačke topljenja (engl. Normal melting point agarose)
NSCLC – nesitnoćelijski karcinom pluća (engl. non-small cell lung cancer)
OCF – otvorena kružna forma plazmida
ONPG – orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
PAH – policiklični aromatični ugljovodonici
PARP – poli-akceptor ADP-D-ribozil-transferaza
PBS – Slani rastvor fosfatnog pufera (engl. Phosphate Buffered Saline Solution)
REML – metoda procene maksimalne verodostojnosti (engl. Restricted Maximum Likelihood)
RIF – rifampicin
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne kiseonične vrste (engl. reactive oxygen species)
SAD – Sjedinjene Američke Države
SBRT – stereotaktička (telesna) radioterapija
SCGE – elektroforeza pojedinačnih ćelija (engl. Single Cell Gel Electrophoresis)
SOD – superoksid-dismutaza
SSBs – jednolančani prekidi DNK molekula (engl. DNA single-strand breaks)
STR – streptomycin
T.I.% – intenzitet repa komete (engl. Tail intensity)
TBE pufer – Tris-borna kiselina-EDTA pufer (engl. Tris-Borate-EDTA buffer)
TBHQ – *tert*-butilhidrohinon
TE pufer – Tris-EDTA puferski rastvor
TGA medijum – Tripton-glukoza-ampicilin medijum
TLC – tankoslojna hromatografija
TNF-a – faktor nekroze tumora
WHO – Svetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Biološki aktivni proizvodi prirodnog porekla	1
1.2. Biološki aktivni proizvodi sintetičkog porekla.....	3
1.3. Hinoni	4
1.4. Mehanizmi delovanja hinona.....	6
1.4.1. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)	6
1.4.2. Alkilovanje/arilovanje proteina, lipida i nukleinskih kiselina	8
1.4.3. Interakcije sa DNK molekulom	8
1.5. Biološka aktivnost hinona i njihova primena u medicinskoj hemiji	8
1.5.1. Antimikrobna aktivnost.....	9
1.5.2. Antioksidativna aktivnost	10
1.5.3. Antineurodegenerativna aktivnost	11
1.5.4. Citotoksična i genotoksična aktivnost hinona.....	11
1.6. Maligne bolesti	12
1.7. Hinoni kao antitumorski agensi	15
1.8. Marinski organizmi kao izvor novih hinonskih antitumorskih agenasa.....	16
1.8.1. Avarol/avaron.....	16
1.9. 2- <i>terc</i> -butil-1,4-benzohinon (TBQ)	18
1.9.1. Derivati 2- <i>terc</i> -butil-1,4-benzohinona	21
1.10. Ispitivanje biološke aktivnosti	23
1.10.1. Biohemijski testovi u proceni biološke aktivnosti	24
1.10.2. Ispitivanje antimikrobnog efekta.....	26
1.10.3. Ispitivanje toksičnosti i citotoksičnosti	27
1.10.4. Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal ćelija <i>in vitro</i> (Wound healing ili Scratch assay)	29
1.10.5. Ispitivanje interakcija sa DNK molekulom.....	29
1.10.6. Analiza ćelijskog ciklusa	32
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
3. MATERIJAL I METODE	35
3.1. Materijal.....	35
3.1.1. Biološki materijal	35
3.1.2. Citostatici	35
3.1.3. Model mutagen	36
3.1.4. Antibiotici	36
3.1.5. Ostali lekovi	36
3.1.6. Rastvori i hemikalije	36
3.2. Metode	42
3.2.1. Sinteza alkiltio i ariltio derivata TBQ	42
3.2.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH testa.....	44

3.2.3.	Određivanje uticaja na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (NBT test)	45
3.2.4.	Ispitivanje antineurodegenerativne aktivnosti testom inhibicije enzima AchE	45
3.2.5.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	46
3.2.6.	Ispitivanje toksičnosti na model organizmu <i>Artemia salina</i>	48
3.2.7.	Kultivacija sisarskih ćelija	48
3.2.8.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti	49
3.2.9.	Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal ćelija MRC-5 i A549 linija <i>in vitro</i> (Wound healing ili Scratch assay).....	50
3.2.10.	Ispitivanje interakcija sa DNK molekulom.....	51
3.2.11.	Analiza ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom.....	55
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	56
4.1.	Antioksidativna aktivnost TBQ i njegovih derivata	56
4.2.	Uticaj TBQ i njegovih derivata na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta	56
4.3.	Antineurodegenerativna aktivnost TBQ i njegovih derivata	57
4.4.	Antimikrobna aktivnost TBQ i njegovih derivata	59
4.4.1.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti difuzionom metodom u bunaru	59
4.4.2.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom	59
4.4.3.	Uticaj TBQ i njegovih derivata na adheziju i invaziju <i>P. aeruginosa</i> PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije.....	61
4.5.	Toksičnost TBQ i njegovih derivata na model organizmu <i>Artemia salina</i>	62
4.6.	Citotoksična aktivnost TBQ i njegovih derivata	63
4.7.	Uticaj TBQ i njegovih derivata na migratorni potencijal ćelija MRC-5 i A549 linija <i>in vitro</i>	67
4.8.	Interakcije TBQ i njegovih derivata sa DNK molekulom.....	69
4.8.1.	Interakcije TBQ i njegovih derivata na acelularnom model sistemu (plazmidna DNK)	69
4.8.2.	Interakcije TBQ i njegovih derivata na prokariotskom model sistemu (SOS/ <i>umuC</i> testom na <i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002).....	71
4.8.3.	Interakcije TBQ i njegovih derivata na eukariotskim model sistemima (Komet test)....	73
4.8.4.	Indukcija dvolančanih oštećenja DNK molekulom TBQ i njegovim derivatima (γ H2AX test)	76
4.9.	Analiza uticaja TBQ i njegovih derivata na zaustavljanje ćelijskog ciklusa.....	77
5.	GENERALNA DISKUSIJA.....	79
6.	ZAKLJUČCI.....	84
7.	LITERATURA.....	86
8.	PRILOZI.....	102

1. UVOD

Biološki aktivna jedinjenja su vrste hemijskih supstanci koje se nalaze u malim količinama u različitim organizmima i imaju dejstva koja mogu uticati na zdravlje drugih organizama, pa i ljudi. Najveći broj biološki aktivnih jedinjenja izolovano je iz biljaka, mikroorganizama i marinskih organizama. Budući da ova jedinjenja ne učestvuju direktno u normalnom rastu, razviću ili reprodukciji organizma, oni se nazivaju i sekundarnim metabolitima. Međutim, osim prirodnih jedinjenja, u biološki aktivna jedinjenja spadaju i sintetička jedinjenja proizvedena, uglavnom, po uzoru na biološki aktivne komponente prirodnih proizvoda.

Najznačajnija blagotvorna dejstva biološki aktivnih jedinjenja na zdravlje ljudi su antioksidativna, antimikrobna, antiinflamatorna i antitumorska dejstva, zbog čega je najveći broj istraživanja usmeren na njihovu primenu u lečenju kardiovaskularnih bolesti i prevenciji ili terapiji malignih bolesti. Navedena istraživanja se često kombinuju sa naprednim tehnologijama, kao što su genomika, proteomika i farmakogenomika, kako bi se identifikovala nova biološki aktivna jedinjenja ili pospešile aktivnosti već poznatih proizvoda. Takođe, pronalaženje novih biološki aktivnih jedinjenja je važno jer omogućava razvoj novih lekova za bolesti za koje, uprkos napretku savremene medicine, nisu pronađeni delotvorni lekovi, niti adekvatna terapija. Ova istraživanja bi pomogla i u smanjenju rizika od neželjenih efekata lekova ili terapije, kao i u poboljšanju kvaliteta života pacijenata. Primeri biološki aktivnih jedinjenja koja ulaze u sastav nekih lekova uključuju: likopene, resveratrol, lignane, tanine, indole i hinone.

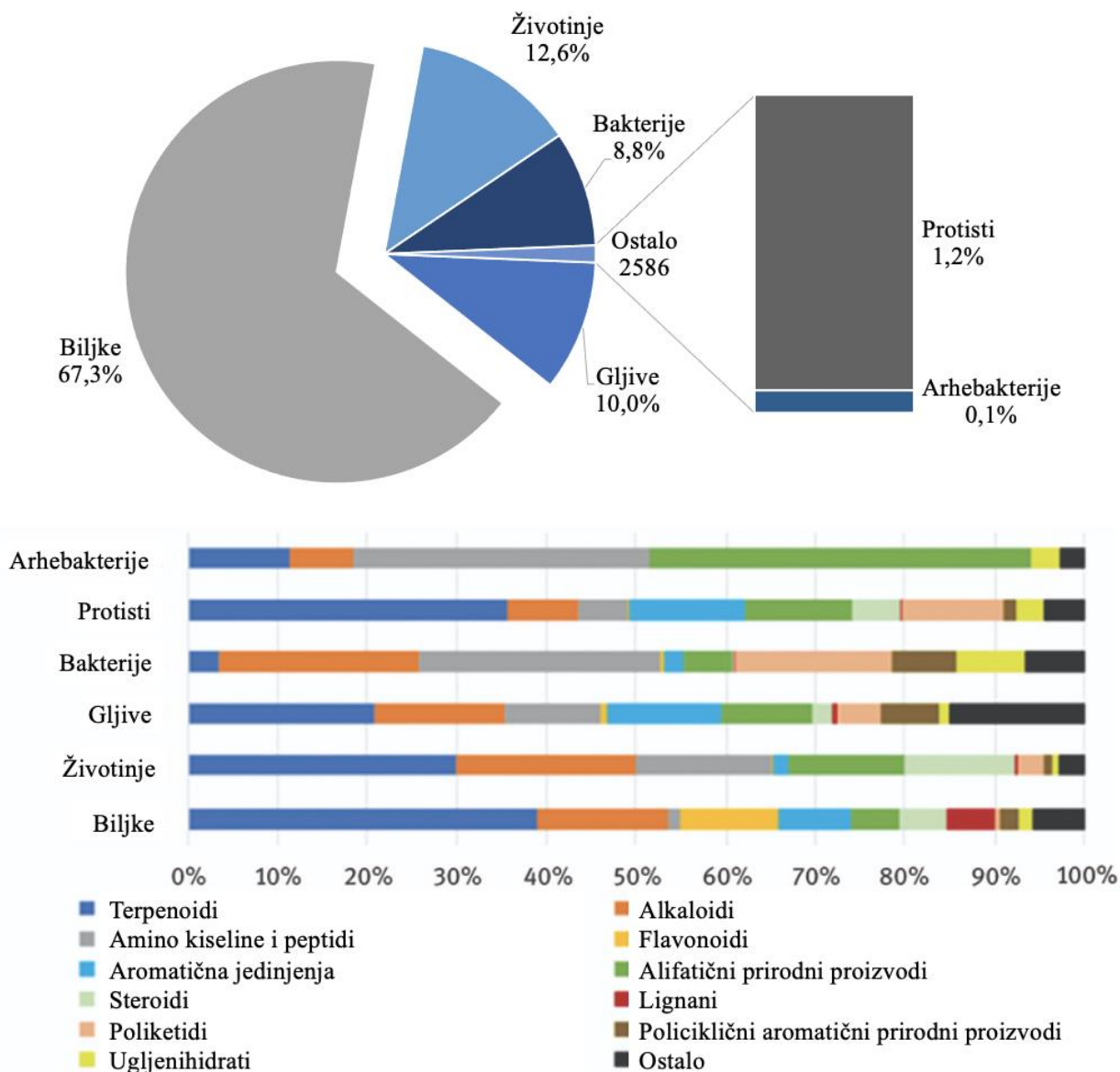
Međutim, pristup dovoljnoj količini biološkog materijala i pitanje sticanje prava intelektualne svojine za nemodifikovana biološki aktivna jedinjenja poreklom iz prirodnih proizvoda, deo su razloga koji su značajno doprineli opadanju interesovanja od strane farmaceutske industrije za njihovu eventualnu primenu (Atanasov i sar., 2021). Stoga je poslednjih godina farmaceutska industrija usmerena više ka alternativnim, sintetičkim analogima kreiranim po uzoru na biološki aktivna jedinjenja iz prirodnih proizvoda, a čija je proizvodnja ekonomski isplativija.

Zbog svega navedenog, biološki aktivna jedinjenja predstavljaju potencijalne sirovine za proizvodnju lekova ili služe kao izvori ideja za sintezu novih lekova, naročito u terapiji malignih bolesti.

1.1. Biološki aktivni proizvodi prirodnog porekla

Uloga prirodnih proizvoda kao terapijskih agenasa prepoznata je još od davnina. Još od razvoja prvih civilizacija, ljudi su koristili proizvode poreklom iz mikroorganizama, biljaka i životinja u najrazličitije terapijske svrhe. Najstariji pisani zapisi primene prirodnih proizvoda u terapijske svrhe potiču iz drevne Mesopotamije, 2600 godina p.n.e. Među supstancama koje su koristili bila su ulja kedra, čempresa, sladića, smirne i sok od maka, koji svoju primenu i danas nalaze za lečenje velikog broja bolesti poput kašlja, prehlade, upalnih procesa i infekcija (Cragg & Newman, 2005). Raniji istorijski izvori upućuju na Stari Egipat, odnosno Ebersov papirus koji datira iz 1500 god. p.n.e. i dokumentuje oko 700 terapijskih prirodnih proizvoda (uglavnom biljaka) različitih formi (melemi, sirupi i dr.) (Cragg & Newman, 2005). Ne treba izostaviti i tradicionalnu kinesku, indijsku (Ajuverda), arapsku i grčku medicinu koje su obeležile vekove ljudskog društva i postavile osnove savremene medicine i farmacije.

Razvojem nauke i tehnologije, do sada je otkriveno približno 300 000 prirodnih proizvoda pri čemu je više od dve trećine poreklom iz biljaka. Najveći broj njih, prema hemijskoj strukturi, pripadaju klasama terpenoida i alkaloida (**Slika 1**) (Chassagne i sar., 2019).



Slika 1. Distribucija biološki aktivnih prirodnih proizvoda po carstvima živih bića i distribucija glavnih hemijskih klasa kojima pripadaju. Preuzeto i modifikovano od (Chassagne i sar., 2019).

Ipak, ne ispoljavaju svi prirodni proizvodi biološku aktivnost. Tako na primer, samo 7% prirodnih proizvoda poreklom iz biljaka ispoljava neku biološku aktivnost, dok je kod bakterija, od kojih potiče samo 9% od ukupnog broja otkrivenih prirodnih proizvoda, čak polovina biološki aktivna (Bérdy, 2012). Zbog toga, ukupan broj biološki aktivnih proizvoda koji se koriste kao terapijski agensi (lekovi) ili su određenim fazama kliničkih ispitivanja iznosi svega 3 882, što je oko 1% od ukupnog broja biološki aktivnih prirodnih proizvoda (Chassagne i sar., 2019). Ovaj podatak zabrinjava u pogledu budućeg potencijala prirodnih proizvoda kao izvora novih lekova, što istovremeno naglašava važnost istraživanja alternativnih izvora. Biološki aktivni prirodni proizvodi danas najveću primenu imaju u terapiji malignih, zaraznih i kardiovaskularnih bolesti kao i u terapiji multiple skleroze (Atanasov i sar., 2021).

Carstvo bakterija je najveći izvor lekova u terapiji zaraznih bolesti, pre svega antibakterijskih agenasa (antibiotika). Prema podacima Uprave za hranu i lekove SAD (FDA) polovina antibiotika su proizvodi bakterijskog porekla (Patridge i sar., 2016). Kada se pogleda hemijska struktura, najveći broj antibiotika pripada klasi amino kiselina i peptida. Mehanizmi njihovog delovanja uključuju

inhibiciju sinteze ćelijskog zida, proteina, nukleinskih kiselina i promene permeabilnosti membrane bakterijske ćelije (Jezdimirović, 2005). Najveći broj antibiotika proizvodi su roda *Streptomyces* koji je osim antibakterijskih agenasa izvor i antifungalnih, antiparazitskih i imunosupresivnih agenasa. Rod *Streptomyces* izvor je β -laktamskih antibiotika (cefamicin), aminoglikozida (neomicin i kanamicin); makrolida (tilozin i spiramicin), peptida (aktinomycin), poliena (kandicidin, amfotericin B i nistatin) i tetraciklina (tetraciklin, hlorotetraciklin i oksitetraciklin) (Katz & Baltz, 2016). Carstvo gljiva takođe je izvor antibiotika poput penicilina iz vrste *Penicillium chrysogenum* i cefalosporina poreklom iz vrste *Cephalosporium acremonium* i dr. (Chassagne i sar., 2019).

U terapiji malignih bolesti, udeo biološki aktivnih proizvoda prirodnog porekla je još veći. Poslednje tri decenije, približno 80% novih molekula, koje je odobrila FDA za lečenje raka, potiču od prirodnih proizvoda dobijenih od biljaka, marinskih organizama i mikroorganizama (Bishayee & Sethi, 2016; Newman & Cragg, 2016). Mehanizmi delovanja prirodnih proizvoda kao antitumorskih agenasa su: regulacija imunološke funkcije, izazivanje apoptoze ili autofagije i/ili inhibiranje proliferacije ćelija (Rayan i sar., 2017). Po hemijskoj strukturi to su uglavnom alkaloidi, flavonoidi, terpenoidi, polisaharidi, saponini i dr. (Avato i sar., 2017; Joshi i sar., 2017; Majumder i sar., 2017). Najčešće se prirodni proizvodi u lečenju maligno transformisanih ćelija primenjuju kao kombinacija nekoliko agenasa sa različitim ciljnim mestima delovanja.

Prirodni proizvodi sve više dobijaju pažnju u terapiji kardiovaskularnih bolesti. Jedan primer takvog proizvoda je crveni kvasac riže produkt vrste *Monascus purpureus* zastupljen u tradicionalnoj kineskoj medicini. Ovaj prirodni proizvod se koristi kao dodatak ishrani kod pacijenata sa kardiovaskularnim bolestima, jer je pokazao dobre rezultate u snižavanju nivoa holesterola u krvi (Banach i sar., 2022). Osnova njegove biološke aktivnosti je monakolin K, jedinjenje čiji je derivat sintetički lek lovastatin koji se koristi za smanjenje nivoa holesterola u krvi. Osim njega, široko zastupljen lek u terapiji kardiovaskularnih bolesti je i digoksin koji se koristi za lečenje srčanih aritmija. Digoksin je izolovan iz biljke *Digitalis purpurea*, deluje na srčane ćelije i pomaže u regulisanju srčanog ritma.

Najveća prednost i razlog zbog čega i pored sve većeg napretka tehnologije i farmaceutske industrije lekovi poreklom iz prirodnih proizvoda još uvek imaju veliku ulogu u kliničkoj praksi je njihova ogromna raznovrsnost i strukturna složenost.

1.2. Biološki aktivni proizvodi sintetičkog porekla

Uprkos navedenim prednostima, određeni nedostaci biološki aktivnih proizvoda prirodnog porekla znatno su uticali na to da farmaceutske kompanije smanje finansijsku podršku za otkrivanje novih lekova zasnovanih na njima. Najveći nedostaci uključuju otežan pristup dovoljnim količinama biološkog materijala, izolovanje, karakterizaciju i sticanje prava intelektualne svojine za nemodifikovane prirodne proizvode.

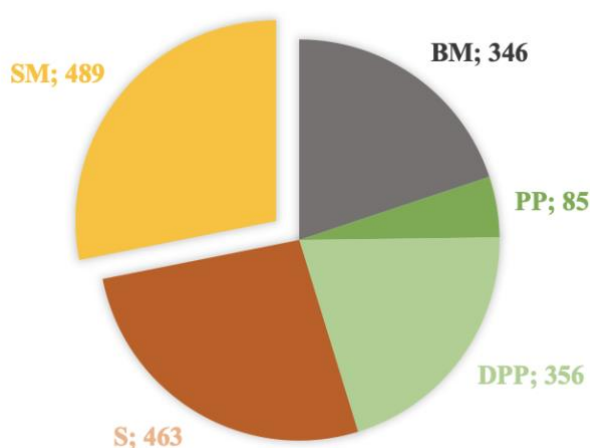
Dodatni nedostatak se odnosi na rigorozne propise koji definišu potrebu za podelom koristi sa zemljama porekla biološkog materijala. Ovi propisi su definisani Konvencijom Ujedinjenih nacija o biološkoj raznolikosti iz 1992. godine i Protokolom iz Nagoje iz 2014. god, a njihov cilj je pravična podela koristi između zemalja (Burton & Evans-Ilidge, 2014).

Postoje i drugi razlozi sve manje upotrebe prirodnih proizvoda i njihove zamene sintetičkim analogima. Jedan takav primer je problem antibakterijske rezistencije koji je nastao prekomernom upotrebom antibiotika i sposobnosti bakterija da brzo mutiraju. Zbog toga većina antibiotika koji se danas koriste predstavljaju polusintetičke ili sintetičke analoge različitih biološki aktivnih jedinjenja prirodnog porekla. Tako se prirodnim antibioticima delimično menja hemijska struktura ili se kombinuju sa drugim jedinjenjima kako bi se zadržala njihova efikasnost.

Postoji veliki broj drugih lekova koji su našli široku primenu u medicini, a razvijeni su na osnovu biološki aktivnih proizvoda prirodnog porekla. Najznačajniji primeri su:

1. Aspirin (acetilsalicilna kiselina), lek koji se koristi za ublažavanje bola, smanjenje upalnih procesa i snižavanje telesne temperature. Ovaj lek je derivat salicilne kiseline koja se prirodno javlja u kori vrbe.
2. Paklitaksel, lek koji se koristi u terapiji malignih bolesti (dojke, pluća i jajnika), izolovan iz kore pacifičke tise (*Taxus brevifolia*). Paklitaksel sprečava deobu maligno transformisanih ćelija i predstavlja jedan od najvažnijih antitumorskih lekova.
3. Metformin, lek koji se koristi za lečenje dijabetesa tipa 2, a Svetska zdravstvena organizacija ga smatra „esencijalnim lekom“ (American Diabetes Association, 2020). Derivat je jedinjenja galegina, koje se nalazi u biljci *Galega officinalis* tradicionalno korišćenoj za lečenje simptoma dijabetesa.

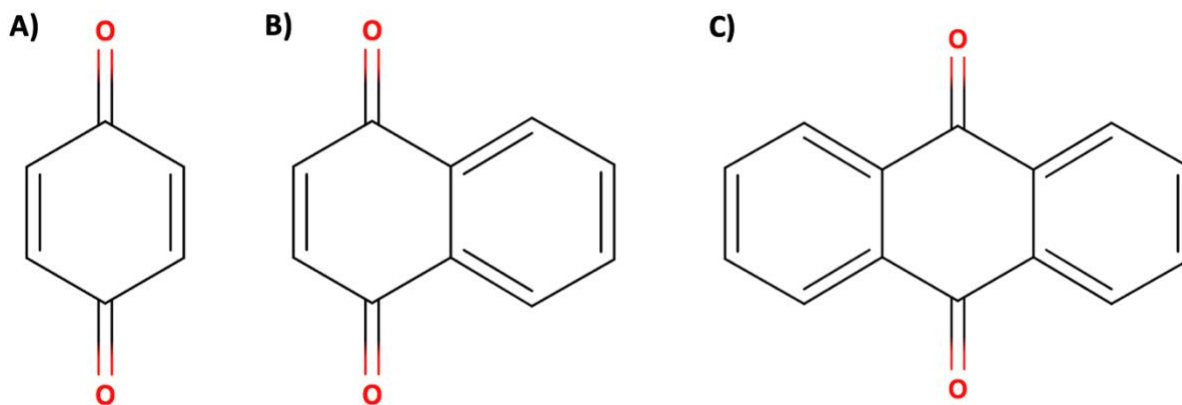
Zbog svega navednog, poslednjih nekoliko decenija, biološki aktivni proizvodi sintetičkog porekla zauzimaju sve veći udeo u broju modernih lekova. Pregledom novootkrivenih lekova u protekle približno četiri decenije (od 1978 do 2019. god), 489 sintetičkih lekova (kreirani po uzoru na prirodne proizvode) odobreno je za različite terapeutske svrhe, dok je npr. broj lekova prirodnog porekla 85, skoro šest puta manji (Newman & Cragg, 2020) (**Slika 2**).



Slika 2. Svi odobreni lekovi od 1978. do 2019. god (Newman & Cragg, 2020). BM-biološki makromolekuli (peptidi ili proteini izolovani iz organizma ili ćelijskih linija ili proizvedeni biotehnoškim putem), PP-proizvodi prirodnog porekla, DPP-derivati prirodnih proizvoda, S-sintetički lekovi i SM-sintetički lekovi kreirani po uzoru na proizvode prirodnog porekla, mimetici i njihovi derivati.

1.3. Hinoni

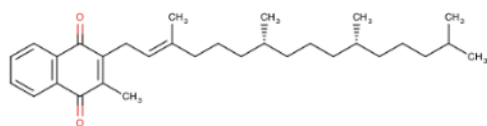
Hinoni su široko zastupljena grupa organskih jedinjenja koja poseduju višestruke biološke aktivnosti, a mogu se naći u velikom broju različitih organizama, uključujući životinje, biljke i mikroorganizme. Po hemijskoj strukturi spadaju u ciklična jedinjenja koja imaju dve karbonilne funkcionalne grupe u istom šestočlanom prstenu. Tri glavne hemijske klase hinona su benzohinoni (**Slika 3A**), naftohinoni (**Slika 3B**) i antrahinoni (**slika 3C**), koji sadrže 1, 2 i 3 benzenova prstena, redom.



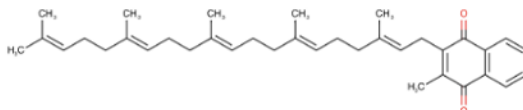
Slika 3. Hemijska struktura (A) 1,4-benzohinona, (B) 1,4-naftohinona i (C) 9,10-antrahinona.

Na hiljade različitih hinonskih jedinjenja izolovana su iz različitih organizama, pri čemu se značajno razlikuje način nastanka hinona u živim organizmima, ali i njihova funkcija. U klasu endogenih ili prirodnih hinona spadaju izoprenoidni hinoni koji se nalaze u ćelijskim membranama svih živih organizama. Oni se sastoje od hidrofilne glave i hidrofobnog izoprenoidnog lanca, što ovim molekulima daje liposolubilni karakter. Izoprenoidni hinoni, uglavnom, učestvuju kao nosioci elektrona i protona u procesu fotosinteze i ćelijskom disanju, dok su u redukovanom obliku važan antioksidant (Nowicka & Kruk, 2010).

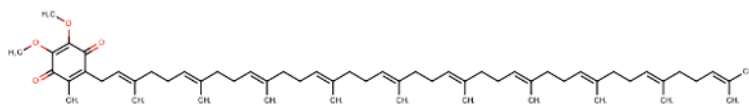
Najznačajniji izoprenoidni hinoni su naftohinoni (vitamin K1, vitamin K2) i benzohinoni (ubihinoni, plastohinoni) (Slika 4). Naftohinoni imaju ulogu u respiratornim i fotosintetičkim lancima transporta elektrona pojedinih bakterija. Vitamin K1 (filohinon) ima ulogu u fotosintetičkom transportnom lancu cijanobakterija, algi i viših biljaka, odnosno svih fotosintetičkih aerobnih organizama. Vitamin K2 (menahinon) učestvuje kao kofaktor u elektron transportnim lancima pojedinih bakterija poput mikobakterija, učestvuje u procesu karboksilacije glutamatnih ostataka proteina, ali i kao faktor koagulacije krvi (De Vos & Koeffler, 2006). Benzohinoni, takođe, imaju ulogu u transportu elektrona. Tako, na primer, ubihinon-10 (koenzim Q10) učestvuje u ćelijskom disanju, a u redukovanom obliku važan je antioksidant (Nowicka & Kruk, 2010). Plastohinoni učestvuju u fotosintetičkom transportnom lancu cijanobakterija i biljnih hloroplasta (Nowicka & Kruk, 2010).



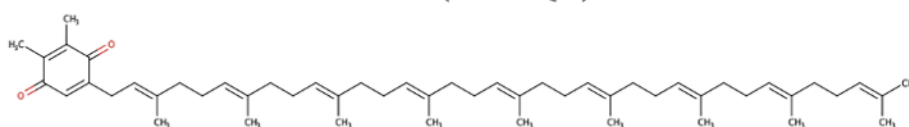
Vitamin K1 (filohinon)



Vitamin K2 (menahinon)



Ubihinon-10 (koenzim Q10)



Plastohinon-9

Slika 4. Hemijske strukture izoprenoidnih hinona.

Hinoni mogu biti i proizvodi metabolizma ksenobiotika i lekova. Benzenovi prstenovi u strukturi ksenobiotika mogu se oksidovati enzimima citohroma P₄₅₀, što dovodi do nastanka fenola, pri čemu se fenoli mogu dalje oksidovati u hinone. Ova oksidativna transformacija ima značajan uticaj na biološku aktivnost i sudbinu ksenobiotika u organizmu, a nastali metaboliti mogu imati različite farmakološke ili toksične efekte u organizmu.

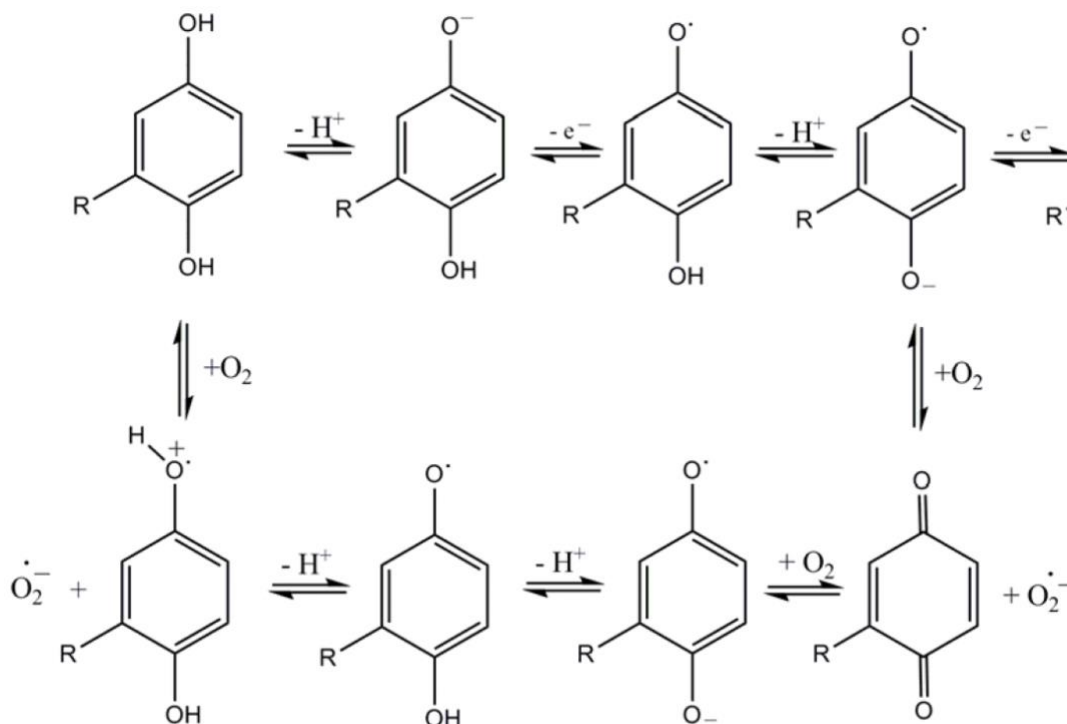
1.4. Mehanizmi delovanja hinona

1.4.1. Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

Slobodni radikali (npr. superoksid anjon-radikal, peroksil radikal, hidroksilni radikal) predstavljaju molekule koji poseduju jedan ili više nesparenih elektrona i zajedno sa reaktivnim kiseoničnim molekulima (molekulski i singletni kiseonik, vodonik peroksid), koji nisu sami po sebi slobodni radikali ali u pobuđenom stanju iniciraju oksidacione procese i stvaranje slobodnih radikala, čine reaktivne kiseonične vrste (ROS). Hinoni su jedinjenja koja podležu redoks ciklusu koji predstavlja kontinuirani ciklus redukcije i oksidacije jedinjenja, formirajući radikalske intermedijere sposobne da prenesu elektron na molekul kiseonika stvarajući superoksidni anjon-radikal ($O_2^{\cdot-}$) (Dudka i sar., 2012). Redoks ciklus na bazi hinona ključan je za mnoge biološke mehanizme, međutim, on može dovesti do stvaranja ROS i na taj način ispoljiti toksični efekat na ćeliju. ROS produkcija je upravo i način antitumorskog delovanja hinona. Jedan od primera značaja redoks ciklusa hinona u biohemijskim procesima ćelije je njihova uloga u mehanizmu ćelijskog disanja, gde se redoks ciklusom hinona olakšava transport elektrona unutar mitohondrija preko ubihinona (koenzim Q) (Nohl, 1990).

Enzimska redukcija hinona može biti jednoelektronska ili dvoelektronska. Jednoelektronska redukcija hinona katalizovana je enzimima NAD(P)H-oksidoreduktazom i citohrom P₄₅₀ reduktazom, pri čemu nastaje semihinon anjon-radikal, koji se u prisustvu molekulskog kiseonika može oksidovati do hinona uz stvaranje superoksidnog anjon-radikala. Superoksidni anjon-radikal se neenzimski ili

pomoću superoksid-dismutaze transformiše do kiseonika i vodonik-peroksida, koji se uklanja katalazom ili glutation-peroksidazom. Dvoelektronska redukcija hinona katalizovana je enzimom DT-dijaforazom, pri čemu nastaju hidrohini oni bez stvaranja semihinon-radikalskog intermedijera. Redoks ciklus hinon/hidrohinskog para prikazan je na **Slici 5**.



Slika 5. Shematski prikaz hidrohinion/hinon redoks ciklusa i nastajanje superoksidnog anjon-radikala (Novaković, 2012).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, smatra se da produkcija ROS najviše doprinosi biološkoj aktivnosti hinona (Lin i sar., 1972; Wilson i sar., 1986). Sa druge strane, u vodenim sredinama, gde je vreme života superoksidnog anjon-radikala kratko, on se može kuplovati sa drugim istim radikalom, uz formiranje H_2O_2 i oslobađanje molekuskog kiseonika (Novaković, 2012). U biološkim sistemima, superoksidni anjon-radikal, ali i sam H_2O_2 mogu stupiti u interakciju sa jonima prelaznih metala (najčešće gvožđa) Fentonovom reakcijom kada nastaje izuzetno toksični hidroksilni radikal ($HO\cdot$) koji može usloviti oksidaciju i degradaciju proteina i nukleinskih kiselina (Novaković, 2012).

Budući da u toku normalnog aerobnog metabolizma u ćelijama kontinuirano nastaju ROS, postoje mehanizmi za sprečavanje njihovog štetnog delovanja od kojih su najznačajniji enzimi (superoksid-dismutaza - SOD, katalaza i glutation) i vitamini (C i E). Vodonik-peroksid se u ćeliji neutrališe u H_2O i O_2 pomoću glutationa (reakcijom glutation-peroksidaze) i katalaze, dok superoksid-dismutaze katalizuju disproporciju superoksidnog anjon-radikala na H_2O_2 i H_2O (Kelly, 1998; Traber & Stevens, 2011). Vitamin C (askorbinska kiselina) i vitamin E svojim antioksidativnim sposobnostima "hvataju" slobodne radikale koji prelaze u manje reaktivne intermedijere i tako štite ćeliju od oštećenja (Traber & Stevens, 2011).

Brojne studije su pokazale da oslobađanje ROS u ćelijama može nadjačati antioksidativni odbrambeni sistem i dovesti do oksidativnog oštećenja DNK molekula, lipida, proteina i ugljenih hidrata. Oslobađanje ROS je uključeno u razvoj nekoliko različitih bolesti ljudi, naročito malignih bolesti, neurodegenerativnih procesa i procesa starenja (Asche, 2005). Reaktivne kiseonične vrste, a posebno izuzetno štetni hidroksilni radikal, dovode do stvaranja preko 100 različitih tipova oksidativnih modifikacija DNK molekula od kojih su najznačajniji primeri spontana oksidacija

guanina od strane hidroksilnog radikala uz nastanak 8-okso-2-dezoksiguanozina koji se uparuje sa adeninom tokom replikacije i dovodi do transverzije guanina u timin (Wiseman & Halliwell, 1996; Dizdaroglu i sar., 2002). Ovaj tip transverzije je najčešće prisutan u onkogenima i spada u jednu od najučestalijih mutacija gena p53, što pokazuje da hinoni mogu doprineti stvaranju maligniteta (Ho i sar., 1996).

1.4.2. Alkilovanje/arilovanje proteina, lipida i nukleinskih kiselina

Hinoni mogu da formiraju kovalentne veze sa makromolekulima unutar ćelije: proteinima, lipidima i DNK molekulom, pri čemu je za njihovo antitumorsko delovanje najvažnija interakcija sa DNK. Delimično supstituisani hinonski molekuli mogu direktno, Michaelovom adicijom, da ariluju ćelijske nukleofile sa kiseonikom, azotom i sumporom (Finley, 1974). Najznačajnije je arilovanje tiola, amina i glutaciona, mada je ovaj tip hemijske reakcije moguć i sa nukleinskim bazama. Hinoni mogu da reaguju sa glutationom (GSH) spontano ili katalizovano glutation-S-transferazama, formirajući manje toksične konjugate hidrohion-glutaciona, što predstavlja početni proces u detoksifikaciji (Buffinton i sar., 1989; Asche, 2005). Ova reakcija je naročito važna, budući da se unutar ćelije nalazi visoka količina GSH. Ipak, izloženost ćelija visokim količinama hinona može zasititi ćelijski sistem detoksifikacije i dovesti do značajnog iscrpljivanja redukovanog oblika tiola arilovanjem glutaciona. Kada se GSH iscrpi, dalje se mogu arilovati ćelijski proteini zavisni od sulfhidrilnih grupa (-SH), što može izazvati nepovratne degenerativne promene i smrt ćelije.

Sa druge strane, alkilujući DNK agensi sa hinonskim jezgrom (čiji je prototip mitomicin C) deluju nakon bioreduktivne aktivacije, što podrazumeva da nakon redukcije molekula dolazi do stvaranja elektrofilnih vrsta, tj. reaktivnih intermedijera koji se kovalentno vezuju za DNK reakcijom nukleofilne adicije nukleinskih baza (Novaković, 2012).

Kod nekih hinonskih lekova moguće je i prenošenje alkil-grupa na azotne baze pri čemu nastaju DNK-hion monofunkcionalni adukti. Tada dolazi do intra i inter-lančanih prekida u DNK i formiranja ukrštenih veza između DNK molekula i proteina (engl. DNA-protein crosslinking) (Helleday i sar., 2008; Woods & Turchi, 2013).

1.4.3. Interakcije sa DNK molekulom

Jedan od načina interakcije hinona sa DNK molekulom je interkalacija koja predstavlja nekovalentno vezivanje jedinjenja za DNK molekul što uzrokuje prekide u DNK lancima, a samim tim i zaustavljanje replikacije DNK i biosinteze proteina. Jedinjenja sa hinonskom strukturom najčešće se interkalacijom ugrađuju u malu brazdu DNK (žljeb) formirajući vodonične veze sa azotnim bazama. Neizbežna hinonska produkcija ROS dodatno dovodi do oštećenja DNK molekula.

Hinoni mogu da dovedu i do depurinacije DNK molekula, tj. hidrolitičkog uklanjanja guanina ili adenina od dezoksiriboze u lancu DNK. Dejstvom hinona najčešće nastaju N7-guaninski i N3-adeninski adukti koji su izuzetno nestabilni, ali mogu biti popravljani ćelijskih mehanizmima reparacije DNK molekula (Cavaliere & Rogan, 2016).

1.5. Biološka aktivnost hinona i njihova primena u medicinskoj hemiji

Ranija istraživanja pokazala su da hinoni poseduju herbicidnu, antimalarijsku, antivirusnu (naročito prema HIV-u), antipsorijaznu, antimalarijsku, antiinflamatornu, antioksidativnu, antidepresivnu i citotoksičnu aktivnost (Sarin i sar., 1987; Lin i sar., 1991; Min i sar., 2002; González-Ibarra i sar., 2005; Martínez & Benito, 2005; da Silva i sar., 2009; Tao i sar., 2010). Zbog navedenog velikog broja bioloških aktivnosti, hinoni su osnova mnogih lekova.

Kao vitamini, hinoni predstavljaju i klasu molekula koji pozitivno utiču na osteoporozu i kardiovaskularne bolesti. Drugi hinoni imaju antimikrobnu ulogu, tačnije inhibiraju rast bakterija,

parazita i gljiva tako što dovode do formiranja vodonik-peroksida, hidrohinona uz pomoć katalaza i peroksidaza (Eisner i sar., 1977).

Mnogi lekovi, koji se primenjuju u terapiji malignih bolesti ili su u različitim fazama prekliničkih i kliničkih ispitivanja, su prirodna ili sintetička jedinjenja srodna hinonima. Tako *p*-benzohinoni, sa reaktivnim heterocikličnim grupama kao supstituentima ili ekstenzivno supstituisani antrahinoni (diazikoni, antraciklini i mitomicin), pripadaju drugoj po veličini klasi hemioterapeutskih agenasa koji se klinički primenjuju i za koje je pokazano da dovode do smrti ćelije putem apoptoze (Powis, 1987, 1989; Gutierrez, 1989; Huang & Pardee, 1999; Schwartzmann i sar., 2002; Öllinger & Kågedal, 2004). Dodatno, hinoni svojim antioksidativnim delovanjem, poboljšavaju opšte zdravstveno stanje organizma.

Istraživanja hinona se nastavljaju kako bi se otkrile nove primene ove klase jedinjenja u terapiji drugih poremećaja i bolesti. Njihova hemijska struktura omogućava razvoj različitih derivata i modifikacija kako bi se poboljšala njihova farmakološka efikasnost i smanjili neželjeni efekti.

Klinički najčešće korišćeni hinoni su persupstituisani antrahinoni, *p*-benzohinoni i naftohinoni sa različitim supstituentima (O'brien, 1991).

1.5.1. Antimikrobna aktivnost

„Zlatna era“ antibiotika kretala se od 1930-ih do 1960-ih, što je dovelo do pronalaska mnogih antibiotika koji su i danas u kliničkoj upotrebi (Nathan & Cars, 2014). Nažalost, nakon ovog perioda, otkrića novih antimikrobnih agenasa su sve ređa. Sa druge strane, pojava patogena rezistentnih na veći broj antibiotika sve je češća, pa rezistencija bakterija prema antibioticima predstavlja ozbiljnu globalnu pretnju po zdravlje ljudi (Nathan, 2004). Zbog toga je pronalazak novih, antimikrobnih, biološki aktivnih molekula imperativ moderne nauke.

Antimikrobna aktivnost hinona potiče od njihove sposobnosti da doniraju slobodne radikale ili da formiraju ireverzibilne komplekse sa aminokiselinama u proteinima i da ih tako inaktiviraju (Othman i sar., 2019). Ova svojstva hinona omogućavaju im da deluju na površinske adhezije, polipeptide u ćelijskom zidu i membranske enzime. Takođe, hinoni mogu da ometaju korišćenje supstrata potrebnih mikroorganizmima (Cowan, 1999). Budući da su hinoni raznovrsna biološki aktivna grupa, njihov antimikrobni potencijal je predmet velikog broja istraživanja.

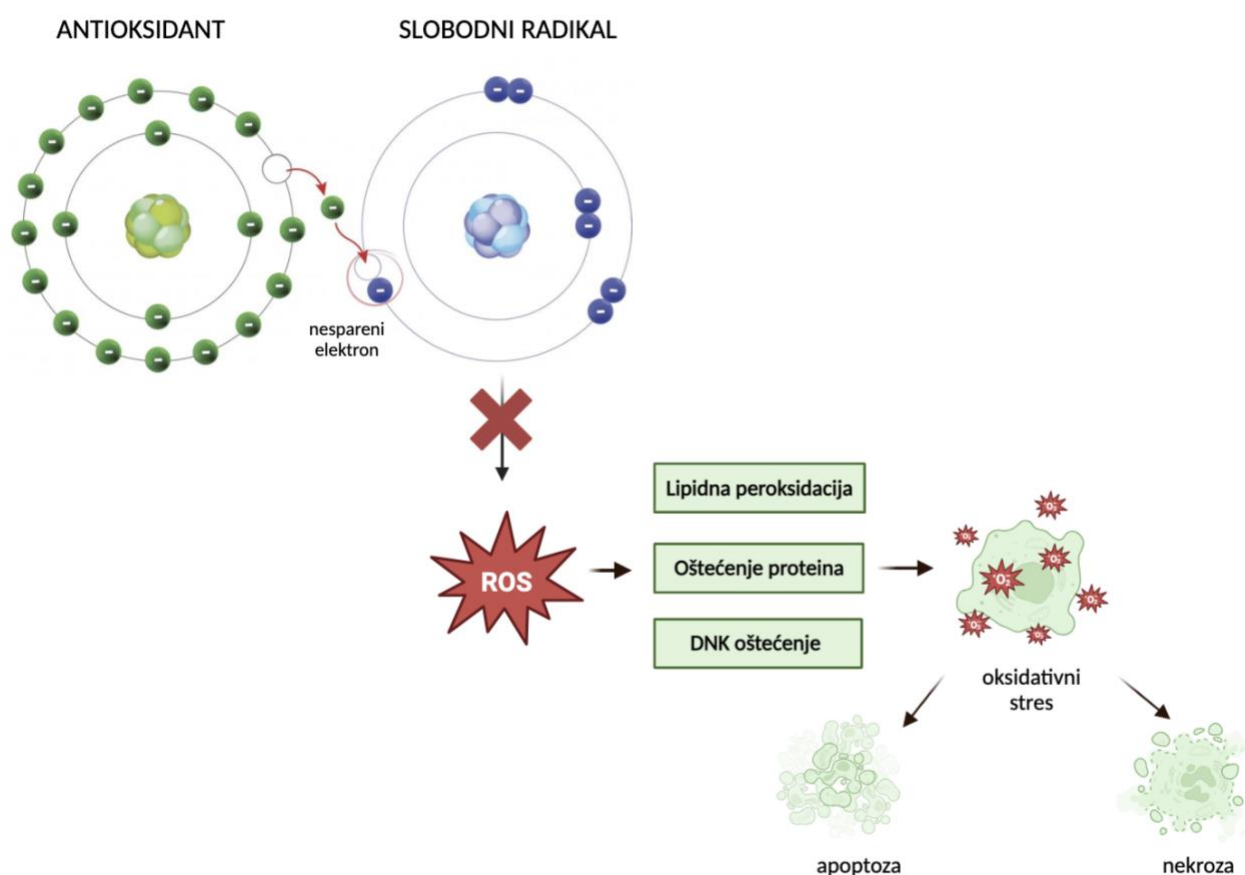
Jedan od takvih primera je 2-hidroksi-1,4-naftohinon, izolovan iz listova kane (*Lawsonia inermis*), za koji je pokazano da inhibira rast *Pseudomonas aeruginosa* (Habbal i sar., 2011). Song (2020) je sintetisao derivate 2-hidroksi-1,4-naftalohinona kako bi pojačao njegovu antimikrobnu aktivnost i smanjio bakterijsku rezistenciju. Pojedini derivati inhibirali su rast metil rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro* i *in vivo*, pri čemu je tobramicinski derivat naftohinona povećao njegovu antimikrobnu efikasnost prema visokorezistentnom soju bakterije *P. aeruginosa* čak 50 puta. Drugi hinoni su, takođe, pokazali antimikrobnu aktivnost. Timohinon, timohidrohinon i ditimohinon poreklom iz semena *Nigella sativa* inhibirali su rast *S. aureus*, *S. mutans* i *Streptococcus mitis*, dok su hinoni prisutni u vodenim i metanolnim ekstraktima semena libanske biljke *Anona squamosa* L. imali antibakterijski efekat na *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Habbal i sar., 2011; Sudhir i sar., 2016; Rathi i sar., 2017; Sabbah i sar., 2017).

Ipak, postoje primeri gde hinoni, koji nastaju kao produkti razgradnje antibiotika, mogu inhibirati antibakterijsku aktivnost samih antibiotika. Tako polusintetički antibiotik rifampicin (RIF), koji se koristi kao prva linija lečenja tuberkuloze i u lečenju drugih zaraznih bolesti, ukoliko se ne sintetiše ili ne skladišti na odgovarajući način može sadržati nečistoće i produkte razgradnje leka od kojih je glavni proizvod razgradnje, rifampicin-hinon koji nastaje neenzimskom autooksidacijom (Sutradhar & Zaman, 2021). Pokazalo se da upravo prisustvo rifampicin-hinona utiče na razvoj rezistencije na RIF kod *E. coli* i *Mycobacterium smegmatis* (Weinstein & Zaman, 2019).

1.5.2. Antioksidativna aktivnost

ROS koje se formiraju u mitohondrijama tokom aerobne respiracije imaju važnu ulogu u metabolizmu samog organizma, kao i u ćelijskom odgovoru na ksenobiotike, citokine i invaziju bakterija (Ray i sar., 2012). Tako ROS učestvuju u fagocitozi bakterija, regulaciji signalnih puteva i različitim metaboličkim procesima, proliferaciji i dr. Međutim, višak produkcije ROS može dovesti do poremećaja bioloških procesa, što može imati za posledicu pojavu različitih bolesti kod ljudi poput kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze, maligniteta i dijabetesa, a u novije vreme izučava se i njihova uloga u procesu starenja (Singh & Jialal, 2006; Mokini i sar., 2010).

Antioksidanti su molekuli koji imaju sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala i njihovog neutralisanja, a najčešće se u organizam unose kao produkti biljnog porekla. Mehanizam delovanja antioksidanata predstavljen je na **Slici 6**. Ukoliko u organizmu postoji neravnoteža zbog viška ROS ili oksidansa u odnosu na sposobnost ćelije da uspostavi efikasan antioksidativni odgovor nastaje stanje koje se naziva oksidativni stres (Ray i sar., 2012).



Slika 6. Shematski prikaz mehanizma delovanja antioksidanata.

Veliki broj istraživanja ispituju sposobnost hinona i njihovih derivata kao potencijalnih antioksidanata. Među hinonima, o-hidroksihinoni poseduju jaku antioksidativnu aktivnost zbog hidroksilnih grupa na orto poziciji. U ranijim istraživanjima hidroksihinoni, uključujući purpurin, pseudopurpurin i alizarin, bili su veoma efikasni antioksidanti upravo zbog prisustva hidroksilnih grupa u orto položaju, dok su drugi hinoni uključujući emodin, rhein, hrizofanol, rajn i aloe-emondin pokazali manju efikasnost (Desam & Al-Rajab, 2022). Najznačajniji antioksidant u ćelijskim metaboličkim procesima koji poseduje hinonsku strukturu je ubihinon (koenzim Q). On u svom redukovanom obliku reaguje sa peroksidnim radikalima i inhibira oksidaciju lipida prisutnih u ćelijskoj membrani. Pored toga, može se koristiti za regeneraciju redukovanog antioksidativnog

oblika vitamina E (Lenaz & Genova, 2013). Budući da hinoni imaju sposobnost reverzibilne oksido-redukcije uz nastanak semihinonskog intermedijera, nakon antioksidativnog delovanja ubihinona, nastaje njegov semihinonski oblik, koji se pomoću enzima citosolna DT-dijaforaza (NAD(P)H-dehidrogenaza), citosolna NADPH hinon-reduktaza i mikrozomalna NADH citokrom b5 reduktaza, vraća u redukovanu, antioksidativnu formu (Lenaz & Genova, 2013).

Najveći broj hinona prirodnog porekla, čija je antioksidativna aktivnost ispitivana, potiče iz biljaka. Hunt i sar. (2001) su utvrdili da hipericin, naftohinon poreklom iz kantariona inhibira produkciju ROS u ćelijama i vaskularnom tkivu ljudi što nije iznenađujuće, budući da se ova biljka, zbog blagotvornih svojstava, koristi za lečenje opekotina, modrica, oticanja i anksioznosti. Danšen, u narodu poznatija kao kineska žalfija, takođe se koristi u tradicionalnoj medicini zbog višestrukih bioloških efekata kao umirujuće sredstvo, sedativ, antimikrobni agens i stimulator cirkulacije (Fang i sar., 1976). Weng i Gordon (1992) predlažu da upravo hinoni prisutni u biljci deluju kao primarni antioksidanti.

1.5.3. Antineurodegenerativna aktivnost

Do sada ispitivana jedinjenja poreklom iz morskih organizama (kao i njihovi derivati) su, uglavnom, pokazala potencijal za inhibiciju enzima acetilholinesteraze (AChE). Abnormalna aktivnost ovog enzima je jedan od faktora odgovornih za nastanak Alchajmerove bolesti, budući da enzim hidrolizuje acetilholin u sinaptičkom prostoru i tako učestvuje u zaustavljanju prenosa nervnih impulsa (Gray i sar., 2015). Alchajmerova bolest je najčešći uzrok senilne demencije u kasnijem životnom dobu ljudi, zbog čega je ispitivanje potencijalnog inhibitornog efekta na enzim AChE jedan od primarnih testova kada se ispituje aktivnost novih biološki aktivnih jedinjenja (Howes i sar., 1999; Perry i sar., 1999). Uprkos napretku medicine i farmakologije, AChE inhibitori su i dalje najbolji lekovi koji su trenutno dostupni u terapiji blagih i umerenih oblika Alchajmerove bolesti (Joe & Ringman, 2019). Statistički podaci o broju obolelih od Alchajmerove bolesti, sa oko 6.2 miliona ljudi od 65 godina i starijih samo u Sjedinjenim Američkim Državama, ukazuju na ozbiljan problem na koji naučna zajednica još uvek ne daje odgovore ("2021 Alzheimer's Disease Facts and Figures," 2021).

Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na veliki broj hinona koji su pokazali antineurodegenerativne aktivnosti inhibicijom AChE kao što su: seskviterpenski, plastohinoni, pirolahinolin-hinin (engl. Pyrroloquinoline-quinine) (Misra i sar., 2012; Stoddard i sar., 2014).

1.5.4. Citotoksična i genotoksična aktivnost hinona

Citotoksičnost predstavlja sposobnost različitih agenasa (citotoksični agensi) da oštete ili dovedu do smrti ćelije. Posledica delovanja citotoksičnih agenasa može biti prestanak deobe ćelija, pojava nekroze ili indukcija programirane ćelijske smrti – apoptoze. U hemioterapiji koriste se citotoksični agensi (citostatici), u cilju oštećenja i/ili uništenja maligno transformisanih ćelija koje se aktivno dele. Zbog toga je citotoksičnost ključna karakteristika koja se razmatra pri razvoju terapijskih lekova protiv malignih bolesti.

Sa druge strane, agensi koji različitim mehanizmima oštećuju DNK se zajednički nazivaju genotoksični agensi. Takođe, genotoksični efekat ovih supstanci može imati za posledicu i smrt ćelije. Genotoksični agensi se mogu podeliti na hemijske, biološke i fizičke. U grupu veoma značajnih genotoksičnih agenasa mogu se svrstati endogeni faktori (produkti metabolizma, ROS), zatim egzogeni faktori, kao što su različita zračenja (nejonizujuća i jonizujuća zračenja), toksini prisutni u životnoj sredini i veliki broj različitih lekova (Reddig i sar., 2018). Oštećenja DNK molekula, izazvana genotoksičnim agensima, mogu biti jednolančani ili dvolančani prekidi DNK lanca, modifikacije baza, abazna mesta, oksidovane baze, DNK-DNK i DNK-protein unakrsne veze. S druge strane, različiti mehanizmi odgovora na oštećenje DNK (mehanizmi reparacije DNK molekula), specifični za odgovarajuće lezije, omogućavaju obnavljanje integriteta DNK molekula.

Kao što je već rečeno, ukoliko se oštećenje ne popravi, ono može dovesti do smrti ćelije ili mutacija koje dalje mogu biti uzrok patoloških promena poput malignih bolesti.

Iako su citotoksičnost i genotoksičnost dva različita fenomena, genotoksični efekat može imati za posledicu smrt ćelije, tj. citotoksični efekat. S druge strane, citotoksični agens ne mora dovesti i do genotoksičnog efekta.

Može se reći da hinoni, kao visokoreaktivna jedinjenja, izazivaju širok spektar efekata koji se kreću od vitalno važnih za homeostazu (vitamin K ili ubihinon) do izuzetno toksičnih ili kancerogenih. Svoj citotoksični i genotoksični efekat ispoljavaju na više načina: (1) produkcijom ROS, (2) alkilacijom/arilacijom ćelijskih nukleofila i (3) interkalacijom u DNK molekule. Budući da sva tri mehanizma mogu dovesti i do smrti ćelije, oni su i mehanizmi antitumorskog delovanja hinona.

Hinoni prisutni u ekstraktima životinjskog ili biljnog porekla često su nosioci citotoksične i genotoksične biološke aktivnosti ekstrakata. Tako su benzohinoni (metil-1,4-benzohinon i etil-1,4-benzohinon) u dihlorometanskom ekstraktu odbrambenog sekreta insekata *Ulomoides dermestoides*, prvenstveno odgovorni za inhibiciju proliferacije ćelija i njegovo antitumorsko delovanje (Crespo i sar., 2011). Navedeni insekti se tradicionalno koriste u Argentini za terapiju različitih bolesti poput Parkinsonove bolesti, astme, dijabetesa, HIV-a i određenih malignih bolesti. Čak male doze (0,15 ekvivalenata/ml) inhibiraju proliferaciju mononuklearnih ćelija za $72,2 \pm 2,7\%$ i komet testom dovode do značajnog oštećenja DNK tumorskih (A549) i mononuklearnih ćelija (Crespo i sar., 2011).

Takođe, hinoni prisutni u biljnim ekstraktima nosioci su njihovog citotoksičnog i genotoksičnog delovanja. Tako je emodin, derivat antrahinona, poreklom iz kineske biljke, pokazao genotoksičnu aktivnost komet, mikronukleus testom i testom mutacije u limfomu L5178Y (Mueller i sar., 1999). Genotoksičnost emodina posledica je njegovog nekovalentnog vezivanja za DNK i inhibiciji topoizomeraze II (Mueller & Stopper, 1999). Drugi antrahinoni poreklom iz lekovitih biljaka su, takođe, pokazali genotoksična svojstva poput 1-hidroksiantrahinona izolovanog iz biljke *Rubia tinctorum* (marena), koji je pored toga i karcinogen prema ćelijama debelog creva miševa (Tanaka i sar., 2000). Karcinogena svojstva antrahinona, odnosno njihov uticaj na formiranje neoplastičnih lezija, kao što su tumor kože i kožni melanom kod miševa, uticaj na ćelije koštane srži miševa uočeni su i drugim istraživanjima (Battalora i sar., 1995; Strickland i sar., 2000).

Iako hinoni proizvode štetne ćelijske efekte, ukoliko je njihovo delovanje usmereno na maligno transformisane ćelije, oni bi mogli biti terapijski korisni kao sredstva protiv malignih bolesti.

1.6. Maligne bolesti

Maligne bolesti (maligni tumori, neoplazme) su bolesti koje nastaju kao posledica nekontrolisanog i brzog rasta abnormalnih ćelija koje rastu izvan svojih uobičajenih granica u organizmu, a koje se mogu proširiti na susedne delove tela i tako zahvatiti druge organe i tkiva procesom koji se naziva metastaza. Uprkos decenijama osnovnih i kliničkih istraživanja i otkrivanju obećavajućih novih antitumorskih lekova i drugih vidova terapija, maligne bolesti ostaju jedan od glavnih uzroka morbiditeta kod ljudi, a široko rasprostranjene metastaze ostaju primarni uzrok smrti.

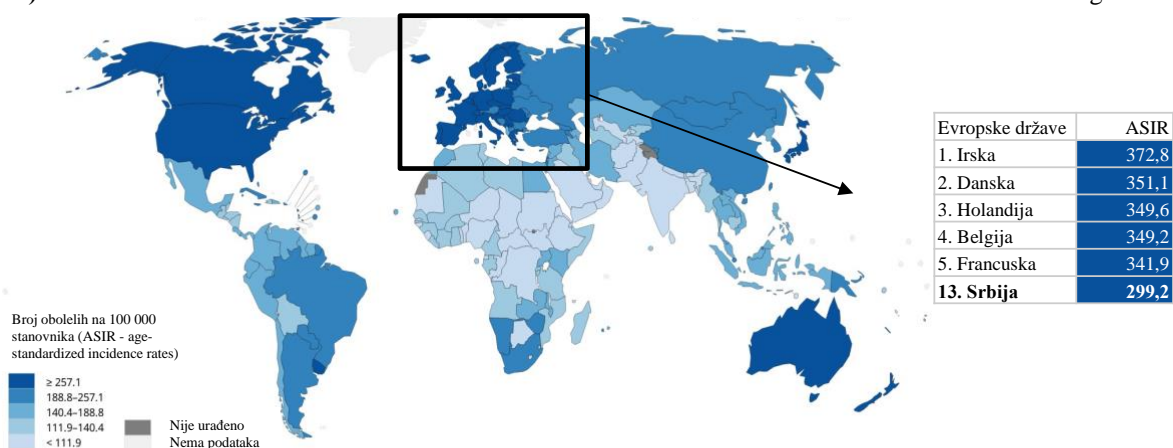
Širom sveta, samo u 2020. godini, procenjuje se da je bilo 19,3 miliona novoobolelih od malignih bolesti i približno 10 miliona umrlih od iste bolesti (Sung i sar., 2021). Očekuje se da će za 20 godina (2040. godine), broj obolelih biti uvećan na 47%, pri čemu se veći porast obolelih očekuje u zemljama u tranziciji sa mogućnošću daljeg pogoršanja i povećavanja faktora rizika povezanih sa globalizacijom i rastućom privredom, poput zagađenja životne sredine (Sung i sar., 2021).

U Republici Srbiji, koja je zemlja u tranziciji, na povećanje faktora rizika za razvoj malignih bolesti najviše utiče zagađenost životne sredine, nedovoljna prevencija i loša zdravstvena zaštita. Zbog toga, prema broju obolelih od malignih bolesti na 100 000 stanovnika, Republika Srbija zauzima 13. mesto u Evropi (Slika 7A), dok je broj umrlih od malignih bolesti na isti broj stanovnika

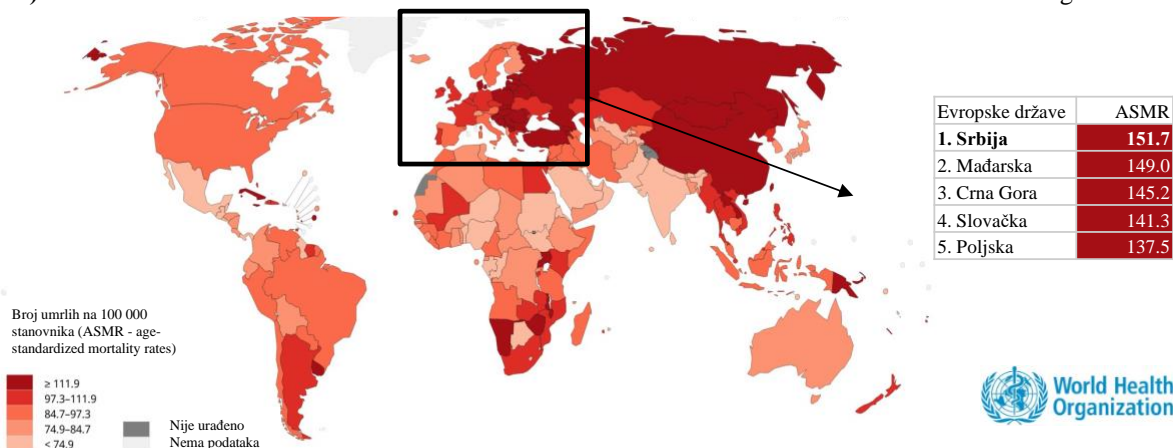
151,7 (**Slika 7B**). Ovi statistički podaci stavljaju Republiku Srbiju na prvo mesto po broju umrlih od malignih bolesti u Evropi.

Molekularna osnova razvoja ćelija raka pripisuje se genetičkim predispozicijama koje uključuju aktivaciju onkogenih i/ili deaktivaciju tumor supresorskih gena (Levine & Puzio-Kuter, 2010; Ngo i sar., 2015). Prirodne mutacije koje utiču na aktivaciju i inaktivaciju onkogenih i tumor supresorskih gena, zajedno ili pojedinačno, mogu izazvati nekontrolisani rast i proliferaciju koja se završava transformacijom ćelija koje stiču svojstva karcinogeneze (Ngo i sar., 2015). Slično, inaktivacija tumor supresorskih gena može dovesti do nekontrolisanog rasta ćelija (Jones & Thompson, 2009). Iako je razumevanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi nastanka malignih bolesti dovelo je do razvoja ogromnog broja lekova, njihova upotreba sa sobom nosi veliki broj štetnih efekata, uglavnom u vidu supresije imunog sistema. Stoga su otkriće i razvoj novih lekova zasnovanih na prirodnim proizvodima u fokusu mnogih naučnih istraživanja (Wright, 2017; Yao i sar., 2017).

A) PROCENJENE STAROSNE STANDARDIZOVANE STOPE OBOLELIH OD RAKA U 2020. god



B) PROCENJENE STAROSNE STANDARDIZOVANE STOPE UMRLIH OD RAKA U 2020. god



Slika 7. Grafički prikaz procenjenih starosnih (od 0 do 85 god.) standardizovanih stopa broja obolelih (**A**) i umrlih (**B**) od raka na 100 000 stanovnika u svetu u 2020. godini. Desno su prikazane tabele sa zemljama Evrope rangirane po najvećim stopama. (GLOBOCAN 2020, IARC gco.iarc.fr/today).

Trenutni načini lečenja koji uključuju hirurško uklanjanje biomase tumora, tretmane zračenjem (radioterapija) i sistemske tretmane hemioterapeutskim agensima, nisu dovoljno efikasni. Razlog tome je pojava rezistencije na hemioterapeutike i teški neželjeni efekti koji nastaju kao posledica terapije hemioterapeutcima, zračenjem i kao posledica operativnih tretmana. Uprkos tome, zbog nedostatka drugih načina lečenja, navedene metode su, najčešće, neizostavni deo tretmana

pacijenata. Poslednjih godina, uključuje se i četvrti način terapije malignih bolesti zasnovan na imunološkim principima tkz. imunoterapija (biološka terapija) koja pokazuje obećavajuće rezultate, kako samostalno, tako i uz primenu drugih načina lečenja.

Tako na primer, hirurgija koja je ranijih godina imala fundamentalnu ulogu u lečenju, često zbog rizika povezanih sa operacijom, nemogućnosti fizičkog pristupa i pojavom novih sistemskih tretmana (hemioterapija, imunoterapija), se ograničava ili čak izbegava uz preporuku da se koriste druge metode (Markham i sar., 2020). Radioterapija uključuje terapiju rendgenskim zracima (X zraci) i koristi se kod preko 50% svih pacijenata obolelih od različitih tipova malignih bolesti, samostalno ili u kombinaciji sa drugim oblicima terapije (Delaney i sar., 2005). Najveći nedostaci radioterapije su neselektivno delovanje i pojava ranih (reverzibilnih) i kasnih (ireverzibilnih) neželjenih efekata kao posledica toksičnosti terapije, kao i neujednačena osetljivost različitih tipova malignih bolesti.

Jedna od karakteristika malignih bolesti je povećana stopa proliferacije ćelija i otpornost na ćelijsku smrt (uključujući apoptozu), koje su često uzrokovane promenama u genomu (Hanahan & Weinberg, 2011). Budući da postoji povećana stopa proliferacije ćelija, zaustavljanje ćelijskog ciklusa i/ili indukcija ćelijske smrti je efikasan način lečenja pacijenata, što se postiže hemioterapijom, gde je proces replikacije molekula DNK jedna od glavnih meta (Swift & Golsteyn, 2014). Hemioterapija je najčešći oblik terapije malignih bolesti i uključuje primenu citotoksičnih lekova koji ubijaju ćelije, a samim tim eliminišu tumor ili, u nekim slučajevima, redukuju njegovu veličinu, smanjuju simptome i produžavaju životni vek pacijenta (Nygren & Glimelius, 2001). Kao citostatici se koriste različiti hemijski agensi kao što su alkilujuća sredstva, antimetaboliti i inhibitori topoizomeraze. Alkilujuća sredstva kovalentno prenose alkil-grupe na baze DNK i stvaraju monofunkcionalne adukte ili intra- i inter-lančane i DNK-proteinske ukrštene veze (Helleday i sar., 2008; Woods & Turchi, 2013). S druge strane, antimetaboliti se pogrešno inkorporiraju u DNK ili iscrpljuju deoksinukleotid-trifosfate (dNTP) čime sprečavaju replikaciju DNK i izazivaju prekide DNK lanca (Helleday i sar., 2008). Inhibicija enzima topoizomeraze, takođe, dovodi do prekida lanaca DNK (Pommier, 2006).

Hemioterapeutski agensi se primenjuju u više slučajeva (DeVita, 1997):

1. u uznapredovaloj ili lokalizovanoj bolesti kao indukciona terapija, sa ciljem ublažavanja simptoma smanjenjem obima maligno transformisanih ćelija,
2. kao pomoćna (adjuvantna) terapija uz hiruršku intervenciju i/ili radioterapiju,
3. preoperativno, sa ciljem povećanja verovatnoće za postizanje lokalne kontrole tumora,
4. postoperativno, kao neoadjuvantna terapija koja za cilj ima dugoročnu kontrolu tumora.

Najčešće se citotoksični lekovi daju u određenim kombinacijama sa ciljem da se prevaziđe pojava rezistencije tumorskih ćelija, što je ujedno i glavni nedostatak ove metode lečenja. Drugi, ozbiljniji nedostatak, jeste pojava neželjenih efekata zbog čestog neselektivnog delovanja ovih lekova. Uprkos tome, hemoterapija je i dalje najčešće korišćen tretman kod svih vrsta malignih tumora i u svakoj fazi njihove progresije.

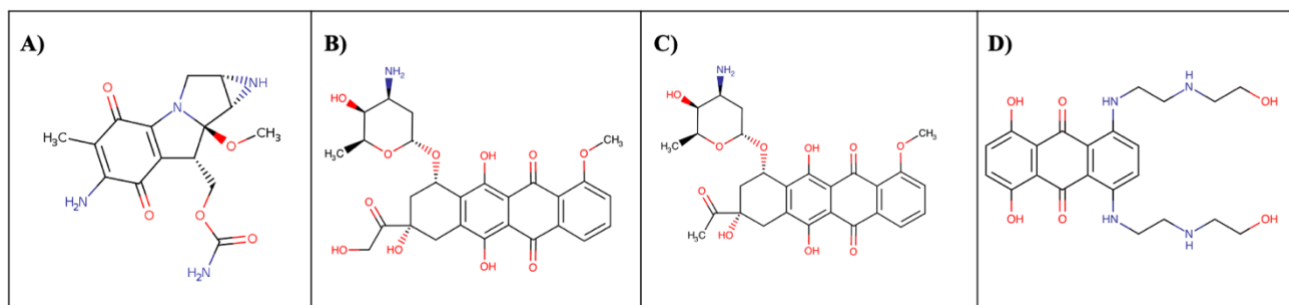
Poslednjih godina, napravljen je ogroman napredak u razumevanju bioloških karakteristika malignih bolesti. Radikalno drugačiji oblik terapije se, konačno, pojavio 2012. godine, a zasnovan je na imunološkom sistemu – imunoterapija (biološka terapija) (Trapani & Darcy, 2017). Ovaj vid terapije pokazuje nesporne dokaze efikasnosti kod nekoliko tipova malignih bolesti, kao i potencijal za njihovu eventualnu kombinovanu primenu sa postojećim terapijama. Bez obzira na pojavu radikalno drugačijeg oblika terapije, zasnovan na imunoterapiji, široka prevencija malignih bolesti i ubrzani pronalazak alternativnih lekova su veoma bitni za globalnu kontrolu ovih bolesti (Sung i sar., 2021).

1.7. Hinoni kao antitumorski agensi

Antitumorska aktivnost ispitana je za više od hiljadu hinonskih jedinjenja, pri čemu je pokazano da predstavljaju jednu od najbrojnijih grupa sa citotoksičnim potencijalom koja se koristi u terapiji tumora. Konkretno, antraciklinski derivati su jedni od najčešće korišćenih hemioterapeutika (Asche, 2005).

Pored antraciklina, značajni antitumorski lekovi sa hinonskom strukturom su mitomicini i streptonigrinoidi. Najznačajniji predstavnik prve grupe, mitomicin C je alkilujući agens koji je u primeni još od 1974. godine (Paz i sar., 2008). Izolovan je 50tih godina XX veka iz *Streptomyces caespitosus*, a njegov genotoksični efekat je posledica kovalentnog vezivanja za DNK i formiranja unakrsnih DNK-DNK veza. Pored direktnog efekta na molekul DNK, terapijska aktivnost mitomicina C ogleda se u njegovom višestrukome dejstvu koje se odvija istovremeno u ćeliji. Mitomicin C alkiluje i druge ćelijske nukleofile (npr. glutation), selektivno inhibira sintezu DNK, učestvuje u mutagenezi i stimulaciji genetičkih rekombinacija, kao i u prekidu hromozoma i razmeni sestrinskih hromatida, a kod bakterija indukuje SOS odgovor (Sharma & Tomasz, 1994; Tomasz, 1995).

Osim mitomicina C, najčešće primenjivani antitumorski lekovi sa hinonskom strukturom, odobreni od strane FDA za kliničku primenu su: doksorubicin, daunorubicin i mitoksantron (**Slika 8**).



Slika 8. Hemijske strukture antitumorskih lekova: (A) mitomicin C, (B) doksorubicin, (C) daunorubicin i (D) mitoksantron.

Doksorubicin je neselektivni antraciklin klase I izolovan iz bakterije *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Odobren je za kliničku upotrebu 1974. godine i komercijalno se proizvodi pod imenima Adriamycin® i Rubex® za terapiju velikog broja različitih tumora, limfoma i akutne limfocitne leukemije (Goldin i sar., 1981). Spada u interkalirajuće agense, formira prekide DNK molekula i inhibira aktivnost enzima topoizomeraze II (Azarova i sar., 2007; Tacar i sar., 2013). Takođe, može inhibirati aktivnost DNK-polimeraze, uticati na regulaciju gena i izazivati oštećenje DNK molekula usled produkcije slobodnih radikala.

Daunorubicin je antraciklinski derivat odobren od strane FDA 1979. godine, koji se koristi za lečenje različitih vrsta maligniteta, posebno akutne i hronične leukemije. Kao i doksorubicin, spada u interkalirajuće agense i inhibira enzim topoizomerazu II, što dovodi do jednostrukih i dvolančanih prekida i inhibiciju sinteze DNK i RNK (Saleem & Kasi, 2020). Daunorubicin, takođe, inhibira aktivnost enzima polimeraze, remeti ekspresiju gena i oštećuje DNK produkcijom ROS, što na kraju rezultira apoptozom (programiranom smrti ćelije) (Saleem & Kasi, 2020). FDA je 2017. godine odobrila lipozomalnu kombinaciju daunorubicina i citarabina pod komercijalnim nazivom Vyxeos®, za lečenje akutne mijeloidne leukemije (AML) povezane sa terapijom ili povezane sa mijelodisplazijom kod odraslih osoba, oba tipa leukemije su poznate su po maloj stopi izlečenja (Maakaron & Mims, 2019). Lipozomalni oblik daunorubicina, takođe se koristi kao lek prve linije za

lečenje Kaposijevog sarkoma kod pacijenata sa uznapredovalim sindromom virusa humane imunodeficijencije (HIV) (Petre & Dittmer, 2007).

Mitoksantron je derivat dihidroksiantracendiona odobren od strane FDA 1987. godine za lečenje AML kod odraslih, 1996. godine za lečenje raka prostate, a 2000. godine za lečenje pogoršanja relapsno-remitentne multiple skleroze (MS), sekundarno progresivne MS i progresivno-relapsne MS (Fox, 2004). Mehanizam delovanja mitoksantrona se bazira na inhibiranju sinteze DNK molekula interkalacijom, indukcijom prekida u lancima DNK izazivajući agregaciju ovog molekula, što onemogućava napredovanje ćelijskog ciklusa, posebno u njegovoj kasnoj S fazi. Kao i ostali lekovi iz ove grupe, mitoksantron inhibira aktivnost enzima topoizomeraze II (Bellosillo i sar., 1998).

1.8. Marinski organizmi kao izvor novih hinonskih antitumorskih agenasa

Okeani pokrivaju više od 70% zemljine površine i stoga predstavljaju najveće stanište na Zemlji, sa najvećim biodiverzitetom. Ekstremni uslovi životne sredine kao što su nedostatak svetlosti, visok pritisak, varijabilna i često ekstremna koncentracija jona i pH vrednost, promene temperature, nedostatak hranljivih materija i ograničen životni prostor, uticali su na razvoj ogromnog biodiverziteta, adaptacija i životnih strategija ka očuvanju vrste (Poli i sar., 2017). Kao odbrambeni mehanizam protiv ekstremnih uslova životne sredine i visoke intra/interspecijski kompeticije, veliki procenat morskih vrsta je evoluirao tako da sintetiše hemijski različite biološki aktivne molekule – sekundarne metabolite.

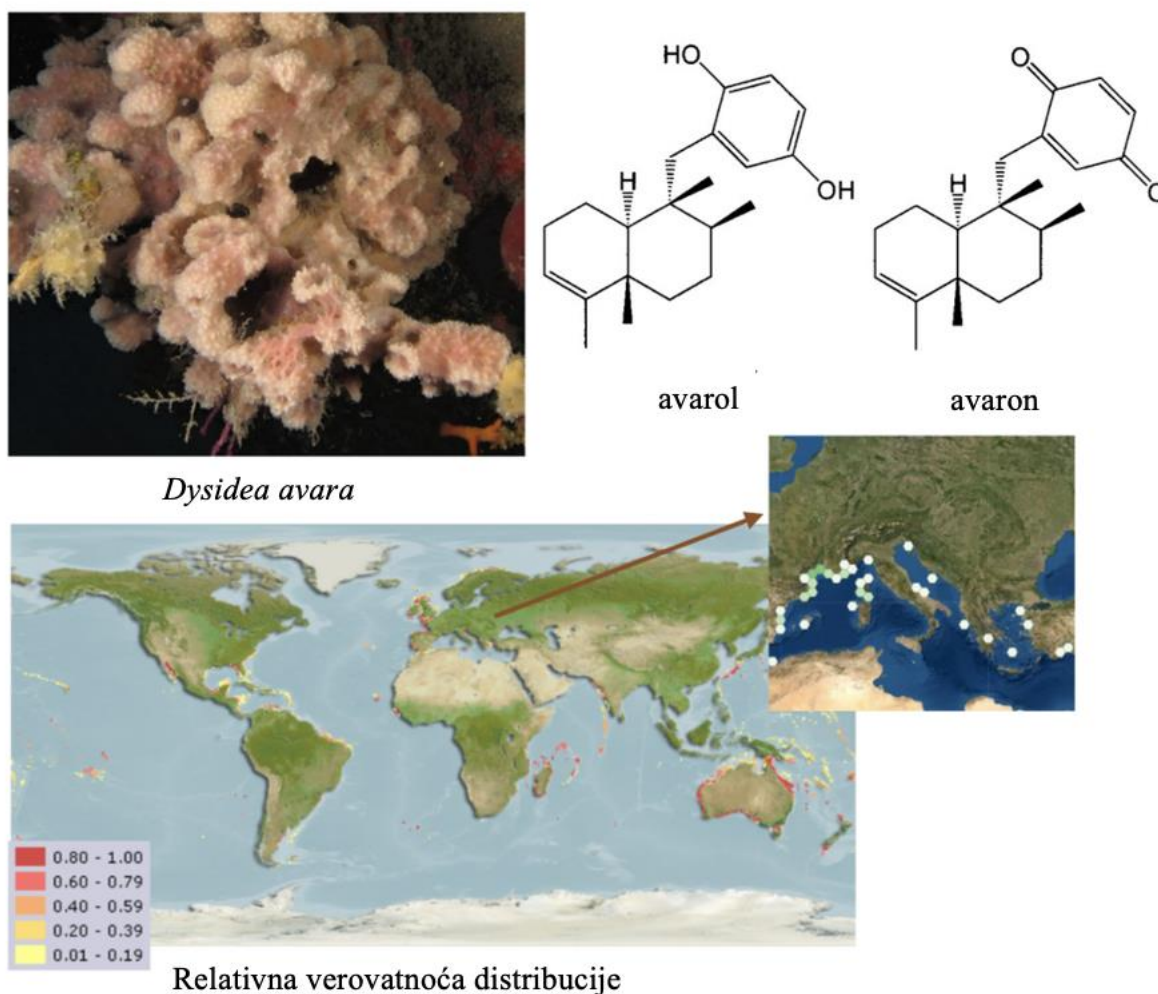
Sekundarni metaboliti poreklom od marinskih organizama spadaju u različite klase hemijskih jedinjenja: terpenoidi, alkaloidi, poliketidi, peptidi, derivati šikiminske kiseline, šećeri, steroidi i mnoštvo mešovitih proizvoda (Firn & Jones, 2000). Jedna od najrasprostranjenijih hemijskih grupa pronađenih u sesilnim morskim organizmima su upravo seskviterpenoidni hinoni i hidrohinoni.

Hinoni poreklom iz marinskih organizama koji su pokazali antitumorsku aktivnost, uglavnom, su izolovani iz sunđera, plaštaša i koralala. Neki od primera su diskodermolid i eleuterobin. Diskodermolid je izolovan iz morskog sunđera *Discodermia dissoluta* i dezorganizacijom mikrotubula dovodi do poremećaja ćelijske deobe i indukcije apoptoze tumorskih ćelija (Kar i sar., 2003; De Souza, 2004). Sa druge strane, eleuterobin svoj mehanizam antitumorskog delovanja ispoljava ometanjem normalnog funkcionisanje citoskeleta tokom mitoze tumorskih ćelija (Gennari i sar., 2007). Izolovan je iz morskog koralala *Eleutherobia* sp.

Ipak, od svih hinonskih i hidrohinonskih sekundarnih metabolita poreklom iz marinskih organizama, biološka aktivnost hidrohinona avarola i hinona avarona do sada je najviše izučavana (Pejin, i sar., 2014a). Zbog toga je ovaj redoks par jedan od najreprezentativnijih primera biološki aktivnih jedinjenja poreklom iz marinskog ekosistema.

1.8.1. Avarol/avaron

Hidrohinon avarol i hinon avaron (**Slika 9**) su redoks par izolovan iz lipidnog ekstrakta sunđera *Dysidea avara* (Schmidt, 1862), koji se može naći na dubinama od 80 metara u Sredozemnom moru i Atlantskom okeanu (priobalju Brazila i saharske Afrike) (Nakarada, 2019).



Slika 9. Fotografija mediteranskog sundera *Dysidea avara* i njihova geografska relativna verovatnoća distribucije, kao i hemijske strukture njegovih sekundarnih metabolita avarola i avarona (modifikovano i preuzeto sa biologiamarina.org i aquamaps.org).

Sunderi kao najprimitivniji višćelijski organizmi bez mogućnosti kretanja i aktivne odbrane od predatora, razvili su alternativne načine zaštite od organizama koje uključuju sintezu širokog spektra sekundarnih metabolita poput avarola/avarona. Dugotrajna koevolucija sundera sa bakterijama i drugim mikroorganizmima rezultirala je bliskom vezom njihovih metaboličkih puteva, a jedna od pretpostavljenih uloga avarola je regulacija rasta i metabolizma simbiotskih mikroorganizama (Müller i sar., 1986). U velikom broju ranijih istraživanja avarol i njegov redoks par avaron pokazuju raznovrsnu biološku aktivnost poput antimikrobne (antibakterijske i antivirusne uključujući i delovanje na HIV), antioksidativne, antiinflamatorne, antipsorijazne, anestetičke, antimutagene i antitumorske aktivnosti (de Pasquale i sar., 1991; Sladic & Gasic, 2006; Božić i sar., 2010; Gordaliza, 2010; de Rosa & Tommonaro, 2012; Pejin i sar., 2014a, 2014b, 2018).

Antimikrobna aktivnost avarola procenjivana je različitim metodama korišćenjem velikog broja različitih mikroorganizama. Pokazana je njegova antibakterijska aktivnost prema nekim gram negativnim bakterijama kao i inhibicija formiranja biofilma *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Pejin i sar., 2014a). Takođe, antifungalna aktivnost avarola prema različitim sojevima *Candida albicans* bila je slična ili jača u odnosu na antimikotik flukonazol (Pejin i sar., 2014a). U drugim istraživanjima, avarol i njegov redoks par avaron su pokazali antimikrobni efekat i prema različitim gram pozitivnim bakterijama, ali i gljivicama i nekim virusima poput HIV-a (Cariello i sar., 1982; de Giulio i sar., 1991; Tsoukatou i sar., 2007).

Antioksidativnu aktivnost avarola, avarona i njihovih derivata utvrdili su Amigó i sar. (2004), pri čemu je avarol pokazao najjaču antioksidativnu aktivnost u poređenju sa derivatima: avarol-3'-tiosalicilat, 3'-vanililaminoavaron i 4'-vanililaminoavaron.

Citotoksična aktivnost avarola i avarona ispitana je u istraživanju Kolarević i sar. (2019) pri čemu su oba jedinjenja pokazala selektivni citotoksični efekat prema tumorskoj A549 ćelijskoj liniji u odnosu na zdrave fibroblaste pluća (MRC-5), kao i odsustvo genotoksičnog potencijala na obe ćelijske linije i humanim ćelijama periferne krvi. Sa druge strane, različite hemijske modifikacije hinona i hidrohina mogu pojačati citotoksični i genotoksični efekat, pa su u istom radu derivati avarona (3'-metoksiavaron i 3'-(metilamino)avaron) indukovali oštećenja DNK molekula (Kolarević i sar., 2019).

Zbog svoje hemijske strukture, avarol i avaron prolaze kroz krvno-moždanu barijeru i inhibiraju aktivnost AchE ispoljavajući tako antineurodegenerativna svojstva (Pejin i sar., 2008; Tommonaro i sar., 2015b). Antineurodegenerativnoj aktivnosti avarola doprinosi i niska citotoksičnost kao i antioksidativna aktivnost budući da se smatra da su ROS jedan od uzročnika Alchajmerove bolesti.

Ipak, većina potencijalno antikancerogenih lekova dobijenih iz različitih marinskih organizama ima kratak period poluraspada, a postoji i problem sa ekonomski prihvatljivim snabdevanjem i količinom aktivnih jedinjenja koja se može dobiti po jedinki. Još jedan od aspekata koji utiče na njihovu eventualnu primenu i proizvodnju jeste očuvanje zdrave životne sredine morskog ekosistema koje je narušeno ljudskom aktivnošću, klimatskim promenama i dostupnošću hranljivih materija. Kada se svi ovi problemi mogu rešiti ekonomski i ekološki izvodljivo, lekovi koji potiču iz marinskih organizama dobijaju šansu na farmaceutskom tržištu (Martins i sar., 2014).

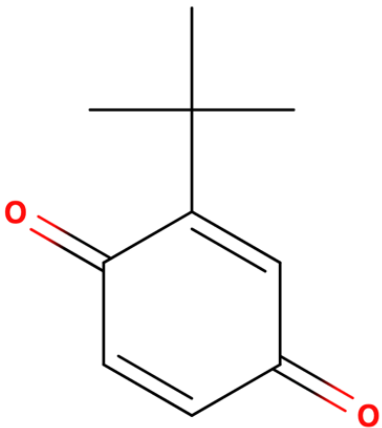

U procesu izolovanja, prinos avarol/avaron je generalno dobar, 3g na 1kg sušera *Dysidea avara* (Müller i sar., 1986). Ipak, kao i kod ostalih marinskih organizama, zbog sredine koju naseljavaju, postoji problem u dostupnosti i u ekonomskoj isplativosti. Primera radi, cena 1g avarola koji distribuira kompanija Toronto Research Chemicals iznosi čak 120 000 dolara. (www.trc-canada.com). Da bi se prevazišao ovaj problem, rađena je kultivacija jedinki i izolovanje iz ćelijskih kultura. Međutim, problem snabdevanja dovoljnom količinom nije rešen (Müller i sar., 2004; Mendola i sar., 2008).

Jedno od rešenja ovog problema je korišćenje sintetičkih jedinjenja, sa hinonskim motivom u strukturi, koji bi pokazali slično hemijsko ponašanje poput dokazanog biološki aktivnog prirodnog proizvoda avarona. Dodatno, hemijskim modifikacijama i sintezom novih derivata, može se pojačati biološka aktivnost, usmeriti na specifična mesta delovanja i smanjiti potencijalni neželjeni efekti. Imajući ovo u vidu, jedno od alternativnih sintetičkih jedinjenja, koje sadrži istu farmakoforu kao avaron jeste 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon – TBQ.

1.9. 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon (TBQ)

TBQ je hinon koji ima jednostavnu hemijsku strukturu (**Tabela 1**). Posедуje nekoliko karakteristika koje ga čine dobrim mimetikom avarona za dizajn novih sintetičkih jedinjenja (**Slika 10**). Prvenstveno, po radu Jeremić i sar. (2016), *terc*-butil grupa je dovoljno velika da doprinosi hidrofobnosti derivata. Drugi razlog je manja voluminoznost *terc*-butil grupe u odnosu na seskviterpenski deo, što redukuje sterne smetnje, ali i utiče na stabilizaciju semihinonskih radikala. Treći razlog je ahiralna priroda grupe čime se izbegavaju problemi sa asimetrijom koja postoji kod avarona. Pored navedenog, TBQ se lako oksiduje iz komercijalno dostupnog hidrohina.

Tabela 1. Strukturna i empirijska formula, molekulska masa, sinonimi i piktogrami za 2-*tert*-butil-1,4-benzohinon (TBQ).

Strukturna formula	Empirijska formula	Molekulska masa	Sinonimi	Piktogrami
	$C_{10}H_{12}O_2$	164.20 g/mol	2-t-BQ; 2- <i>tert</i> -butil(1,4)para-hinon; <i>tert</i> -butil-p-hinon	 <p>Akutno toksično</p> <p>Nadražujuće</p> <p>Opasnost po životnu sredinu</p>

1. HIDROFOBNOŠT

Hidrofobnost grupe sa manje atoma ugljenika u odnosu na avaron omogućava da se na jednostavan način mogu izvršiti hemijske modifikacije različitim supstituentima koji daju derivate različite hidrofobnosti.

Grupa nije toliko velika da bi izrazito menjala svojstva, ali ipak doprinosi hidrofobnosti derivata.

2. VOLUMINOZNOST (MASIVNOST)

Regulacija sternih smetnji koje su uočene kod seskviterpenskog dela.
Stabilizacija semihinonskih radikala.

3. AHIRALNA PRIRODA

Izbegavanje problema sa asimetrijom

4. EKONOMIČNOST

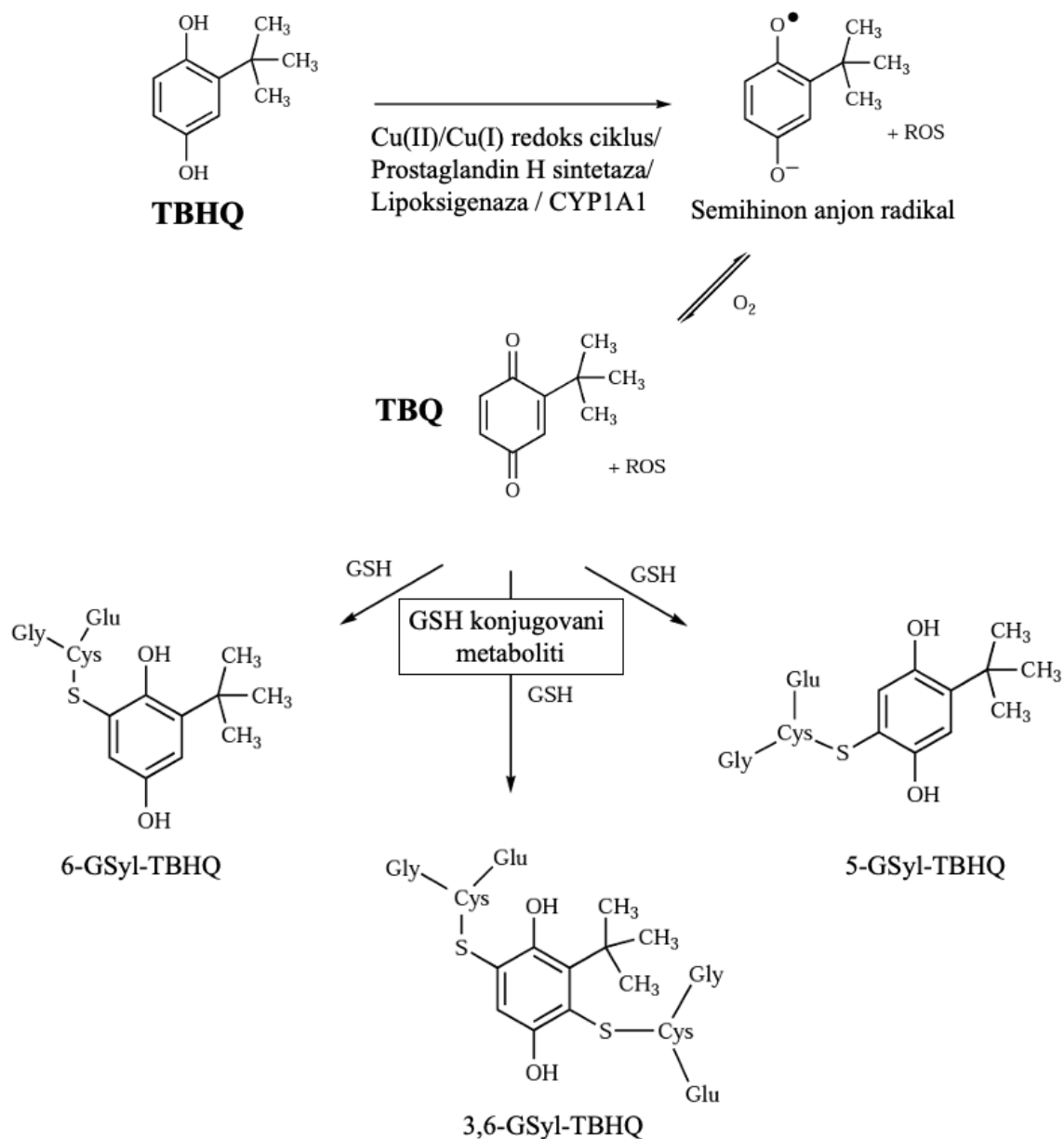
Slika 10. Karakteristike *tert*-butil grupe koja je čini dobrim modelom za dizajn sintetičkih jedinjenja po uzoru na avaron (Jeremić i sar., 2016).

TBQ nije bio predmet velikog broja ranijih istraživanja koliko je njegov redukovani oblik *tert*-butilhidrohion (TBHQ) koji ima visoku komercijalnu primenu. TBHQ je potentan antioksidant, hvatač slobodnih radikala i superoksidnog anjon-radikala $O_2^{\cdot -}$ (Badary i sar., 2003). Uglavnom se koristi u jestivim uljima, pecivima i mesnim proizvodima za sprečavanje oksidacije hrane, ali i kao antioksidant u kozmetičkim proizvodima, ruževima, parfemima i preparatima za negu kože (Kashanian & Dolatabadi, 2009; Shahabadi i sar., 2011).

Najveća mana za njegovu još širu komercijalnu primenu je slaba rastvorljivost ovog antioksidanta u vodi, pa je najveći broj naučnih istraživanja usmeren ka sintezi rastvorljivih derivata

TBHQ. Dodatni problem predstavlja razgradnja TBHQ na visokim temperaturama i gubitak aktivnosti (EFSA, 2004). Međutim, pokazalo se da je u uslovima skladištenja i termičke obrade hrane, glavni proizvod razgradnje TBHQ upravo TBQ, koji čini približno 30% TBHQ (Kim & Pratt, 1990; Hamama & Nawar, 1991). U istraživanju Astill i sar. (1967), predloženo je da se oksidacija TBHQ vrši monooksigenazama posredovanim citohromom P₄₅₀, prostaglandin H sintazom i lipoksigenazom do njegovog reaktivnog metabolita TBQ, pri čemu se naknadno stvara konjugat sa glutationom (GSH) (Slika 11).

Svi ovi podaci govore da je glavni proizvod razgradnje visoko komercijalno zastupljenog TBHQ, upravo TBQ, pa je i deo istraživanja u okviru ove disertacije bio usmeren na biološku aktivnost TBQ.



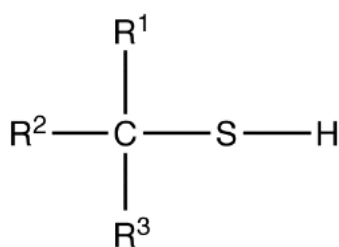
Slika 11. Shematski prikaz dobijanja TBQ oksidacijom TBHQ monooksigenazama posredovanim citohromom P₄₅₀, prostaglandin H sintazom i lipoksigenazom uz stvaranje mono i bis-konjugata sa glutationom (GSH) (modifikovano od Gharavi i sar. (2007)).

1.9.1. Derivati 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona

U ranijim istraživanjima sintetisani su različiti derivati TBQ i ispitana je njihova biološka aktivnost. Tako su Vilipić i sar. (2015) sintetisali aminokiselinske derivate TBQ i avarona i uporedili njihove citotoksične, antimikrobne aktivnosti i toksičnosti. Iako nisu pokazali citotoksičnost za normalne ćelije (MRC-5 ćelijska linija), aminokiselinski TBQ derivati su pokazali mnogo nižu aktivnost od derivata avarona. Antimikrobna aktivnost, kao i toksičnost na model organizmu *Artemia salina* aminokiselinskih TBQ derivata bila je, takođe, niža od aminokiselinskih avaronskih derivata što govori da aminokiselinske modifikacije nisu dale odgovarajući efekat (Vilipić i sar., 2015).

Slično prethodnom istraživanju, Jeremić i sar. (2016) su sintetisali alkilamino i aralkilamino derivate TBQ i avarona kako bi ispitali eventualnu primenu TBQ derivata kao dostupnijih sintetičkih analoga avaronu. Međutim, za razliku od aminokiselinskih derivata ispitivanih u radu Vilipić i sar (2016), alkilamino i aralkilamino TBQ derivati su pokazali istu ili bolju citotoksičnu aktivnost i selektivnost u odnosu na avaronske analoge. Najperspektivnijim su se pokazali oktilamino i fenetilamino derivati TBQ zbog njihove selektivnosti prema rezistentnim MDR ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća (nerezistentnoj – NCI-H460 i rezistentnoj – NCI-H460/R formi) u poređenju sa normalnim humanim keratinocitima (HaCaT). Takođe, u istom radu alkilamino i aralkilamino derivati TBQ pokazali su jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na avaronske derivate, pri čemu su pojedini pokazali uporedivu efikasnost sa antibiotikom amikacinom. Na osnovu navedenih radova može se uvideti da različite hemijske modifikacije TBQ daju različitu biološku efikasnost.

Tioli su sumporni analozi alkohola koji nastaju zamenom kiseonika sumporom. Oksiduju se u prisustvu blagih oksidacionih sredstava (poput vodonik peroksida) do disulfida, a kao krajnji proizvod oksidacije tiolne grupe nastaje sulfonska kiselina. Oksidacija tiola do disulfida predstavlja važan biološki proces budući da aminokiselina cistein sadrži tiolnu grupu, a stvaranjem disulfidnih veza dolazi do povezivanja susednih delova polipeptidnih lanaca i formiranja tercijarne strukture proteina. U prisustvu jake baze iz tiolne grupe nastaje tiolatni anjon koji je dobar nukleofil. Strukturna formula tiolne grupe prikazana je na **slici 12** pri čemu ostaci: R1-R3 mogu biti atomi vodonika, alkil grupe, aril grupe ili bilo koja njihova kombinacija.

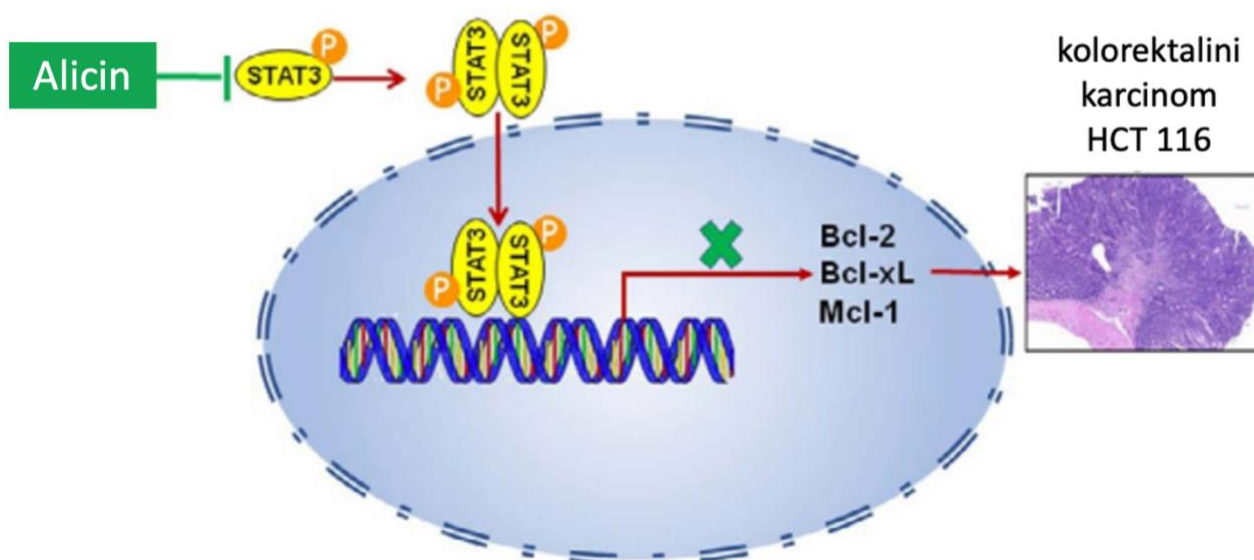


Slika 12. Strukturna formula tiola.

Nekoliko ključnih hemijskih svojstava omogućava tiolima niz bioloških aktivnosti. Jedinjenja koja sadrže tiolnu funkcionalnu grupu smanjuju toksične efekte nastale ROS produkcijom delujući kao antioksidanti i obnavljaju unutarćelijske količine endogenih tiola (npr. glutationa) (Pfaff i sar., 2020). Takođe, tioli su „meki“ donori elektrona i lako formiraju komplekse sa jonima metala kao što su bakar, olovo i živa. Kao rezultat toga, jedinjenja koja sadrže tiolnu grupu se koriste kao helatori jona teških metala, uklanjajući ih iz tela i sprečavajući ih da blokiraju aktivnost enzima i podstiču oksidaciju (Pfaff i sar., 2020).

Zbog navedenih prednosti, funkcionalna grupa tiola se nalazi u brojnim biološki aktivnim jedinjenjima prirodnog ili sintetičkog porekla kojima daje jedinstvenu kombinaciju korisnih svojstava. Jedno od najznačajnijih organosumpornih jedinjenja prirodnog porekla je alicin, glavno

biološki aktivno jedinjenje poreklom iz biljke *Allium sativum* L. Alicin je pokazao brojne korisne biološke efekte kao što su antimikrobni, antivirusni, antioksidativni, antidijabetski i od posebnog značaja antitumorski efekat (Sheela i sar., 1995; Kim i sar., 1997; Ankri & Mirelman, 1999; Coppi i sar., 2006; Li i sar., 2019). U radu Li i sar. (2019) ustanovljeno je da suzbijanje aktivacije STAT3 signalizacije leži u osnovi molekularnog mehanizma inhibicije tumorogeneze kolorektalnog karcinoma HCT 116 ćelijske linije od strane alicina. Navedeni mehanizam dejstva alicina podstiče apoptozu, budući da STAT3 učestvuje u njenom molekularnom mehanizmu (**Slika 13**).

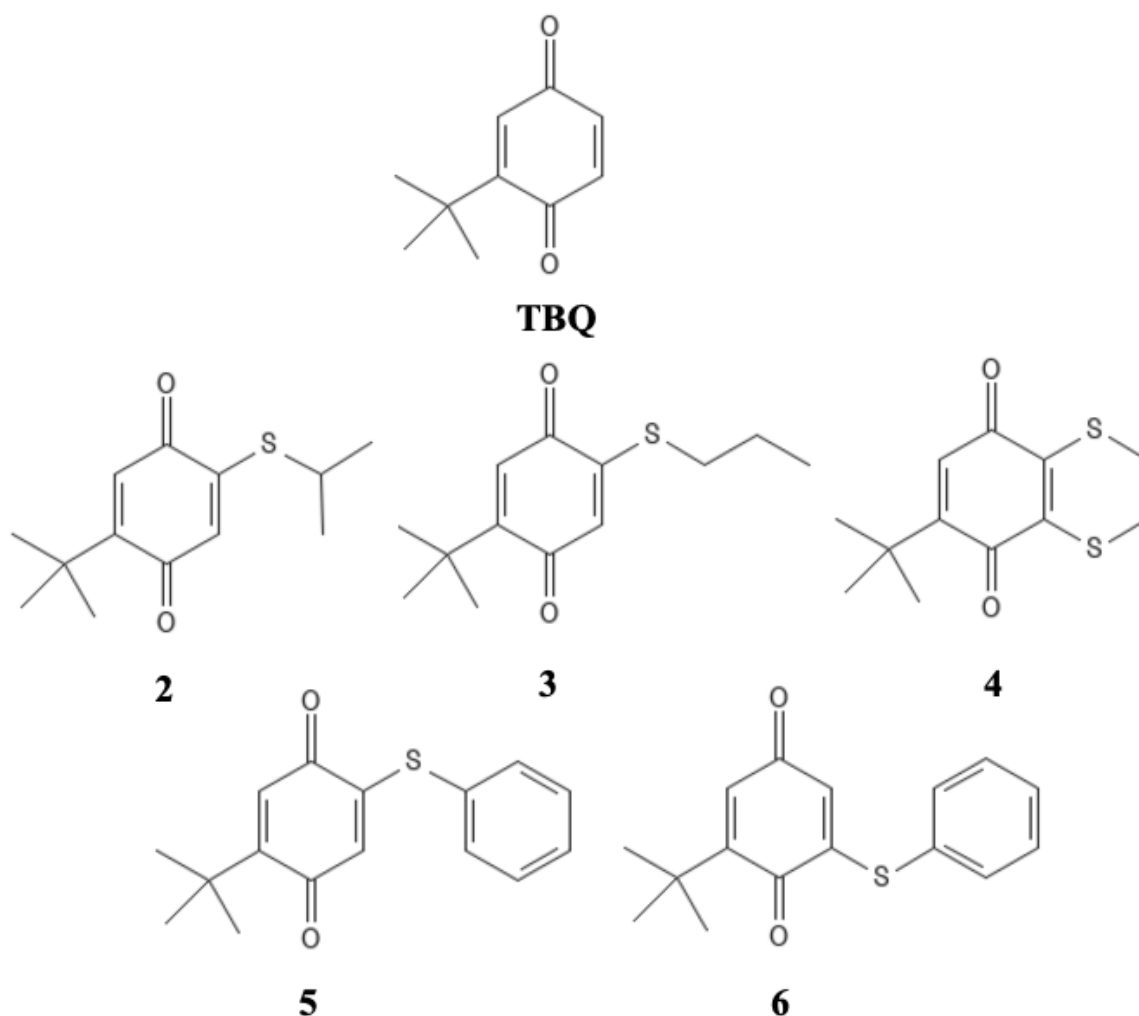


Slika 13. Shematski prikaz molekularnog mehanizma delovanja alicina poreklom iz biljke *Allium sativum* L. na ćelije kolorektalnog karcinoma – HCT 116 (modifikovano od Li i sar., 2019).

Mnogi organosumporni lekovi predstavljaju standard u terapiji različitih poremećaja i bolesti, uključujući N-acetilcistein koji najveću primenu ima kod trovanja paracetamolom, ali i za olakšavanje iskašljavanja mukusa zbog čega je jedan od preporučenih lekova u terapiji COVID-19 (Izquierdo-Alonso i sar., 2022). Osim ovog leka značajni organosumporni lekovi su: DMSA (2,3-mezodimerkaptosukcinska kiselina), D-penicilamin i amifostin koji se koriste u terapiji trovanja teškim metalima, Vilsonove bolesti i posledica radijacije, redom.

Zbog svega navedenog, organosumporna jedinjenja zajedno sa višestruko biološki aktivnim hinonima predstavljaju odličnu osnovu za kreiranje novih terapijskih agenasa.

Osnovni cilj pri dizajniranju derivata TBQ bio je da se hemijskim modifikacijama pojača aktivnost i postigne selektivni efekat prema tumorskim ćelijskim linijama. Sintetisana su tri alkiltio derivata: 2-*terc*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinon (**2**), 2-*terc*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinon (**3**) i 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinon (**4**), kao i dva ariltio derivata: 2-*terc*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinon (**5**) i 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinon (**6**). Nazivi i hemijske strukture derivata prikazani su na **slici 14**.



Slika 14. Hemijska struktura 2-*tert*-butil-1,4-benzohinona - TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata: TBQ (**1**) 2-*tert*-butil-1,4-benzohinon, (**2**) 2-*tert*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinon, (**3**) 2-*tert*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinon, (**4**) 2-*tert*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinon, (**5**) 2-*tert*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinon i (**6**) 2-*tert*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinon.

Kao što je pokazano u prethodnim radovima, različite hemijske modifikacije TBQ mogu dovesti do različitih mehanizama delovanja i biološke aktivnosti. Usled toga, a i u cilju detekcije najaktivnijeg i najselektivnijeg, svi novosintetisani derivati TBQ se moraju dalje testirati.

1.10. Ispitivanje biološke aktivnosti

Uvođenje novih lekova na tržište bez dobrih sigurnosnih testiranja nosi rizik od pojave neželjenih toksičnih efekata prilikom konzumiranja. Zbog toga se, pre eventualne kliničke primene, osim procena efikasnosti, obavezno rade sigurnosne provere koje uključuju ispitivanje efekata lekova na bakterijske kulture, ćelijske linije i eksperimentalne životinje.

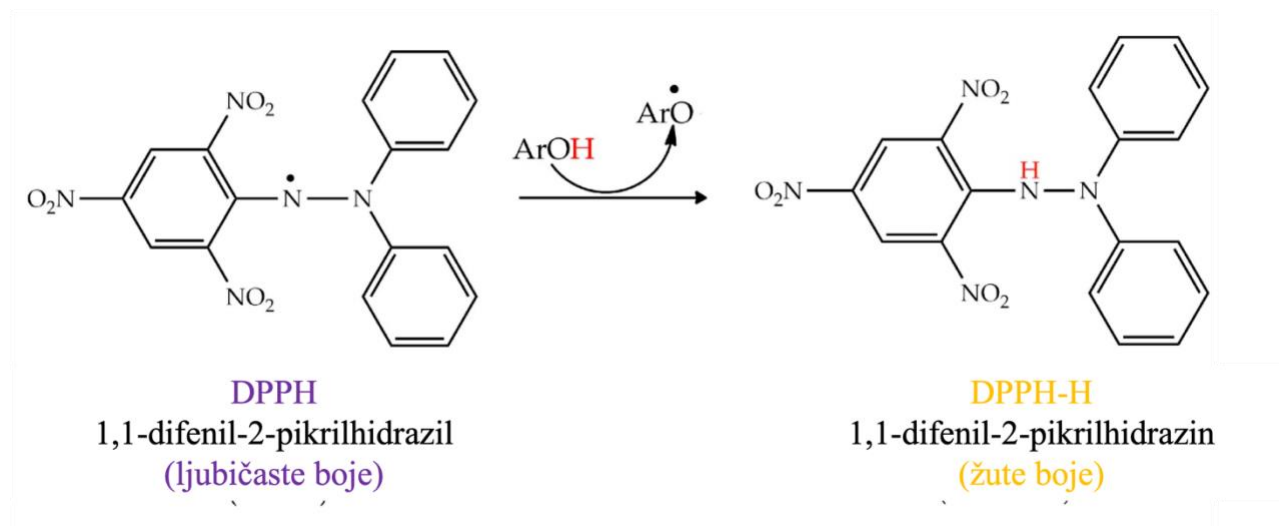
Procena biološke aktivnosti hemijskih jedinjenja prirodnog ili sintetičkog porekla obuhvata veliki broj biohemijskih i bioloških testova koji uključuju: acelularne, celularne, prokariotske i eukariotske model sisteme.

1.10.1. Biohemijski testovi u proceni biološke aktivnosti

Biohemijski testovi su brzi testovi koji se baziraju na biohemijskim reakcijama odgovarajućih supstanci sa uzorkom pri čemu se metoda kvantifikacije najčešće bazira na spektrofotometrijskim metodama.

DPPH test

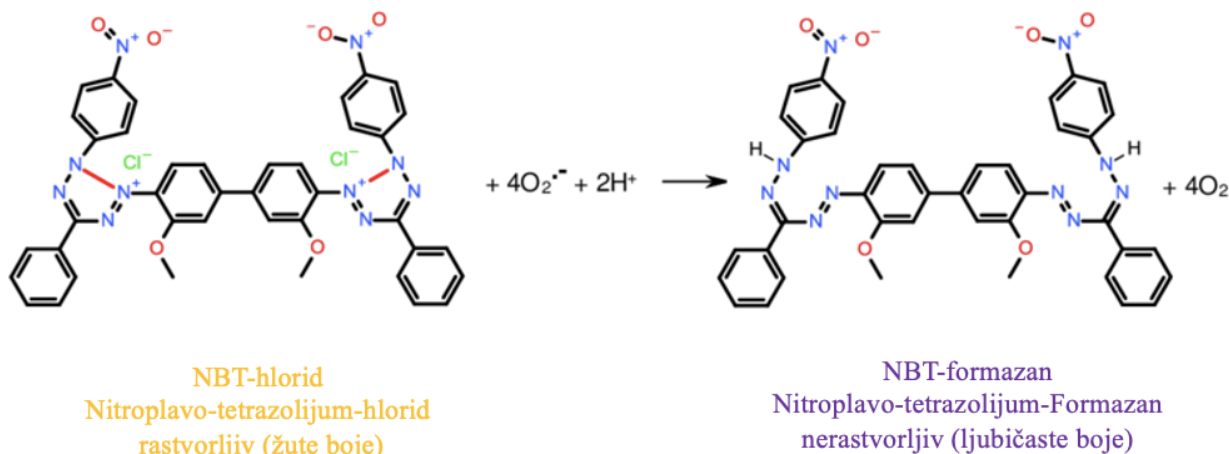
DPPH test je kolorimetrijski test za procenu antioksidativnog potencijala jedinjenja prirodnog ili sintetičkog porekla, kao i njihovih smeša, koji je prvi put razvio Blois (1958). To je jednostavan i široko korišćen metod za procenu sposobnosti jedinjenja da deluju kao hvatači slobodnih radikala ili donori vodonika (Liu i sar., 2010). Test meri potencijal jedinjenja za uklanjanje 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH radikal) koji je poznat po svojoj izuzetnoj stabilnosti zbog delokalizacije radikala u aromatičnim prstenovima i ima intenzivnu tamno ljubičastu boju (Bibi Sadeer i sar., 2020). U testu se radikal neutrališe prihvatanjem atoma vodonika ili elektrona iz antioksidativnog jedinjenja tokom čega se na kraju procesa pretvara u žuto obojeni redukovani oblik 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H) (Slika 15).



Slika 15. Shematski prikaz biohemijskog procesa DPPH testa. U prisustvu antioksidanta kao donora elektrona dolazi do redukcije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH radikal, ljubičaste boje) u 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H, žute boje).

Uticaj na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

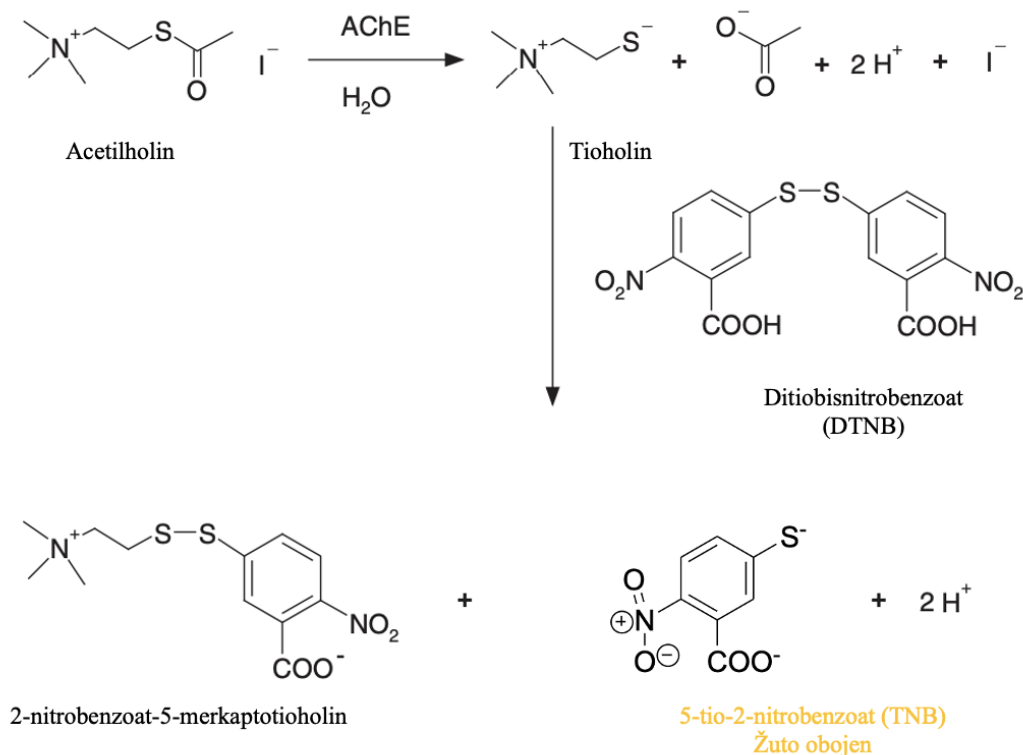
Jedan od kolorimetrijskih testova za utvrđivanje uticaja na produkciju ROS od strane jedinjenja različitog porekla je NBT test. Test se zasniva na redukciji NBT reagensa (nitroplavo-tetrazolijum-hlorid, engl. Nitro Blue Tetrazolium) superoksidnim anjon-radikalima ($O_2^{\cdot-}$), pri čemu se formira NBT-formazan, nerastvorljivi talog ljubičaste boje ($\lambda_{max}=560$ nm), koji se može koristiti za kvantifikaciju nivoa produkovanog $O_2^{\cdot-}$ od strane ćelija (Auclair & Voisin, 1985) (Slika 16).



Slika 16. Shematski prikaz redukcije NBT reagensa u prisustvu superoksidnog anjon-radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$) pri čemu nastaje NBT-formazan, jedinjenje ljubičaste boje.

Ispitivanje inhibicije acetilholinesteraze

Acetilholinesteraza (AChE) je enzim uključen u metaboličku hidrolizu acetilholina u holineričkim sinapsama u centralnom i perifernom nervnom sistemu. Spektrofotometrijska metoda za određivanje aktivnosti AChE tkivnih ekstrakata, homogenata, ćelijskih suspenzija i dr. prvi put je opisana od strane Ellman i sar. (1961). Aktivnost enzima se meri kvantifikacijom žuto obojenog jedinjenja TNB (5-tio-2-nitrobenzoat) koji nastaje iz tihololina kada reaguje sa DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat)) (Badawy i sar., 2014) (**Slika 17**). Reakcija nastanka TNB-a je izuzetno brza.

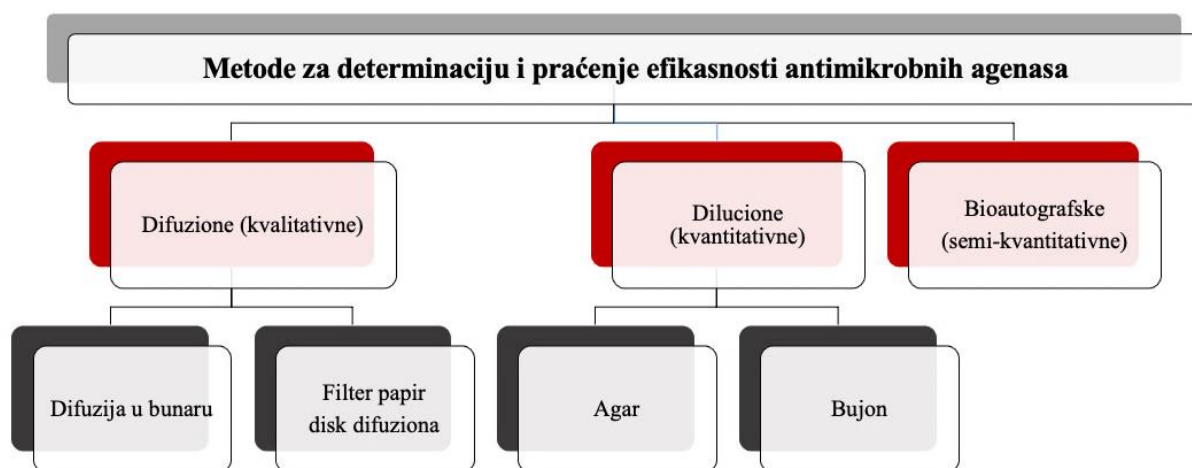


Slika 17. Shematski prikaz hidrolize acetiltioholina acetilholinesterazom (AChE) i nastanka tihololina, koji zatim reaguje sa DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat)) i formira TNB, 5-tio-2-nitrobenzoat žute boje. Slika preuzeta i modifikovana od (Worek i sar., 2012).

1.10.2. Ispitivanje antimikrobnog efekta

Metode za determinaciju i praćenje efikasnosti antimikrobnih agenasa se dele na difuzione, dilucione i bioautografske (**Slika 18**). Najčešće su u laboratorijskoj primeni brze i jednostavne difuzione metode koje zahtevaju malu količinu uzorka i na osnovu kojih se preko prečnika zone inhibicije rasta može odrediti da li je bakterija osetljiva, intermedijerno osetljiva ili rezistentna na određeni antibiotik (Wiegand i sar., 2008). Ograničenja u primeni ovih metoda uključuju nemogućnost pojedinih supstanci da difunduju u hranljivu podlogu kao i nemogućnost određivanja tačne količine supstance koja je difundovala u podlogu, zbog čega se dobija samo kvalitativan podatak.

Dilucione metode su veoma precizne kvantitativne metode koje se u zavisnosti od vrste medijuma dele se na agar i bujon dilucione metode, a u zavisnosti od ukupne zapremine medijuma na makro (do 2 mL) i mikrodilucione metode (do 500 μ L). Najčešće je u kliničkoj upotrebi mikrodiluciona metoda koja se primenjuje za ispitivanje antimikrobnog efekta jedinjenja ili njihovih smeša sintetičkog ili prirodnog porekla i smatra se referentnom metodom za *in vitro* ispitivanje osetljivosti bakterija (Wiegand i sar., 2008). Antimikrobni efekat se utvrđuje određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), koja predstavlja najnižu koncentraciju agensa koja inhibira vidljiv rast bakterija (Tully & Razin, 1996).



Slika 18. Metode za determinaciju i praćenje efikasnosti antimikrobnih agenasa.

Mikrodiluciona metoda se izvodi u mikrotitarskim pločama i uključuje pravljenje serijskih razblaženja antimikrobnih agenasa u tečnom medijumu za gajenje bakterija, dodavanje bakterija i resazurina kao indikatora rasta mikroorganizama, inkubaciju u odgovarajućim fizičko-hemijskim uslovima i optičko ili spektrofotometrijsko očitavanje rezultata. Resazurin tamno ljubičaste boje, nakon inkubacije pod dejstvom oksidoreduktaza u vijabilnim ćelijama prelazi u resorufin, svetlo ružičaste boje.

MIK vrednost se utvrđuje kao najniža koncentracija antimikrobnog agensa na kojoj nije došlo do promene boje resazurina. MIK nije konstantan za dati antimikrobni agens, specifičan je u zavisnosti od bakterijskog soja, veličine inokuluma, sastava medijuma, fizičko-hemijskih uslova i vremena inkubacije. Međutim, kada su uslovi kultivacije standardizovani (specifičan medijum i fizičko-hemijski uslovi za rast mikroorganizma), mogu se porediti različiti antimikrobni agensi kako bi se utvrdilo koji od njih ima najjači efekat na dati bakterijski soj (Madigan i sar., 1997). Naknadnom kultivacijom u čvrstom medijumu za gajenje mikroorganizama sa odgovarajućim koncentracijama test jedinjenja na kojima nije došlo do rasta mikroorganizama (bakterija), odnosno promene boje resazurina, moguće je odrediti koncentraciju koja dovodi do smrti 99,99% bakterija (minimalna baktericidna koncentracija – MBK) (Schwalbe i sar., 2007).

Osim navedenih metoda, za ispitivanje antimikrobnog potencijala složenih smeša koriste se bioautografske metode, semi-kvantitativne, koje se izvode u kombinaciji sa tečnom hromatografijom.

Ispitivanje sposobnosti adhezije i invazije bakterija pri infekciji humanih ćelija

Adhezija je interakcija između specifičnih receptora na membrani ćelija i liganda na površini bakterija. Kako bi izbegle nespecifične mehanizme odbrane organizma i razvile stabilnu bakterijsku populaciju u inficiranom organizmu, bakterije najčešće adheriraju kapsulom i sluzavim omotačem na epitelne ćelije domaćina na površinama sluzokože respiratornog, digestivnog i urogenitalnog sistema (Costerton i sar., 1985; Hori & Matsumoto, 2010). Sa druge strane, invazija predstavlja sposobnost mikroorganizama da prodru kroz epitelni sloj produkcijom enzima koji omogućavaju širenje infekcije (koagulaza, streptokinaza, lipaza i dr.) i antifagocitnim faktorima u koje spadaju kapsula, protein A i protein M prisutni kod pojedinih vrsta bakterija (Cossart & Sansonetti, 2004). Oba mehanizma, zajedno sa produkcijom toksina spadaju u faktore virulencije bakterija.

Ispitivanje sposobnosti adhezije i invazije se bazira na inkubaciji bakterija sa humanim ćelijama, pri čemu se vodi računa o multiplicitetu infekcije, odnosno da broj bakterija bude višestruko veći u odnosu na broj ćelija. Nakon inkubacije, adherirane bakterijske ćelije se ispiraju, ćelije liziraju, te se na osnovu broja izraslih kolonija, gajenjem bakterija na čvrstim hranljivim podlogama, određuje broj bakterija koje su adherirale i izvršile invaziju u ćelije.

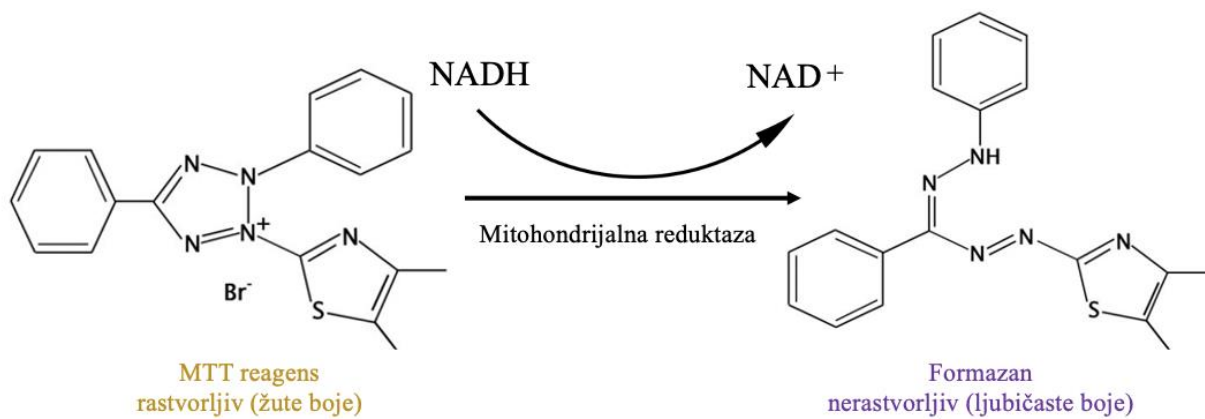
1.10.3. Ispitivanje toksičnosti i citotoksičnosti

ARC test

Test toksičnosti na model organizmu *Artemia salina* (ARC test) je jedan od najčešće korišćenih testova za procenu akutne toksičnosti jedinjenja različitog hemijskog sastava i porekla, smeša različitih jedinjenja, otpadnih i komunalnih voda itd. Budući da vrsta *A. salina* živi u simbiozi sa nekim vrstama bakterija, toksičnost ovih jedinjenja može biti povezana sa lizom ćelijskog zida bakterija prisutnih u digestivnom traktu odraslih *A. salina*, tako da se lažno pozitivni rezultati toksičnosti izbegavaju tretmanom larvi u II i III fazi razvoja (*A. naupli*) kod kojih digestivni trakt još nije razvijen (Soto-Rodriguez i sar., 2003). Nakon tretmana, a na osnovu broja živih i mrtvih jedinki utvrđuje se LC₅₀ vrednost koja predstavlja koncentraciju ispitivanog jedinjenja koja dovodi do mortaliteta 50% jedinki. Glavna prednost *A. salina* kao model organizma je njena stalna dostupnost u vidu suvih cista koje se vrlo lako mogu izleći, što eliminiše sve biološke, tehnološke i finansijske probleme uzgoja.

MTT test

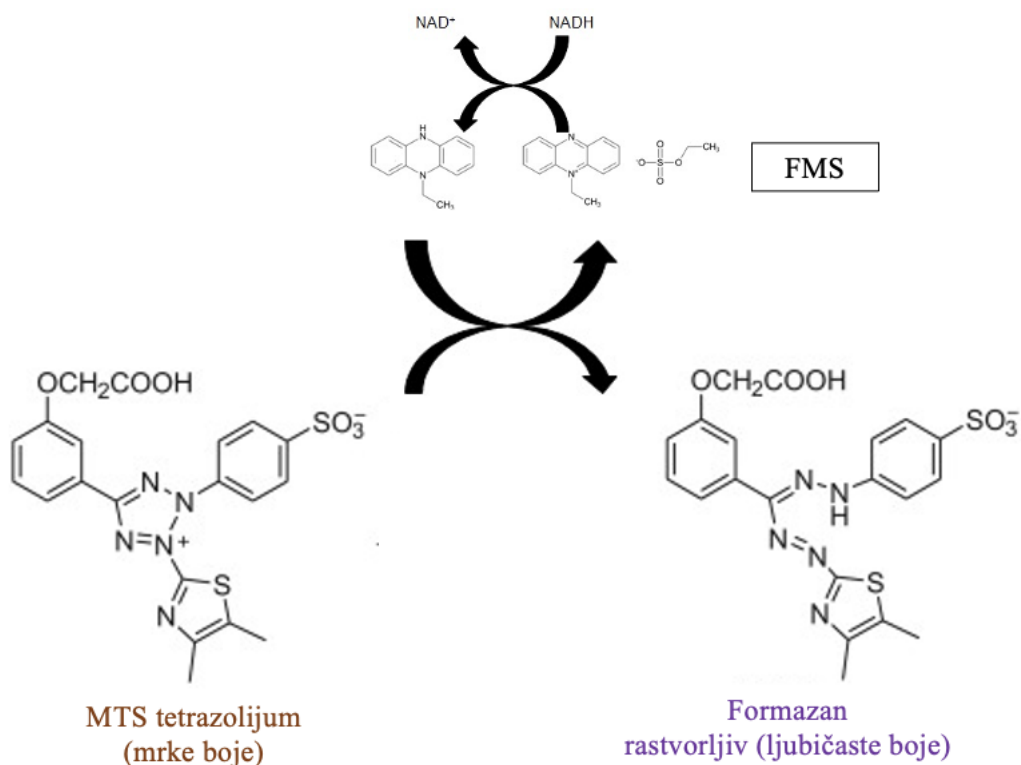
MTT test je *in vitro* kolorimetrijski test koji procenjuje broj živih ćelija i njihovu proliferaciju na osnovu procene metaboličke aktivnosti ćelije (Bahuguna i sar., 2017). Zasniva se na enzimskoj redukciji žuto obojenog tetrazola (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid) u ljubičasti nerastvorni formazan koji formira kristale u metabolički aktivnim ćelijama i rastvara se u organskom rastvaraču DMSO (**Slika 19**).



Slika 19. Shematski prikaz redukcije MTT reagensa u ljubičasto obojen formazan u metabolički aktivnim ćelijama.

MTS test

MTS test je test vijabilnosti i proliferacije ćelija zasnovan na bioredukciji MTS tetrazolijuma od strane živih ćelija u vodeno rastvorljivo jedinjenje formazan (Riss i sar., 2016) (**Slika 20**). Za razliku od MTT testa, ovaj test zahteva jedan korak manje jer se reagens dodaje direktno u medijum ćelijske kulture bez potrebnih koraka ispiranja i solubilizacije, pa se ovaj test često naziva jednostepeni MTT test.



Slika 20. Intermedijarni akceptor elektrona fenazin-metil-sulfat (FMS) prenosi elektron iz NADH u citoplazmi da bi, u metabolički aktivnim ćelijama, redukovao MTS tetrazolijum u vodeno rastvorljiv, ljubičasto obojen formazan (modifikovano od Riss i sar. (2016)).

1.10.4. Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal ćelija *in vitro* (Wound healing ili Scratch assay)

Skratch esej ili Wound healing esej koristi se za utvrđivanje brzine migracije ćelija *in vitro* nakon tretmana različitim agensima (Liang i sar., 2007). Test se bazira na određivanju rastojanja između ćelija nakon fizičkog narušavanja ćelijskog monosloja pri čemu dolazi do aktivacije migracije ćelija ka regionu gde je nastalo fizičko oštećenje, odnosno povreda. Upoređujući rastojanje između ćelija u migratornom sloju pre i nakon inkubacije sa različitim agensima, a zavisnosti od dužine inkubacionog perioda, određuje se brzina ćelijske migracije.

1.10.5. Ispitivanje interakcija sa DNK molekulom

Ispitivanje genotoksičnosti, koja nastaje kao posledica interakcija genotoksičnih agenasa sa DNK molekulom, naročito je važno kod antitumorskih lekova koji su dizajnirani tako da ubijaju ili smanjuju proliferaciju ćelija. Mehanizam delovanja antitumorskih lekova često uključuje direktnu ili indirektnu interakciju sa molekulom DNK, a samim tim i genotoksičnost (Toolaram i sar., 2014). Interakcije agenasa sa DNK molekulom mogu se ispitivati na acelularnim i celularnim (prokariotskim i eukariotskim) model sistemima.

Ispitivanje interakcije na acelularnom model sistemu

Test za determinaciju interakcija različitih jedinjenja ili njihovih smeša na acelularnom model sistemu, plazmidnoj DNK, višestruko se primenjuje u genotoksikološkim istraživanjima. Plazmidi predstavljaju ekstrahromozomalni genetički materijal bakterija kružne forme koji, između ostalog, nosi informacije za rezistenciju na antibiotike i faktore virulencije bakterija. Nakon inkubacije plazmida sa različitim test jedinjenjima prati se da li ispitivani agens dovodi do oštećenja zatvorene kružne forme (CCF) plazmidne DNK i dovodi do njenog prelaska u otvorenu kružnu formu (OCF).

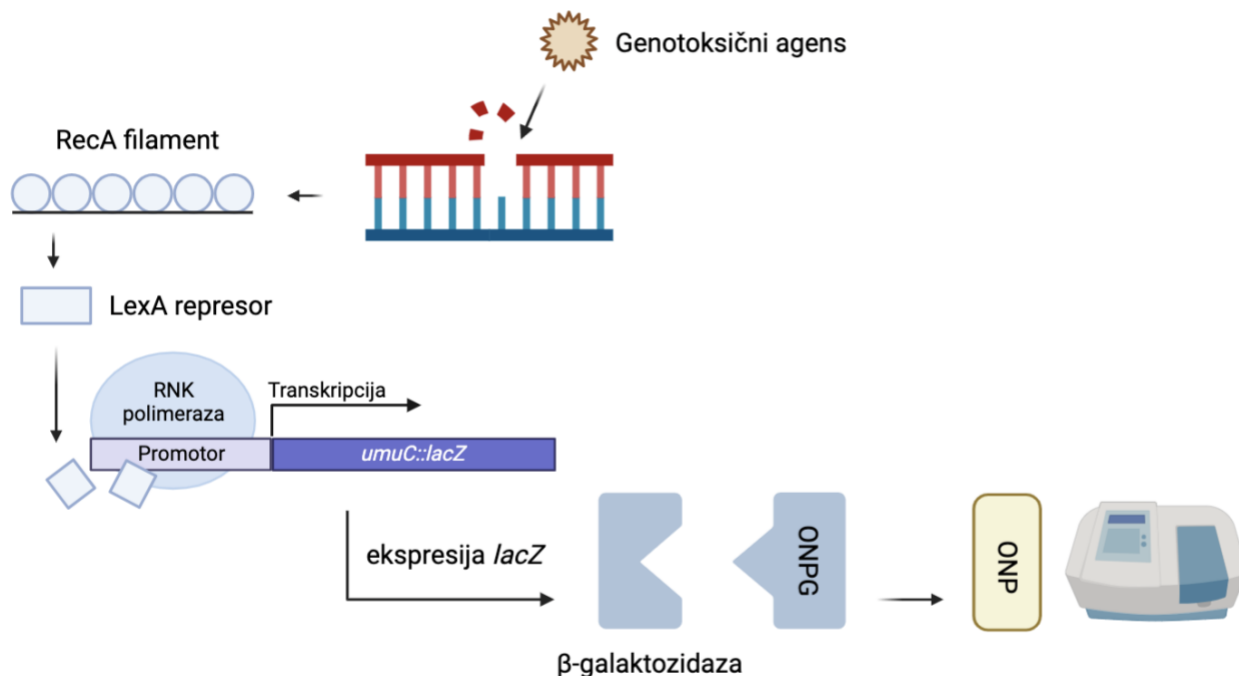
Ispitivanje interakcije na celularnom prokariotskom model sistemu

U celularnom prokariotskom sistemu, ispitivanje interakcije jedinjenja sa DNK molekulom se može vršiti primenom SOS/*umuC* testa na model organizmu *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. SOS/*umuC* test je standardizovan test prema nemačkoj klasifikaciji (DIN 38415 T3) i međunarodnom ISO standardu (ISO/DIS 13829, 2000) za određivanje mutagenog potencijala čistih i otpadnih voda. Danas se koristi za ispitivanje genotoksičnog potencijala širokog spektra uzoraka poput lekova, hrane, seruma, urina i sl. kao i kompleksnih smeša iz prirode (Nakamura i sar., 1987; Česen i sar., 2016). Primenom ovog testa moguće je detektovati agense koji dovode do različitih oštećenja DNK molekula poput O-alkilovanja i N-alkilovanja, deaminacije, fotodimera, depurinacije, depirimidacije, oksidativnih oštećenja.

Test je baziran na sposobnosti genotoksičnih agenasa da indukuju ekspresiju gena *umuC*, jednog od indukovanih gena SOS bakterijskim odgovorom na oštećenje DNK molekula u genetički modifikovanom bakterijskom soju *S. typhimurium* TA1535/pSK1002.

SOS bakterijski odgovor je prvi put opisan od strane Miroslava Radmana (Radman, 1975) kod *E. coli* i predstavlja specifični mehanizam koji se indukuje u slučaju nastanka višestrukih oštećenja DNK molekula i/ili zaustavljanja replikacije. Ukoliko dođe do oštećenja DNK molekula dolazi do kaskadne ekspresije gena uključenih u proces reparacije. Prvi geni koji se ekspimiraju su geni error-free mehanizama reparacije koji omogućavaju preciznu reparaciju oštećenja DNK molekula (nukleotidna, bazna i metil zavisna ekscizija pogrešno sparenih baza). Međutim, ukoliko ovi mehanizmi ne isprave nastala oštećenja DNK molekula, dolazi do aktivacije error-prone mehanizama reparacije koji uključuju translezijsku sintezu koja je deo SOS odgovora. Ovi mehanizmi mogu dovesti do promena u sekvenci DNK molekula i nastanak mutacija, ali su evolutivno značajni za preživljavanje prokariotskih organizama.

U regulaciju SOS odgovora, uključeno je 50 gena koji su pod kontrolom proteina induktora RecA i represora LexA (Masłowska i sar., 2019). Usled oštećenja DNK molekula na mestu jednolančane DNK vezuje se RecA protein koji se prevodi u aktivnu formu uz prisustvo ATP-a i formira RecA filament (Butala i sar. 2009). RecA filament indukuje razgradnju LexA represora SOS regulona čime počinje kaskadna ekspresija SOS gena (Jaszczur i sar., 2016). Jedan od gena uključenih u proces SOS reparacije je *umuC* gen (Slika 21).



Slika 21. Shematski prikaz indukcije SOS odgovora *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 soja nakon oštećenja DNK molekula genotoksičnim agensima.

Soj *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 specifično je genetički modifikovan za SOS/*umuC* test. Posедуje višestruke kopije plazmida pSK1002 koji u sebi nosi fuziju *umuC* i *lacZ* gena. Produkt *lacZ* gena je β-galaktosidaza, enzim čiji su supstrati laktaza i ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid). Razlaganjem ONPG-a nastaje žuto obojeni o-nitrofenol (ONP) koji se može kolorimetrijski detektovati (McDaniels i sar., 1990). Budući da su *umuC* i *lacZ* geni fuzionisani, kolorimetrijskim merenjem aktivnosti enzima β-galaktosidaze (produkta *lacZ*) gena nakon dodavanja ONPG-a, moguće je odrediti i stepen eksprimiranog *umuC* gena.

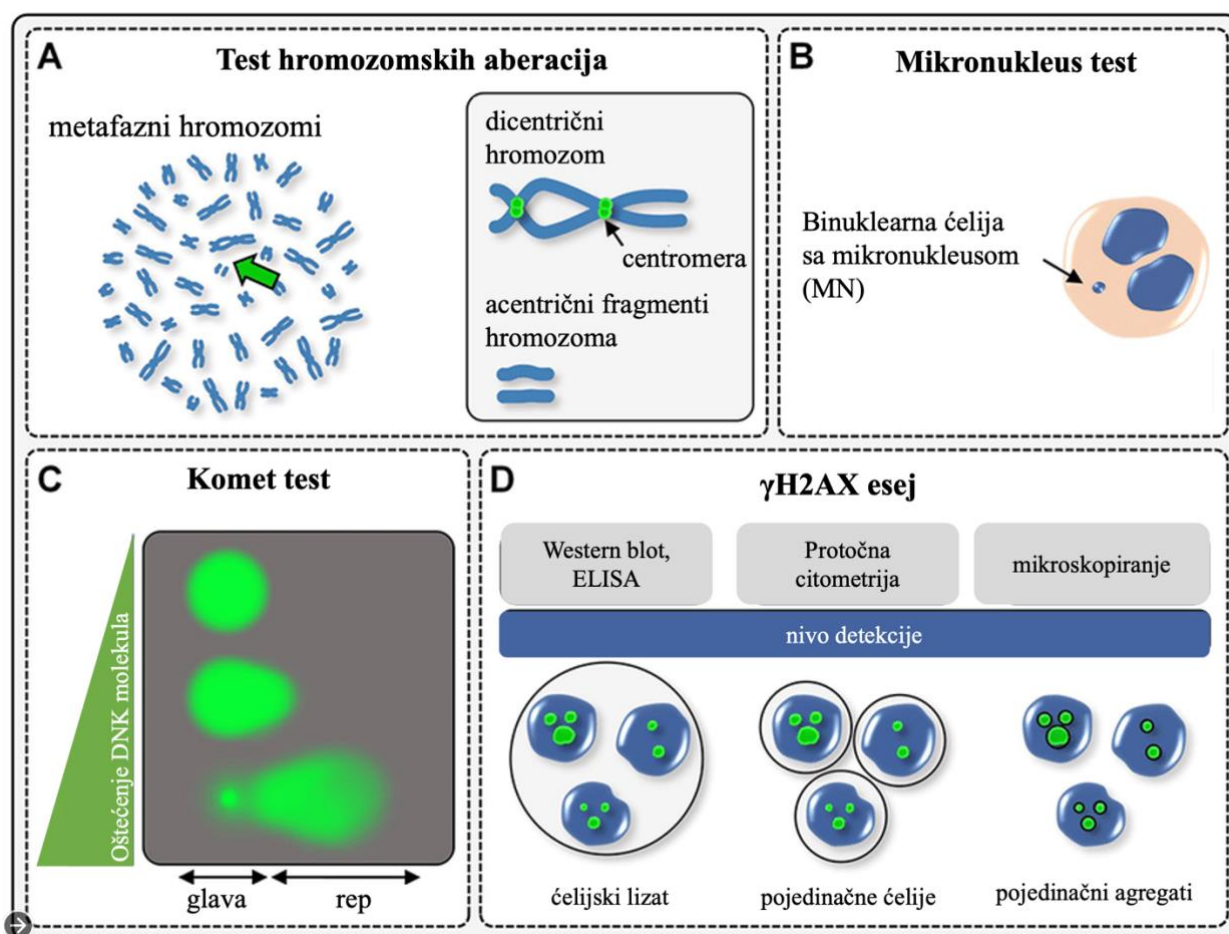
Plazmid nosi i gen za rezistenciju soja na antibiotik ampicilin (amp), što omogućava selekciju samo onih bakterija kod kojih je plazmid očuvan gajenjem u selektivnom medijumu sa dodatkom ampilicilina. Osim toga, soj je auksotrof za histidin (*his*-) i defektan u lipopolisaharidnom sloju (*rfa*-) kako bi se povećala propustljivost membrane za genotoksične agense, a onemogućila precizna reparacija (*uvrB*-) i sinteza enzima β-galaktosidaze (*lacZ*-).

Ispitivanje interakcije na celularnim, eukariotskim model sistemima

Različitim metodama koje se primenjuju u genotoksikologiji, može se proceniti efekat genotoksičnog agensa na DNK molekul na celularnim, eukariotskim model sistemima primenom različitih testova (test hromozomskih aberacija, mikronukleus test, SCGE (engl. single cell gel electrophoresis) poznatiji kao komet test (engl. Comet assay), γH2AX testa itd.) (Slika 22). Komet test omogućava procenu trenutnog stanja u ćeliji, dok drugi testovi poput mikronukleus testa ili testa

hromozomskih aberacija omogućuju uvid u procenu trajnih oštećenja DNK molekula tj. onih oštećenja koja se ne mogu popraviti mehanizmima ćelijske reparacije DNK molekula.

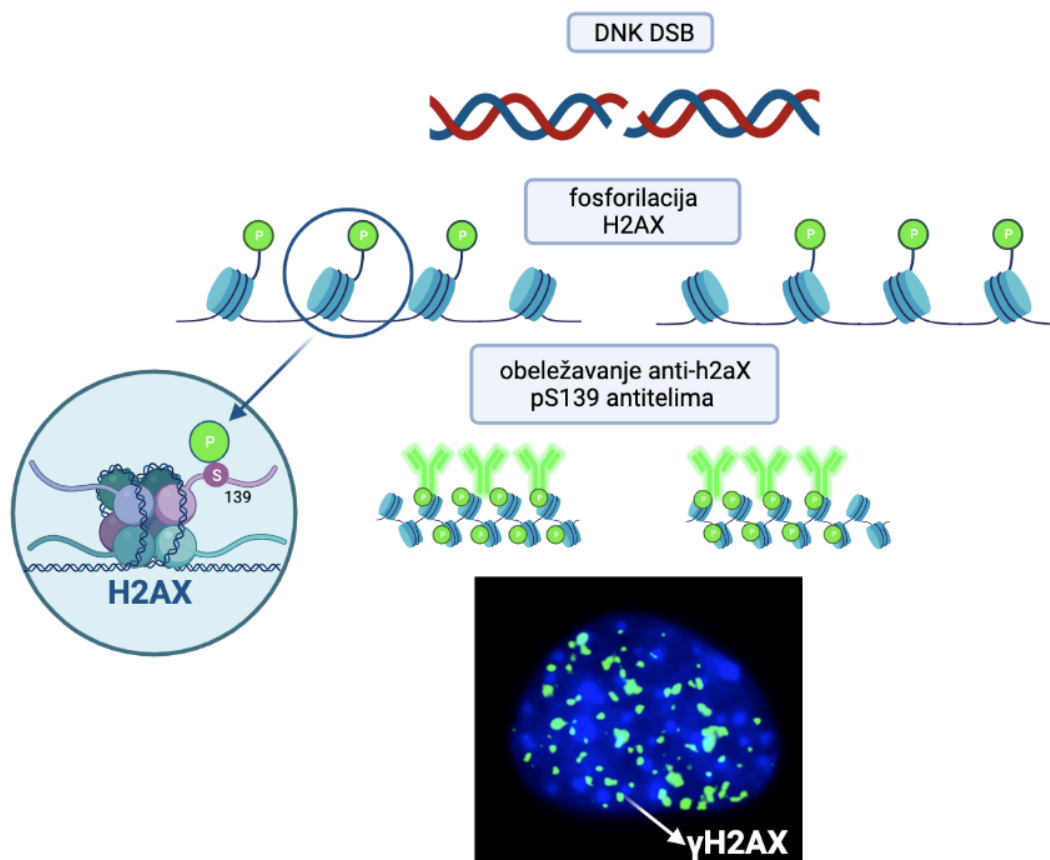
Komet test je osetljiva metoda za otkrivanje različitih tipova oštećenja DNK molekula na nivou jedne ćelije uključujući oštećenja alkalno labilnih mesta (engl. Alkali lable sites, ALS), abaznih mesta, jednolančane prekide (engl. DNA single-strand breaks, SSBs) i dvolančane prekide (engl. DNA double-strand breaks, DSBs) DNK molekula (Ge i sar., 2015). Ćelije ugrađene u agarozni gel na mikroskopskim pločicama se liziraju da bi se formirali nukleoidi koji sadrže super namotane petlje negativno naelektrisane DNK povezane sa nuklearnim matriksom i koje će se elektroforezom pri visokoj pH vrednosti, kretati ka pozitivno naelektrisanj elektrodi – anodi. Budući da će se kraći fragmenti kretati brže, nakon fluorescentnog obeležavanja DNK molekula, mogu se vizuelizovati fragmenti različitih dužina. Oštećena DNK se nalazi u „repu“ komete, dok će intaktna (neoštećena) DNK ostati u „glavi“ komete.



Slika 22. Šematski pregled testova genotoksičnosti. **(A)** Test hromozomskih aberacija pokazuje spojeni dicentrični hromozom u metafazi i preostale acentrične fragmente hromozoma. **(B)** Mikronukleus test: Binuklearna ćelija koja sadrži mikronukleus (MN) kao rezultat trajnih oštećenja DNK molekula nakon prve mitoze. **(C)** Komet test: jednoćelijska gel elektroforeza za kvantifikaciju nivoa oštećenja DNK u pojedinačnim ćelijama. Nakon izvođenja testa, odmotana, denaturisana DNK neoštećenih ćelija ostaje u predelu glave komete. Veće DNK lezije dovode do pojačane migracije DNK u rep komete i smanjenog intenziteta regiona glave. **(D)** γ H2AX esej: Prekidi dvostrukih lanaca DNK mogu se nakon imunofluorescentnog bojenja vizualizovati u ćelijskim jezgrima (plavo) i kao diskretna γ H2AX žarišta (zeleno) pomoću fluorescentne mikroskopije. Modifikovano od Reddig i sar. (2018).

γ H2AX test je metoda za detekciju dvostrukih oštećenja molekula DNK (DSBs) uzrokovanih različitim genotoksičnim agensima (Ivashkevich i sar., 2011). Metoda se zasniva na detekciji

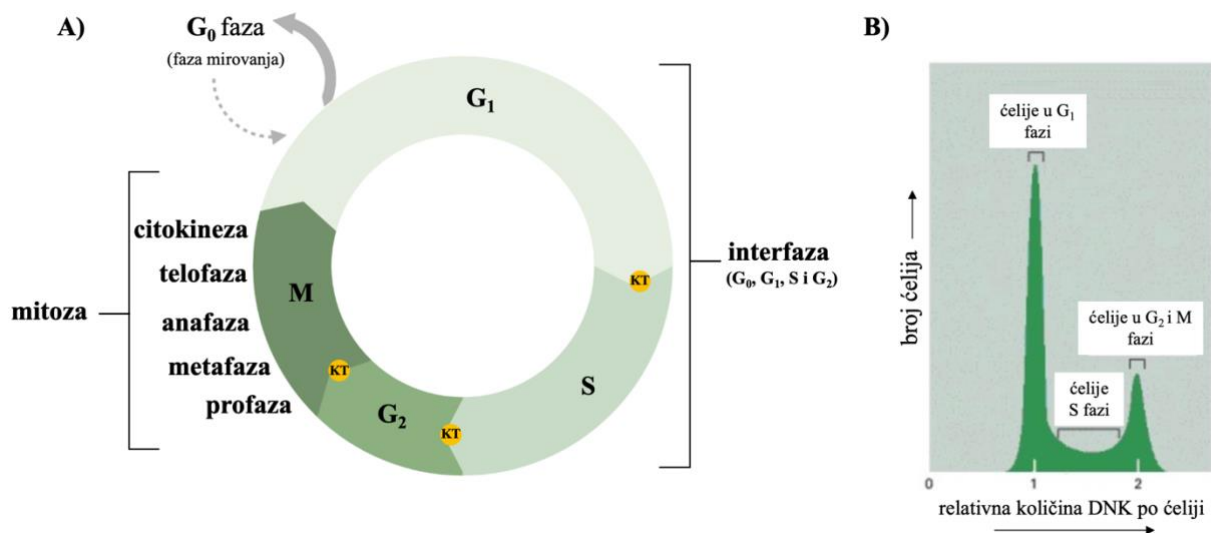
fosforilovanih histona H2AX (γ H2AX) koji su deo histonskog oktamera u nukleozomima i akumuliraju se na mestima dvolančanih prekida u korelaciji 1:1 (Štraser i sar., 2013). Obeleženim antitelima specifičnim za γ H2AX, mogu se detektovati tačna mesta dvolančanih oštećenja DNK molekula (**Slika 23**). Evaluacija rezultata se vrši protočnom citometrijom koja podrazumeva merenje fluorescencije (na nivou pojedinačne ćelije) i rasipanja svetlosti o čestice tokom njihovog prolaska u struji fluida kroz protočni citometar. Njenom primenom mogu se analizirati različite osobine ćelija kao i njihov sadržaj.



Slika 23. Shematski prikaz detekcije dvolančanih oštećenja DNK molekula (DSBs) preko γ H2AX agregata obeleženih specifičnim γ H2AX antitelima

1.10.6. Analiza ćelijskog ciklusa

Najosnovnija funkcija ćelijskog ciklusa je da duplira količinu DNK u hromozomima, a zatim precizno odvoji kopije u dve genetski identične ćerke ćelije. Ovi procesi definišu dve glavne faze ćelijskog ciklusa: interfazu i mitozu (**Slika 24**). Interfaza uključuje pripremu ćelije za deobu i sastoji se iz četiri faze: G_0 faza mirovanja koja počinje nakon završetka prethodne deobe; G_1 (presintetička, priprema ćelije za replikaciju) koja ima najduže trajanje; replikacija DNK se dešava tokom najkraće S faze (S za sintezu), koja zahteva 10-12 sati i traje skoro polovinu vremena ćelijskog ciklusa u tipičnoj ćeliji sisara i poslednja G_2 faza koja je postsintetička i uključuje pripremu ćelije za deobu (Shackelford i sar., 1999; Chaffey, 2003). Mitoza (M faza) počinje nakon interfaze, zahteva mnogo manje vremena (manje od sat vremena u ćeliji sisara) i uključuje niz dramatičnih događaja koji počinju nuklearnom podelom, a završavaju se citokinezom (Chaffey, 2003). Između faza G_1 i S, zatim nakon S faze, kao i između S i M faza, proverava se pravilnost sinteze DNK molekula ili integritet njegovih komponenti kroz tzv. kontrolne tačke (engl. checkpoints) i ukoliko je došlo do promena, ćelijski ciklus se zaustavlja (Shackelford i sar., 1999).



Slika 24. Grafički prikaz A) faza ćelijskog ciklusa i B) primer rezultata dobijenih analizom ćelijskog ciklusa kada se sadržaj DNK njenih pojedinačnih ćelija odredi protočnim citometrom. KT-kontrolna tačka.

Ako replikacija DNK nije završena, jedan od ključnih proteina koji dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa je faktor transkripcije p53 sisara i tumor supresor. Ovaj faktor, na osnovu stepena oštećenja DNK, odlučuje o sudbini ćelije, tj. da li je oštećenje popravljivo i ćelija može da pređe u sledeću fazu ili ukoliko nije, dolazi do njene smrti putem apoptotičkih mehanizama (Elmore, 2007; Jamil i sar., 2015). Budući da osim faktora transkripcije p53 postoje i drugi markeri uključeni u zaustavljanje ćelijskog ciklusa ili apoptoze, njihovim praćenjem može se odrediti citotoksični i genotoksični efekat različitih agenasa.

Metoda za ispitivanje uticaja agenasa na ćelijski ciklus se bazira na primeni protočne citometrije i zasniva se na diskriminaciji ćelija na osnovu više parametara koji uključuju tip ćelije, veličinu, granularnost i prisustvo specifičnih, fluorescentno obeleženih biomarkera (Macey & Macey, 2007).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ove doktorske teze je da se ispita biološka aktivnost 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona – TBQ i njegovih sintetisanih alkiltio i ariltio derivata: 2-*terc*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinon (**2**), 2-*terc*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinon (**3**), 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinon (**4**), 2-*terc*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinon (**5**) i 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinon (**6**) i utvrdi da li derivati poseduju jaču biološku aktivnost, a slabiju toksičnost u odnosu na polazno jedinjenje TBQ.

Da bi se postigao navedeni naučni cilj, definisani su sledeći specifični ciljevi disertacije:

1. Sinteza alkiltio i ariltio derivata TBQ.
2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata DPPH testom.
3. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata NBT testom.
4. Ispitivanje antineurodegenerativne aktivnosti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata.
5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata prema izabranim gram-pozitivnim (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) i gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442).
6. Ispitivanje uticaja TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na adheziju i invaziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 soja (ATCC 15693) pri infekciji ćelija MRC-5 linije.
7. Ispitivanje toksičnosti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na model organizmu *Artemia salina*.
8. Ispitivanje citotoksične aktivnosti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na humanim tumorskim ćelijskim linijama (A549, Hs 294T, HepG2, HCT 116) i zdravoj (MRC-5) ćelijskoj liniji.
9. Ispitivanje uticaja TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na migratorni potencijal ćelija MRC-5 i A549 linija *in vitro*.
10. Ispitivanje interakcija TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata sa molekulom DNK na acelularnom model sistemu, plazmidnoj DNK pUC19 plazmida *E. coli*.
11. Ispitivanje genotoksičnog efekta TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na prokariotskom model sistemu SOS/*umuC* testom na *Salmonella typhimurium* TA1535 pSK1002 soju.
12. Ispitivanje genotoksičnog efekta TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na eukariotskim model sistemima na zdravoj (MRC-5) i tumorskoj (HepG2) ćelijskoj liniji.
13. Ispitivanje uticaja TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na stvaranje DSBs na ćelijama HepG2 linije testom detekcije histonskog proteina γ H2AX.
14. Ispitivanje uticaja TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivate na ćelijski ciklus primenom protočne citometrije na ćelijama linije HepG2.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Biološki materijal

Za analizu (detekciju) antimikrobnog efekta korišćena su četiri soja gram-pozitivnih bakterija: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633; i tri soja gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. U ispitivanju invazivnog efekta korišćen je soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ATCC 15693.

Ispitivanje genotoksičnog efekta na plazmidnu DNK rađeno je na pUC19 - plazmidu poreklom iz bakterije *E. coli*.

Test toksičnosti je rađen na model organizmu *Artemia salina* (Artemia eggs, Dajana, Češka Republika).

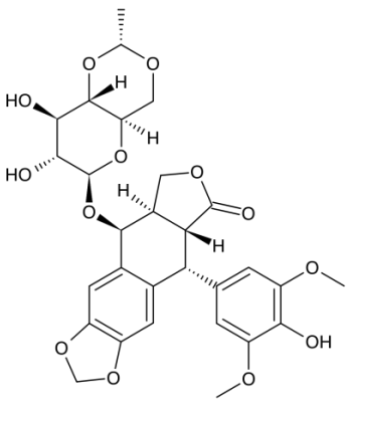
Za ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog efekta korišćene su humane ćelijske linije: MRC-5 zdrava ćelijska linija fibroblasta pluća fetusa (ECACC No. 84101801), HepG2 - ćelijska linija humanog karcinoma jetre (dobijena od B. Žegura sa Nacionalnog instituta za biologiju, Ljubljana, Slovenija), A549 - ćelijska linija adenokarcinoma pluća (ATCC CCL-185), Hs 294T - ćelijska linija melanoma (ATCC HTB-140) i HCT 116 - ćelijska linija humanog raka debelog creva.

3.1.2. Citostatici

Etopozid

Etopozid je hemioterapeutik koji se koristi u lečenju velikog broja tipova malignih bolesti. Strukturna formula, empirijska formula i molekulska masa prikazane su u **Tabeli 2**.

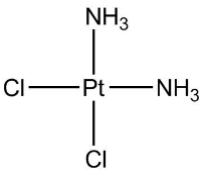
Tabela 2. Molekulska masa, strukturna i empirijska formula hemioterapeutika etopozida.

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃
Molekulska masa	588.557 g/mol

Cisplatina

Cisplatina je hemioterapeutik koji se koristi za lečenje raka testisa, jajnika, bešike i drugih tipova malignih bolesti. Strukturna formula, empirijska formula i molekulska masa prikazane su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Molekulska masa, strukturna i empirijska formula hemioterapeutika cisplatine.

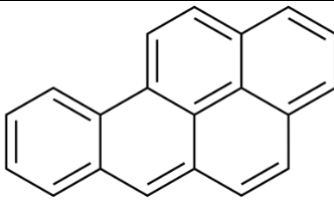
Strukturna formula	
Empirijska formula	H ₆ Cl ₂ N ₂ Pt
Molekulska masa	301,1 g/mol

3.1.3. Model mutagen

Benzo[*a*]piren

Benzo[*a*]piren je policiklični aromatični ugljovodonič (PAH) koji nastaje kao produkt nepotpunog sagorevanja fosilnih goriva što ga čini široko prisutnim u mnogim ekosistemima. Metabolički produkti benzo[*a*]pirena su visoko kancerogeni zbog čega ga je Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer – IARC) uvrstila u prvu grupu kancerogena (Baan i sar., 2019). Strukturna formula, empirijska formula i molekulska masa benzo[*a*]pirena prikazane su u **Tabeli 4.**

Tabela 4. Molekulska masa, strukturna i empirijska formula hemioterapeutika benzo[*a*]pirena.

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₂₀ H ₁₂
Molekulska masa	252,31 g/mol

3.1.4. Antibiotici

Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Austrija) – suva praškasta supstanca je rastvorena u destilovanoj vodi u koncentraciji od 20 mg/mL od čega je napravljen finalni stok od 1 mg/mL u MHB medijumu.

Rifampicin (PAA Laboratories GmbH, Austrija) – suva praškasta supstanca je rastvorena u destilovanoj vodi u koncentraciji od 100 mg/mL od čega je napravljen finalni stok od 10 mg/mL u BHI medijumu.

Gentamicin (PAA Laboratories GmbH, Austrija) – korišćen je finalni stok od 300 µg/ml gentamicina.

3.1.5. Ostali lekovi

Galantamin (Sigma Chemicals Co., SAD) – korišćen je finalni stok od 200 µM.

3.1.6. Rastvori i hemikalije

Rastvor za lizu ćelija – pH 10

NaCl146,6 g

Na-EDTA	37,2 g
Tris	1,21 g
Destilovana voda	1000 mL

Nakon što su supstance rastvorene u destilovanoj vodi, pH rastvora je podešen na 10, a neposredno pre izvođenja eksperimenta dodat je 1% Triton X-100 i rastvor je dobro promešan.

Rastvor za denaturaciju i elektroforezu – pH 13

10 M NaOH	30 mL
0,2 M Na-EDTA	5 mL
Dodato dH ₂ O do 1000mL rastvora	

10 M NaOH

NaOH	200 g
Dodato dH ₂ O do 500 mL rastvora	

0,2 M Na-EDTA

Na-EDTA	37,2 g
Dodato dH ₂ O do 500 mL rastvora	

0,5 M Na-EDTA – pH 8

Na-EDTA	93,06 g
Dodato dH ₂ O do 500 mL rastvora	

Rastvor za neutralizaciju – pH 7,5

Tris	48,44 g
Dodato dH ₂ O do 1000 mL rastvora	

1% NMP agaroz za prvi sloj

NMP	1 g
Dodato dH ₂ O do 100 mL rastvora	

1% NMP agaroz za drugi sloj

NMP	1 g
Dodato 1 x PBS do 100 mL rastvora	

1% LMP agaroz

LMP	1 g
Dodato 1 x PBS do 100 mL rastvora	

Puferisani fiziološki rastvor

1 x DPBS, gotov rastvor (Dulbekov fiziološki rastvor puferovan sa fosfatom)

Sastav:

KCl	200 mg/L
KH ₂ PO ₄	200 mg/L
NaCl	8000 mg/L
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	2160 mg/L

Tripsin

Tripsin	0,1 g
Na-EDTA	0,01 g

NaCl	0,8 g
Glukozaaminohidrat	0,1 g
NaHCO ₃	0,084 g
Destilovana voda	100 mL

Akridin-oranž za komet test – korišćen je finalni stok od 2µg/mL

B-pufer

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,18 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,5 g
KCl	0,75 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25 g
Bidestilovana voda do 100 mL rastvora	

Fosfatni pufer – pH 7

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,086 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,538 g
Dodato bidestilovane vode do 100 mL rastvora	

Reagens za prekidanje reakcije (1M Na₂CO₃)

Na ₂ CO ₃	105,99 g
Dodato bidestilovane vode do 1000 mL rastvora	

ONPG (2-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid)

ONPG	45 mg
Fosfatni pufer do 10 mL	

Rastvor I (za izolovanje plazmida)

1 M Tris pufer (pH 7,5)	1 mL
0,5 M Na-EDTA (pH 8,0)	200 µL
RNK-aza (50 mg/mL)	80 µL
Destilovana voda	8,8 mL

Rastvor II (za izolovanje plazmida)

1 M NaOH	2 mL
10% SDS	1,17 mL
Destilovana voda	6,83 mL

Rastvor III (za izolovanje plazmida)

Natrijum-acetat	2,9 g
Glacijalna kiselina	1,15 mL
Destilovana voda	8,85 mL

TE pufer (Tris-EDTA puferski rastvor)

Tris – HCl	10 mM
0,5 M Na-EDTA	1 mM
Podešena pH vrednost na 8,0	

1% agaroz (za elektroforezu plazmidne DNK)

Agaroz	0,5 g
TBE pufer	50 mL

0,5 × TBE pufer (engl. Tris-Borate-EDTA)

Trizma baza	54 g
Borna kiselina	27,5 g
0,5 M Na-EDTA (pH 8,0)	20 mL
Destilovana voda	1000 mL

Bromfenol plavo

Glicerol	3 mL
Bromfenol plavo	25 mg
Ksilen cijanol	25 mg
Destilovana voda	7 mL

DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina), (0,01 M):

DTNB	7,92 mg
NaHCO ₃	3 mg
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7)	2 mL

Acetilholin-jodid AChI (0,075 M):

AChI	21,67 mg
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7)	1 mL

Acetilholinesteraza (5 U/mL):

Acetilholinesteraza	1 mg
Tris-HCl pufer (20 mM, pH 7,5)	11,765 mL

Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 6,8, sa 6 mM NaCl):

NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	1,123 g
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	1,002 g
NaCl	35,01 mg
Destilovana voda	do 100 mL

Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7):

NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	0,965 g
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	1,365 g
Destilovana voda	do 100 mL

Kalijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 6,8):

K ₂ HPO ₄	0,865 g
KH ₂ PO ₄	0,685 g
Destilovana voda	do 100 mL

Tris-HCl (20 mM, pH 7,5):

Trizma baza	0,24 g
Destilovana voda	do 100 mL

pH je podešena uz pomoć 10 M HCl.

SDS-HCL rastvor

SDS	10%
1 M HCl	0,1%

0,01 M MgSO₄

1 M MgSO ₄	100 µL
-----------------------------	--------

Destilovana voda (sterilna) 10 mL

3.1.7. Hranljive podloge

MHB – Mueller-Hinton Broth

MHB 21 g
Destilovana voda 1000 mL

MHA – Mueller-Hinton agar

MHB 21 g
Agar 15 g
Destilovana voda 1000 mL
Zagrejano do potpunog rastvaranja i potom autoklavirano na 121°C, 15 minuta.

BHI – Brain-Heart infusion

BHI 37 g
Destilovana voda 1000 mL
Zagrejano do potpunog rastvaranja i potom autoklavirano na 121°C, 15 minuta.

BHA – Brain-Heart agar

BHA 50 g
Destilovana voda 1000 mL
Autoklavirano na 121°C, 15 minuta.

LB – Luria Bertani Broth:

Tripton 10 g
Ekstrakt kvasca 5 g
NaCl 5 g
Destilovana voda 1000 mL
Autoklavirano na 121°C, 15 minuta.

LA – Luria Bertani Agar:

Agar 15 g
Tripton 10 g
Ekstrakt kvasca 5 g
NaCl 5 g
Destilovana voda 1000 mL
Autoklavirano na 121°C, 15 minuta.

1xTGA medijum (Tripton-glukoza-ampicilin medijum)

Tripton 10 g
NaCl 5 g
Hepes 1,63 g
Glukoza-6-fosfat 2 g

Tripton, NaCl i HEPES su rastvoreni u 980 mL destilovane vode, pH je podešen na 7,0±0,2 i rastvor je autoklaviran na 121°C, 15 minuta. Glukoza-6-fosfat je rastvorena u 20 mL destilovane vode, autoklavirana pod istim uslovima i dodata u 1xTGA. Nakon što je rastvor ohlađen, dodato je 50 mg ampicilina.

Medijum za gajenje MRC-5 ćelija

Fetal bovine serum	10%
L-glutamine	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/mL
Dulbeccos modified Eagles medium – DMEM	do 1000 mL

Medijum za gajenje HepG2 ćelija

Fetal bovine serum	15%
L-glutamine	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/mL
Dulbeccos modified Eagles medium – DMEM	do 1000 mL

DMSO (dimetil-sulfoksid), **DPPH** (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), **FBS**, **askorbinska kiselina**, **Triton X-100**, **etopozid**, **benzo[a]piren**, **4NQO** (4-nitrohinolin-N-oksidi), **NMP** (agarozna normalna tačka topljenja), **LMP** (agarozna niska tačka topljenja), **tripton**, **Hepes**, **ekstrakt kvasca**, **Na-EDTA** (dinatrijumova so etilendiamintetrasirćetne kiseline), **DTNB**, **NaCl**, **NaOH**, **Na₂CO₃**, **MgCl₂**, **NaHCO₃**, **Na₂HPO₄ x 2H₂O**, **NaH₂PO₄ x H₂O**, **KCl**, **MgSO₄ x 7H₂O**, **L-glutamin**, **Tris**, **glukoza-6-fosfat**, **bromfenol plavo**, **ksilen cijanol**, **glicerol**, **glukozaaminohidrat**, **RNK-aza**, **Penicillin/Streptomycin** i **MTS reagens** nabavljeni su od Merck group (SAD). **PBS**, **MHA**, **MHB**, **BHA**, **BHI** i **DMEM** su nabavljeni od PAA Laboratories GmbH, Austrija. **1 x DPBS** i **tripsin** su nabavljeni od Gibco[®] Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, SAD. **ONPG** je nabavljen od Germany Boehringer Mannheim GmbH, Nemačka. **NBT reagens** (engl. Nitro Blue Tetrazolium) i **SDS** su nabavljeni od Serva Electrophoresis GmbH, Nemačka, dok je **MTT reagens** nabavljen od Elabscience Biotechnology Inc. **Williams Media E** je nabavljen od Thermo Fisher Scientific, SAD. **HCl** i **ampicilin** su nabavljeni od Farmanea Galenska Laboratorija, Srbija. **Hoechst 33258** boja je nabavljena od kompanije Invitrogen (Waltham, SAD). **Anti-H2AX pS139 (130-107-586)** i **REA Control (I)-APC (131-104-615)** antitela su nabavljeni od kompanije Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Nemačka).

3.2. Metode

3.2.1. Sinteza alkiltio i ariltio derivata TBQ

Sinteza alkiltio i ariltio derivata rađena je na Hemijskom fakultetu u saradnji sa Centrom za hemiju na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu (Đorđević i sar., 2022). Svi korišćeni reagensi su bili komercijalni proizvodi kupljeni od Merck group, osim srebro(I)-oksida koji je sintetisan. Hromatografija na koloni je rađena na silika gelu (0,063-0,200 mm, Merck). Analitička tankoslojna hromatografija (TLC) je izvedena na aluminijumskim pločama obloženim silika gelom (silika gel 60 F₂₅₄, Merck). ¹H i ¹³C NMR spektri su snimljeni na 500 MHz (Bruker Avance III) u deuterisanom hloroformu (CD₃Cl). Hemijski pomaci su predstavljeni u delovima na milion (ppm), u odnosu na tetrametilsilan. Konstante kuplovanja su iskazane u hercima (Hz). EI MS spektri su snimljeni na Agilent 7890A – 5975 inertnom KSL EI CI.

Alkiltio i ariltio derivati 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona sintetisani su nukleofilnom adicijom odgovarajućih tiola na hinon (Đorđević i sar., 2022). Komercijalno dostupan 2-*terc*-butil-1,4-benzohidrohionon je oksidovan korišćenjem srebro(I)-oksida u odgovarajući 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon. Optimalni reakcioni uslovi za sintezu alkiltio derivata (2-*terc*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinon, 2-*terc*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinon, 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinon) su: ekvimolarna količina reaktanata, blago alkalna sredina, u atmosferi argona, temperatura od 60°C i 30 min vreme reakcije. Ariltio derivati (2-*terc*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinon i 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinon) sintetisani su u neutralnoj sredini u atmosferi vazduha, dok su temperatura i vreme trajanja reakcija bili isti.

3.2.1.1. Sinteza 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ)

2-*terc*-butil-1,4-benzohidrohionon (2,13 g) rastvoren je u 150 mL dietil-etra u balonu od 250 mL. Nakon rastvaranja, u reakcionu smešu je postepeno dodato 3,70 g srebro(I)-oksida uz stalno mešanje tokom 3,5h na sobnoj temperaturi, nakon čega je mešanje prekinuto a u reakcionu smešu je dodat anhidrovani natrijum-sulfat i smeša je ostavljena da se suši preko noći. Oksidacija je praćena tankoslojnom hromatografijom u sistemu toluen:etil-acetat (9:1). Posle 12h, smeša je filtrirana kroz sloj celita i rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni su žuti kristali (t.t. 56-58°C) 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona. Prinos reakcije je 2,05 g (98%).

3.2.1.2. Sinteza 2-*terc*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinona (2)

2-*terc*-butil-1,4-benzohinon (312 mg) je rastvoren u 40 mL EtOH/zasićen rastvor NaHCO₃ (1:1). U rastvor je potom dodato 498 mg (600 mL) 2-propantiola. Reakcija je rađena u atmosferi argona, uz stalno mešanje na 60°C u trajanju od 30 minuta. Vodeno-etanolni rastvor je neutralisan sa 5% HCl, ekstrahovan toluenom i osušen preko anhidrovanog Na₂SO₄. Toluene je uparen, a sirovi crveni proizvod (444 mg) je stavljen na kolonu formiranu od 22 g silika gela (0,063–0,200 mm). Posle eluiranja toluenom, dobijeno je nekoliko frakcija, a glavna frakcija (136 mg) je rehromatografisana na koloni od 7 g silika gela. Dobijena frakcija (87 mg) je prečišćena preparativnom tankoslojnom hromatografijom (silika gel 60 GF₂₅₄) gde je kao eluent korišćen toluen. Dobijen je uljasti proizvod žute boje u količini od 43 mg (19%).

Struktura dobijenog proizvoda potvrđena je metodama:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ / ppm): 6,62 (1H, s); 6,32 (1H, s); 3,26 (1H, septet, J = 6,5 Hz); 1,37 (6H, d, J = 6,5 Hz); 1,26 (9H, s).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ / ppm): 186,67 (C1); 185,92 (C4); 158,34 (C2); 151,73 (C5); 132,79 (C6); 129,01 (C3); 36,93 (C7); 35,78 (C11); 30,76 (C8, C9, C10); 23,70 (C12, C13).

UV/Vis, λ_{max} / nm (ε / dm² mol⁻¹): 252 (1,5×10⁴), 290 (1,9×10⁴), 420 (1,5×10³).

EI MS, m/z (obilnost, %): 238,2 (M^+ , 100); 223,1 (100); 196,1 (80); 181,1 (50); 154,1 (55); 85,0 (70); 41,1 (55).

3.2.1.3. *Sinteza 2-terc-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinona (3)*

2-terc-butil-1,4-benzohinon (271 mg) je rastvoren u 40 mL EtOH/zasićen rastvor NaHCO_3 (1:1) nakon čega je u rastvor dodato 368 mg (584 mL) 1-propantiola. Reakcioni uslovi su bili isti kao u reakciji sa 2-propantiolom (stalno mešanje, zagrevanje na 60°C , atmosfera argona). Sirovi crveni proizvod (432 mg) je stavljen na kolonu pripremljenu od 22 g silika gela (0,063–0,200 mm) i eluiran toluenom. Dobijeno je više frakcija, a odabrana frakcija (133 mg) je prečišćena preparativnom tankoslojnom hromatografijom (silika gel 60 GF₂₅₄) gde je kao eluent korišćen toluen. Dobijeno je uljasto jedinjenje narandžaste boje u količini od 63 mg (32%).

Struktura dobijenog proizvoda potvrđena je metodama:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ / ppm): 6,61 (1H, s); 6,27 (1H, s); 2,73 (2H, t, $J = 4$ Hz); 1,76 (2H, sextet, $J = 6,5$ Hz); 1,28 (9H, s); 1,07 (3H, t, $J = 4$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , δ / ppm): 186,51 (C1); 185,71 (C4); 158,49 (C2); 152,47 (C5); 132,59 (C6); 128,28 (C3); 36,87 (C7); 33,64 (C11); 30,61 (C8, C9, C10); 22,18 (C12); 15,09 (C13).

UV/Vis, λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$): 250 ($1,8 \times 10^4$), 292 ($1,4 \times 10^4$), 440 ($1,4 \times 10^3$).

EI MS, m/z (obilnost, %): 238,2 (M^+ , 100); 223,1 (100); 196,1 (80); 181,1 (50); 154,1 (55); 85,0 (70); 41,1 (55).

3.2.1.4. *Sinteza 2-terc-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinona (4)*

2-terc-butil-1,4-benzohinon (303 mg) je rastvoren u 40 mL EtOH/zasićen vodeni rastvor NaHCO_3 (1:1) nakon čega je u dobijeni rastvor dodato 92 mg (82 mL) etilenditiola. Reakcija je izvedena u atmosferi argona, uz stalno mešanje na 60°C i trajala je oko 50 minuta. Dobijeno je 412 mg sirovog proizvoda koji je nanet na kolonu od 20 g silika gela (0,063–0,200 mm) i eluiran mešavinom petroletar ($30\text{--}50^\circ\text{C}$)-benzol (3:1), a hromatografija je praćena tankoslojnom hromatografijom. Dobijena je uljasta supstanca ljubičaste boje u količini od 39 mg (17%).

Struktura dobijenog proizvoda potvrđena je metodama:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ / ppm): 6,57 (1H, s); 3,23 (4H, dd, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 10$ Hz); 1,28 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , δ / ppm): 181,44 (C1); 180,57 (C4); 156,17 (C2); 139,61 (C6); 136,54 (C5); 131,41 (C3); 35,45 (C7); 29,11 (C8, C9, C10); 27,06 (C12); 26,34 (C11).

UV/Vis, λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$): 230 ($8,9 \times 10^4$), 275 ($4,1 \times 10^4$), 535 ($1,3 \times 10^3$).

EI MS, m/z (obilnost, %): 254,1 (M^+ , 100); 239,1 (30); 210,9 (40); 193,0 (25); 183,0 (20); 88,0 (15); 67,1 (15); 41,1 (20).

3.2.1.5. *Sinteza 2-terc-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinona (5) i 2-terc-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinona (6)*

2-terc-butil-1,4-benzohinon (313 mg) i 55 mg (51 mL) tiofenola su pomešani u 96% etanolu, smeša je refluktovana na 60°C uz konstantno mešanje u atmosferi vazduha tokom 30 minuta. Tamnocrveni sirovi proizvod (466 mg) je nanet na kolonu od 24 g silika gela (0,063–0,200 mm), eluiran toluenom, a tok hromatografije je praćen pomoću TLC. Dobijena su dva proizvoda: 2-terc-

butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinon (5) u količini od 29 mg (11%) i 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinon (6) u količini od 51 mg (19%).

Strukture dobijenih proizvoda potvrđene su metodama:

2-*terc*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinon (5)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ / ppm): 7,48 (5H, *m*); 6,49 (1H, *s*); 5,82 (1H, *s*); 1,31 (9H, *s*).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ / ppm): 186,96 (C1); 185,71 (C4); 157,80 (C6); 156,99 (C2); 137,23 (C5); 134,00 (C3); 132,01 (C11); 131,86 (C12, C16); 129,27 (C13, C15); 126,62 (C14); 36,88 (C7); 30,58 (C8, C9, C10).

UV/Vis, λ_{\max} / nm (ϵ / dm² mol⁻¹): 253 (2,1×10⁴), 290 (1,4×10⁴), 443 (5,8×10³).

EI MS, *m/z* (obilnost, %): 272,1 (M⁺, 100); 257,1 (20); 229,1 (30); 188,1 (20); 134,1 (20); 109,1 (20); 95,1 (20); 67,1 (20).

2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinon (6)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ / ppm): 7,47 (5H, *m*); 6,48 (1H, *d*, *J* = 5 Hz); 5,80 (1H, *d*, *J* = 5 Hz); 1,30 (9H, *s*).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ / ppm): 186,74 (C1); 185,45 (C4); 157,69 (C6); 156,99 (C2); 137,16 (C5); 133,85 (C3); 132,38 (C11); 131,79 (C12, C16); 129,18 (C13, C15); 126,57 (C14); 36,87 (C7); 30,36 (C8, C9, C10).

UV/Vis, λ_{\max} / nm (ϵ / dm² mol⁻¹): 250 (6,1×10³), 298 (4,9×10³), 440 (1,5×10³).

EI MS, *m/z* (obilnost, %): 272,1 (M⁺, 100); 257,1 (20); 229,1 (30); 188,1 (20); 134,1 (20); 109,1 (20); 95,1 (20); 67,1 (20).

3.2.2. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH testa

Procena antioksidativnog potencijala rađena je primenom kolorimetrijskog 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) testa koji meri potencijal za uklanjanje radikala odabranih jedinjenja. Eksperiment je rađen prema protokolu koji je razvio Blois (1958) u mikrotitarskim pločama od 96 bunara u triplikatu. Rađena su tri nezavisna eksperimenta. Ukupno 180 μ L sveže pripremljenog metanolnog rastvora DPPH (koncentracija od 40 mg/mL) je dodato u svaki bunar mikrotitarskih ploča, a zatim još po 20 μ L TBQ i njegovih derivata u odgovarajućim koncentracijama. Testirano je po 7 koncentracija za svako test jedinjenje u trostrukom gradijentu sa najvišom koncentracijom od 1 mM. Osim test jedinjenja, testiran je i rastvarač 5% DMSO kao i pozitivna kontrola AsAc (askorbinska kiselina) u istim koncentracijama kao i test jedinjenja.

Nakon dodavanja TBQ i derivata, ploče su inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega je apsorbancija očitana na talasnoj dužini od 517 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (Multiskan Ski Thermo Scientific, Finska). Od očitanih vrednosti su oduzete očitane vrednosti za slepe probe za svako testirano jedinjenje ponaosob zbog neutralisanja obojenosti samih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata određena je inhibicija DPPH radikala u prisustvu testiranih jedinjenja preko formule:

$$\text{Inhibicija DPPH radikala (\%)} = \frac{A_0 - A_u}{A_0} * 100\%$$

gde je A_0 - apsorbancija DPPH, a A_u - apsorbancija uzorka.

Preko dobijenih vrednosti a u zavisnosti od primenjene koncentracije test jedinjenja, konstruisane su linearne krive iz koje je izračunata IC_{50} vrednost, odnosno vrednost koja dovodi do „hvatanja“ 50% DPPH radikala. Statistički značajne razlike između ispitivanih jedinjenja utvrđene su T testom (engl. One sample T-test) u programu IBM SPSS ($p < 0,05$).

3.2.3. Određivanje uticaja na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (NBT test)

Koncentracija superoksidnog anjon-radikala ($O_2^{\cdot-}$) u ćelijama je određena NBT testom prema protokolu Auclair & Voisin (1985). Ćelijska HCT 116 linija je gajena u T75 flaskovima do formiranja monosloja nakon čega su ćelije tripsinizovane i gajene u mikrotitarskim pločama od 96 bunara (10^4 ćelija po bunaru). Nakon formiranja monosloja, DMEM medijum je zamenjen medijumom sa odgovarajućom koncentracijom test jedinjenja (TBQ i derivati - 100 μ M, DMSO - 0,5%) i ćelije su inkubirane 24h na 37°C i 5% CO_2 . Nakon ovog perioda, medijum je pažljivo uklonjen, u svaki bunar je dodato po 10 μ L NBT reagensa (5 mg/mL), a ploče su inkubirane još 3h na 37°C i 5% CO_2 . Radi kvantifikacije produkcije formazana, u svaki bunar je dodato po 100 μ L SDS-HCL rastvora, ploče su inkubirane 24h u mraku nakon čega je apsorbancija izmerena na talasnoj dužini od 540 nm na čitaču mikrotitarskih ploča LKB 5060-006 (LKB Instruments, Austrija). Za svako jedinjenje oduzete su odgovarajuće vrednosti slepih proba (tretman bez ćelija) budući da sama boja jedinjenja može uticati na dobijene rezultate.

Rezultati su predstavljeni preko NBT indeksa koji je računat kao odnos apsorbancija tretiranih i netretiranih uzoraka na 100% vijabilnih ćelija preko formule:

$$NBT \text{ indeks} = \frac{A_u}{A_0} * \frac{100}{V}$$

gde su A_0 - apsorbancija negativne kontrole, A_u - apsorbancija uzorka, a V – vijabilnost ćelija u procentima izračunata MTT testom.

Statistički značajne razlike između TBQ i derivata utvrđene su T-testom u programu IBM SPSS ($p < 0,05$).

3.2.4. Ispitivanje antineurodegenerativne aktivnosti testom inhibicije enzima AchE

Antineurodegenerativna aktivnost TBQ i njegovih derivata je određena kolorimetrijskim testom za merenje inhibicije aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AchE) na osnovu protokola Ellman i sar. (1961), sa određenim modifikacijama. Test je rađen u mikrotitarskim pločama od 96 bunara u tri ponavljanja i tri nezavisna eksperimenta.

U svaki bunar je dodato po: 140 μ L 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera (pH 7), 20 μ L rastvora DTNB, 20 μ L test jedinjenja u natrijum-fosfatnom puferu koji sadrži 5% DMSO i 20 μ L rastvora AchE (5 U/mL) u 20mM Tris-HCl puferu (pH 7,5). Testirane koncentracije TBQ i derivata bile su: C1 = 200, C2 = 66,7, C3 = 22,2 i C4=7,4 μ M. Osim jedinjenja, testirani su i negativna kontrola (destilovana voda), pozitivna kontrola (galantamin - GA) kao i slepe probe za svako testirano jedinjenje posebno (smeša bez enzima), budući da bi obojenost jedinjenja znatno uticala na rezultate. Ploče su inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega je za iniciranje reakcije u svaki bunar dodato po 10 μ L acetilholin-jodida.

Apsorbancija je očitavana na talasnoj dužini od 412 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (Tecan Sunrise SN, Švajcarska), a kao i za prethodne eksperimente, oduzete su vrednosti slepih proba. Procenat inhibicije AchE (%) je izračunat na osnovu formule (Adewusi i sar., 2011)

$$\text{Inhibicija AchE (\%)} = (1 - (Au - Ak)) \times 100$$

gde je Au – apsorbancija uzorka, a Ak – apsorbancija negativne kontrole.

Na osnovu dobijenih vrednosti, konstruisane su linearne krive zavisnosti koncentracije jedinjenja i procenta inhibicije AchE na osnovu kojih je određena IC_{50} vrednost, odnosno koncentracija koja dovodi do inhibicije 50% enzima AchE. Statistički značajne razlike između TBQ i derivata utvrđene su T testom u programu IBM SPSS ($p < 0,05$).

Pirson korelacije su urađene u programu Microsoft Excel. Prema Taylor (1990) za vrednosti $r < 0,35$ korelacija se definiše kao slaba, za vrednosti r između 0,36 i 0,67 kao umerena, a za vrednosti $r > 0,68$ korelacija se definiše kao jaka.

3.2.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

3.2.5.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti difuzionom metodom

„Agar well diffusion“ test korišćen je za ispitivanje antimikrobne aktivnosti derivata difuzionom metodom u bunaru na četiri gram-pozitivne bakterije (*E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus* i *B. subtilis*) i tri gram-negativne bakterije (*E. coli*, *S. typhimurium* i *P. aeruginosa*). Na LA podloge, na označenim mestima u Petri šoljama, sterilnom pincetom su postavljene modle za formiranje bunarića. U 7 mL LA soft medijuma zasejane su bakterijske kulture ($CFU/mL = 10^6$) prethodno gajene u MHB medijumu (BHI za *E. faecalis* i *L. innocua*), promešane na vorteksu i dodate na LA podloge sa odgovarajućim bunarićima. Nakon što se LA agar stegao, sterilnom pincetom su pažljivo izvađene modle za bunariće i u odgovarajuće novoformirane bunariće je dodato po 10 μ L test jedinjenja (10 mM), nakon čega su Petri šolje inkubirane na 37°C 24h. Nakon inkubacije, meren je prečnik zone inhibicije rasta (mm), odnosno, prečnik površine oko test jedinjenja na kome nije došlo do rasta bakterija.

3.2.5.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti dilucionom metodom

Iste gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (*E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* i *P. aeruginosa*) su korišćene za određivanje antimikrobne aktivnosti TBQ i njegovih alkilto i ariltio derivata mikrodilucionim testom. Test je rađen u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara u duplikatu i u tri nezavisna eksperimenta. Kao indikator bakterijskog rasta korišćen je resazurin. Ispitivana je serija dvostrukih razblaženja test jedinjenja u opsegu od 1 mM do 7,81 μ M. Kao pozitivne kontrole korišćeni su rifampicin do 30 μ M ili streptomycin do 43 μ M, u zavisnosti od bakterijskog soja. Kao kontrola rastvarača testiran je 5% DMSO. Na dan eksperimenta, prekoćna bakterijska kultura, gajena u MHB (BHI za *E. faecalis* i *L. innocua*) medijumu, razblažena je 50x i gajena do eksponencijalne faze rasta uz aeraciju na 180 rpm.

U prvi red bunara dodato je 90 μ L medijuma MHB (BHI za *E. faecalis* i *L. innocua*) i 10 μ L test jedinjenja koncentracije od 20 mM. U sve ostale redove mikrotitarskih ploča dodato je po 50 μ L odgovarajućeg medijuma u zavisnosti od ispitivanog bakterijskog soja. Napravljena su serijska razblaženja prenošenjem 50 μ L medijuma iz prvog reda mikrotitarskih ploča u drugi, iz drugog u treći itd. U sve bunare je potom dodato još po 40 μ L medijuma, 10 μ L bakterijske suspenzije razblažene odgovarajućim medijumom do $CFU/mL = 10^5$ (kako bi finalna koncentracija bakterija po bunaru iznosila $CFU/mL = 10^4$). Ploče su zatim inkubirane 24h na 37°C. Nakon inkubacije, u sve bunare dodato je po 11 μ L resazurina finalne koncentracije od 0,675 mg/mL i ploče su dodatno inkubirane 3h. Najmanja koncentracija na kojoj nije došlo do promene boje resazurina određena je

kao MIK (minimalna inhibitorna koncentracija, bakteriostatički efekat). Na osnovu dobijenih MIK vrednosti, antimikrobni efekat je kategorisan kao jak (0-100 μM), umeren (100-500 μM) i slab (500–1000 μM) (Crevelin i sar., 2015). Nakon što je određen MIK, sadržaj iz bunara je sterilnom ezom prenet na Petri šolje sa čvrstom mikrobiološkom podlogom MHA (BHA za *E. faecalis* i *L. innocua*) i Petri šolje su inkubirane 24h na 37°C. Nakon inkubacije, najniža koncentracija na kojoj nije došlo do rasta mikroorganizama (bakterija) određena je kao MBK (minimalna baktericidna koncentracija, baktericidni efekat)

3.2.5.3. Ispitivanje uticaja na adheziju i invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije

Bakterijski soj *P. aeruginosa* PAO1 je gajen do eksponencijalne faze rasta ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) tokom 16h na 37°C u MHB. MRC-5 ćelijska linija gajena je u T75 flaskovima na 37°C u prisustvu 5% CO₂ u DMEM kompletnom hranljivom medijumu (dodat 10% (v/v) FBS i antibiotici), nakon čega su ćelije tripsinizovane. U mikrotitarske ploče od 12 bunara je zasejano po 1 mL 10⁵ ćelija/mL dobijenih ćelija i ploče su inkubirane 48 sati do formiranja konfluentnog monosloja. Ćelije su zatim pažljivo isprane termostataranim PBS-om na 37°C i u svaki bunar dodato je po 1 mL svežeg DMEM medijuma (sa dodatkom 10% FBS bez antibiotika) sa test jedinjenjima u koncentracijama od: C1 = 100 μM , C2 = 33 μM i C3 = 11 μM . U bunare je zatim dodato 5 puta više bakterija (5:1) u odnosu na broj ćelija kako bi se postigla višestrukost infekcije (OD₆₀₀ = 0,5 sadrži $1,5 \times 10^9$ CFU; 90% konfluentnog monosloja na 25 cm² sadrži oko $2,5 \times 10^6$ ćelija/mL). Ploče su inkubirane 3h na 37°C u prisustvu 5% CO₂. Nakon inkubacije, medijum je uklonjen i ćelije su isprane 3 puta toplim (37°C) PBS-om. Nakon ovog koraka, eksperiment adhezije (A) i invazije (B) je rađen nezavisno.

- (A) Da bi se bakterije koje su adherirale na ćelije odvojile i ćelije lizirale, dodato je po 100 μL 1% Triton X-100 u svaki bunar i ploče su inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u sve bunare dodato je još po 900 μL LB medijuma. Sadržaj u bunarima je homogenizovan pomoću automatske pipete. Da bi se utvrdio broj adheriranih bakterija, sadržaj iz bunara je razblažen 10, 100, 1 000 i 10 000 puta sa 0,01 M MgSO₄. Na čvrste LA podloge je zasejano po 10 μL nerazblaženog i razblaženih uzoraka a podloge su inkubirane preko noći na 37°C.
- (B) Ispitivanje invazije *P. aeruginosa* PAO1 na MRC-5 ćelijsku liniju nastavljeno je ispiranjem adherentnih ćelija DMEM medijumom sa 300 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina i ploče su inkubirane 1h na 37°C. Posle inkubacije, ćelije su dodatno isprane tri puta PBS-om kako bi se uklonile bakterije. U sve bunare u mikrotitarskim pločama dodato je po 100 μL 1% Triton X-100, a ploče su inkubirane 10 min. Nakon inkubacije, u sve bunare, dodato je po 900 μL LB medijuma i sadržaj bunara je homogenizovan. Broj bakterija koje su izvršile invaziju na MRC-5 ćelije utvrđen je serijskim razblaženjima pomoću 0,01 M MgSO₄ kao i u eksperimentu gde je ispitivana adhezija (A), nakon čega je po 100 μL nerazblaženog i razblaženih uzoraka zasejano na čvrste LA podloge i inkubirano preko noći na 37°C.

Nakon inkubacije, na čvrstim LA podlogama izbrojan je broj kolonija i izračunat je broj bakterija po mililitru (CFU/mL) za oba eksperimenta (A i B) pomoću formule:

$$\text{CFU/mL} = \frac{n}{r \cdot V}$$

gde su: n – broj kolonija, r – razblaženje i V – zapremina uzorka.

Budući da su dobijeni rezultati pokazali normalnu raspodelu, provera statistički značajne razlike između kontrolne grupe (eksperiment bez tretmana) i TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata rađena je u programu IBM SPSS, T testom ($p < 0,05$).

3.2.6. Ispitivanje toksičnosti na model organizmu *Artemia salina*

Ispitivanje toksičnosti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata rađeno je na model organizmu *Artemia salina* (ARC test). Test je rađen prema protokolu Vanhaecke & Persoone (1984) u tri ponavljanja i tri nezavisna eksperimenta. Komercijalno dostupna mešavina liofilizovanih jaja *A. salina* gajena su u rastvoru morske vode (33‰ morske soli) oko 24h do izlaganja larvi II i III larvenog stupnja uz aeraciju, na svetlu i na temperaturi od 26°C.

Testirani su TBQ i njegovi derivati u šest koncentracija u trostrukom ili dvostrukom gradijentu (u zavisnosti od test jedinjenja) kako bi se na osnovu dobijenih rezultata utvrdila LC_{50} (koncentracija koja dovodi do preživljavanja 50% jedinki). Maksimalna koncentracija za sva testirana jedinjenja iznosila je 500 mM. Pored TBQ i derivata, testirani su i kontrola rasta (morska voda sa 33‰ morske soli), pozitivna kontrola ($K_2Cr_2O_7$, opseg koncentracije 50–10 mg/mL) i kontrola rastvarača (5% DMSO). Eksperiment je rađen u mikrotitarskim pločama sa 24 bunara. Prvo je u sve bunare dodato po 900 μ L morske vode sa oko 10 larvi *A. salina* i po 100 μ L test jedinjenja odgovarajućih koncentracija. Ploče su inkubirane 24h na 26°C nakon čega je pomoću svetlosnog mikroskopa (uveličanje 10x) izbrojan broj živih i mrtvih jedinki (**Slika 25**).



Slika 25. Izgled mikrotitarske ploče nakon tretmana larvi *A. salina*.

Na osnovu dobijenih vrednosti, konstruisane su linearne krive i određena je LC_{50} koncentracija za svako testirano jedinjenje. Statistički značajne razlike između TBQ i derivata utvrđene su T-testom pomoću programa IBM SPSS ($p < 0,05$).

3.2.7. Kultivacija sisarskih ćelija

Ćelije su gajene u flaskovima T25 ($6,5 \times 10^5$ ćelija i do 5 mL medijuma) i T75 ($1-5 \times 10^4$ ćelija i do 10 mL medijuma) i inkubirane na 37°C i 5% CO_2 . Nakon formiranja konfluentnog monosloja medijum je uklonjen i ćelije su isprane sa 1 x PBS (5 mL PBS-a za flask T25, 10 mL za flask T75). Sterilnim pipetama, pažljivo je uklonjen PBS i u flaskove je dodat tripsin (1,5 mL za flask

T25, 2,5 mL za flask T75). Flaskovi su inkubirani na 37°C i 5% CO₂ (ne duže od 5 min). Nakon ovog vremena, tripsin je neutralisan dvostruko većom količinom medijuma (3 mL za flask T25, 5 mL za flask T75) uz pažljivo lupkanje flaskova u cilju odvajanja ćelija. Suspenzija ćelija prebačena je u epruvete i centrifugirana 5 min na 1000 rpm. Supernatant je odvojen, a talog sa ćelijama resuspendovan u svežem medijumu.

Ukupan broj ćelija po mililitru je određen nakon bojenja tripan plavim (0,4%) u hemocitometru (Bürker komora) pod svetlosnim mikroskopom (protokol Louis & Siegel, 2011). Korišćeni hemocitometar je sačinjen od dve komorice koje su ugraviranim linijama podeljene na 9 velikih kvadrata, širine 0,1 mm (zapremine 10⁻⁴ mL). Svaki kvadrat dodatno je podeljen ugraviranim linijama na 16 manjih kvadratića širine 0,2 mm. Nakon nanošenja istog volumena (20 µL) suspenzije ćelija i boje na hemocitometar, izbrojane su ćelije u svakom od četiri velika ugaona kvadrata i ukupan broj ćelija po mililitru suspenzije računat je prema formuli:

$$\text{Br. ćelija/mL} = n \times 10^4 \times R$$

gde su:

n – srednja vrednost broja ćelija u četiri ugaona kvadrata

R – faktor razblaženja u rastvoru za bojenje (R = 2).

3.2.8. Ispitivanje citotoksične aktivnosti

Citotoksična aktivnost na MRC-5, A549, Hs 294T i HCT 116 ćelijskim linijama određena je MTT testom, dok je MTS test korišćen u slučaju HepG2 ćelijske linije. Ćelijske linije su gajene u DMEM medijumu sa mešavinom penicilin/streptomycin (100 U/mL) i 10% ili 15% FBS (HepG2 ćelijska linija) u flaskovima T25 i T75 na 37 °C u 5% CO₂. Korišćeni su pasaži 25 i 26 za MRC-5 ćelijsku liniju; 7, 10, 12 i 19 za A549 ćelijsku liniju; 14 i 15 za Hs 294T ćelijsku liniju; 18 i 19 za HCT 116 ćelijsku liniju i 9, 10 i 11 za HepG2 ćelijsku liniju.

3.2.8.1. MTT test

MTT test je rađen po protokolu opisanom u Kolarević i sar. (2019). Ćelije su gajene u pločama sa 96 bunara (10⁴ ćelija po bunariću) u DMEM medijumu sa dodatkom 10% FBS i antibiotika (penicilin/streptomycin, 100 U/mL) i tretirane TBQ-om i njegovim alkiltio i ariltio derivatima. Ispitane su koncentracije u trostrukom (CT₁–3,7; CT₂–11; CT₃–33 µM i CT₄–100 µM) ili dvostrukom (CT₁–12,5; CT₂–25; CT₃–50 i CT₄–100 µM) gradijentu u zavisnosti od ćelijske linije i dužine tretmana, sa ciljem da se jasnije utvrdi IC₅₀ vrednost (**PRILOG 2**).

Etopozid je korišćen kao pozitivna kontrola u istim koncentracijama dok je DMSO (0,5%) korišćen kao kontrola rastvarača. Posle 24h i 72h inkubacije na 37 °C i 5% CO₂, medijum je pažljivo uklonjen i ćelijski monosloj je dalje ispran 1 x PBS-om. U svaki bunar je dodato po 200 µL MTT rastvora (finalne koncentracije 5 mg/mL prethodno filtriran i rastvoren u 1 x PBS) i ploče su inkubirane još 3h na 37 °C i 5% CO₂. Nakon ovog vremena, medijum je pažljivo uklonjen da se ćelije ne bi oštetile, a u svaki bunar dodato je po 200 µL DMSO uz mešanje da bi se rastvorili kristali formazana. Apsorbancija je merena na talasnoj dužini od 570 nm. DMSO je korišćen kao referentni rastvor, a od očitanih vrednosti su oduzete vrednosti slepih proba za svako testirano jedinjenje. Vijabilnost (V) je izračunata prema formuli:

$$V(\%) = 100 \times \text{OD}_{570} \text{ test supstance} / \text{OD}_{570} \text{ kontrola rasta}$$

Na osnovu dobijenih rezultata, za svako test jedinjenje, konstruisani su grafici zavisnosti vijabilnosti od koncentracije test jedinjenja i izračunate su IC₅₀ vrednosti (koncentracije test jedinjenja koje smanjuju vijabilnost ćelija za 50%) za oba perioda inkubacije. Statistički značajne razlike između TBQ i derivata utvrđene su T-testom pomoću programa IBM SPSS (p<0,05).

3.2.8.2. MTS test

Budući da HepG2 ćelije često rastu u grupama i mogu se lako oštetiti nakon ispiranja 1 x PBS-om, što je sastavni deo MTT protokola, za ispitivanje citotoksičnog efekta TBQ i njegovih derivata na ovoj ćelijskoj liniji je korišćen MTS test.

Eksperiment je izveden prema protokolu opisanom u Riss i sar. (2016). Ćelije koje su gajene u pločama sa 96 bunara (10⁴ ćelija po bunariću) u DMEM medijumu sa dodatkom 15% FBS i antibioticima (penicilin/streptomycin, 100 U/mL) su tretirane TBQ-om i njegovim derivatima u istim koncentracijama koje su korišćene za MTT test. Nakon 24h i 72h inkubacije (na 37 °C i 5% CO₂), 20 µl MTS rastvora je dodato u svaki bunar (konačna MTS koncentracija od 0,33 mg/mL) i ploče su dalje inkubirane 3h na 37 °C i 5% CO₂. Rezultati su kvantifikovani merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 490 nm (Cory i sar., 1991). Izmerenim vrednostima apsorpcije, su, kao i za MTT test, oduzete vrednosti slepih proba za svako ispitivano jedinjenje. Vijabilnost (V) je izračunata prema formuli:

$$V(\%) = 100 \times OD_{490} \text{ test supstance} / OD_{490} \text{ kontrola rasta}$$

Na osnovu dobijenih rezultata, kao i za MTT test konstruisani su grafici zavisnosti vijabilnosti od koncentracije test jedinjenja i izračunate su IC₅₀ vrednosti za oba perioda inkubacije. Statistički značajne razlike aktivnosti derivata u odnosu na TBQ utvrđene su T-testom pomoću programa IBM SPSS (p<0,05).

3.2.9. Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal ćelija MRC-5 i A549 linija *in vitro* (Wound healing ili Scratch assay)

Efekat na inhibiciju migracije ćelija praćen je testom „zarastanja rane“ u konfluentnom ćelijskom monosloju (Wound healing ili Scratch assay). Ovaj metod se zasniva na pojavi da će se, nakon stvaranja veštačke ogrebotine na ćelijskom monosloju, ćelije na ivicama ogrebotine pomeriti ka novonastalom praznom prostoru kako bi zatvorile „ogrebotinu“ i uspostavile kontakt sa drugim ćelijama (Liang i sar., 2007). Ćelije MRC-5 i A549 linija su gajene u T75 flaskovima do formiranja konfluentnog monosloja, potom su tripsinizovane i prebačene u mikrotitarske ploče od 12 bunara i inkubirane na 37°C i 5% CO₂ sve dok konfluentni monosloj nije pokrio preko 90% površine ploča (oko 36h). Nakon formiranja monosloja, uklonjen je medijum, ćelije ispirane PBS-om a u bunare je dodat medijum sa test jedinjenjima (finalna koncentracija 100 µM). Da bi se narušio ćelijski monosloj, vrhom pipete su precizno povučene prave, vertikalne linije duž bunara. Posle inkubacije od 24 h sa 5% CO₂, uklonjen je medijum i u bunare je dodato 100 µL akridin-oranža (2 mg/mL). Eksperiment je rađen u triplicatu, pri čemu je svaki bunar posmatran duž prethodno nacrtane linije i fotografisan pomoću fluorescentnog mikroskopa (Leica DMLS, Austrija), a fotografije su obrađene u ImageJ softveru.

Da bi se jasnije uvidela razlika efekata različitih testiranih jedinjenja, u ImageJ softveru primenom MRI Wound Healing dodatka, izmerena je širina migracionog sloja na tri različite tačke za tri nezavisna eksperimenta i upoređena sa širinom migracionog sloja pre tretmana. Brzina ćelijske migracije izračunata je preko formule:

$$Rm = \frac{Wi - Wf}{t}$$

Gde su:

Rm = brzina ćelijske migracije (nm/h)

Wi = širina migracionog sloja pre inkubacije (nm)

Wf = širina migracionog sloja nakon inkubacije (nm)

t = vreme trajanja migracije (h)

Na osnovu dobijenih vrednosti, konstruisan je grafički prikaz rezultata i primenom T-testa u IBM SPSS softveru, utvrđene su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu i osnovno jedinjenje - TBQ ($p < 0,05$).

3.2.10. Ispitivanje interakcija sa DNK molekulom

3.2.10.1. Ispitivanje interakcija sa DNK molekulom na acelularnom model sistemu (plazmidna DNK)

Plazmid pUC19 je izolovan iz *E. coli* KSL1-plava prema protokolu Birnboim (1983), dok je interakcija TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata sa plazmidnom DNK ispitana po protokolu Vujčić i sar. (2007) uz male modifikacije propisa.

Izolovanje plazmida:

Prekonoćna kultura bakterijskog soja *E. coli* KSL1-plava centrifugirana je 1 min na 14 000 rpm, supernatant je odliven, a preko taloga je dodata ista količina prekonoćne kulture. Postupak je ponovljen da bi se izolovala veća količina plazmida. Supernatant je pažljivo odliven, ćelije su resuspendovane u 200 µL Rastvora I za izolovanje plazmida (1 M Tris puffer, 0,5 M Na-EDTA i RNK-aza) i inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je u ependorfice dodato po 200 µL Rastvora II za izolovanje plazmida (1 M NaOH i 10% SDS), sadržaj je pažljivo promešan (okretanjem ependorfice pod uglom od 180°) i ostavljen na ledu 5 min. Potom je dodato 200 µL Rastvora III za izolovanje plazmida (Na-acetat i glacijalna sirćetna kiselina) čija je uloga da ukloni proteine i druge nečistoće. Ependorfice su pažljivo promućkane, inkubirane na ledu 5 min i centrifugirane 5 min na 14 000 rpm. Supernatant sa plazmidnom DNK je pažljivo odliven automatskom pipetom i prebačen u sterilnu ependorficu. Da bi došlo do precipitacije plazmida dodato je 420 µL izo-propanola, sadržaj je promešan na vorteksu i inkubiran 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon ovog vremena, sadržaj je ponovo centrifugiran 10 min na 14 000 rpm, supernatant pažljivo uklonjen, a talog ispran sa 1 mL 70% etanola i pažljivo promešan da bi se rastvorile zaostale soli i dodatno prečistio plazmid. Nakon ponovnog centrifugiranja (5 min na 14 000 rpm), supernatant je odliven, a talog u kome se nalaze plazmidi je osušen na sobnoj temperaturi (oko 15 min). Nakon sušenja, talog je resuspendovan u 30 µL TAE pufera i čuvan na -20°C do tretmana sa TBQ i derivatima.

Izolovani plazmid je proveren elektroforezom na 1% agaroznom gelu (0,5 x TBE, 80V, 300 mA). U zatvorenoj, kružnoj formi (CCF) je bilo prisutno oko 80% izolovanog plazmida, dok je 20% bilo u otvorenoj formi (OCF).

Ispitivanje interakcija plazmida sa TBQ i njegovim alkiltio i ariltio derivatima:

Interakcije TBQ i njegovih derivata sa plazmidom pUC19 ispitivane su u bikarbonatnom puferu (40 mM, pH 8.4). Svaka reakciona smeša je napravljena od 800 ng plazmida pUC19 i TBQ i njegovih derivata rastvorenih u DMSO-u u finalnoj koncentraciji od 1 mM. Finalna koncentracija DMSO u reakcionoj smeši je iznosila 5%. Rekcija je trajala 2h na 37°C, a prekinuta je dodavanjem 5

μL 6 x boje za punjenje (engl. loading dye, 30% (v/v) glicerol, 0,25% (w/v) bromfenol-plavo, 0,5% (w/v) ksilen cijanol). Pozitivna kontrola je bila UV ozračena (540 J/m^2) smeša plazmida i vodonik-peroksida (3 mM). Uzorci su analizirani elektroforezom na 1% agaroznom gelu u 0,5 x TBE puferu. Položaj otvorene kružne forme (OCF) i zatvorene kružne forme (CCF) plazmida je upoređen sa markerima (engl. ladder) λPstI (0,5 $\mu\text{g/lane}$, Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza je rađena pri konstantnom naponu od 80 V, 300 mA oko 1h, dok bromfenol-plavo nije prešao 75% gela. Gelovi su posmatrani na UV transiluminatoru pod ultraljubičastim svetlom na talasnoj dužini od 312 nm i fotografisani digitalnom kamerom. Apsolutni intenzitet elektroforetskih traka, koji predstavlja zastupljenost DNK u OCF i CCF formi je određen korišćenjem softvera ImageJ (Nacionalni instituti za zdravlje, Bethesda, MD) na osnovu kojeg je konstruisan denzitogram.

3.2.10.2. Ispitivanje interakcija testiranih jedinjenja sa DNK molekulom na prokariotskom model sistemu (SOS/umuC test na *S. typhimurium* TA1535/pSK1002)

Za praćenje genotoksičnog potencijala TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata korišćen je bakterijski soj *S. typhimurium* TA1535/pSK1002, koji je čuvan u 1 x TGA sa dodatkom 10% DMSO na -80°C . Iz prethodno pripremljenog uzorka inokulisano je 50 μL bakterijske suspenzije u 10 mL 1 x TGA medijuma, a suspenzija je inkubirana preko noći uz aeraciju na 250 rpm.

Prekonoćna kultura je razblažena 10 x sa 1 x TGA medijumom i inkubirana 1,5 h na 37°C uz aeraciju (250 rpm). Eksperiment je rađen u triplicatu sa tri različite bakterijske kulture ovog soja i u tri ponavljanja. U svaki od 96 bunarića na mikrotitarskoj ploči dodato je 90 μL bakterijske suspenzije i 10 μL test supstance. Testirani su TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati u koncentracijama od: GT1 = 500 μM ; GT2=166,7 μM ; GT3=55,6 μM i GT4=18,5 μM . U eksperiment su uključeni i kontrola rasta - K (10 μL bidestilovane vode i 90 μL suspenzije bakterija), kontrola rastvarača (5% DMSO) i pozitivna kontrola: 4-nitrohinolin-1-oksid - 4NQO (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Nakon nanošenja uzoraka, a da bi se sprečilo taloženje bakterija, ploče su inkubirane 2h na 37°C pod uglom od 45° uz aeraciju (≈ 150 rpm). Nakon ovog perioda, sadržaj ploča je razblažen 10 puta 1xTGA medijumom (30 μL dodato je u nove ploče sa po 270 μL 1 x TGA medijuma) i ploče su dalje inkubirane pod uglom od 45° u istim uslovima. Gustina (stopa) rasta bakterija (G) izmerena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 600 nm (OD_{600}) i izračunata je preko formule:

$$\text{Stopa rasta (G)} = \text{OD}_{600} (\text{uzorka}) / \text{OD}_{600} (\text{kontrola})$$

U posebne mikrotitarske ploče dodato je po 120 μL B-pufera, ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi 20 min da bi se B-pufer koji je čuvan na 4°C temperirao, nakon čega je u svaki bunar preneto po 30 μL uzoraka iz ploča u kojima je već merena apsorbancija. Potom je u sve bunare dodato još po 30 μL rastvora ONPG-a (supstrat za β -galaktozidazu) i ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi 30 min uz aeraciju. Nakon toga, reakcija je prekinuta dodavanjem 120 μL natrijum-karbonata (Na_2CO_3).

Apsorbancija je izmerena spektrofotometrom na talasnoj dužini od 405 nm (A_{405}), a izmerenim vrednostima oduzeta je vrednost slepe probe i izračunata je aktivnost β -galaktozidaze u relativnim jedinicama (U) preko formule:

Aktivnost β -galaktozidaze u relativnim jedinicama (U):

$$U = A_{405} (\text{uzorka}) / A_{405} (\text{kontrola})$$

Na osnovu dobijenih rezultata za stopu rasta (G) i aktivnost β -galaktozidaze (U) izračunata je indukciona stopa (IR) preko formule:

Indukciona stopa (IR):

$$IR = 1/G \times U$$

3.2.10.3. Ispitivanje interakcija sa DNK molekulom na eukariotskom model sistemu (Komet test)

Priprema ćelija i tretman:

Ćelije MRC-5 i HepG2 linija su gajene u T75 flaskovima na 37 °C uz 5% CO₂. Na dan eksperimenta, po 1 mL tripsinizovanih ćelija (3×10^5 ćelija/mL) je dodato u ploče sa 12 bunara sa odgovarajućim koncentracijama test jedinjenja, pripremljenih u medijumu za gajenje ćelija, a za koje je utvrđeno MTT i MTS testovima da je vijabilnost ćelija bila veća od 75%. Koncentracije test jedinjenja (µM) koje su testirane komet testom prikazane su u **Tabeli 5**.

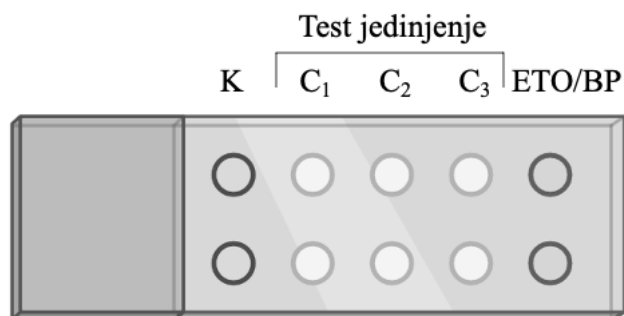
Tabela 5. Koncentracije TBQ i njegovih alkilto i arilto derivata testirane komet testom na MRC-5 i HepG2 ćelijskim linijama.

MRC-5							
(µM)	TBQ	TBHQ	2	3	4	5	6
CA1	/	/	/	/	0,4	/	/
CA2	1,3	/	/	/	1,3	/	/
CA3	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
CA4	11	11	11	11	/	11	11
CA5	/	33	33	33	/	33	33
CA6	/	/	/	/	/	/	/

HepG2							
(µM)	TBQ	TBHQ	2	3	4	5	6
CA1	/	/	/	/	/	/	/
CA2	1,3	/	/	/	/	/	/
CA3	3,7	3,7	3,7	/	3,7	/	3,7
CA4	11	11	11	11	11	11	11
CA5	/	33	33	33	33	33	33
CA6	/	/	/	100	/	100	/

Liza, denaturacija, elektroforeza i neutralizacija:

Rađena je alkalna verzija komet testa prema protokolu opisanom u Kolarević i sar. (2019) uz modifikaciju propisa. Nakon što su sa mikroskopskih pločica uklonjene sve masnoće, jedna strana pločica je presvučena slojem 1% agarose normalne tačke topljenja (engl. Normal melting point agarose - NMP) a pločice su ostavljene preko noći na sobnoj temperaturi da bi se agarosa stegla. Sutradan je na pločice nanet drugi, dodatni sloj 1% NMP agarose i po 15 µL rastvora 1% agarose niske tačke topljenja (engl. Low melting point agarose - LMP) pomešane sa prethodno tretiranim ćelijama (70 µL LMP zagrejanog na 37°C i 30 µL suspenzije ćelija u medijumu) u vidu kupola po shemi prikazanoj na **Slici 26**.



Slika 26. Prikaz sheme mikroskopske pločice nakon nanošenja uzoraka u vidu kupola. K-negativna kontrola, C₁, C₂, C₃ – različite koncentracije test jedinjenja, ETO/BP – pozitivna kontrola

Na svaku pločicu su naneti i uzorci za negativnu (K, ćelije bez tretmana) i pozitivnu kontrolu (za MRC-5 ćelijsku liniju, etopozid (ETO) koncentracije 33 μM i benzo[*a*]piren (BP) za HepG2 ćelijsku liniju, koncentracije 50 μM) i pločice su ostavljene na 4°C da bi se agarozna stegla.

Nakon očvršćavanja agarozne pločice su postavljene u kadicu za lizu, prelivene hladnim puferom za lizu (2,5M NaCl, 100 mM Na-EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1,5% Triton X-100, podešeno na pH=10) i lizirane 1h na 4 °C. Nakon lize, pločice su prebačene u kadicu za elektroforezu uz dodatak hladnog (4 °C) pufera za alkalnu elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM Na-EDTA, podešeno na pH=13). Prvi korak je denaturacija ćelija u puferu za elektroforezu u trajanju od 20 minuta na 4°C bez napona. Drugi korak je elektroforeza u istom rastvoru u kome je izvršena denaturacija u trajanju od 20 min (0,75 V/cm, 300mA). Nakon elektroforeze, izvršena je neutralizacija u svežem i ohlađenom puferu za neutralizaciju (0,4M Tris, podešeno na pH=7,5) tokom 15 min, a zatim su pločice fiksirane u ledeno-hladnom metanolu na 4°C u trajanju od 5 min.

Vizuelizacija:

Vizuelizacija interakcije testiranih jedinjenja sa molekulima DNK je uključivala fluorescentno obeležavanje nukleoida (DNK pričvršćena za nuklearni matriks nakon ćelijske lize i uklanjanja histona) akridin-oranžom (20 μL po pločici, štok rastvor koncentracije 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nakon čega je analizirano 50 nukleoida po uzorku (kupoli) fluorescentnim mikroskopom (Leica, DMLS, Austrija, pod uvećanjem 400x, ekscitacioni filter 510–560 nm, barijera filter 590 nm).

Za procenu nivoa oštećenja molekula DNK je korišćen program Comet IV (Perceptive Instruments, UK), a parametar za procenu je bio intenzitet repa komete (engl. Tail intensity - T.I.%).

Statističke analize:

S obzirom na to da je Kolmogorov-Smirnov testom utvrđeno da dobijeni rezultati nisu imali normalnu distribuciju, za dalju analizu korišćena je jednosmerna Kruskal-VolisoVA ANOVA (engl. Kruskal–Wallis one-way ANOVA). Za ispitivanje statistički značajnih razlika korišćen je Vilkokson test (engl. Wilcoxon Signed Ranks). Nivo značajnosti za sva poređenja postavljen je na $p < 0,05$.

3.2.10.4. Ispitivanje indukcije dvolančanih oštećenja DNK (γH2AX test)

Eksperimenti su izvedeni prema protokolu opisanom u radu Hercog i sar. (2019) sa određenim modifikacijama. Ćelije HepG2 ćelijske linije (6×10^5 ćelija/mL) su zasejane u T25 flakove i inkubirane 24 h na 37 °C uz 5% CO₂ do formiranja ćelijskog monosloja. Nakon formiranja monosloja, ćelije su tretirane TBQ-om i njegovim alkiltio i ariltio derivatima u koncentraciji od 33 mM, dok je kao pozitivna kontrola korišćen etopozid u koncentraciji od 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nakon tretmana od 24h na 37 °C uz 5% CO₂ ćelije su tripsinizovane, isprane dva puta hladnim PBS-om, resuspendovane u 0,5 mL

hladnog PBS-a i fiksirane etanolom (1,5 mL) koji je dodavan postepeno, u kapima. Čelije su čuvane na -20°C do analize.

Pre početka eksperimenta, čelije su isprane ledeno-hladnim PBS-om i obeležene anti-H2AX pS139 antitelima (engl. anti-H2AX-Phosphorylated (Ser139) Antibody - APC) inkubacijom na sobnoj temperaturi u trajanju od jednog sata. Obeležene čelije su potom isprane sa 2 mL 1% BSA, prelivene Hoechst bojom i ostavljene 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, čelije su ponovo isprane sa 2 mL 1% BSA, resuspendovane u 0,2 mL $1 \times$ PBS i analizirane protočnom citometrijom na MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Nemačka). Intenzitet APC, koji je odgovarao dvolančanim oštećenjima DNK (DSBs) je identifikovan u kanalu R1 (655–730 nm), a Hoechst fluorescencija koja je ključna za analizu ćelijskog ciklusa je određena u kanalu V1 (450/500 nm). Izvedena su tri nezavisna eksperimenta, gde je zabeleženo 10 000 događaja po uzorku u svakom eksperimentu.

Za dalju analizu DSBs-a, sirovi podaci dobijeni iz protočnog citometra su obrađeni u GraphPad Prism 6 da bi se napravili odgovarajući dijagrami.

Statistički značaj promene fluorescencije APC je izračunat u statističkom programu R pomoću biblioteke linearnih i nelinearnih modela mešovitenih efekata (nlme, engl. nonlinear mixed-effects), alata za analizu složenih hijerarhijskih podataka u kombinaciji sa metodom procene maksimalne verodostojnosti (REML), prema protokolu Pinheiro i sar. (2007).

3.2.11. Analiza ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom

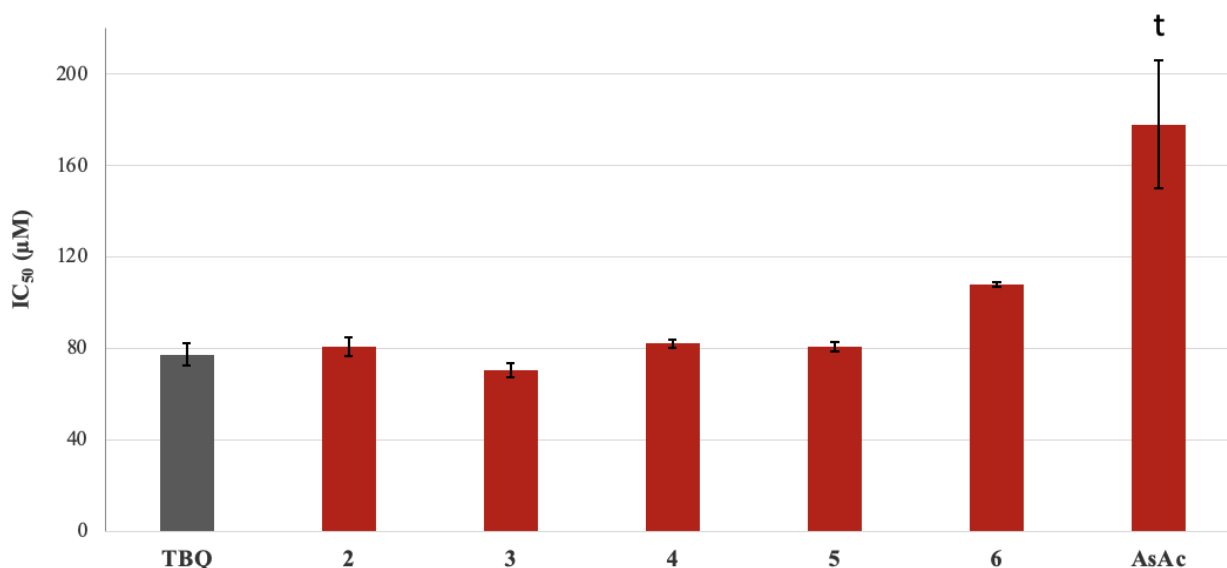
Analizirane čelije HepG2 linije su obojene Hoechst bojom jer ona postaje fluorescentna tek kada se veže za DNK, tako da je količina fluorescencije direktno proporcionalna količini DNK u svakoj ćeliji. Čelije su podeljene u tri kategorije: one koje imaju diploidni broj hromozoma ($2n$, gde n predstavlja broj hromozoma) i stoga su u G_1 fazi; one koje imaju potpuno repliciran broj hromozoma ($4n$), odnosno dvostruki sadržaj G_1 DNK i nalaze se u G_2 ili početku M faze; i one koje imaju srednju količinu DNK (postoji široka distribucija sadržaja DNK između G_1 i G_2 faze) i nalaze se u S fazi tokom koje dolazi do replikacije DNK.

Distribucija ćelija u svakoj fazi ćelijskog ciklusa (G_0/G_1 , S i G_2/M) je procenjena programom FlowJo (Single Cell Analysis Software v10, FlowJo, LLC) koristeći Dean jet fox model. Statistička značajnost između kontrolnih i tretiranih grupa je analizirana Kruskal-Wallis testom, nakon čega je urađen Dun-ov test višestrukog poređenja (Engl. Dunn's multiple comparison test) korišćenjem softvera Graph-Pad Prism 6 (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, Kalifornija, SAD) (* $p < 0,05$).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Antioksidativna aktivnost TBQ i njegovih derivata

Na osnovu rezultata dobijenih DPPH testom (**Slika 27**), može se zaključiti da TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati pokazuju statistički značajno jaču aktivnost od pozitivne kontrole, askorbinske kiseline (Đorđević i sar., 2022). Najjača antioksidativna aktivnost uočena je za derivat **3**. U poređenju sa TBQ, derivati **2**, **4** i **5** pokazuju sličnu, derivat **3** pokazuje nešto jaču, dok je derivat **6** pokazao najslabiju aktivnost ali bez statističke značajnosti.



Slika 27. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkiltio i ariltio derivata predstavljeni preko IC₅₀ vrednosti (sr. vrednost ± SD). AsAc – askorbinska kiselina. ^t statistički značajna razlika u odnosu na TBQ (p<0,05).

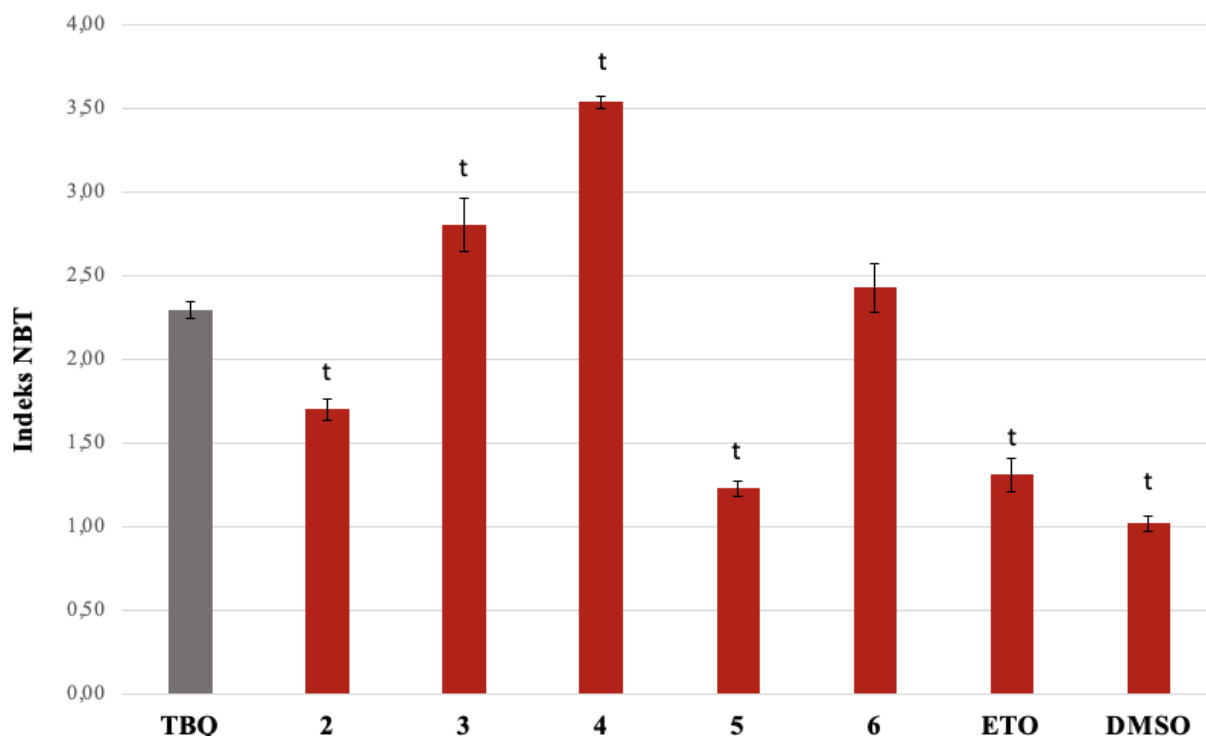
Antioksidativna aktivnost derivata TBQ nije iznenađujuća. Naime, uvođenjem alkiltio i ariltio grupa molekuli poseduju atom sumpora koji može izgubiti elektron i na taj način povećati antioksidativnu aktivnost jedinjenja. Štaviše, alkiltio derivati (**2**, **3** i **4**) imaju nešto jaču aktivnost od ariltio derivata (**5** i **6**) što se može objasniti delokalizacijom elektrona u feniltio grupi, što smanjuje dostupnost elektrona sa atoma sumpora.

U ranijim istraživanjima nije utvrđena antioksidativna aktivnost TBQ, dok je TBHQ u istom testu ispoljio IC₅₀ vrednost od 18,1 µM, što ga čini potentnijim antioksidansom u odnosu na TBQ (Bekdeser i sar., 2011). Ipak, TBQ se spontano redukuje u TBHQ, naročito u ćelijama jetre, što može doprineti njegovoj antioksidativnoj aktivnosti.

4.2. Uticaj TBQ i njegovih derivata na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta

NBT testom je procenjen uticaj TBQ i njegovih derivata na produkciju ROS u ćelijama HCT 116 linije. Rezultati ovog testa su prikazani kao indeks NBT, koji predstavlja odnos između apsorbancija tretiranih i netretiranih ćelija, izračunat na 100% vijabilnih ćelija (**Slika 28**). TBQ i svi ispitivani alkiltio i ariltio derivati uticali su na produkciju ROS. Statistički značajno jaču aktivnost, odnosno veću produkciju ROS u odnosu na TBQ, pokazali su derivati **3** i **4**. Statistički najslabiju produkciju ROS u poređenju sa TBQ pokazali su derivati **2** i **5**, kao i pozitivna kontrola, etopozid. Takođe, produkcija ROS statistički je značajno različita među svim derivatima.

Svi derivati, kao i pozitivna kontrola etopozid, su pokazali statistički značajnu razliku u produkciji ROS u odnosu na kontrolu rastvarača (DMSO). U poređenju sa etopozidom, svi derivati (izuzev derivata 5) kao i TBQ pokazali su značajno veću produkciju ROS.



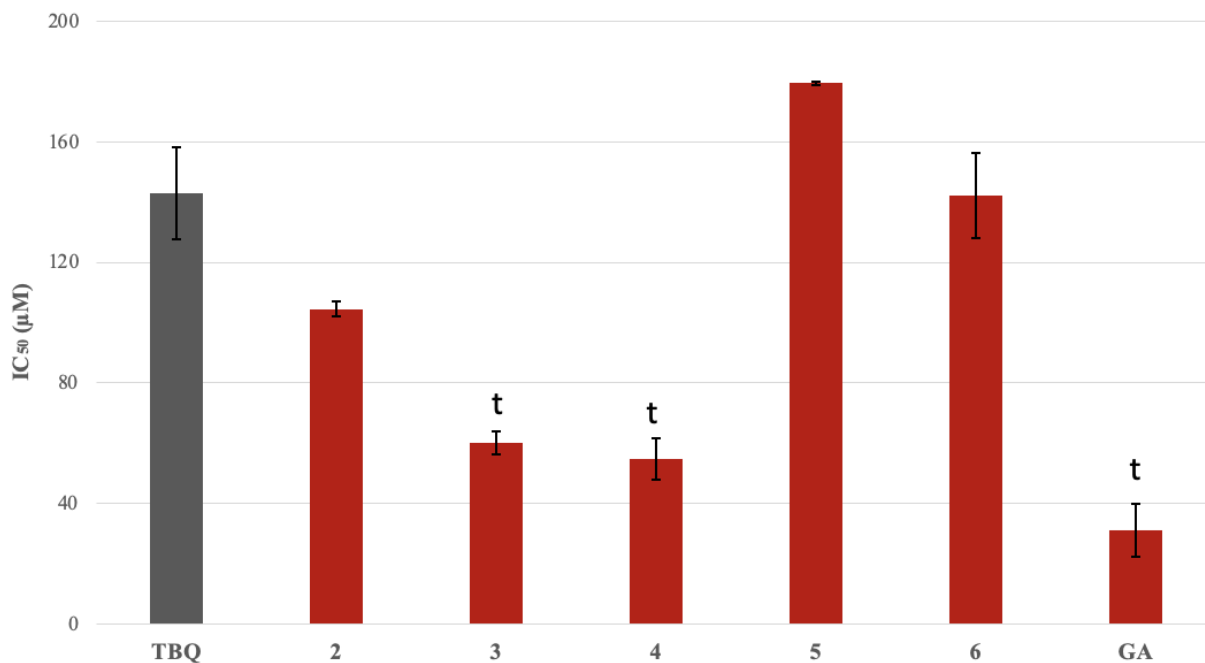
Slika 28. Efekat 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkiltio i ariltio derivata na produkciju ROS, predstavljen preko NBT indeksa (sr. vrednost \pm SD). Ispitivana je koncentracija test jedinjenja od 100 μ M i DMSO od 0,5%. ^t statistički značajna razlika u odnosu na TBQ ($p < 0,05$).

Molekularni mehanizmi delovanja hinona uključuju formiranje ROS ili alkilovanje ćelijskih nukleofila. S obzirom na to da je kod derivata 4 formirana ciklična struktura na hinonskom jezgru upotrebom etilenditiola kao nukleofila, dalji nukleofilni napad na hinonsko jezgro je onemogućen, tako da je njegov mehanizam delovanja isključivo produkcija ROS. Zbog toga je visoka produkcija ROS indukovana derivatom 4 i očekivana. Uticaj supstituenata na produkciju ROS može se pratiti kroz njihovu voluminoznost. Voluminoznija izopropil grupa kod derivata 2 je uticala na smanjenje produkcije ROS u odnosu na derivat 3 sa manje voluminoznom propiltio grupom. Derivat 5 (5-feniltio izomer) je u odnosu na derivat 6 (6-feniltio regioizomer) indukovao manju produkciju ROS, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u DPPH testu. U ovom testu detektovana je bolja antioksidativna aktivnost derivata 5 u poređenju sa derivatom 6, dok je NBT testom potvrđena prooksidativna aktivnost (produkcija ROS) derivata 6.

4.3. Antineurodegenerativna aktivnost TBQ i njegovih derivata

Antineurodegenerativna aktivnost TBQ i njegovih derivata je određena na osnovu inhibicije enzima acetilholinesteraze (AChE). Rezultati su predstavljeni na **slici 29** preko IC_{50} vrednosti, što je koncentracija jedinjenja koja inhibira 50% AChE. U poređenju sa TBQ, jaču antineurodegenerativnu aktivnost su pokazali derivati 2, 3 i 4 (statistički značajno jaču samo derivati 3 i 4 sa IC_{50} vrednostima od: $60,12 \pm 3,68 \mu$ M i $54,97 \pm 6,86 \mu$ M, respektivno). Aktivnost derivata 6 ($IC_{50} = 142,34 \pm 14,18 \mu$ M), je bila slična TBQ ($IC_{50} = 142,87 \pm 18,23 \mu$ M), dok je derivat 5 pokazao slabiji efekat ali bez statističke značajnosti.

Međutim, najjaču antineurodegenerativnu aktivnost je pokazala pozitivna kontrola, galatamin (GA, $IC_{50} = 31,22 \pm 8,83 \mu M$), lek koji se koristi u terapiji Alchajmerove bolesti. Poređenjem antineurodegenerativne aktivnosti derivata TBQ-a i galantamina, derivati **3** i **4** imaju samo dva puta slabiju aktivnost od komercijalnog leka galantamina.



Slika 29. Inhibitorski efekat 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkiltio i ariltio derivata prema acetilholin-esterazi, predstavljen preko IC_{50} vrednosti (sr. vrednost \pm SD). GA-galantamin. ^t statistički značajna razlika u odnosu na TBQ ($p < 0,05$).

Uočeno je da položaj supstituenta kao i njihova voluminoznost imaju uticaj na antineurodegenerativnu aktivnost derivata TBQ. Tako je 6-feniltio derivat TBQ (derivat **6**) pokazao skoro 30% jaču aktivnost u odnosu na njegov regioizomer 5-feniltio derivat TBQ (derivat **5**) koji je pokazao i statistički značajno slabiju aktivnost od ostalih derivata (osim derivata **6**), dok je propiltio derivat **3** imao jaču aktivnost u odnosu na voluminozniji izopropil derivat **2**. Takođe, formiranje cikličnog šestočlanog prstena na hinonskom jezgru sa dva atoma sumpora izgleda da ima ulogu u inhibiciji AchE, budući da etileneditio derivat (derivat **4**) ima najjači antineurodegenerativni efekat.

Slobodni radikali su jedan od glavnih pretpostavljenih uzroka Alchajmerove bolesti. Da bi se utvrdilo da li antioksidativna aktivnost doprinosi antineurodegenerativnoj aktivnosti, urađene su Pirson korelacije između rezultata dobijenih za antioksidativnu, prooksidativnu (produkcija ROS) i antineurodegenerativnu aktivnost TBQ i njegovih derivata (**Slika 30**).

Kod osnovnog jedinjenja - TBQ-a uočava se jaka negativna korelacija između njegove antineurodegenerativne i antioksidativne aktivnosti, zbog čega njegov antineurodegenerativni potencijal ne može biti posledica „hvatanja“ ROS. Međutim, kod svih ispitivanih derivata (izuzev derivata **6**) uočena je jaka korelacija između antioksidativne i antineurodegenerativne aktivnosti. Dodatno, kod derivata **3** i **5** uočena je i jaka negativna korelacija antineurodegenerativne i prooksidativne aktivnosti.

TBQ	AnOX	ProOX	AnND
AnOX	1,00		
ProOX	0,10	1,00	
AnND	-0,95	-0,41	1,00

Derivat 2	AnOX	ProOX	AnND
AnOX	1,00		
ProOX	0,88	1,00	
AnND	0,99	0,82	1,00

Derivat 3	AnOX	ProOX	AnND
AnOX	1,00		
ProOX	-0,98	1,00	
AnND	0,96	-1,00	1,00

Derivat 4	AnOX	ProOX	AnND
AnOX	1,00		
ProOX	1,00	1,00	
AnND	0,74	0,78	1,00

Derivat 5	AnOX	ProOX	AnND
AnOX	1,00		
ProOX	-0,65	1,00	
AnND	0,99	-0,77	1,00

Derivat 6	AnOX	ProOX	AnND
AnOX	1,00		
ProOX	0,74	1,00	
AnND	0,12	0,75	1,00

Slika 30. Pirsonova korelacija dobijenih rezultata za antioksidativnu (AnOX), produkciju ROS (prooksidativnu aktivnost - ProOX) i antineurodegenerativnu aktivnost (AnND) 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkiltio i ariltio derivata. Prema Taylor (1990), zelenom bojom su označene jake korelacije, žutom umerene, a crvenom slabe, dok su pozitivne vrednosti korelacije predstavljene crnom bojom, a negativne vrednosti crvenom.

Inhibicija AchE je izuzetno važna budući da je njegova abnormalna aktivnost jedan je od faktora koji doprinose razvoju Alchajmerove bolesti i demencije (Tommonaro i sar., 2015b). Trenutno komercijalno dostupni lekovi za lečenje Alchajmerove bolesti spadaju u grupu alkaloida koji pokazuju dobar efekat ali i niz neželjenih efekata, pa bi eventualna primena drugih lekova koji ne pripadaju ovoj klasi hemijskih jedinjenja mogla dobiti na važnosti (Pejin i sar., 2008; Tommonaro i sar., 2015a).

Antineurodegenerativna aktivnost preko inhibicije AchE ispitivana je i za druge hinone upravo zbog njihovih hemijskih karakteristika i sposobnosti da „hvataju“ ROS i prolaze krvno-moždanu barijeru. U radu Pejin i sar. (2008) hinon avaron je ispoljio srednje jaku aktivnost u inhibiciji enzima AchE, ali ipak 100 puta slabiju od galantamina. Derivati TBQ-a (derivati **3** i **4**) pokazali su jaču aktivnost od avarona, jer su u odnosu na galantamin pokazali samo dva puta slabiju aktivnost.

4.4. Antimikrobna aktivnost TBQ i njegovih derivata

Antimikrobna aktivnost ispitivana je difuzionom i mikrodilucionom metodom na četiri gram-pozitivne (*E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus* i *B. subtilis*) i tri gram-negativne bakterije (*E. coli*, *S. typhimurium* i *P. aeruginosa*). Kao pozitivne kontrole korišćeni su antibiotici streptomycin i rifampicin. Pored toga, ispitan je uticaj TBQ i njegovih derivata na adheziju i invaziju bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije.

4.4.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti difuzionom metodom u bunaru

Ni za jedno od testiranih jedinjenja nije uočen antimikrobni efekat prema različitim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama. Zona inhibicije rasta je jedino uočena kod pozitivnih kontrola, streptomicina i rifampicina. Jedan od razloga odsustva zone inhibicije rasta testiranih bakterija može biti i posledica otežane ili slabe difuzije jedinjenja kroz čvrstu hranljivu podlogu.

4.4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom

Na osnovu dobijenih rezultata, TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati su pokazali selektivnost prema gram-pozitivnim bakterijama (Đorđević i sar., 2022). Prema Kalli i sar. (2021), uočeno je

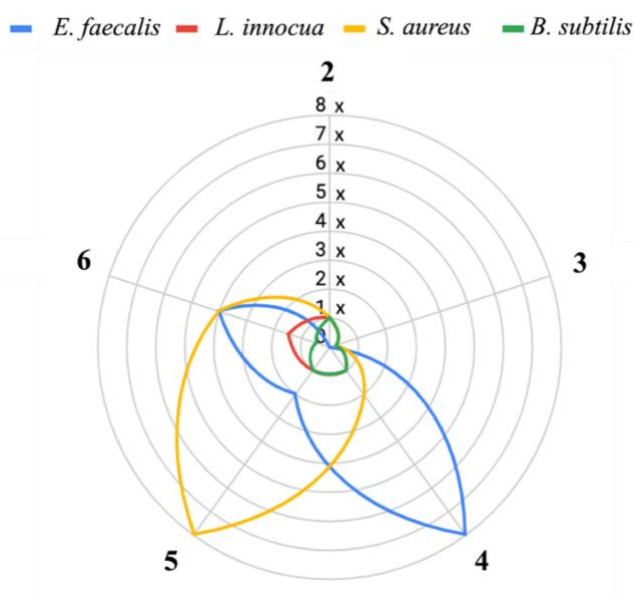
uglavnom jako do umereno dejstvo na gram-pozitivne, dok antimikrobni efekat nije uočen prema gram-negativnim bakterijama. Generalno, u poređenju sa osnovnim jedinjenjem, prema većini bakterija, skoro svi sintetisani derivati su pokazali istu ili bolju antibakterijsku aktivnost, što opravdava njihovu sintezu. Najjaču antimikrobnu aktivnost pokazali su derivati **4**, **5** i **6** na *S. aureus*, a TBQ i derivati **2**, **4** i **5** na *B. subtilis* (Tabela 6). U poređenju sa TBQ, derivati **4**, **5** i **6** su pokazali jaču antimikrobnu aktivnost na *E. faecalis* i *S. aureus*.

Tabela 6. Antimikrobna aktivnost 2-terc-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkiltio i ariltio derivata prikazana na osnovu dobijenih MIK vrednosti u μM . AB – antibiotici rifampicin ili streptomycin (pozitivna kontrola) (Đorđević i sar., 2022).

JEDINJENJA	<i>E. faecalis</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
TBQ	1000	250	125	62,5	>1000	>1000	>1000
2	>1000	250	125	62,5	>1000	>1000	>1000
3	>1000	1000	500	250	>1000	>1000	>1000
4	125	250	62,5	62,5	>1000	>1000	>1000
5	500	250	15,6	62,5	>1000	>1000	>1000
6	250	125	31,2	125	>1000	>1000	>1000
AB	3,79 ^r	1,90 ^r	10,75 ^s	10,75 ^s	21,50 ^s	42,99 ^s	42,99 ^s

^r rifampicin; ^s streptomycin

Da bi se utvrdilo da li hemijske modifikacije pojačavaju antimikrobni efekat jedinjenja i koliko puta (2-8x), izračunat je odnos jačine antibakterijskog efekta derivata u odnosu na osnovno jedinjenje – TBQ ($\text{MIK}_{\text{derivata}} / \text{MIK}_{\text{TBQ}}$) i dobijeni rezultati su prikazani na radijalnom dijagramu (Slika 31) (Đorđević i sar., 2022). Na dijagramu se uočava da su derivati **4**, **5** i **6** pokazali bolju aktivnost prema *E. faecalis* i *S. aureus*, dok je u slučaju *L. innocua*, derivat **6** pokazao bolju aktivnost od TBQ. Najveću aktivnost, 8 puta jaču od TBQ, pokazali su derivati **4** (prema *E. faecalis*) i derivat **5** (prema *S. aureus*).



Slika 31. Uporedni prikaz odnosa jačine (1x, 2x...i 8x) antimikrobnog efekta alkiltio i ariltio derivata 2-terc-butil-1,4-benzohinona (TBQ) u odnosu na TBQ na gram-pozitivne bakterije: *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus* i *B. subtilis* (Đorđević i sar., 2022).

Na osnovu dobijenih rezultata (Đorđević i sar., 2022), može se zaključiti da uvođenje supstituenta u hinonski deo TBQ, generalno, dovodi do poboljšanja antimikrobne aktivnosti za većinu sintetisanih derivata. Takođe, uočena je selektivnost TBQ i svih njegovih ispitivanih derivata prema gram-pozitivnim bakterijama. Iz analize odnosa struktura–aktivnost (SAR), moglo se primetiti da derivati sa voluminoznijim supstituentom pokazuju jaču antimikrobnu aktivnost. U skladu sa ovim podacima, izopropiltio derivat **2** je pokazao bolju aktivnost od propiltio derivata **3**, dok su sterno zahtevne grupe etilenditio (derivat **4**) i feniltio (derivati **5** i **6**), takođe, pokazivale povećanu aktivnost. S druge strane, dva feniltio regioizomera (derivati **5** i **6**) pokazali su različite aktivnosti, pri čemu je derivat **5** pokazao jaču aktivnost. Derivat **5** je pokazao i obećavajuća antimikrobna svojstva zbog aktivnosti prema *S. aureus*, pri čemu je njegova aktivnost uporediva sa aktivnosti kontrolnog antibiotika streptomicina.

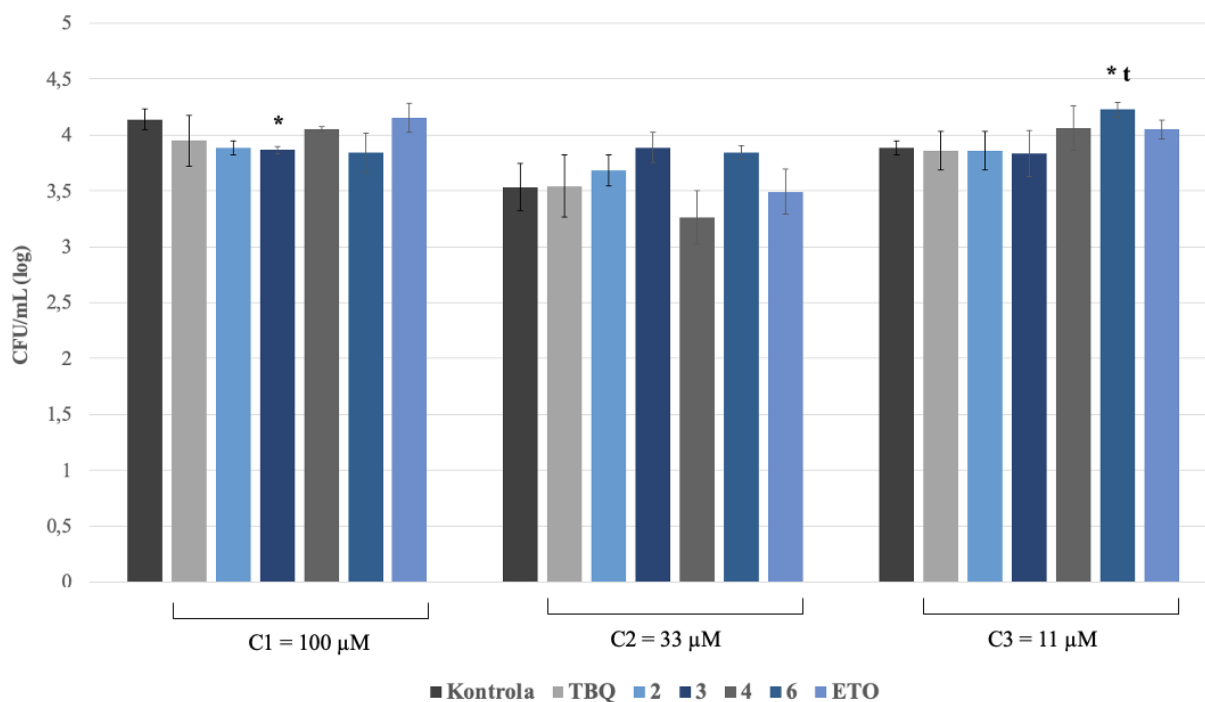
Na osnovu dostupne literature, hemijske modifikacije avarona nisu doprinele poboljšanju njegove antimikrobne aktivnosti. Tako u radu Božić i sar. (2010), alkiltio i ariltio derivati avarona bili su manje ili podjednako aktivni od avarona prema bakterijskim sojevima *S. aureus* i *E. coli*. Sa druge strane, na istim bakterijskim sojevima, alkilamino, aralkilamino i aminokiselinski derivati TBQ su, uglavnom, pokazali jaču aktivnost u odnosu na TBQ (Jeremić i sar., 2016, 2018; Vilipić i sar., 2015).

U radu Cariello i sar. (1982) pokazana je antimikrobna aktivnost avarola prema sojevima *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Streptococcus faecalis* R/B1 1 (soj rezistentan na β -laktamske antibiotike). Takođe je pokazana i antibakterijska aktivnost avarola i avarona prema marinskim bakterijama: *Cobetia marina*, *Marinobacterium stanieri*, *Vibrio fischeri* i *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Tsoukatou i sar., 2007). Avaron i 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon, kao i njihovi alkilamino i aralkilamino derivati, su u radu pokazali najjaču antibakterijsku aktivnost prema *E. coli*, *S. aureus* and *M. luteus*. U istom radu, 2-*terc*-butil-6-(butilamino)-1,4-benzohinon i 2-(benzilamino)-6-(*terc*-butil)-1,4-benzohinon su pokazali jaču antibakterijsku aktivnost u odnosu na antibiotik amikacin. Avarol i avaron kao i njihovi 3' i 4' derivati su pokazali antivirusnu aktivnost prema poliovirusu, dok je derivat 4'-seril-avaron imao antivirusnu aktivnost prema HIV-u (de Giulio i sar., 1991)

4.4.3. Uticaj TBQ i njegovih derivata na adheziju i invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije

U ovom testu nije uočena inhibicija adhezije bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije, ni za TBQ ni za njegove alkiltio i ariltio derivate pri testiranim koncentracijama (100, 33 i 11 μ M). Rezultati testa invazije TBQ i derivata **2**, **3**, **4** i **6** (derivat **5** nije testiran) na bakterijski soj *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije su prikazani na **slici 32**. Najveću redukciju invazije pokazali su pozitivna kontrola (etopozid) i derivat **4** (pri koncentraciji od 33 μ M), ali bez statističkog značaja. Generalno, TBQ i testirani derivati nisu imali statistički značajan uticaj na invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije. Statistički značajno smanjenje invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije primećeno je za derivat **3** pri najvišoj testiranoj koncentraciji (100 μ M). Sa druge strane, derivat **6**, na najnižoj testiranoj koncentraciji (11 μ M), doveo je do statistički značajne stimulacije invazije.

U odnosu na etopozid, statistički značajno veće smanjenje invazije uočeno je za derivat **3** pri najvišoj testiranoj koncentraciji (100 μ M) i derivat **4** pri koncentraciji od 33 μ M. Derivat **6** je pri istoj koncentraciji (33 μ M) statistički značajno stimulisao invaziju istog soja u odnosu na etopozid.

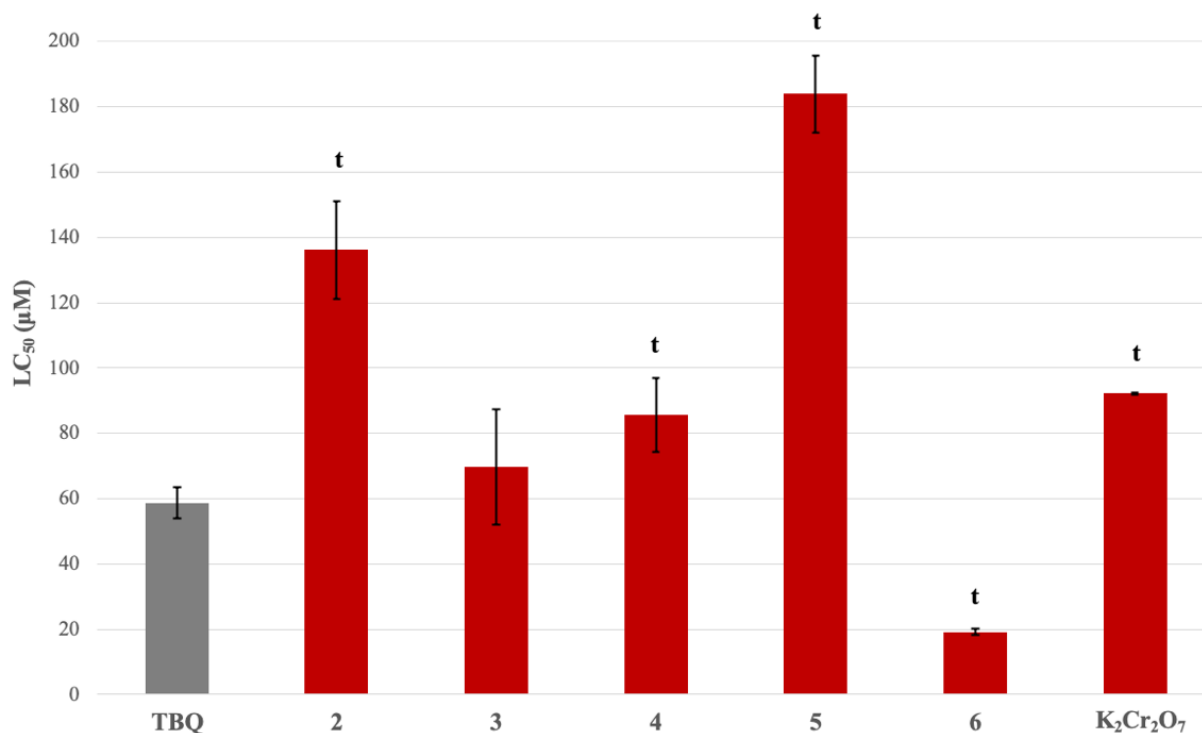


Slika 32. Uticaj 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkiltio i ariltio derivata na invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija MRC-5 linije prikazani preko logaritamskog broja bakterija po mililitru (CFU/mL) (sr. vrednost \pm SD). *statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (Kontrola), ^t statistički značajna razlika u odnosu na TBQ ($p > 0,05$).

Budući da su TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati u mikrodilucionom testu pokazali slab efekat na gram-negativne bakterije, njihovo slabo dejstvo na invaziju *P. aeruginosa* PAO1 nije iznenađujuće. Propiltio derivat **3** je jedini pokazao statistički značajno veću aktivnost u odnosu na kontrolu. Budući da je propiltio grupa ujedno i najmanje voluminozna grupa od svih ostalih ispitivanih alkiltio i ariltio derivata, može se pretpostaviti da veličina supstituenta doprinosi anti-invazionoju aktivnosti jedinjenja.

4.5. Toksičnost TBQ i njegovih derivata na model organizmu *Artemia salina*

Na osnovu dobijenih rezultata (Đorđević i sar., 2022), uočavaju se razlike u toksičnosti TBQ i njegovih derivata u zavisnosti od hemijske strukture jedinjenja, pri čemu je najjača toksičnost uočena za derivat **6** (Slika 33). Svi ostali derivati pokazali su manju toksičnost u poređenju sa TBQ, što ukazuje da uvođenje tio supstituenta na hinonsko jezgro smanjuje toksičnost. TBQ i derivati **3**, **4** i **6** su bili toksičniji od pozitivne kontrole kalijum-dihromata ($K_2Cr_2O_7$) ($6 > TBQ > 3 > 4$).



Slika 33. Rezultati testa toksičnosti 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkiltio i ariltio derivata na model organizmu *Artemia salina* predstavljeni preko LC₅₀ vrednosti (sr. vrednost ± SD). Pozitivna kontrola – kalijum-dihromat (K₂Cr₂O₇). † statistički značajna razlika u odnosu na TBQ (p>0,05) (Đorđević i sar., 2022).

Najtoksičnije jedinjenje je derivat **6**, koji je skoro 10 puta toksičniji od njegovog regioizomera derivata **5**. Pošto je toksičnost hinona povezana ili sa formiranjem ROS ili sa alkilovanjem ćelijskih nukleofila, moguće objašnjenje za ovu razliku u aktivnosti je činjenica da je u derivatu **6**, najaktivnija pozicija za nukleofilni napad dostupna, jer se odgovarajući feniltio supstituent nalazi na susednom ugljenikovom atomu na hinonskom jezgru. Međutim, ova razlika u toksičnosti regioizomera je u skladu i sa rezultatima dobijenim za produkciju ROS, gde je derivat **6** ispoljio jači uticaj na produkciju ROS u odnosu na derivat **5**. Toksičnost drugih derivata bi se mogla objasniti formiranjem ROS, pošto je nukleofilna adicija ili malo verovatna za derivate **2**, **3** i **5** (tio supstituenti se već nalaze na ugljenikovom atomu hinonskog jezgra koji je najaktiviraniji za nukleofilni napad) ili nemoguća za derivat **4** (formirani šestociklični prsten na hinonskom jezgru je stabilan i onemogućava dalju nukleofilnu adiciju).

U radu Vilipić i sar. (2015), TBQ je pokazao 6 puta veću toksičnost od avarona i jaču toksičnost u odnosu na aminokiselinske derivate. Alkiltio i ariltio derivati TBQ koji su ispitani u ovoj disertaciji su u odnosu na aminokiselinske derivate TBQ, prikazanim u radu Vilipić i sar. (2015), pokazali i do nekoliko desetina puta jaču toksičnost. Zbog toga se može zaključiti da je uvođenje S-supstituenata u hinonski deo doprinosi povećanju toksičnosti.

4.6. Citotoksična aktivnost TBQ i njegovih derivata

Radi eventualne primene TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata u terapiji malignih bolesti, citotoksični potencijal ispitivan je prema zdravoj ćelijskoj liniji fetalnih, humanih fibroblasta pluća - MRC-5 i četiri humane tumorske ćelijske linije: ćelijskoj liniji humanog melanoma - Hs 294T, adenokarcinoma pluća - A549, kolorektalnog karcinoma - HCT 116 i hepatocelularnog karcinoma -

HepG2. Rezultati citotoksičnog efekta TBQ i njegovih derivata na ćelijama MRC-5, Hs 294T i A549 linija predstavljeni su u radu Đorđević i sar. (2022).

Citotoksičnost metaboličkog produkta TBQ, TBHQ, ispitana je na MRC-5 i HepG2 ćelijskim linijama. Rezultati su kvantitativno predstavljeni u **Tabeli 7** preko IC_{50} vrednosti. Prema utvrđenim kriterijumima, jedinjenja su aktivna (zadovoljavajuće citotoksična) ako imaju vrednost IC_{50} nižu od 20 μM , imaju umerenu citotoksičnost ukoliko im je IC_{50} vrednost u opsegu od 20 do 100 μM i smatraju se neaktivnim ako prelaze graničnu vrednost od 100 μM (Tanamatayarat i sar., 2003).

Na ćelijama MRC-5 linije, TBQ i njegovi derivati pokazuju umereno citotoksičan efekat, pri čemu TBQ pokazuje najnižu citotoksičnost u 24h tretmanu i zajedno sa derivatima **2** i **5** u 72h tretmanu. Najjači citotoksični efekat ima derivat **4** sa IC_{50} vrednostima: 20,61 μM (24h) i 11,12 μM (72h), što ga klasifikuje kao zadovoljavajuće citotoksičan. TBHQ pokazao je manju citotoksičnost od TBQ u kraćem tretmanu, međutim, nakon dužeg tretmana pokazao se dvostruko citotoksičnijim. U odnosu na navedenu klasifikaciju, pozitivna kontrola citostatik etopozid, bio je neaktivan nakon 24h ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) i umereno aktivan nakon 72h ($IC_{50} = 84,34 \mu\text{M}$).

TBQ nije pokazao citotoksični efekat na ćelijama Hs 294T linije nakon ni jednog od perioda inkubacije (24h i 72h). Citotoksični efekti etopozida i TBQ derivata bili su uočeni tek nakon 72h. Umerenu citotoksičnost, pored etopozida ($IC_{50} = 34,08 \mu\text{M}$), pokazao je i derivat **3** ($IC_{50} = 53,12 \mu\text{M}$).

Slični rezultati su dobijeni i na ćelijama A549 linije, gde je umereni citotoksični efekat nakon 24h pokazao samo derivat **5** ($IC_{50} = 57,04 \mu\text{M}$). Najjači citotoksični efekat nakon 72h je pokazao etopozid ($IC_{50} = 36,65 \mu\text{M}$), dok su jedino derivati **2** i **5** pokazali jaču citotoksičnost ($IC_{50} = 52 \mu\text{M}$) u odnosu na TBQ ($IC_{50} = 67,58 \mu\text{M}$).

Tabela 7. Citotoksična aktivnost 2-*terc*-butil-1,4-benzohinona (TBQ) i njegovih alkilno i arilno derivata, predstavljena preko IC₅₀ vrednosti u μM (sr. vrednost ± SD) na MRC-5, Hs 294T, A549, HCT116 i HepG2 ćelijskim linijama posle 24h i 72h tretmana.

Jedinjenja	IC ₅₀ /μM									
	MRC-5 ^c		Hs 294T ^c		A549 ^c		HCT 116		Hep G2	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
TBQ	82,93±4,79	54,22±8,02	>100	>100	>100	67,58±0,87	71,73±3,03	63,66±10,83	>100	81,12±5,12
2	64,14±3,66	51,51±5,38	>100	83,77±7,88	>100	52,99±4,01	64,57±7,60	55,77±3,54	>100	87,88±2,09
3	61,15±4,89	35,516±9,79	>100	53,12±9,80	>100	75,72±1,18	80,16±9,87	69,55±1,39	>100	70,03±5,84
4	20,61±12,87	11,12±15,65	>100	94,74±18,07	>100	>100	20,11±1,47	16,62±0,58	64,68±1,57	55,64±4,91
5	64,32±2,36	55,16±3,68	>100	n.t. ^b	57,04±6,63	52,80±6,98	46,52±2,43	39,98±4,08	>100	74,79±5,48
6	82,51±2,94	37,11±3,47	>100	68,09±3,66	>100	75,73±1,18	59,17±9,89	57,23±4,59	>100	80,92±3,02
TBHQ	>100	29,79±2,77	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	>100	87,40±13,46
Etopozid	>100	84,34±8,03	>100	34,08±16,21	>100	<100 ^b	59,79±4,12	5,06±0,95	n.t. ^a	n.t. ^a
Cisplatina	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	n.t. ^a	>100	57,70±3,79

^a nije testirano

^b testirana samo koncentracija od 100 μM (vijabilnost = 36,65±5,22)

^c Đorđević i sar., 2022

Na ćelijama HCT 116 linije derivat **4** je pokazao zadovoljavajuću citotoksičnost i nakon 24h ($IC_{50} = 20,11 \mu M$) i nakon 72h ($IC_{50} = 16,62 \mu M$). Umerenu citotoksičnost za oba perioda inkubacije pokazali su i TBQ i ostali testirani derivati, pri čemu je, u poređenju sa njima, derivat **5** imao nešto veću citotoksičnost sa IC_{50} vrednostima od $46,52 \mu M$ nakon 24h i $39,98 \mu M$ nakon 72h. Na istoj ćelijskoj liniji, etopozid je umereno aktivan u 24h tretmanu ($IC_{50} = 59,79 \mu M$) i zadovoljavajuće aktivan u 72h tretmanu ($IC_{50} = 5,06 \mu M$).

Na ćelijama HepG2 linije TBQ i njegovi derivati, osim derivata **4** koji je pokazao umerenu aktivnost ($IC_{50} = 64,68 \mu M$), nisu bili aktivni nakon 24h. Pored toga, isti derivat je bio najaktivniji i nakon 72h ($IC_{50} = 55,64 \mu M$). TBHQ je pokazao umerenu citotoksičnost tek nakon 72h ($IC_{50} = 87,4 \mu M$) samo prema ćelijama HepG2 i MRC-5 linije, dok je IC_{50} vrednost za cisplatinu nakon 72h iznosila $57,70 \mu M$.

Na osnovu dobijenih rezultata, generalno, može se zaključiti da TBQ i njegovi derivati pokazuju umereno citotoksični efekat. Takođe, primećeno je da se citotoksičnost povećava nakon duže inkubacije (72h) (izuzetak TBQ bez efekta na ćelijama Hs 294T linije). TBHQ i pozitivne kontrole su pokazali umerenu citotoksičnost tek nakon 72h. Ćelijske linije MRC-5 i HCT 116 su se pokazale kao najosetljivije na citotoksično dejstvo testiranih supstanci. Za razliku od njih, visoka rezistencija je uočena u metabolički veoma aktivnoj liniji HepG2 (osim za derivat **4**) i liniji adenokarcinoma pluća A549 (osim za derivat **5**).

Kombinovani mehanizam delovanja koji uključuje nukleofilnu adiciju i proizvodnju ROS nije moguć kod derivata **4**, što objašnjava zašto je ovaj derivat prema pojedinim tumorskim ćelijskim linijama (Hs 294T i A549) manje aktivan od derivata **2** i **5**. U prethodno opisanim rezultatima NBT testa, derivati **2** i **5** imali su najslabiji efekat, odnosno najmanju produkciju ROS ali prema drugoj, HCT 116 ćelijskoj liniji. To, takođe, ukazuje da produkcija ROS najverovatnije nije mehanizam citotoksičnosti derivata **2** i **5** prema navedenim ćelijskim linijama.

Sa druge strane, i u NBT testu prema ćelijama HCT 116 linije, derivat **4** se pokazao najaktivnijim u proizvodnji ROS. Budući da je ovaj derivat prema istoj ćelijskoj liniji imao zadovoljavajući citotoksični efekat, a istovremeno i najjači efekat u poređenju sa ostali testiranim jedinjenjima ($IC_{50} < 20 \mu M$), proizvodnja ROS je najverovatniji mehanizam citotoksičnosti.

U odnosu na testirane citostatike, TBQ i njegovi derivati pokazali su prema ćelijama MRC-5 linije jaču citotoksičnost od etopozida. U slučaju derivata **4**, citotoksičnost je bila oko 7 puta jača od kontrolnog etopozida. Prema drugim ćelijskim linijama, efekat TBQ i derivata bio je sličan ili slabiji. Izuzetak je primećen kod derivata **5**, koji je pokazao za oko 20% jači citotoksični efekat od etopozida tokom 24h tretmana ćelijske linije HCT 116, ali je ovakav trend povećanja aktivnosti izostao tokom tretmana od 72h.

Procenjajući selektivni citotoksični efekat, generalno, ćelijska linija MRC-5 bila je osetljivija na TBQ i njegove derivate u poređenju sa drugim testiranim linijama raka. Izuzetak se može uočiti za derivat **5**, koji je imao jači citotoksični efekat prema ćelijama A549 i HCT 116 linija nego prema zdravoj MRC-5 liniji. Međutim, kada se odredi selektivni indeks (SI) za oba navedena slučaja, on je niži od 2, što derivat **5** kategoriše kao generalno toksično jedinjenje prema ustaljenoj normi, navedenoj u radu Koch i sar. (2005). Još jedan izuzetak, kada je neki derivat pokazao jači efekat prema tumorskim ćelijama u odnosu na zdrave ćelije MRC-5 linije, je citotoksičnost derivata **6** prema ćelijama HCT 116 linije, nakon inkubacionog perioda od 24h, sa selektivnim indeksom od $SI < 2$.

Prema Sladić & Gašić (2006) glavni mehanizam citotoksičnosti hinona može biti nukleofilna adicija i proizvodnja ROS, što dovodi do oksidativnog stresa i smrti ćelije. Tumorske ćelije su podložnije oksidativnom stresu. Jači citotoksični efekat derivata prema zdravoj ćelijskoj liniji MRC-5 u poređenju sa tumorskim ćelijskim linijama se ne može objasniti stvaranjem ROS, te je verovatno posledica pojačanog transporta kroz ćelijsku membranu i/ili razlike u metaboličkim transformacijama u normalnim i tumorskim ćelijama.

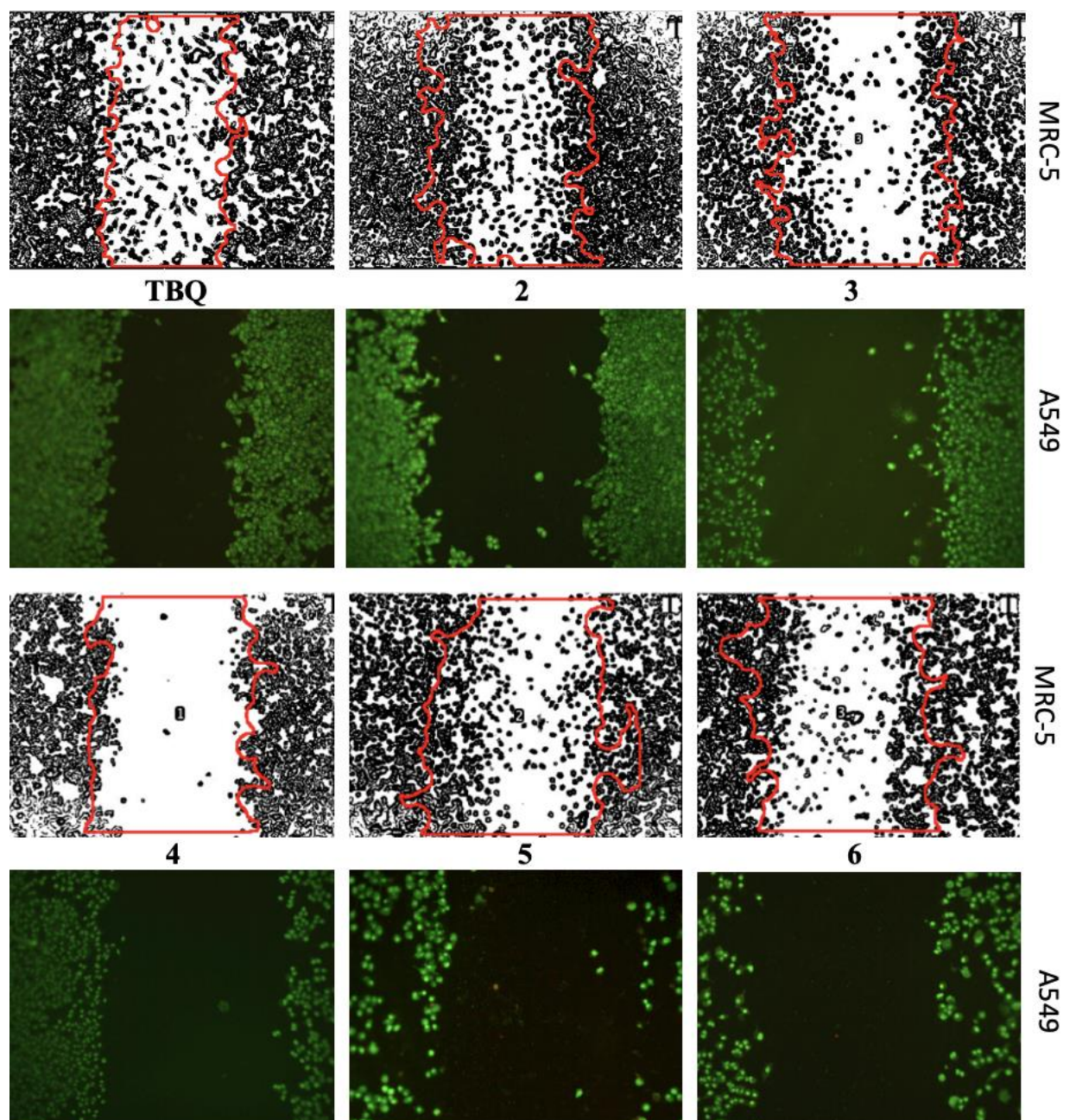
Upoređivanjem citotoksičnog efekta derivata **4** u ćelijskim linijama MRC-5 i HCT116 sa rezultatima dobijenim u metabolički aktivnijoj HepG2 liniji, uočava se smanjenje citotoksičnog efekta. Jedno od objašnjenja može biti aktivnost enzima DT-dijaforaze. DT-dijaforaza (NAD(P)H: hinon-oksidoreduktaza) je flavoenzim koji katalizuje dvoelektronsku redukciju hinona i srodnih jedinjenja i prekomerno je eksprimiran u mnogim tipovima maligno transformisanih ćelija (Siegel i sar., 1998). DT-dijaforaza katalizuje transfer dva elektrona sa TBQ na 2-*terc*-butilhidrohinon (TBHQ), pri čemu je koncentracija potrebna da izazove oštećenje DNK veća od koncentracije koja je potrebna za redukciju TBQ (Morimoto i sar., 1991). S obzirom na to da se enzim DT- dijaforaza nalazi u velikim količinama u ćelijskoj liniji HepG2 (Beyer i sar., 1987), aktivnost ovog enzima može dovesti do smanjenja citotoksičnog efekata TBQ.

Aktivnost enzima DT-dijaforaze smanjuje citotoksičnost TBQ i njegovih derivata i prema drugim ćelijskim linijama poput ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća (engl. non-small cell lung cancer - NSCLC) koji čini oko 85% svih karcinoma pluća i najčešći je uzrok smrti kod oba pola (Siegel i sar., 2013). DT – dijaforaza nije zastupljena u zdravom plućnom tkivu, ali je visoko zastupljena u NSCLC, a njena visoka koncentracija u ćelijama je u korelaciji sa lošom prognozom izlječenja (Li i sar., 2015; Lee i sar., 2017). Najčešće korišćena ćelijska linija za ispitivanje NSCLC je A549 ćelijska linija. Pored DT – dijaforaze, u NSCLC je široko zastupljena i laktat-dehidrogenaza A (LDH-A) čije povećano prisustvo, takođe, koreliše sa lošom terapijskom prognozom i nedovoljnim odgovorom na hemioterapeutske agense (Koukourakis i sar., 2003). Prema istraživanjima Fantin i sar. (2006) i Le i sar. (2010) inhibicija LDH-A dovodi do smrti ćelija raka *in vitro* i *in vivo* usled oksidativnog stresa. Budući da je jedan od mehanizama delovanja hinona produkcija ROS, dobijeni rezultati niske citotoksičnosti TBQ i njegovih alikiltio i ariltio derivata prema ćelijama A549 linije nisu iznenađujući. Ovakav zaključak, dodatno potvrđuje najnižu citotoksičnost derivata **4** na ovoj ćelijskoj liniji koji, kao što je već rečeno, jedino produkcijom ROS može ispoljiti citotoksičnost što je visokom ekspresijom LDH-A onemogućeno.

I drugi proteini mogu imati ulogu u aktivaciji DT-dijaforaze u maligno transformisanim ćelijama. Jedan od primera je NF-κB protein, porodica transkripcionih faktora koji su od centralnog značaja u inflamatornim procesima i imaju važnu ulogu u preživljavanju i proliferaciji brojnih maligno transformisanih ćelija uključujući karcinome dojke, jajnika, debelog creva, pluća, pankreasa i skvamozni karcinom glave i vrata (Bours i sar., 1994; Sovak i sar., 1997; Batra i sar., 1999; Duffey i sar., 1999). NF-κB se konstitutivno aktivira u ćelijskim linijama melanoma, uključujući liniju Hs 294T, kao rezultat pojačane degradacije njegovog inhibitora (Meyskens Jr et al., 1999; McNulty et al., 2004). ROS imaju različite inhibitorne ili stimulatívne uloge u signalnim putevima NF-κB. Aktivnost enzima DT–dijaforaze i gama-glutamyl-transferaze imaju stimulatornu ulogu u aktivaciji NF-κB i tako doprinose preživljavanju i proliferaciji Hs294T ćelija (Brar et al., 2002; Dominici et al., 2003; Pieri et al., 2003). Međutim, i drugi izvori ROS doprinose aktivaciji NF-κB u ćelijskim linijama melanoma. Niska citotoksičnost TBQ i njegovih derivata na Hs294T ćelijskoj liniji može biti posledica produkcije ROS, a derivat **4** je upravo na ovoj ćelijskoj liniji pokazao najnižu citotoksičnost, što potvrđuje stimulatornu ulogu ROS u proliferaciji i preživljavanju Hs294T ćelija.

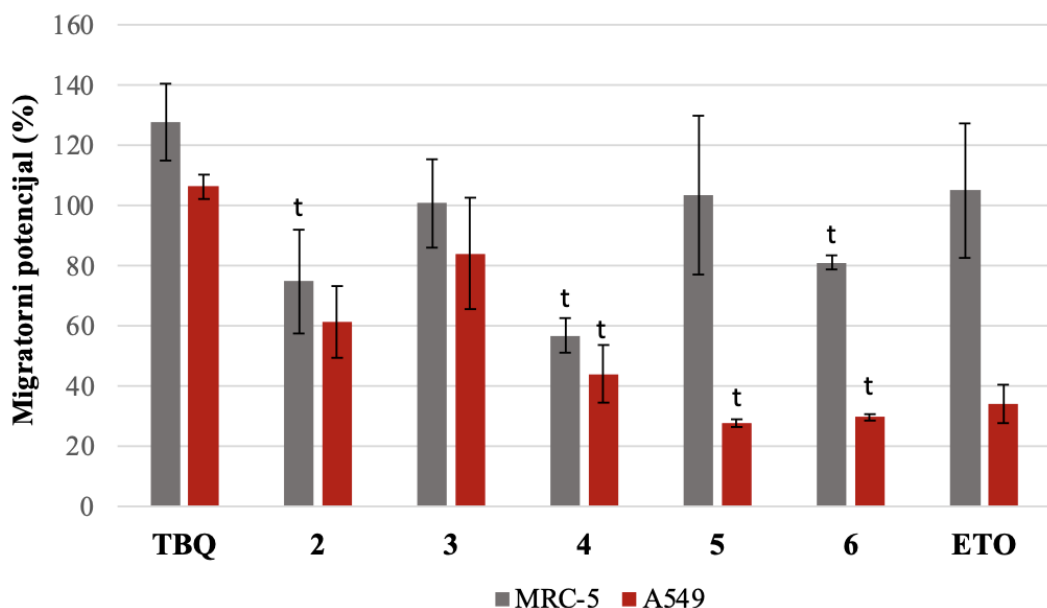
4.7. Uticaj TBQ i njegovih derivata na migratorni potencijal ćelija MRC-5 i A549 linija *in vitro*

Efekat TBQ i njegovih derivata na potencijal migracije ispitivan je Skretch esejom na ćelijama MRC-5 i A549 linija nakon inkubacije od 24h. Uporedni prikaz migratornih slojeva obe ćelijske linije dat je na **Slici 34**. Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti razlika u širini migratornog sloja (definisan crvenom bojom) između MRC-5 i A549 ćelijske linije. Brzina migracije A549 linije ($8,74 \pm 0,18$ nm/h) je u poređenju MRC-5 ($7,20 \pm 1,06$ nm/h) je bila nešto veća.



Slika 34. Migratorni sloj MRC-5 i A549 ćelija nakon tretmana 2-*terc*-butil-1,4-benzohinonom (TBQ) i njegovim alkiltio i ariltio derivatima. Prvi i treći red predstavljaju MRC-5 ćelijsku liniju, pri čemu je crvenom bojom obeležena površina migratornog sloja A549 ćelijske linije kako bi se jasnije uporedila razlika migratornih slojeva između ovih ćelijskih linija.

Da bi se prevazišle razlike u brzini migracije koja je uočena između ćelija MRC-5 i A549 linija tokom rasta bez tretmana, dati su efekti testiranih supstanci na inhibiciju migracije ćelijskih linija u odnosu na njihove kontrole u procentima (**Slika 35**).



Slika 35. Migratorni potencijal ćelija MRC-5 i A549 ćelijskih linija nakon tretmana TBQ-om i njegovim alkiltio i ariltio derivatima prikazana u procentima u odnosu na odgovarajuće kontrole za različite ćelijske linije (sr. vrednost \pm SD). Koncentracija test jedinjenja - 100 μ M. ^t statistički značajna razlika u odnosu na TBQ ($p < 0,05$).

Na osnovu dobijenih rezultata migratornog potencijala uočeno je da svi derivati TBQ dovode do veće inhibicije migracije u odnosu na osnovno jedinjenje TBQ u obe ćelijske linije. U slučaju MRC-5 ćelijske linije, statistički značajno veća inhibicija migracije ($p < 0,05$) u odnosu na TBQ uočena je za derivate **2**, **4** i **6** (oko 25%, 43% i 19% redom). Sa druge strane, na ćelijama A549 linije statistički značajno veća inhibicija migracije u odnosu na TBQ uočena je za derivate **4**, **5** i **6**, pri čemu su derivati **5** i **6** pokazali najjači efekat, bolji i od pozitivne kontrole etopozida.

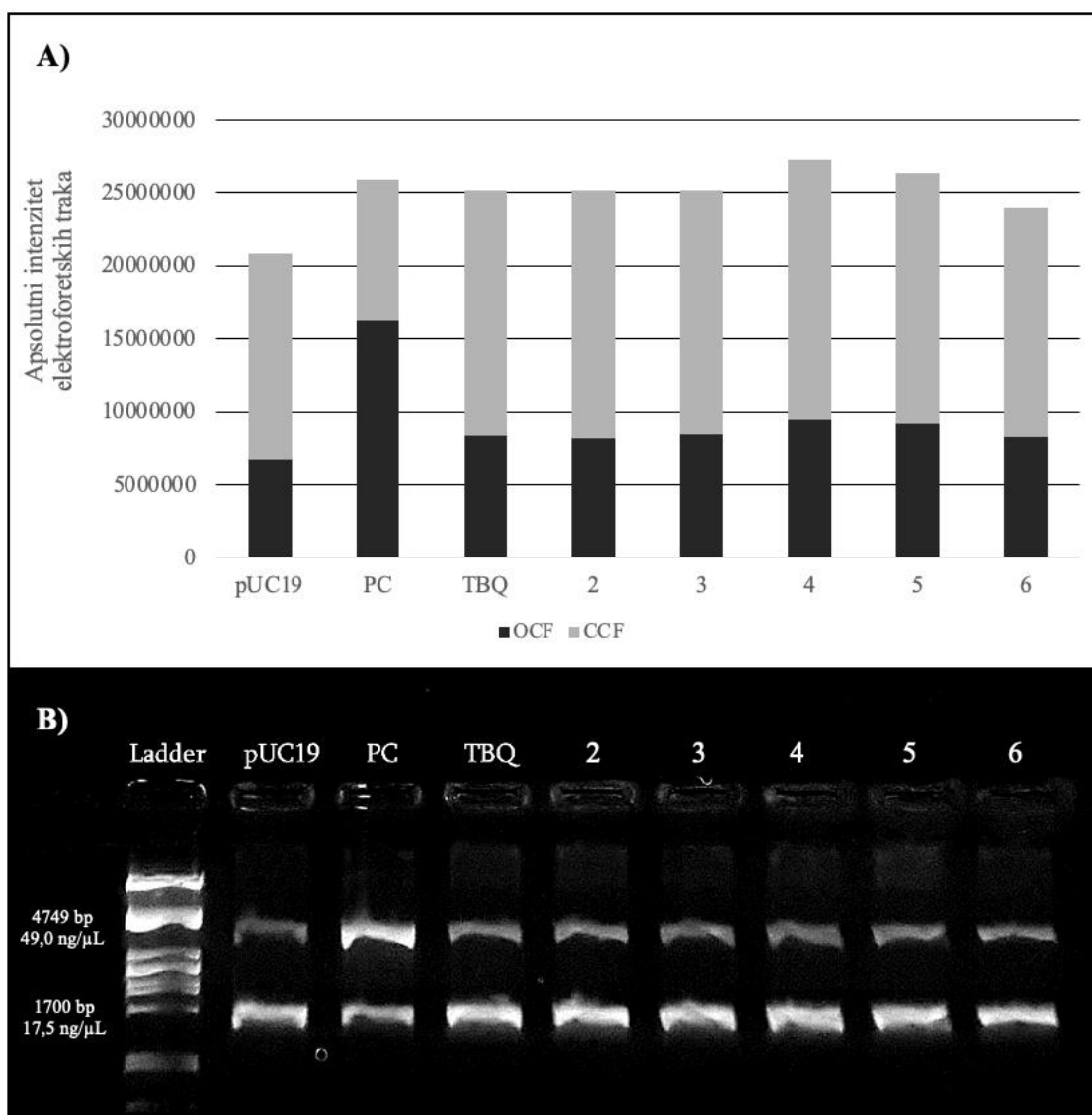
TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati pokazali su jaču inhibiciju migracije prema tumorskim ćelijama A549 linije u odnosu na zdrave MRC-5 ćelije, pri čemu su derivat **5** (SI = 3,7) i derivat **6** (SI = 2,7) pokazali najveću selektivnost prema A549 ćelijskoj liniji. Sličan rezultat je dobijen i za etopozid (SI = 3,07).

Na osnovu rezultata u MTT testu, uočava se selektivni citotoksični efekat derivata **5** prema tumorskim A549 u odnosu na zdrave MRC-5 ćelije. Međutim, istim testom i za iste odabrane ćelijske linije selektivni citotoksični efekat nije uočen za derivat **6**. Budući da su derivati **5** i **6** regioizomeri, moguće objašnjenje za uočenu antimigratornu, ali ne i citotoksičnu selektivnu aktivnost derivata **6**, je njegova slabija citotoksičnost (oko 2,3 puta manja prema ćelijama A549 linije pri koncentraciji derivata od 100 μ M).

4.8. Interakcije TBQ i njegovih derivata sa DNK molekulom

4.8.1. Interakcije TBQ i njegovih derivata na acelularnom model sistemu (plazmidna DNK)

Denzitogram koji predstavlja apsolutni intenzitet elektroforetskih traka nakon tretmana sa TBQ i njegovim derivatima prikazan je na **slici 36A**, dok je reprezentativna slika elektroforetskog gela prikazana na **slici 36B**. Na osnovu dobijenih rezultata apsolutnog intenziteta elektroforetskih traka, TBQ i njegovi derivati nisu doveli do formiranja otvorenog kružnog oblika – OCF koji nastaje usled prekida na DNK molekulu. Do prekida u plazmidnoj DNK je došlo samo nakon tretmana pozitivnom kontrolom (PC), usled pojave ROS nakon UV zračenja i prisustva vodonik-peroksida.



Slika 36. (A) denzitogram gela nakon tretmana sa 2-*terc*-butil-1,4-benzohinonom (TBQ) i njegovim alkiltio i ariltio derivatima. Pozitivna kontrola (PC) se sastoji od UV ozračene smeše 3 mM vodonik-peroksida i plazmida pUC19; OCF-otvorena kružna forma, CCF – zatvorena kružna forma. (B) Agarozni gel plazmida pUC19 posle tretmana; Ladder – DNK/PstI.

Veliki broj jedinjenja male molekulske težine, sintetičkih i prirodnih proizvoda ili njihovih derivata kao što su lekovi (posebno antitumorski agensi), stupaju u interakciju sa molekulima DNK u različitim nekovalentnim režimima koji su: vezivanje za veliki i/ili mali žleb DNK zavojnice, elektrostatičko/alosterno vezivanje i interkalacija u DNK molekul (Almaqwash i sar., 2016). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su pokazali da nema formiranja prekida u plazmidu pUC19 u prisustvu TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata. Ovo je u saglasnosti sa istraživanjima Vilipic i sar. (2016) koji su pratili efekat aminokiselinskih derivata TBQ i istraživanjem Đorđević i sar. (2020), u kojima je pokazano da ne postoji interakcija alkilamino i aralkilamino derivata TBQ sa plazmidnom DNK.

Kako je utvrđeno u radu Vilipic i sar. (2016), prekidi plazmidne DNK hinonima *in vitro* može se objasniti stvaranjem slobodnih radikala nakon nukleofilnog napada ili nakon redukcije hinona, nakon čega sledi reoksidacija hidrohina ili semihinonskog anjon-radikala u hinon. Jedinjenja koja prolaze brzu tautomerizaciju (u ovom radu aminokiselinski derivati TBQ) nisu podložna nukleofilnim

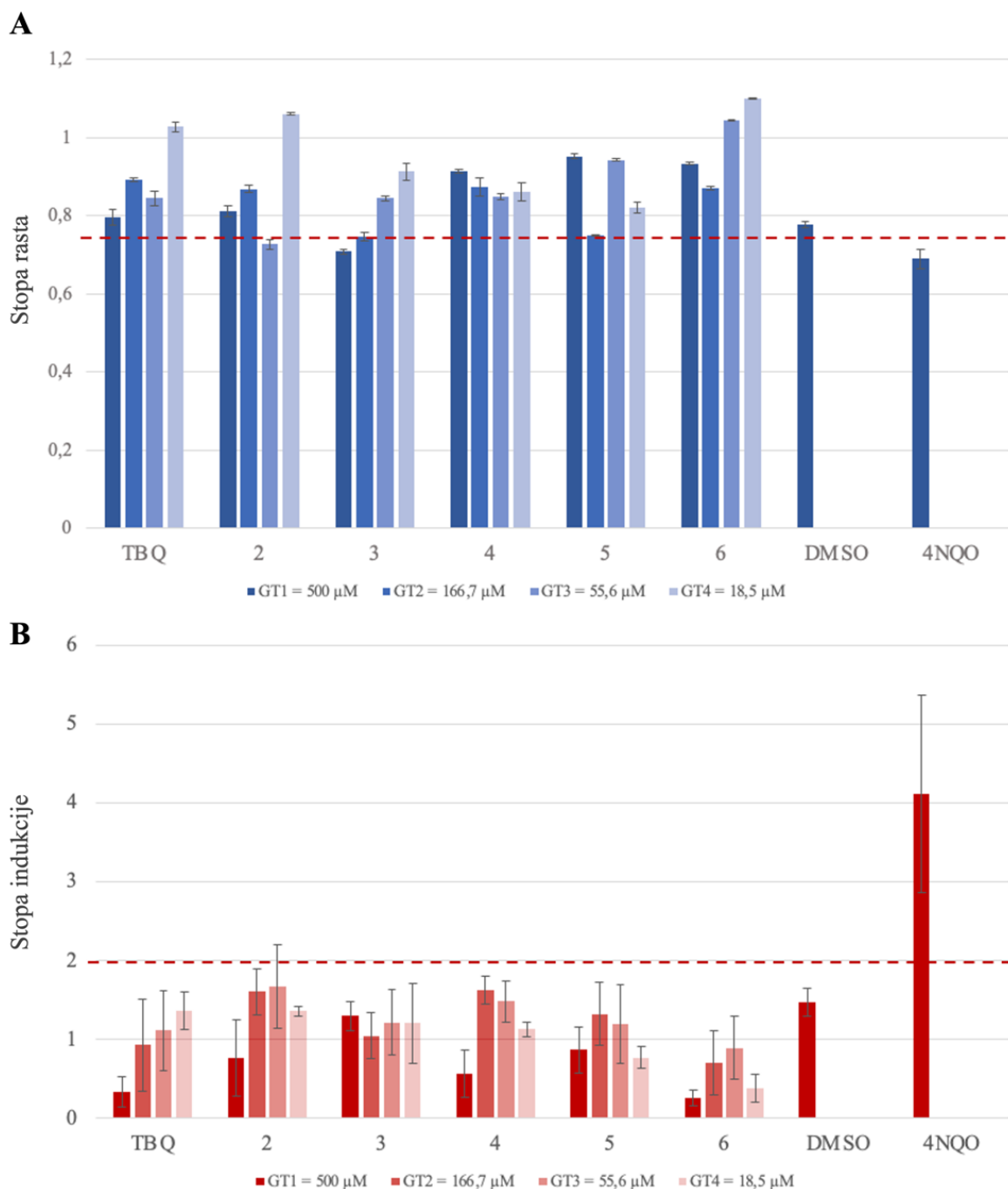
napadima, pa se oštećenje plazmidnog DNK molekula nije očekivalo ni kod alkiltio i ariltio derivata TBQ.

Prema Vilipic i sar. (2016), na osnovu hemijske strukture, glavni mehanizam delovanja aminokiselinskih derivata TBQ na plazmidnu DNK je najverovatnije njihovo vezivanje za male brazde DNK, što bi mogao biti i mehanizam delovanja alkiltio i ariltio derivata TBQ prema plazmidnoj DNK.

4.8.2. Interakcije TBQ i njegovih derivata na prokariotskom model sistemu (SOS/*umuC* testom na *S. typhimurium* TA1535/pSK1002)

Stopa rasta nakon tretmana bakterijskog soja *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 za TBQ i sve ispitivane derivate, kao i za DMSO, iznosila je preko 75%, sa izuzetkom najviše testirane koncentracije derivata **3** (500 μ M) (**Slika 37A**). U odnosu na TBQ, derivati su pokazali sličnu stopu rasta. Pozitivna kontrola 4-nitrohinolin-1-oksid (4NQO) dovela je do inhibicije rasta bakterija za oko 30%.

Stopa indukcije za sva testirana jedinjenja bila je niža od 2, što sugeriše na odsustvo genotoksičnog potencijala. Sa druge strane, genotoksični potencijal je primećen samo kod pozitivne kontrole (4NQO) (**Slika 37B**). Dozno zavisni efekat uočen je jedino za TBQ.



Slika 37. Stopa rasta (A) i stopa indukcije (B) nakon tretmana 2-*terc*-butil-1,4-benzohinonom (TBQ) i njegovim alkiltio i ariltio derivatima (sr. vrednost \pm SD). Ispitivane koncentracije: GT1=500 μ M, GT2 = 166,7 μ M; GT3 = 55,6 μ M i GT4 = 18,5 μ M. DMSO, 4NQO - 4-nitrohinolin-1-oksidi.

U prethodnom radu (Đorđević i sar., 2020), TBQ je u SOS/*umuC* testu pokazao genotoksični potencijal samo na jednoj koncentraciji koja je bila toksična (preživljavanje ćelija niže od 75%). Takođe, još jedan razlog zbog koga su eksperimenti ponovljeni u ovoj doktorskoj disertaciji je i uočena visoka standardna devijacija između replika.

Studijom Bergmanna i sar. (1992) ukazano je da TBQ i manje ekstenzivno jedinjenje TBHQ u prisustvu kiseonika formiraju *terc*-butil semihinonske anjon-radikale u mikrozomima jetre pacova, što može pojačati mutageni potencijal jedinjenja. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata u radu

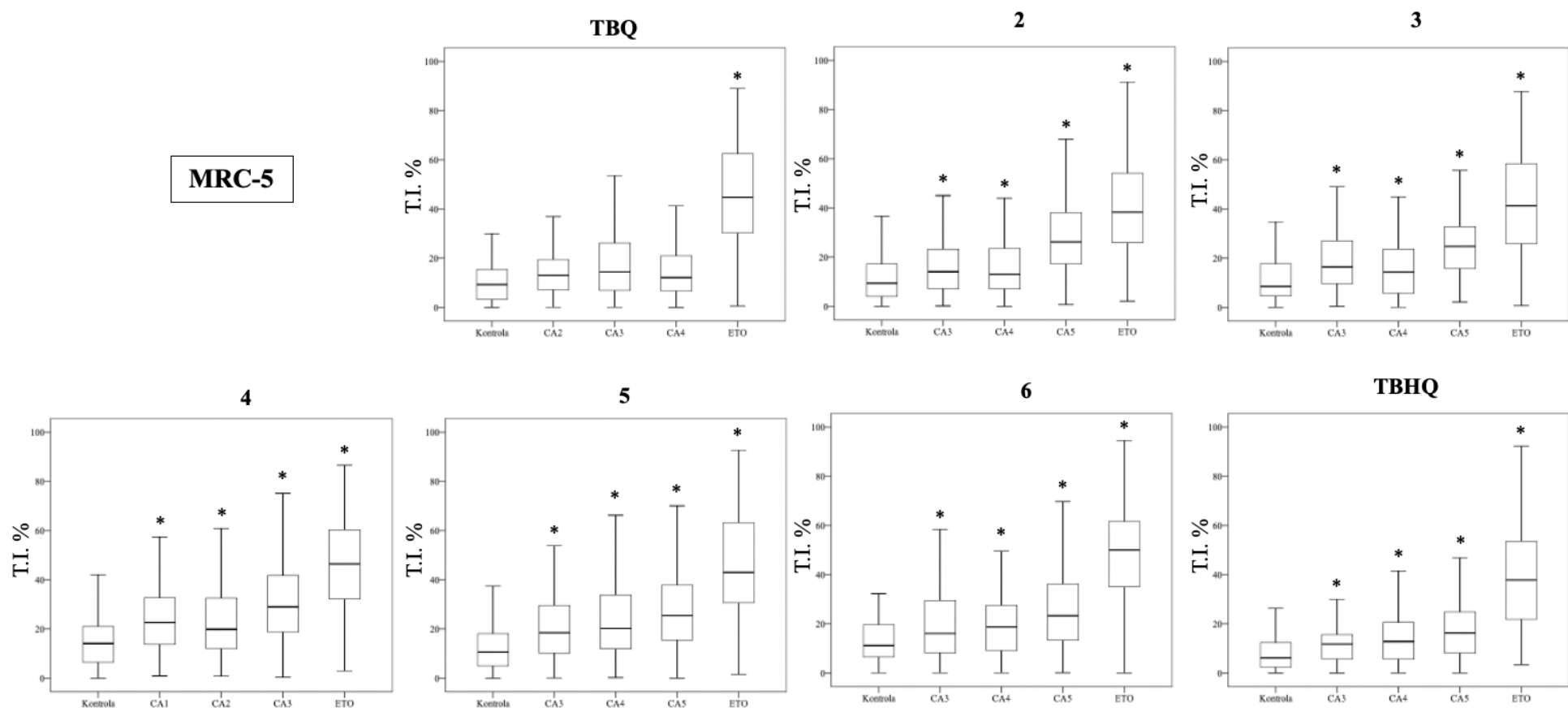
Đorđević i sar. (2020), metaboličkom aktivacijom TBQ mikrozomalnom frakcijom jetre pacova S9, mutageni potencijal nije značajno povećan. U drugim studijama, mutageni potencijal TBQ-a i TBHQ-a, takođe, nije uočen (Abe & Sasaki, 1977; Hageman i sar., 1988; Matsuoka i sar., 1990; Zeiger i sar., 1992).

4.8.3. Interakcije TBQ i njegovih derivata na eukariotskim model sistemima (Komet test)

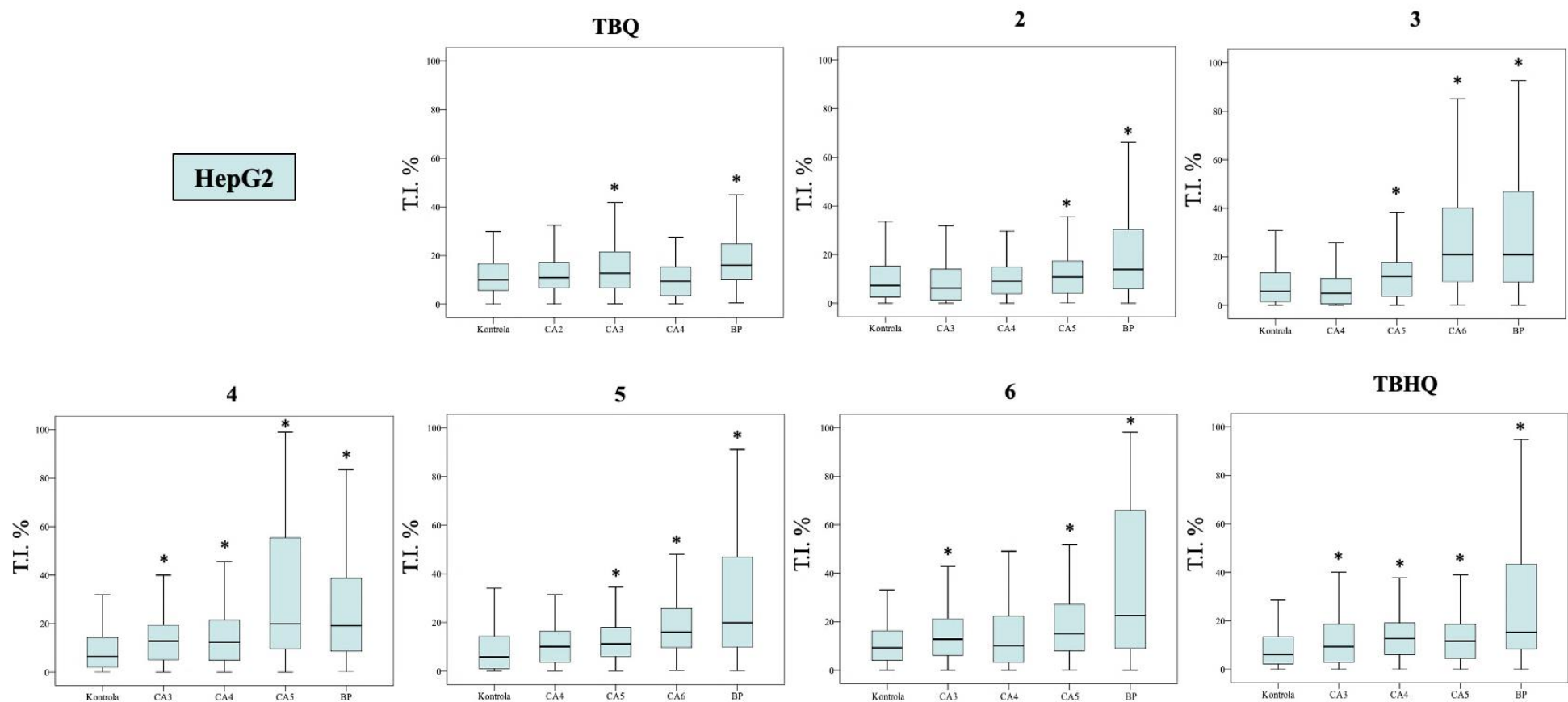
Kako bi se izbegao uticaj citotoksičnosti na interpretaciju rezultata, za određivanje genotoksičnosti komet testom, izabrane su koncentracije test jedinjenja na kojima su MRC-5 i HepG2 ćelije imale vijabilnost veću od 75%. Rezultati citotoksičnosti na navedenim ćelijskim linijama predstavljeni su u **PRILOGU 2**.

Rezultati komet testa, predstavljeni su na osnovu procenta intenziteta repa komete (T.I.%) na dve ćelijske linije, zdravoj MRC-5 (**Slika 38**) i ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma – HepG2 (**Slika 39**). Statistički značajno veće oštećenje DNK nakon tretmana sa TBQ, u odnosu na kontrolu, uočeno je jedino na ćelijama HepG2 linije, pri koncentraciji od $CA_3 = 3,7 \mu\text{M}$ (Đorđević i sar., 2020). TBHQ je na obe ćelijske linije pokazao jači genotoksični potencijal od TBQ. Najviši genotoksični potencijal je pokazao etopozid. Statistički značajan genotoksični efekat na ćelijama MRC-5 linije u odnosu na kontrolu pokazali su svi testirani derivati TBQ, dok je najveći dozno zavisni genotoksični potencijal pokazao derivat **4** (Đorđević i sar., 2022).

Na osnovu rezultata dobijenih na ćelijama HepG2 linije, statistički značajan genotoksični efekat imali su samo pojedini derivati. Kao i prema MRC-5 ćelijama, derivat **4** je imao najjači genotoksični efekat i prema HepG2 ćelijama. Jači genotoksični potencijal u odnosu na pozitivnu kontrolu (bezno[a]piren-BP) nisu pokazali ni TBQ, TBHQ niti alkiltio i ariltio derivati TBQ, izuzev derivata **4** pri njegovoj najvišoj ispitanoj koncentraciji od $33 \mu\text{M}$.



Slika 38. Rezultati komet testa za 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon (TBQ), *terc*-butilhidrohion (TBHQ) i alkiltilio i ariltilio derivate TBQ prema ćelijama MRC-5 linije, predstavljeni parametrom intenziteta repa (T.I. %). Koncentracije ispitivanih jedinjenja: CA₁–0,41, CA₂–1,3, CA₃–3,7, CA₄–11 i CA₅–33 μM; Kontrola - ćelije bez tretmana; ETO - etopozid (33 μM); *značajno povećanje oštećenja DNK u poređenju sa Kontrolom (p<0,05) (Đorđević i sar., 2020, 2022).



Slika 39. Rezultati komet testa za 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon (TBQ) (Đorđević i sar., 2020), *terc*-butilhidrohino (TBHQ) i alkilno i arilno derivate TBQ, prema ćelijama HepG2 linije, predstavljeni parametrom intenziteta repa (T.I. %). Koncentracije ispitivanih jedinjenja: CA₂–1,3, CA₃–3,7, CA₄–11, CA₅–33 i CA₆-100 μM; Kontrola - ćelije bez tretmana; benzo[*a*]piren - BP (50 μM); *značajno povećanje oštećenja DNK u poređenju sa Kontrolom (p<0,05).

U odnosu na alkilamino i aralkilamino derivate TBQ, ispitane u radu Đorđević i sar. (2020), alkiltio i ariltio derivati TBQ pri istim koncentracijama izazivaju veća oštećenja DNK, odnosno imaju jači genotoksični potencijal. Genotoksičnost alkilamino i aralkilamino derivata TBQ na HepG2 ćelijskoj liniji, takođe je ispitana u radu Đorđević i sar. (2020), pri čemu su dobijeni rezultati slični dobijenim rezultatima za alkiltio i ariltio derivate TBQ predstavljenih u ovoj disertaciji.

Za razliku od TBQ i njegovih derivata, avarol i avaron, kao i njihovi metoksi i metilamino derivati, ne ispoljavaju genotoksični potencijal u istom opsegu koncentracija na ćelijama MRC-5 i A549 linija kao i na ćelijskoj liniji periferne krvi čoveka, izuzetak je jedino uočen za derivate avarona 3'-metoksiavaron i 3'-(metilamino)avaron (Kolarević i sar., 2019).

Budući da se različitim metaboličkim procesima TBQ redukuje u TBHQ, uz istovremenu mogućnost oksidacije TBHQ u TBQ, rađeno je ispitivanje genotoksičnosti za oba jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata za obe ćelijske linije, TBHQ je pokazao veću genotoksičnost u odnosu na TBQ i značajno doveo do oštećenja DNK molekula pri svim testiranim subtoksičnim koncentracijama.

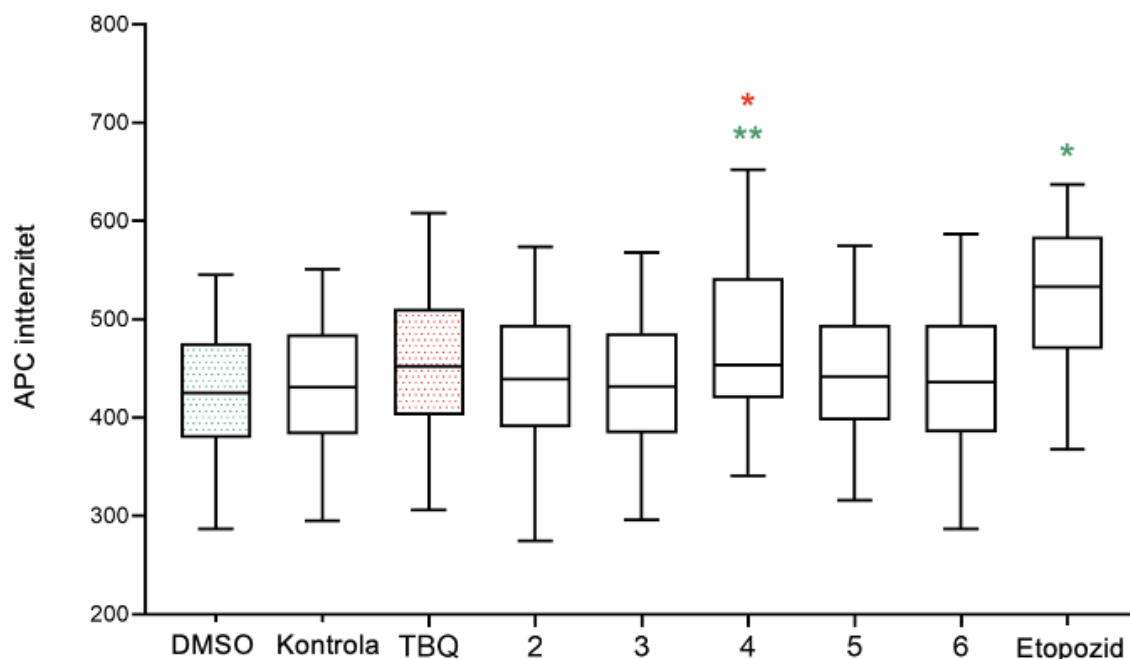
Rezultati ranijih studija genotoksičnosti TBQ i TBHQ su kontradiktorni. U velikom broju istraživanja nisu primećeni genotoksični i mutageni potencijal TBQ i TBHQ (Abe & Sasaki, 1977; Hageman i sar., 1988; Matsuoka i sar., 1990; Zeiger i sar., 1992). U radu Rogers i sar. (1993), utvrđeno je da je TBQ citotoksičan, ali ne i genotoksičan za ćelije V79 linije, uz nizak genotoksični efekat na ćelije *S. cerevisiae*, dok TBHQ nije pokazao genotoksični potencijal. TBHQ nije pokazao genotoksičnost ni mikronukleus testom u koštanoj srži miša u istraživanju Nacionalnog toksikološkog programa iz 1995 (Gharavi i sar., 2007). Sa druge strane, postoje i druga istraživanja koja upućuju da TBQ i TBHQ mogu proizvesti genotoksični i mutageni potencijal (Giri i sar., 1984; Mukherjee i sar., 1988; Phillips i sar., 1989; van Esch, 1986; Matsuoka i sar., 1990; EFSA 2004). U pojedinim istraživanjima sugerise se da je upravo TBQ aktivni metabolit TBHQ koji uzrokuje oštećenje DNK preko produkcije ROS (Morimoto i sar. 1991; Dobo & Eastmond, 1994).

Zbog svega navedenog, nakon opsežne analize, Zajednički stručni komitet FAO/WHO za aditive u hrani (JECFA, engl. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) i Evropska agencija za bezbednost hrane, 2004. godine donosi odluku da su negativni rezultati Nacionalnog toksikološkog programa iz 1995. godine dovoljno ubedljivi i zaključuju da je malo verovatno da će TBHQ biti genotoksičan *in vivo* pod uslovima upotrebe kao antioksidanta (Gharavi i sar., 2007).

Budući da TBHQ ima izuzetno široku primenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, kontroverze u vezi ispitivanja njegove i genotoksične aktivnosti njegovog metabolita TBQ nisu iznenađujuće.

4.8.4. Indukcija dvolančanih oštećenja DNK molekulom TBQ i njegovim derivatima (γ H2AX test)

Indukcija DNK dvolančanih oštećenja (DSBs) TBQ-om i njegovim alkiltio i ariltio derivatima (koncentracija od 33 μ M) određena je γ H2AX testom na ćelijama HepG2 linije. Na osnovu dobijenih rezultata, samo je u tretmanu derivatom **4** indukovano formiranje DSBs (**Slika 40**).



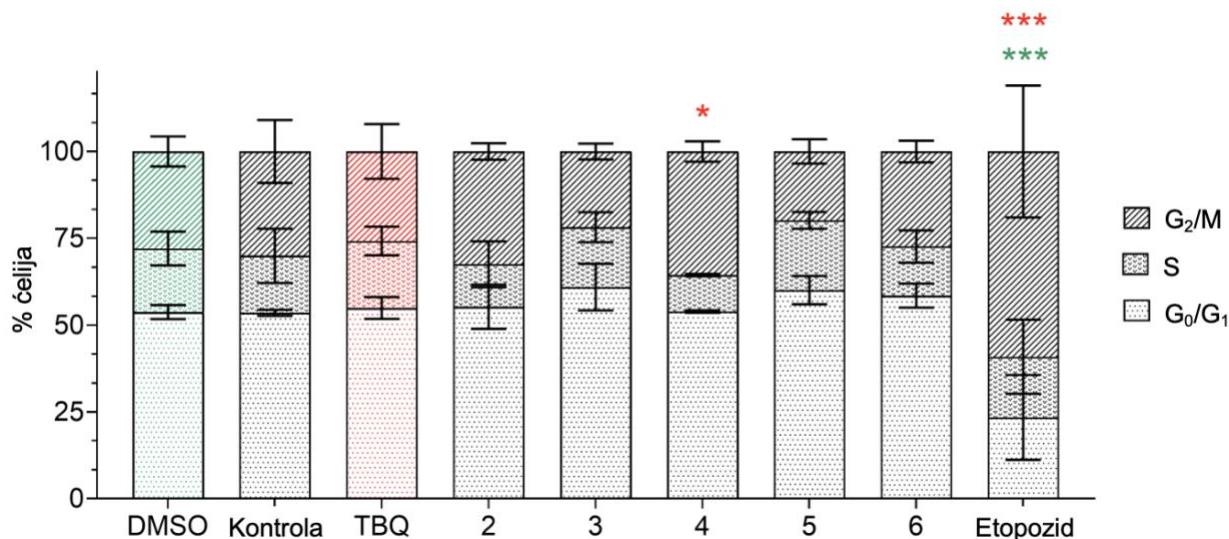
Slika 40. Intenzitet anti-H2AX pS139 antitela (APC intenzitet) nakon tretmana 2-*terc*-butil-1,4-benzohinonom (TBQ) i njegovim alkiltio i ariltio derivatima (33 μ M) na ćelijama HepG2 linije. Kontrola rastvarača (DMSO), kontrola medijuma (Kontrola), pozitivna kontrola - Etopozid. *značajno povećanje (linearni mešoviti model efekta – nlme) indukcije DNK DSBs u poređenju sa Kontrolom (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) i TBQ (* $p < 0.05$).

Kao što je već ranije rečeno, toksičnost hinona se može ispoljiti i preko formiranja kovalentnih veza sa biološkim molekulima Michaelovom adicijom. U tom slučaju hinoni reaguju sa glutathionom kroz neenzimsku reakciju Michaelove adicije, što dovodi do pojave redukovanih adukata glutathion-hidrohinona, koji se mogu ponovo oksidovati u hinon. Ovaj redoks ciklus iscrpljuje ćelijski glutathion i izaziva oksidativni stres, odnosno produkciju ROS (Song i sar., 2008). ROS uzrokuju oštećenja DNK kroz oksidativnu modifikaciju DNK baza, spontanu hidrolizu nukleozida i formiranje DSBs (Khanna & Jackson, 2001). Budući da derivat **4** snažno indukuje oslobađanje ROS, formiranje DSBs je očekivano.

4.9. Analiza uticaja TBQ i njegovih derivata na zaustavljanje ćelijskog ciklusa

U ovoj disertaciji, efekti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata na progresiju ćelijskog ciklusa HepG2 određeni su protočnom citometrijom (**Slika 41**). TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati nisu uticali na značajno povećanje ili smanjenje faza ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolu. Najjači efekat je primećen za derivat **4** sa statistički značajnim povećanjem populacije G₂/M faze ($p < 0,05$ u odnosu na TBQ) praćeno smanjenjem populacije S faze. Derivat **4** je povećao populaciju G₂/M faze sa oko 27% (TBQ) na 34% ukupne populacije i sa 2,25 puta smanjenjem populacije S faze.

Pozitivna kontrola etopozid je dovela do statistički značajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa HepG2 ćelija u G₂/M fazi ($p < 0,01$ u odnosu na kontrolu i TBQ). Etopozid indukuje oštećenje DNK inhibicijom enzima topoizomerase II nakon čega se ćelijski ciklus zaustavlja i, ukoliko se oštećenje ne popravi mehanizmima popravke DNK, dolazi do smrti ćelije sa akumulacijom u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa (Burden i sar., 1996, Jamil i sar., 2015).



Slika 41. Analiza protočnom citometrijom distribucije ćelija HepG2 u ćelijskom ciklusu nakon 24h izlaganja 2-*terc*-butil-1,4-benzohinonom (TBQ) i njegovim alkiltio i ariltio derivatima. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD od 3 nezavisna eksperimenta sprovedena u tri primerka. * statistička značajnost (*chi-squared test*) u poređenju sa negativnom kontrolom – Kontrola (***) $p < 0,01$) i TBQ (* $p < 0,05$; *** $p < 0,01$).

Eukariotski ćelijski ciklus je strogo regulisan kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa kako bi se minimizirala oštećenja DNK molekula i osigurao genomski integritet tokom ćelijskog ciklusa (de Gooijer i sar., 2017). Kada tokom G₂ faze ćelijskog ciklusa dođe do DSBs DNK molekula, aktivira se ATM kinaza (kinaza sa mutiranom ataksijom-telangiektazijom) koja aktivira kinazu kontrolne tačke ćelijskog ciklusa 2 (CHK2), koja dalje koordinira zaustavljanje ćelijskog ciklusa i blokira ćeliju da uđe u mitozu (Lee & Paull, 2005; Fernando i sar., 2021). Budući da je derivat 4 (za razliku od TBQ) indukovao DSBs u γ H2AX testu, povećano zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G₂/M fazi je očekivani rezultat.

U dosadašnjim istraživanjima nije jasno utvrđen način ćelijske smrti izazvane TBQ. Shi i sar. (2014) su dokazali da tretman sa TBQ dovodi do gubitka integriteta mitohondrijalne membrane, što ukazuju na apoptozu kao način smrti ćelije. TBQ je pokazao apoptotičke karakteristike i u istraživanju Okubo i sar. (2003), međutim, u istom radu nije primećena oligonukleozomalna degradacija nuklearne DNK ili nuklearna fragmentacija, što ukazuje da efekti TBQ nisu bili tipično apoptotični, ali je bilo nemoguće zaključiti ni da su efekti izazvani nekrozom. Iako se na apoptozu i nekrozu dugo gledalo kao na međusobno isključive, sve je više dokaza da one predstavljaju samo krajnje krajeve širokog spektra mogućih morfoloških i biohemijskih smrti i da mogu biti rezultat istog stimulusa (Kroemer i sar., 1998; Brown i sar., 1999; Fiers i sar., 1999; Zeiss, 2003). To može biti slučaj i sa TBQ i njegovim alkiltio i ariltio derivatima.

5. GENERALNA DISKUSIJA

U ovom poglavlju uporedno su predstavljeni najznačajniji rezultati dobiveni u ovoj disertaciji i navedene smernice za dalja istraživanja. Najveći deo ove disertacije obuhvata ispitivanje antimikrobne, citotoksične i genotoksične aktivnosti TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata zbog čega će generalna diskusija biti najviše fokusirana na ove tri biološke aktivnosti.

Antimikrobna aktivnost

Derivati TBQ nisu pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost prema gram-negativnim bakterijama. Sa druge strane, ohrabruju rezultati za MIK koji su dobiveni za derivate **5** i **6** (MIK = 15,6 μ M i 31,2 μ M, redom) prema gram-pozitivnoj bakteriji *S. aureus*. Ova bakterija je čest uzročnik oportunističkih bakterijskih infekcija ljudi, uključujući kožu i druga meka tkiva, kosti, krvotok i respiratorni trakt (David & Daum, 2017). Navedeni soj je brzo stekao rezistenciju na antibiotike penicilin, meticilin, a u novije vreme i vankomicin, dok je prema pojedinim istraživanjima, meticilin rezistentan *S. aureus* (MRSA) prisutan u čak 29% bakterijskih izolata u Evropi (de Kraker i sar., 2013; David & Daum, 2017). Rešenje ovog problema može biti pronalazak novih, biološki aktivnih jedinjenja prirodnog ili sintetičkog porekla. Tako su Hou i sar. (2018) izvršili visoko tehnološki skrining biblioteke biološki aktivnih jedinjenja zasnovane na prirodnim proizvodima i lekovima i predložili grupu jedinjenja sa hinonskim motivom u hemijskoj strukturi kao potencijalne antimikrobne agense prema *S. aureus*. Ukazali su da se njihovo antimikrobno delovanje ogleda u alkilovanju ćelijskih nukleofila što inhibira Sortazu A, koja vezuje površinske proteine za ćelijski zid i pomaže formiranje biofilma.

Jedan od mehanizma delovanja derivata **5** i **6**, koji su takođe hinonske hemijske strukture, je alkilovanje ćelijskih nukleofila, što ukazuje da inhibicija Sortaze A može biti jedan od načina njihovog antimikrobnog delovanja prema *S. aureus*. Ipak, derivat **5** prema klasifikaciji predstavljenoj u radu Cesa-Luna i sar. (2019) pokazuje srednje jaku antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* (MIK između 10 do 30 μ M), dok se derivat **6** nalazi na granici ka niskoj aktivnosti (MIK > 30 μ M).

Navedeno ukazuje da derivat **5** nema dovoljno dobru antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus*, ali da od svih ostalih testiranih derivata TBQ, pokazuje najbolji potencijal za kreiranje dobrog antimikrobnog agensa odgovarajućim hemijskim modifikacijama. Dodatni testovi koji bi uključili ispitivanje efekta derivata **5** i **6** na formiranje biofilma, kao i ispitivanje njihovog delovanja na Sortazu A, mogu biti naredni koraci u ispitivanju njihovog antimikrobnog potencijala. Sinergično dejstvo derivata sa drugim antimikrobnim agensima, takođe, može biti jedna od smernica za dalja istraživanja.

Citotoksična aktivnost

TBQ i njegovi derivati uglavnom su pokazali umerenu citotoksičnost prema ispitivanim ćelijskim linijama, izuzev derivata **4** koji je prema ćelijama MRC-5 i HCT 166 linija pokazao snažno citotoksično delovanje, jače i od hemioterapeutika etopozida. Ispitivana jedinjenja nisu pokazala značajno selektivno delovanje, odnosno jaču citotoksičnost prema tumorskim u odnosu na zdravu ćelijsku liniju MRC-5. Ipak, selektivni efekat na inhibiciju migracije uočen je za derivat **5** prema ćelijama adenokarcinoma pluća (A549 linija) u odnosu na zdrave ćelije fibroblasta pluća (MRC-5 linija), što je ispitivanjem inhibicije migratornog potencijala dodatno potvrđeno (3,7 puta jača aktivnost). Njegov regioizomer, derivat **6**, takođe, je doveo do jače inhibicije migracije tumorskih u odnosu na zdrave ćelije (2,7 puta).

Dosadašnja istraživanja citotoksičnosti TBQ nisu dala dovoljno jasan uvid u njegove mehanizme delovanja, dok ispitivanja mehanizama citotoksičnosti njegovih derivata nisu rađena. Na

osnovu hemijske strukture TBQ, predložena su dva molekularna mehanizma: kovalentno vezivanje za makromolekule i formiranje ROS što dovodi do oksidativnog stresa (O'Brien, 1991; Bolton i sar., 2000; Okubo i sar., 2003; Siraki i sar., 2004; Pérez-Rojas i sar., 2011).

Za razliku od svih drugih ispitivanih jedinjenja, derivat **4** nije u mogućnosti da izvrši kovalentno vezivanje za makromolekule, pa svoju citotoksičnost ispoljava jedino produkcijom ROS. To je potvrđeno NBT testom gde je upravo derivat **4** pokazao najvišu produkciju ROS na HCT 116 ćelijskoj liniji. Istim testom je potvrđen molekularni mehanizam produkcije ROS i za TBQ i ostale derivate. Iako regioizomeri, derivat **5** je pokazao manju aktivnost u produkciji ROS u odnosu na derivat **6**, što je posledica njegovog jačeg antioksidativnog potencijala koji je potvrđen DPPH testom. Međutim, ovde se postavlja pitanje: Kako TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati istovremeno imaju i prooksidativno delovanje, odnosno produkuju ROS i antioksidativno delovanje, "hvataju" ROS?

Na prvi pogled, kontradiktorni rezultati između citotoksičnosti derivata kao posledica produkcije ROS i prethodno opisanog antioksidativnog dejstva derivata, mogu se objasniti činjenicom da antioksidativni suplementi, kao što su vitamini i/ili flavonoidi, u uslovima povećanog oksidativnog stresa, takođe, pojačavaju prooksidativni efekat (Pérez-Torres i sar., 2017).

Maligne ćelije često poseduju povećane nivoe ROS što je posledica metabolizma, mitohondrijalne disfunkcije, gubitka funkcionalnog p53 i aktivacije određenih proonkogeno (Trachootham i sar., 2006, 2009; Verrax i sar., 2011). ROS imaju važnu ulogu u posredovanju progresije malignih bolesti tako što promovišu angiogenezu, metastaze, izbegavanje imunološkog sastava i remete antioksidativni status organizma. Ukoliko je homeostaza antioksidativnog sistema narušena u malignim ćelijama, zdrave ćelije poseduju antioksidativni sistem koji im omogućava da kontrolišu nivo ROS, te tako preveniraju štetan efekat do koga oni dovode. Na taj način zdrave ćelije čvrsto kontrolišu ravnotežu između produkcije ROS i njihove eliminacije pomoću antioksidanata. Kao posledica toga, zdrave ćelije mogu tolerisati određeni nivo egzogenih ROS, dok maligne ćelije nemaju tu sposobnost i naročito su osetljive na narušavanje redoks sistema (Trachootham i sar., 2009). Zbog toga je upotreba jedinjenja, koja moduliraju redoks sistem tako što dovode do povećanog stvaranja ROS ili inhibiraju antioksidativni sistem, jedan od načina tretmana malignih bolesti.

Verrax i sar., 2011 su razvili novu strategiju u terapiji malignih bolesti zasnovanu na upotrebi farmakoloških koncentracija askorbinske kiseline i redoks-aktivnih hinona. Prema ovoj strategiji, hinoni bi generisali formiranje ROS i izazivali oksidativni stres koji bi doveo do smrti malignih ćelija, dok bi askorbinska kiselina svojim antioksidativnim delovanjem modulirala redoks sistem i zaštitila zdrave ćelije od štetnog delovanja ROS.

TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati su DPPH testom pokazali jaču antioksidativnu aktivnost od askorbinske kiseline što, zajedno sa prooksidativnim potencijalom, ovim jedinjenjima daje osobine redoks modulatora. Kombinacijom sa drugim antioksidantima poput askorbinske kiseline i sl. mogao bi se dodatno modulirati redoks sistem, što bi dovelo do neutralisanja malignih i zaštite zdravih ćelija. Na osnovu svih dobijenih rezultata, derivati **4**, **5** i **6** bi zbog antioksidativnog i prooksidativnog delovanja, snažnog citotoksičnog delovanja (derivat **4**) i izraženog selektivnog efekta na inhibiciju migracije tumorskih ćelija (derivati **5** i **6**) bili najbolji kandidati za eventualna dalja istraživanja kao potencijalni hemioterapeutici. Ipak, akcenat treba staviti na njihovo kombinovano delovanje sa antioksidantima kako bi se povećao selektivni efekat i smanjila neželjena dejstva, naročito visoka toksičnost uočena za derivat **6**.

Genotoksična aktivnost

Iako ne interaguju sa acelularnom DNK (ispitan na modelu plazmidne DNK – plazmid pUC19) niti pokazuju genotoksični efekat (ispitan SOS/*umuC* testom na *S. typhimurium*), alkiltio i ariltio derivati TBQ ispoljavaju genotoksičnost na humanim ćelijskim linijama. Na osnovu γ H2AX eseja, genotoksičnost TBQ na ćelijama HepG2 linije posledica je jednolančanih DNK prekida i

oštećenja DNK na alkalno labilnim mestima najverovatnije kombinovanim delovanjem: kovalentnim vezivanjem za DNK preko Michaelove adicije i produkcijom ROS. Jedini izuzetak je uočen za derivat **4** koji zbog hemijske strukture dovodi do dvolančanih oštećenja DNK isključivo produkcijom ROS. Derivat **4** je na osnovu komet testa najjači genotoksični agens u odnosu na sva testirana jedinjenja.

Kod svih derivata zabrinjavajuća je veća genotoksičnost uočena na zdravim MRC-5 ćelijama u odnosu na tumorske HepG2 ćelije. Takav neselektivni efekat uočen je i u ispitivanju citotoksičnosti MTT i MTS testovima gde su TBQ i derivati pokazali jači efekat na MRC-5 u odnosu na HepG2 ćelije.

Neselektivni genotoksični efekat derivata TBQ predstavlja veliku prepreku za njihovu eventualnu primenu u terapiji malignih bolesti jer bi oštećenje DNK zdravih ćelija mogao dovesti do sekundarnih maligniteta.

Ipak, kada se upoređi genotoksičnost alkiltio i ariltio derivata TBQ sa genotoksičnošću pozitivnih kontrola etopozida i benzo[*a*]pirena, može se uvideti da su pozitivne kontrole imale jači genotoksični efekat. Benzo[*a*]piren ima drugačiji mehanizam delovanja od hinona, kancerogen je i nije hemioterapeutik (citotoksični agens) (Collins i sar., 1991), pa je zbog toga njegova jača genotoksičnost u odnosu na derivate TBQ i očekivana. Međutim, etopozid jeste citotoksični agens i njegova citotoksičnost proizilazi iz sposobnosti da stabilizuje kovalentni kompleks između DNK topoizomerase II i DNK, što dovodi do visokog nivoa oštećenja DNK (Montecucco & Biamonti, 2007). Ipak, pored izražene genotoksičnosti, ovaj lek ima visoku kliničku primenu u terapiji različitih malignih oboljenja poput raka testisa, prostate, bešike, želuca i pluća (Reyhanoglu & Tadi, 2022). Takođe, i drugi citotoksični agensi koji se koriste u terapiji malignih bolesti izazivaju visok nivo oštećenja DNK molekula, što može dovesti do sekundarnih maligniteta, ali budući da moderna medicina nije još uvek pronašla alternativni način terapije, genotoksičnost se prihvata kao “nužno zlo”.

Utvrđena genotoksičnost može ali i ne mora biti posledica citotoksičnosti, zbog čega su potrebne dodatne analize mehanizama delovanja TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivata. Modifikovanim komet test sa određenim bakterijskim enzimima koji prepoznaju oksidovane purinske i pirimidinske baze, tkz. FPG modifikovan komet test, omogućilo bi se određivanje oštećenja DNK koja su posledica ROS-a (Tice i sar., 2000). Ukoliko bi se utvrdilo da su oksidativna oštećenja dominantan mehanizam genotoksičnog delovanja TBQ i njegovih alkiltio i ariltio derivatima, kombinovan tretman sa antioksidantima mogao bi prevenirati povećanu genotoksičnost u zdravim ćelijama.

Uporedna analiza biološkog potencijala derivata u odnosu na TBQ

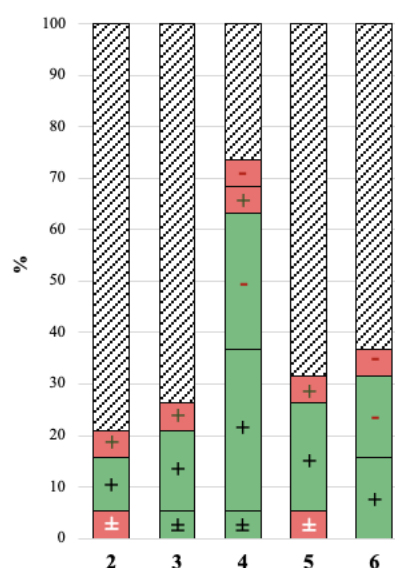
Na osnovu svih dobijenih rezultata za svaki ispitivani parametar, a kako bi se uporedile biološke aktivnosti derivata i osnovnog jedinjenja, konstruisana je tabela efikasnosti derivata TBQ u odnosu na TBQ (**Slika 42**). Za konstruisanje tabele efikasnosti uzeti su samo parametri koji su pokazali statistički značajnu razliku.

Alkiltio i ariltio derivati TBQ su, uglavnom, pokazali jaču biološku aktivnost u odnosu na TBQ što ukazuje da je navedeno jedinjenje dobar model za sintezu derivata sa većim biološkim potencijalom.

A)

		2	3	4	5	6
ANTIOKSIDATIVNI EFEKAT						
PRODUKCIJA ROS-a		±	±	±	±	
ANTINEURODEGENERATIVNI EFEKAT			+	+		
ANTIMIKROBNI EFEKAT	MIK			+	+	+
	invazija PAO1					-
TOKSIČNOST		+		+	+	-
CITOTOKSIČNOST (72h)	MRC-5			-		
	Hs 294T					
	A549		+	-		-
	HCT 116	+		+	+	
	HepG2		+	+	+	
INHIBICIJA MIGRACIJE ČELIJA	MRC-5	+		+		+
	A549			+	+	+
GENOTOKSIČNOST	pUC19					
	SOS/ <i>umuC</i>					
	komet-MRC-5			-		
	komet-HepG2		+	-		-
	DSBs			-		
UTICAJ NA ČELIJSKI CIKLUS				-		

B)



Slika 42. A) Uporedni prikaz jačine biološke aktivnosti derivata TBQ u odnosu na TBQ. Crvenom bojom su obeležene statistički značajno slabije, a zelenom jače aktivnosti u odnosu na TBQ. Siva boja prikazuje rezultate bez statističke značajnosti ($p > 0,05$). Oznaka „+“ predstavlja pozitivan, a oznaka „-“ negativan biološki efekat dok oznaka „±“ predstavlja biološku aktivnost čiji se efekat razlikuje u zavisnosti od biološkog procesa. **B)** procentualni udeo svakog od navedenih parametara.

Derivat 2 nije pokazao statistički značajno jaču biološku aktivnost u odnosu na TBQ ni za jedan ispitivani parametar, izuzev jačeg citotoksičnog potencijala prema ćelijama HCT 116 linije i značajno jače inhibicije migracije ćelija MRC-5 linije. Budući da pokazuje i nizak citotoksični potencijal, najverovatnije kao posledicu slabije produkcije ROS (značajno slabije u odnosu na TBQ), jedino uz dodatne hemijske modifikacije ili kombinovanim delovanjem sa drugim biološki aktivnim jedinjenjima, može se klasifikovati kao potencijalni hemioterapeutski agens. Ipak, derivat 2 nije pokazao toksičnost niti genotoksični potencijal ni na jednom od testiranih modela, što su njegove pozitivne karakteristike.

Derivat 3 je pokazao najjaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na sva testirana jedinjenja i statistički značajno jaču produkciju ROS i antineurodegenerativnu aktivnost u odnosu na TBQ. Dalja istraživanja bi mogla biti usmerena ka njegovoj eventualnoj primeni kao antioksidativnog sredstva ili antineurodegenerativnog agensa. Dodatno, ovaj derivat je pokazao jači citotoksični potencijal na ćelijama A549 i HepG2 linija u odnosu na TBQ. Budući da derivat 3 ima najmanje voluminozan

supstituent na hinonskom jezgru u odnosu na sve ostale TBQ derivate, njegova hemijska struktura bi mogla imati značajnu ulogu za citotoksični potencijal. Međutim, jači citotoksični potencijal na ćelijama HepG2 linije rezultirao je i jačom genotoksičnošću koja je uočena komet testom.

Hemijska struktura **derivata 4** je omogućila višestruko povećanje biološkog potencijala. U gotovo svim ispitanim biološkim aktivnostima, derivat **4** je pokazao jači efekat u odnosu na TBQ, izuzev slabije toksičnosti i citotoksičnosti na ćelijama A549 linije. Na osnovu svih dobijenih rezultata u ovom radu, derivat **4** pokazuje najjaču biološku aktivnost koja se ogleda u zadovoljavajućem citotoksičnom efektu prema ćelijama MRC-5 i HCT116 linija, umerenoj citotoksičnosti prema ostalim ćelijskim linijama, nižoj migraciji ćelija MRC-5 i A549 linija, boljoj antioksidativnoj aktivnosti od askorbinske kiseline, najjačoj produkciji ROS u odnosu na sve druge derivate i TBQ, jačim antineurodegenerativnim efektom u odnosu na sve derivate (statistički značajno u odnosu na TBQ) i jačoj antimikrobnoj aktivnosti od TBQ (8 puta jačoj prema bakteriji *E. faecalis*). Međutim, derivat **4** generiše DSB-s što dovodi i do povećanja populacije G₂/M faze tokom ćelijskog ciklusa. Dodatno, komet testom je utvrđeno da pokazuje genotoksični potencijal prema ćelijama zdravih (MRC-5) i tumorskih (HepG2) linija, najverovatnije kao posledicu jače citotoksičnosti produkcijom ROS. Ipak, genotoksičnost bi se mogla smanjiti kombinovanim delovanjem sa antioksidantima ili hemijskom modifikacijom samog jedinjenja, a ukoliko bi se na taj način povećala selektivnost, ovo jedinjenje bi bilo odličan kandidat za hemioterapeutik.

Derivat 5 dovodi do slabije produkcije ROS u odnosu na TBQ. Ispitivanjem antimikrobnog potencijala, utvrđeno je da je njegova aktivnost prema *S. aureus* čak 8 puta jača u odnosu na TBQ. Na osnovu navedenog, ovaj derivat može biti dobar kandidat za antimikrobni agens, potencijalno na MRSA. Dodatne pozitivne karakteristike, uočene za derivat **5**, su jači citotoksični potencijal prema tumorskim ćelijama HCT 116 i HepG2 linija kao i 3,7 puta jači efekat na migraciju tumorskih ćelija A549 linije u odnosu na zdrave ćelije MRC-5 linije. Na svim model sistemima genotoksičnost nije uočena, niti je uočen uticaj na ćelijski ciklus.

Derivat 6 ima jači antimikrobni potencijal prema *E. faecalis* i *S. aureus* (4 puta jači) u odnosu na TBQ, ali je doveo do značajnog povećanja invazije *P. aeruginosa* PAO1 soja pri infekciji ćelija MRC-5 linije. Dodatna negativna aktivnost uočena za derivat **6** je visoka toksičnost prema *A. salina*. Derivat **6** nije pokazao jači citotoksični potencijal niti jaču produkciju ROS od TBQ-a. Prema ćelijama A549 linije je pokazao čak slabiju citotoksičnost u odnosu na TBQ. Ipak, u testu gde je ispitan uticaj jedinjenja na migraciju, derivat **6** pokazuje značajno jaču inhibiciju migracije i tumorskih i zdravih ćelija. Na svim model sistemima nije uočena jača genotoksičnost, već naprotiv, derivat **6** je doveo do značajnog smanjenja genotoksičnosti prema tumorskim ćelijama HepG2 linije što, budući da je linija metabolički aktivna, može sugerisati da se metaboličkom aktivacijom smanjila njegova efikasnost.

Na osnovu svega navedenog, najveći biološki potencijal ima derivat **4**, naročito kao potencijalni hemioterapeutski agens. Dodatnim hemijskim modifikacijama ili u kombinaciji sa drugim jedinjenjem/njima koja bi umanjila uočene neželjene efekte ovog derivata, značajno bi se pojačao njegov biološki potencijal.

6. ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji sintetisani su 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon - TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati: TBQ (**1**) 2-*terc*-butil-1,4-benzohinon, (**2**) 2-*terc*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinon, (**3**) 2-*terc*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinon, (**4**) 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinon, (**5**) 2-*terc*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinon i (**6**) 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinon i ispitana je njihova biološka aktivnost. Na osnovu rezultata predstavljenih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. TBQ i njegovi alkiltio i ariltio derivati imaju dobru antioksidativnu aktivnost.
2. TBQ i svi ispitivani alkiltio i ariltio derivati uticali su na produkciju ROS u ćelijama HCT 116 linije, pri čemu je najjaču aktivnost imao derivat **4**. U odnosu na TBQ, derivati **3** i **4** su pokazali statistički značajno jači efekat.
3. Derivati su pokazali istu (derivat **6**) ili jaču (derivati **2**, **3** i **4**) antineurodegenerativnu aktivnost u odnosu na TBQ, izuzev derivata **5** koji ima slabiji efekat od TBQ za oko 30%. Najjaču antineurodegenerativnu aktivnost su pokazali derivati **3** i **4**, statistički značajno jaču od TBQ.
4. Ispitivana jedinjenja su mikrodilucionom metodom pokazala jaču antimikrobnu aktivnost prema gram-pozitivnim u odnosu na gram-negativne bakterijske sojeve. Najjaču antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* pokazuju derivati **4**, **5** i **6**, a TBQ i derivati **2**, **4** i **5** prema bakterijskom soju *B. subtilis*. U odnosu na TBQ, derivati **4**, **5** i **6** su pokazali bolju antimikrobnu aktivnost prema bakterijskim sojevima *E. faecalis* i *S. aureus*, dok je prema bakterijskom soju *L. innocua* derivat **6** pokazao bolju aktivnost.
5. TBQ i njegovi derivati nisu pokazali efekat na adheziju *P. aeruginosa* PAO1 bakterijskog soja prema ćelijama MRC-5 linije. Statistički značajno smanjenje sposobnosti invazije uočeno je jedino za derivat **3** pri najvišoj testiranoj koncentraciji (100 µM), dok je derivat **6** na najnižoj testiranoj koncentraciji (11 µM) pokazao čak stimulaciju invazije.
6. Uvođenje tio supstituenta na hinonsko jezgro smanjuje toksičnost derivata, budući da su svi ispitivani derivati, osim derivata **6**, pokazali manju toksičnost od TBQ na model organizmu *Artemia salina*. Toksičnost TBQ i derivata **3**, **4** i **6** bila je veća od toksičnosti kalijum-dihromata (K₂Cr₂O₇), koji je korišćen kao pozitivna kontrola.
7. Generalno, ispitivana jedinjenja pokazuju umeren citotoksični efekat, pri čemu modifikacije TBQ pojačavaju citotoksični efekat koji je izraženiji nakon dužeg perioda inkubacije (72h). U odnosu na sve ispitivane ćelijske linije, sintetisani derivati su pokazali najjaču citotoksičnost prema ćelijama MRC-5 linije. Derivat **4** je pokazao najjači citotoksični efekat, zadovoljavajući prema ćelijama MRC-5 i HCT 116 linija i umereni prema ćelijama HepG2 linije, što je najverovatnije posledica produkcije ROS. Derivati **3** i **5** imali su najjači citotoksični efekat prema ćelijama Hs 294T i A549, linija respektivno. U odnosu na testirane citostatike, TBQ i njegovi derivati pokazali su jaču citotoksičnost od etopozida na ćelijama MRC-5 linije (7 puta jaču u slučaju derivata **4**).
8. Testirana jedinjenja nisu pokazala zadovoljavajuću selektivnost prema tumorskim, u odnosu na zdrave ćelije.

9. Derivati TBQ pokazuju jači efekat na inhibiciju migracije ćelija u odnosu na TBQ i to: derivati **2**, **4** i **6** prema ćelijama MRC-5, a derivati **4**, **5** i **6** prema ćelijama A549 linije. Ispitivana jedinjenja su, generalno, pokazala jači efekat na inhibiciju migracije tumorskih ćelija A549 linije u odnosu na zdrave ćelije MRC-5 linije, pri čemu su derivati **5** i **6** pokazali najveći selektivni efekat (SI = 3,7 i SI = 2,7, respektivno), sličan etopozidu.
10. U eksperimentu gde je ispitivana interakcija TBQ i njegovih derivata sa plazmidnom DNK, jedinjenja nisu dovela do promene zatvorenog kružnog oblika - CCF plazmidne DNK u otvoreni kružni oblik – OCF koji nastaje usled oštećenja DNK molekula, što govori u prilog tome da jedinjenja ne interaguju sa plazmidnom DNK.
11. Genotoksična aktivnost primenom SOS/*umuC* testa nije uočena za ispitivana jedinjenja.
12. TBQ je pokazao statistički značajan genotoksični potencijal prema ćelijama HepG2 linije, pri koncentraciji od 3,7 μ M. Statistički značajan genotoksični efekat na ćelije MRC-5 linije pokazali su svi testirani derivati TBQ, dok je najveći dozno zavisni genotoksični potencijal prema ovoj ćelijskoj liniji pokazao derivat **4**. Prema ćelijama HepG2 linije, samo su pojedini derivati pokazali genotoksični potencijal, pri čemu je najizraženiji efekat imao derivat **4**. Nijedno od ispitivanih jedinjenja nije pokazalo jači genotoksični potencijal u odnosu na pozitivne kontrole etopozid i benzo[*a*]piren, izuzev derivata **4** (koncentracija od 33 μ M) prema HepG2 ćelijskoj liniji.
13. Na osnovu γ H2AX testa, jedino je derivat **4** indukovao povećano formiranje DSBs na ćelije HepG2 linije, dok su za druga ispitivana jedinjenja, SSBs ili ALS verovatniji tip oštećenja DNK molekula.
14. Derivat **4** je izazvao značajno zaustavljanje HepG2 ćelija u G₂/M fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na TBQ, što je najverovatnije posledica DSBs.
15. Uporednom analizom bioloških aktivnosti alkiltio i ariltio derivata TBQ u odnosu na TBQ, derivat **4** je pokazao najjaču biološku aktivnost.

7. LITERATURA

- 2021 Alzheimer's disease facts and figures. (2021). *Alzheimer's & Dementia*, 17(3), 327–406.
- Abe, S., & Sasaki, M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(6), 1635–1641.
- Adewusi, E. A., Moodley, N., & Steenkamp, V. (2011). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 77(3), 638–644.
- Almaqwashy, A. A., Paramanathan, T., Rouzina, I., & Williams, M. C. (2016). Mechanisms of small molecule–DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 44(9), 3971–3988.
- American Diabetes Association. (2020). 9. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes-2020. *Diabetes Care*, 43(Suppl 1), S98–S110.
- Amigó, M., Terencio, M. C., Mitova, M., Iodice, C., Payá, M., & de Rosa, S. (2004). Potential antipsoriatic avarol derivatives as antioxidants and inhibitors of PGE2 generation and proliferation in the HaCaT cell line. *Journal of Natural Products*, 67(9), 1459–1463.
- Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1(2), 125–129.
- Asche, C. (2005). Antitumour quinones. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(5), 449–467.
- Astill, B. D., Cantor, E. E., Ely, T. S., Jones, W. H., & Uskavitch, R. J. (1967). The Oral ingestion of t-butylhydroquinone (TBHQ) by humans; clinical observations and metabolic fate. *Unpublished Report from the Laboratory of Industrial Medicine, Eastman Kodak.*(As Cited by WHO 1998).
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
- Auclair, C., & Voisin, E. (1985). Handbook of methods for oxygen radical research. *CRC Press*, 123–132.
- Avato, P., Migoni, D., Argentieri, M., Fanizzi, F. P., & Tava, A. (2017). Activity of saponins from *Medicago* species against HeLa and MCF-7 cell lines and their capacity to potentiate cisplatin effect. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 17(11), 1508–1518.
- Azarova, A. M., Lyu, Y. L., Lin, C.-P., Tsai, Y.-C., Lau, J. Y.-N., Wang, J. C., & Liu, L. F. (2007). Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(26), 11014–11019.
- Baan, R. A., Stewart, B. W., & Straif, K. (2019). Tumour site concordance and mechanisms of carcinogenesis. *IARC Scientific Publications No. 165*, 60–60.
- Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal El-Din, A. M., & Abdel-Wahab, M. H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*, 26(2), 87–98.
- Badawy, A. A., El-Shafey, S. E., Abd El All, S., & El-Shobaky, G. A. (2014). Effect of γ -irradiation and calcination temperature of nanosized ZnO/TiO₂ system on its structural and electrical properties. *Advances in Chemistry*, 2014, 301410.
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 115–118.

- Banach, M., Catapano, A. L., Cicero, A. F. G., Escobar, C., Foger, B., Katsiki, N., Latkovskis, G., Rakowski, M., Reiner, Z., & Sahebkar, A. (2022). Red yeast rice for dyslipidaemias and cardiovascular risk reduction: A position paper of the International Lipid Expert Panel. *Pharmacological Research*, 106370.
- Batra, R. K., Guttridge, D. C., Brenner, D. A., Dubinett, S. M., Baldwin, A. S., & Boucher, R. C. (1999). I κ B α Gene Transfer Is Cytotoxic to Squamous-Cell Lung Cancer Cells and Sensitizes Them to Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Cell Death. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21(2), 238–245.
- Battalora, M. S. J., Johnston, D. A., & DiGiovanni, J. (1995). The effects of calcium antagonists on anthrone skin tumor promotion and promoter-related effects in SENCAR mice. *Cancer Letters*, 98(1), 19–25.
- Bekdeser, B., Özyürek, M., Guclu, K., & Apak, R. (2011). tert-Butylhydroquinone as a spectroscopic probe for the superoxide radical scavenging activity assay of biological samples. *Analytical Chemistry*, 83(14), 5652–5660.
- Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G., & Gil, J. (1998). Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 100(1), 142–146.
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385–395.
- Beyer, R. E., Segura-Aguilar, J., Lind, C., & Castro, V. M. (1987). DT-diaphorase activity in various cells in culture with emphasis on induction in ascites hepatoma cells. *Chemica Scripta A*, 27, 145–150.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Birnboim, H. C. (1983). [17] A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in enzymology*, 100, 243–255.
- Bishayee, A., & Sethi, G. (2016). Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Seminars in Cancer Biology*, 40, 1–3.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 13(3), 135–160.
- Bours, V., De Jardin, E., Goujon-Letawe, F., Merville, M.-P., & Castronovo, V. (1994). The NF- κ B transcription factor and cancer: high expression of NF- κ B-and I κ B-related proteins in tumor cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 47(1), 145–149.
- Božić, T., Novaković, I., Gašić, M. J., Juranić, Z., Stanojković, T., Tufegdžić, S., Kljajić, Z., & Sladić, D. (2010). Synthesis and biological activity of derivatives of the marine quinone avarone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(3), 923–929.
- Brar, S. S., Kennedy, T. P., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., Quinn, M. T., Whorton, A. R., & Hoidal, J. R. (2002). An NAD (P) H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(6), 1212–1224.
- Brown, G. C., Nicholls, D. G., Cooper, C. E., Nicotera, P., Leist, M., & Ferrando-May, E. (1999). Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochemical Society Symposia*, 66, 69–73.

- Buffinton, G. D., Öllinger, K., Brunmark, A., & Cadenas, E. (1989). DT-diaphorase-catalysed reduction of 1, 4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates. Effect of substituents on autoxidation rates. *Biochemical Journal*, 257(2), 561–571.
- Burden, D. A., Kingma, P. S., Froelich-Ammon, S. J., Bjornsti, M.-A., Patchan, M. W., Thompson, R. B., & Osheroff, N. (1996). Topoisomerase II· etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29238–29244.
- Burton, G., & Evans-Illidge, E. A. (2014). Emerging R and D law: the Nagoya Protocol and its implications for researchers. *ACS chemical biology*, 9(3), 588-591.
- Butala, M., Žgur-Bertok, D., & Busby, S. J. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 82-93.
- Cariello, L., Zanetti, L., Cuomo, V., & Vanzanella, F. (1982). Antimicrobial activity of avarol, a sesquiterpenoid hydroquinone from the marine sponge, *Dysidea avara*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 71(2), 281–283.
- Cavaliere, E. L., & Rogan, E. G. (2016). Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: their minimization leads to cancer prevention. *Clinical and Translational Medicine*, 5(1), 1–15.
- Cesa-Luna, C., Muñoz-Rojas, J., Saab-Rincon, G., Baez, A., Morales-García, Y. E., Juárez-González, V. R., & Quintero-Hernández, V. (2019). Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. *PLoS One*, 14(11), e0222438.
- Česen, M., Eleršek, T., Novak, M., Žegura, B., Kosjek, T., Filipič, M., & Heath, E. (2016). Ecotoxicity and genotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and their mixtures. *Environmental Pollution*, 210, 192–201.
- Chaffey, N. (2003). Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Oxford University Press*, 91(3), 401.
- Chassagne, F., Cabanac, G., Hubert, G., David, B., & Marti, G. (2019). The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural Products®. *Phytochemistry Reviews*, 18, 601–622.
- Collins, J. F., Brown, J. P., Dawson, S. v, & Marty, M. A. (1991). Risk assessment for benzo [a] pyrene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 170–184.
- Coppi, A., Cabinian, M., Mirelman, D., & Sinnis, P. (2006). Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), 1731–1737.
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7), 207–212.
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), 242–248.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 7–24.

- Crespo, R., Villaverde, M. L., Girotti, J. R., Güerci, A., Juárez, M. P., & de Bravo, M. G. (2011). Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, *136*(1), 204–209.
- da Silva, A. J. M., Netto, C. D., Pacienza-Lima, W., Torres-Santos, E. C., Rossi-Bergmann, B., Maurel, S., Valentin, A., & Costa, P. R. R. (2009). Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1, 4-naphthoquinone derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *20*, 176–182.
- David, M. Z., & Daum, R. S. (2017). Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Staphylococcus Aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*, 409, 325–383.
- de Giulio, A., de Rosa, S., Strazzullo, G., Diliberto, L., Obino, P., Marongiu, M. E., Pani, A., & la Colla, P. (1991). Synthesis and evaluation of cytostatic and antiviral activities of 3' and 4'-avarone derivatives. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, *2*(4), 223–227.
- de Gooijer, M. C., van den Top, A., Bockaj, I., Beijnen, J. H., Würdinger, T., & van Tellingen, O. (2017). The G2 checkpoint—a node-based molecular switch. *FEBS Open Bio*, *7*(4), 439–455.
- de Kraker, M. E. A., Jarlier, V., Monen, J. C. M., Heuer, O. E., van de Sande, N., & Grundmann, H. (2013). The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(9), 860–868.
- de Rosa, S., & Tommonaro, G. (2012). Bioactive marine prenylated quinones/quinols. *Studies in Natural Products Chemistry*, *36*, 163–218.
- De Souza, M. V. N. (2004). (+)-Discodermolide: a marine natural product against cancer. *The Scientific World Journal*, *4*, 415–436.
- De Vos, S., & Koeffler, H. P. (2006). CHAPTER 27 - Differentiation Induction in Leukemia and Lymphoma. In D. Heber (Ed.), *Nutritional Oncology (Second Edition)*. *Academic Press*, 491–506.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *104*(6), 1129–1137.
- Desam, N. R., & Al-Rajab, A. J. (2022). Herbal biomolecules: anticancer agents. In *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications*. *Elsevier*, 435–474.
- DeVita, V. T. (1997). Principles of cancer management: chemotherapy. *CANCER: Principles and Practice of Oncology*, *1*, 333–347.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(11), 1102–1115.
- Dobo, K. L., & Eastmond, D. A. (1994). Role of oxygen radicals in the chromosomal loss and breakage induced by the quinone-forming compounds, hydroquinone and tert-butylhydroquinone. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *24*(4), 293–300.
- Dominici, S., Visvikis, A., Pieri, L., Paolicchi, A., Valentini, M. A., Comporti, M., & Pompella, A. (2003). Redox modulation of NF- κ B nuclear translocation and DNA binding in metastatic melanoma. The role of endogenous and γ -glutamyl transferase-dependent oxidative stress. *Tumori Journal*, *89*(4), 426–433.
- Đorđević, J., Kolarević, S., Jovanović, J., Kostić-Vuković, J., Novaković, I., Jeremić, M., Sladić, D., & Vuković-Gačić, B. (2020). Evaluation of genotoxic potential of tert-butylquinone and its

- derivatives in prokaryotic and eukaryotic test models. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(5), 522–530.
- Dorđević, J., Kolarević, S., Jovanović Marić, J., Oalđe Pavlović, M., Sladić, D., Novakovic, I., & Vuković-Gačić, B. (2022). Synthesis and biological activity of alkylthio and arylthio derivatives of *tert*-butylquinone: Scientific paper. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 87(11), 1245–1258.
- Dudka, J., Burdan, F., Korga, A., Iwan, M., Madej-Czerwonka, B., Cendrowska-Pinkosz, M., Korobowicz-Markiewicz, A., Jodłowska-Jedrych, B., & Matysiak, W. (2012). Intensification of doxorubicin-related oxidative stress in the heart by hypothyroidism is not related to the expression of cytochrome P450 NADPH-reductase and inducible nitric oxide synthase, as well as activity of xanthine oxidase. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 139327.
- Duffey, D. C., Chen, Z., Dong, G., Ondrey, F. G., Wolf, J. S., Brown, K., Siebenlist, U., & van Waes, C. (1999). Expression of a dominant-negative mutant inhibitor- κ B α of nuclear factor- κ B in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Research*, 59(14), 3468–3474.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food (2004). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to tertiary-Butylhydroquinone (TBHQ). *EFSA Journal*, 2(10), 84.
- Eisner, T., Jones, T. H., Aneshansley, D. J., Tschinkel, W. R., Silberglied, R. E., & Meinwald, J. (1977). Chemistry of defensive secretions of bombardier beetles (Brachinini, Metriini, Ozaenini, Paussini). *Journal of Insect Physiology*, 23(11–12), 1383–1386.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Fang, C. N., Chang, P. L., & Hsu, T. P. (1976). The antibacterial components of dan-shen. *Acta Chim. Sinica*, 34, 197–209.
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., & Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9(6), 425–434.
- Fernando, M., Duijf, P. H. G., Proctor, M., Stevenson, A. J., Ehmann, A., Vora, S., Skalamera, D., Adams, M., & Gabrielli, B. (2021). Dysregulated G2 phase checkpoint recovery pathway reduces DNA repair efficiency and increases chromosomal instability in a wide range of tumours. *Oncogenesis*, 10(5), 41.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., & Vandenameele, P. (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18(54), 7719–7730.
- Finley, K. T. (1974). The addition and substitution chemistry of quinones. *Quinonoid Compounds (1974) Part 2*, 2, 877–1144.
- Firn, R. D., & Jones, C. G. (2000). The evolution of secondary metabolism—a unifying model. *Molecular Microbiology*, 37(5), 989–994.
- Fox, E. J. (2004). Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology*, 63(12 suppl 6), S15–S18.

- Ge, J., Chow, D. N., Fessler, J. L., Weingeist, D. M., Wood, D. K., & Engelward, B. P. (2015). Micropatterned comet assay enables high throughput and sensitive DNA damage quantification. *Mutagenesis*, *30*(1), 11–19.
- Gennari, C., Castoldi, D., & Sharon, O. (2007). Natural products with taxol-like anti-tumor activity: Synthetic approaches to eleutherobin and dictyostatin. *Pure and Applied Chemistry*, *79*(2), 173–180.
- Gharavi, N., Haggarty, S., & S El-Kadi, A. O. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Current Drug Metabolism*, *8*(1), 1–7.
- González-Ibarra, M., Farfán, N., Trejo, C., Uribe, S., & Lotina-Hennsen, B. (2005). Selective herbicide activity of 2, 5-di (benzylamine)-p-benzoquinone against the monocot weed *Echinochloa crusgalli*. An in vivo analysis of photosynthesis and growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(9), 3415–3420.
- Gordaliza, M. (2010). Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. *Marine Drugs*, *8*(12), 2849–2870.
- Gray, S. L., Anderson, M. L., Dublin, S., Hanlon, J. T., Hubbard, R., Walker, R., Yu, O., Crane, P. K., & Larson, E. B. (2015). Cumulative use of strong anticholinergics and incident dementia: a prospective cohort study. *JAMA Internal Medicine*, *175*(3), 401–407.
- Hageman, G. J., Verhagen, H., & Kleinjans, J. C. S. (1988). Butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tert-butylhydroquinone are not mutagenic in the Salmonella/microsome assay using new tester strains. *Mutation Research Letters*, *208*(3–4), 207–211.
- Hamama, A. A., & Nawar, W. W. (1991). Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*(6), 1063–1069.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., & Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *8*(3), 193–204.
- Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., & Žegura, B. (2019). Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Science of the Total Environment*, *687*, 267–276.
- Ho, Y., Wang, Y., & Lin, J. (1996). Induction of p53 and p21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells. *Molecular Carcinogenesis: Published in Cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, *16*(1), 20–31.
- Hori, K., & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, *48*(3), 424–434.
- Hou, X., Wang, M., Wen, Y., Ni, T., Guan, X., Lan, L., Zhang, N., Zhang, A., & Yang, C.-G. (2018). Quinone skeleton as a new class of irreversible inhibitors against *Staphylococcus aureus* sortase A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *28*(10), 1864–1869.
- Howes, M. J. R., Houghton, P. J., & Jenner, P. (1999). In-vitro screening for anticholinesterase activity of plants used traditionally for memory improvement. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *51*, 238.
- https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular&map=cached 26.06.2022.
- <https://www.trc-canada.com/product-detail/?A794688#> 10.11.2022.

<https://www.biologiamarina.org/disidea-avara/> 10.04.2023.

- Huang, L., & Pardee, A. B. (1999). β -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Molecular Medicine*, 5(11), 711–720.
- Hunt, E. J., Lester, C. E., Lester, E. A., & Tackett, R. L. (2001). Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sciences*, 69(2), 181–190.
- Ivashkevich, A. N., Martin, O. A., Smith, A. J., Redon, C. E., Bonner, W. M., Martin, R. F., & Lobachevsky, P. N. (2011). γ H2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1–2), 49–60.
- Izquierdo-Alonso, J. L., Pérez-Rial, S., Rivera, C. G., & Peces-Barba, G. (2022). N-acetylcysteine for prevention and treatment of COVID-19: Current state of evidence and future directions. *Journal of Infection and Public Health*, 15, 1477-1483.
- Jamil, S., Lam, I., Majd, M., Tsai, S.-H., & Duronio, V. (2015). Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53. *Cancer Cell International*, 15(1), 1–11.
- Jaszczur, M., Bertram, J. G., Robinson, A., van Oijen, A. M., Woodgate, R., Cox, M. M., Goodman, M. F. (2016). Mutations for worse or Better: Low-Fidelity DNA synthesis by SOS DNA polymerase V is a tightly regulated Double-Edged sword. *Biochemistry*, 55(16), 2309-2318.
- Jeremić, M., Dinić, J., Pešić, M., Stepanovic, M., Novaković, I., Šegan, D., & Sladić, D. (2018). Alkylamino and aralkylamino derivatives of avarone and its mimetic as selective agents against non-small cell lung cancer cells, their antibacterial and antifungal potential. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 83(11), 1193–1207.
- Jeremić, M., Pešić, M., Dinić, J., Banković, J., Novaković, I., Šegan, D., & Sladić, D. (2016). Simple avarone mimetics as selective agents against multidrug resistant cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 118, 107–120.
- Jezdimirović, M. (2005). Veterinarska farmakologija. *Fakultet Veterinarske Medicine, Univerzitet u Beogradu*.
- Joe, E., & Ringman, J. M. (2019). Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention. *BMJ*, 367, l6217.
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23(5), 537–548.
- Joshi, P., Vishwakarma, R. A., & Bharate, S. B. (2017). Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 273–292.
- Kalli, S., Araya-Cloutier, C., Hageman, J., & Vincken, J. P. (2021). Insights into the molecular properties underlying antibacterial activity of prenylated (iso) flavonoids against MRSA. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.
- Kar, S., Florence, G. J., Paterson, I., & Amos, L. A. (2003). Discodermolide interferes with the binding of tau protein to microtubules. *FEBS Letters*, 539(1–3), 34–36.
- Kashanian, S., & Dolatabadi, J. E. N. (2009). DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chemistry*, 116(3), 743–747.
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(2–3), 155–176.
- Kelly, F. J. (1998). Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry*, 10(1), 21–23.

- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254.
- Kim, C. M., & Pratt, D. E. (1990). Degradation Products of 2-tert-Butylhydroquinone at Frying Temperature. *Journal of Food Science*, 55(3), 847.
- Kim, S. M., Kubota, K., & Kobayashi, A. (1997). Antioxidative activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(9), 1482–1485.
- Koch, A., Tamez, P., Pezzuto, J., & Soejarto, D. (2005). Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1–3), 95–99.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Sunjog, K., Martinović, R., Đorđević, J., Novaković, I., Sladić, D., & Vuković-Gačić, B. (2019). Evaluation of genotoxic potential of avarol, avarone, and its methoxy and methylamino derivatives in prokaryotic and eukaryotic test models. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(2), 130–139.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Bougioukas, G., Didilis, V., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *British Journal of Cancer*, 89(5), 877–885.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., & Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 619–642.
- Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., Royer, R. E., vander Jagt, D. L., Semenza, G. L., & Dang, C. v. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2037–2042.
- Lee, H. Y., Parkinson, E. I., Granchi, C., Paterni, I., Panigrahy, D., Seth, P., Minutolo, F., & Hergenrother, P. J. (2017). Reactive oxygen species synergize to potently and selectively induce cancer cell death. *ACS Chemical Biology*, 12(5), 1416–1424.
- Lee, J.-H., & Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308(5721), 551–554.
- Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Bioenergetics Theory and Components | Quinones. *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)*, Elsevier, 2021, 43-52.
- Levine, A. J., & Puzio-Kuter, A. M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, 330(6009), 1340–1344.
- Li, X., Ni, J., Tang, Y., Wang, X., Tang, H., Li, H., Zhang, S., & Shen, X. (2019). Allicin inhibits mouse colorectal tumorigenesis through suppressing the activation of STAT3 signaling pathway. *Natural Product Research*, 33(18), 2722–2725.
- Li, Z., Zhang, Y., Jin, T., Men, J., Lin, Z., Qi, P., Piao, Y., & Yan, G. (2015). NQO1 protein expression predicts poor prognosis of non-small cell lung cancers. *BMC Cancer*, 15(1), 1–9.
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333.
- Lin, A. J., Cosby, L. A., Shansky, C. W., & Sartorelli, A. C. (1972). Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15(12), 1247–1252.
- Lin, T. S., Zhu, L. Y., Xu, S. P., Divo, A. A., & Sartorelli, A. C. (1991). Synthesis and antimalarial activity of 2-aziridinyland 2, 3-bis (aziridinyl)-1, 4-naphthoquinonyl sulfonate and acylate derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34(5), 1634–1639.

- Liu, P., Liu, Y., & Shi, J. (2010). Antioxidant Potential of Water Soluble Alkaloids from Rauvolfia Study by DPPH· in vitro Assay [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 3(21), 607–609.
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Mammalian cell viability: methods and protocols, Methods in Molecular Biology*, 740, 7–12.
- Maakaron, J. E., & Mims, A. S. (2019). Daunorubicin-cytarabine liposome (CPX-351) in the management of newly diagnosed secondary AML: A new twist on an old cocktail. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 32(2), 127–133.
- Macey, M. G., & Macey, M. G. (2007). *Flow Cytometry: Principles and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Majumder, D., Das, A., & Saha, C. (2017). Catalase inhibition an anti cancer property of flavonoids: A kinetic and structural evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 929–935.
- Markham, M. J., Wachter, K., Agarwal, N., Bertagnolli, M. M., Chang, S. M., Dale, W., Diefenbach, C. S. M., Rodriguez-Galindo, C., George, D. J., & Gilligan, T. D. (2020). Clinical cancer advances 2020: annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 38(10), 1081.
- Martínez, M. J. A., & Benito, P. B. (2005). Biological activity of quinones. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 303–366.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., & Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Marine Drugs*, 12(2), 1066–1101.
- Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenska, K., Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: a complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(4), 368–384.
- Matsuoka, A., Matsui, M., Miyata, N., Sofuni, T., & Motoi Jr, I. (1990). Mutagenicity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and its metabolites in short-term tests in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 241(2), 125–132.
- McDaniels, A. E., Reyes, A. L., Wymer, L. J., Rankin, C. C., Stelma, G. N. (1990). Comparison of the Salmonella (Ames) test, umu tests, and the SOS chromotests for detecting genotoxins. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16(3), 204–215.
- McNulty, S. E., Rosario, R. del, Cen, D., Meyskens Jr, F. L., & Yang, S. (2004). Comparative expression of NFκB proteins in melanocytes of normal skin vs. benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies. *Pigment Cell Research*, 17(2), 173–180.
- Mendola, D., de Caralt, S., Uriz, M. J., van den End, F., van Leeuwen, J. L., & Wijffels, R. H. (2008). Environmental flow regimes for Dysidea avara sponges. *Marine Biotechnology*, 10(5), 622–630.
- Meyskens Jr, F. L., Buckmeier, J. A., McNulty, S. E., & Tohidian, N. B. (1999). Activation of nuclear factor-κB in human metastatic melanoma cells and the effect of oxidative stress. *Clinical Cancer Research*, 5(5), 1197–1202.
- Min, B., Miyashiro, H., & Hattori, M. (2002). Inhibitory effects of quinones on RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *Phytotherapy Research*, 16(S1), 57–62.

- Misra, H. S., Rajpurohit, Y. S., & Khairnar, N. P. (2012). Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *Journal of Biosciences*, 37, 313–325.
- Mokini, Z., Marcovecchio, M. L., & Chiarelli, F. (2010). Molecular pathology of oxidative stress in diabetic angiopathy: role of mitochondrial and cellular pathways. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87(3), 313–321.
- Montecucco, A., & Biamonti, G. (2007). Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Letters*, 252(1), 9–18.
- Morimoto, K., Tsuji, K., Iio, T., Miyata, N., Uchida, A., Osawa, R., Kitsutaka, H., & Takahashi, A. (1991). DNA damage in forestomach epithelium from male F344 rats following oral administration of tert-butylquinone, one of the forestomach metabolites of 3-BHA. *Carcinogenesis*, 12(4), 703–708.
- Mueller, S. O., & Stopper, H. (1999). Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1428(2–3), 406–414.
- Mueller, S. O., Schmitt, M., Dekant, W., Stopper, H., Schlatter, J., Schreier, P., & Lutz, W. K. (1999). Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. *Food and Chemical Toxicology*, 37(5), 481–491.
- Müller, W. E. G., Grebenjuk, V. A., le Pennec, G., Schröder, H.-C., Brümmer, F., Hentschel, U., Müller, I. M., & Breter, H.-J. (2004). Sustainable production of bioactive compounds by sponges—cell culture and gene cluster approach: a review. *Marine Biotechnology*, 6(2), 105–117.
- Müller, W. E., Diehl-Seifert, B., Sobel, C., Bechtold, A., Kljajić, Z., & Dorn, A. (1986). Sponge secondary metabolites: biochemical and ultrastructural localization of the antimitotic agent avarol in *Dysidea avara*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 34(12), 1687–1690.
- Nakamura, S., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I., & Sugimoto, K. (1987). SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutation Research Letters*, 192(4), 239–246.
- Nakarada, Đ. (2019). Antiradikalska aktivnost avarola: teorijski i eksperimentalni pristup. Doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu.
- Nathan, C. (2004). Antibiotics at the crossroads. *Nature*, 431(7011), 899–902.
- Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic resistance—problems, progress, and prospects. *New England Journal of Medicine*, 371(19), 1761–1763.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803.
- Ngo, D. C., Ververis, K., Tortorella, S. M., & Karagiannis, T. C. (2015). Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. *Molecular Biology Reports*, 42(4), 819–823.
- Nohl, H. (1990). Is redox-cycling ubiquinone involved in mitochondrial oxygen activation? *Free Radical Research Communications*, 8(4–6), 307–315.
- Novaković, I. (2012). Proučavanje interakcija biološki aktivnog hinona avarona i njegovih derivata sa lizozimom, linearnom i cirkularnom dezoksiribonukleinskom kiselinom. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

- Nowicka, B., & Kruk, J. (2010). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(9), 1587–1605.
- Nygren, P., & Glimelius, B. (2001). The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) report on Cancer Chemotherapy--Project objectives, the working process, key definitions and general aspects on cancer trial methodology and interpretation. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 40(2–3), 155–165.
- O'Brien, P. J. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 80(1), 1–41.
- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., & Kano, I. (2003). Cell death induced by the phenolic antioxidant tert-butylhydroquinone and its metabolite tert-butylquinone in human monocytic leukemia U937 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41(5), 679–688.
- Öllinger, K., & Kågedal, K. (2004). Induction of apoptosis by redox-cycling quinones. *Phospholipid Metabolism in Apoptosis*, 151–170.
- Othman, L., Sleiman, A., & Abdel-Massih, R. M. (2019). Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 911.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., & Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 204–207.
- Paz, M. M., Ladwa, S., Champeil, E., Liu, Y., Rockwell, S., Boamah, E. K., Bargonetti, J., Callahan, J., Roach, J., & Tomasz, M. (2008). Mapping DNA adducts of mitomycin C and decarbamoyl mitomycin C in cell lines using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 21(12), 2370–2378.
- Pejin, B., Iodice, C., Kojic, V., Jakimov, D., Lazovic, M., & Tommonaro, G. (2016). In vitro evaluation of cytotoxic and mutagenic activity of avarol. *Natural Product Research*, 30(11), 1293–1296.
- Pejin, B., Iodice, C., Tommonaro, G., & de Rosa, S. (2008). Synthesis and biological activities of thio-avarol derivatives. *Journal of Natural Products*, 71(11), 1850–1853.
- Pejin, B., Iodice, C., Tommonaro, G., Stanimirovic, B., Ciric, A., Glamoclija, J., Nikolic, M., de Rosa, S., & Sokovic, M. (2014a). Further in vitro evaluation of antimicrobial activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(6), 583–588.
- Pejin, B., Kartali, T., Stanimirović, B., & Karaman, M. (2014b). Avarol effectively inhibits bacillus cereus growth. *Asian Journal of Chemistry*, 26(23), 8255–8256.
- Pejin, B., Tommonaro, G., Glumac, M., Jakimov, D., & Kojic, V. (2018). The redox couple avarol/avarone in the fight with malignant gliomas: the case study of U-251 MG cells. *Natural Product Research*, 32(5), 616–620.
- Pérez-Rojas, J. M., Guerrero-Beltrán, C. E., Cruz, C., Sánchez-González, D. J., Martínez-Martínez, C. M., & Pedraza-Chaverri, J. (2011). Preventive effect of tert-butylhydroquinone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(10), 2631–2637.
- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., & Rubio-Ruiz, M. E. (2017). Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2098.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., & Perry, R. (1999). Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends in Neurosciences*, 22(6), 273–280.
- Petre, C. E., & Dittmer, D. P. (2007). Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *International Journal of Nanomedicine*, 2(3), 277.

- Pfaff, A. R., Beltz, J., King, E., & Ercal, N. (2020). Medicinal thiols: Current status and new perspectives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(6), 513–529.
- Phillips, B. J., Carroll, P. A., Tee, A. C., & Anderson, D. (1989). Microsome-mediated clatogenicity of butylated hydroxyanisole (BHA) in cultured Chinese hamster ovary cells: The possible role of reactive oxygen species. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 214(1), 105–114.
- Pieri, L., Dominici, S., del Bello, B., Maellaro, E., Comporti, M., Paolicchi, A., & Pompella, A. (2003). Redox modulation of protein kinase/phosphatase balance in melanoma cells: the role of endogenous and γ -glutamyltransferase-dependent H₂O₂ production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1621(1), 76–83.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & Team, R. C. (2007). Linear and nonlinear mixed effects models. *R Package Version*, 3(57), 1–89.
- Poli, A., Finore, I., Romano, I., Gioiello, A., Lama, L., & Nicolaus, B. (2017). Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. *Microorganisms*, 5(2), 25.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789–802.
- Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, 355–367.
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.
- Rayan, A., Raiyn, J., & Falah, M. (2017). Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PloS One*, 12(11), e0187925.
- Reddig, A., Rube, C. E., Rödiger, S., Schierack, P., Reinhold, D., & Roggenbuck, D. (2018). DNA damage assessment and potential applications in laboratory diagnostics and precision medicine. *J. Lab. Precis. Med*, 3, 31.
- Reyhanoglu, G., & Tadi, P. (2022). *Etoposide*. Study Guide from StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/abstract/MED/32491787>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. Assay Guidance Manual [Internet]. *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*.
- Rogers, C. G., Boyes, B. G., Matula, T. I., Neville, G., & Stapley, R. (1993). Cytotoxic and genotoxic properties of tert.-butyl-p-quinone (TBQ) in an in vitro assay system with Chinese hamster V79 cells and in strain D7 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 299(1), 9–18.
- Sabbah, A., Nasser, M., Hijazi, A., Rammal, H., & Nasser, G. (2017). Phytochemical screening and cytotoxic activity of two extracts from seeds of Lebanese *Annona squamosa* L. *Int J Pharma Res Health Sci*, 5(1), 1586–1591.
- Saleem, T., & Kasi, A. (2020). *Daunorubicin*. Study Guide from StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <https://europepmc.org/article/nbk/nbk559073>
- Sarin, P. S., Sun, D., Thornton, A., & Müller, W. E. G. (1987). Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone. *Journal of the National Cancer Institute*, 78(4), 663–666.
- Schmidt, O. (1862). *Die spongien des adriatischen meeres* (Vol. 1). W. Engelmann.

- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols (1st ed.). *Crc Press*, 4, 79-85.
- Schwartzmann, G., Ratain, M. J., Cragg, G. M., Wong, J. E., Saijo, N., Parkinson, D. R., Fujiwara, Y., Pazdur, R., Newman, D. J., & Dagher, R. (2002). Anticancer drug discovery and development throughout the world. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(18 Suppl), 47S-59S.
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., & Paules, R. S. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environmental Health Perspectives*, 107(suppl 1), 5–24.
- Shahabadi, N., Maghsudi, M., Kiani, Z., & Pourfoulad, M. (2011). Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin. *Food Chemistry*, 124(3), 1063–1068.
- Sharma, M., & Tomasz, M. (1994). Conjugation of glutathione and other thiols with bioreductively activated mitomycin C. Effect of thiols on the reductive activation rate. *Chemical Research in Toxicology*, 7(3), 390–400.
- Sheela, C. G., Kumud, K., & Augusti, K. T. (1995). Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Medica*, 61(04), 356–357.
- Shi, X., Lan, X., Li, X., Chen, X., Carter, B. Z., Wang, X., & Liu, J. (2014). 2-tert-butyl-1, 4-benzoquinone induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib via inducing caspase-dependent Bcr-Abl downregulation. *Med. Chem*, 4, 786–790.
- Siegel, D., Franklin, W. A., & Ross, D. (1998). Immunohistochemical detection of NAD (P) H: quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors. *Clinical Cancer Research*, 4(9), 2065–2070.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), 11–30.
- Singh, U., & Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 13(3), 129–142.
- Siraki, A. G., Chan, T. S., & O'brien, P. J. (2004). Application of quantitative structure-toxicity relationships for the comparison of the cytotoxicity of 14 p-benzoquinone congeners in primary cultured rat hepatocytes versus PC12 cells. *Toxicological Sciences*, 81(1), 148–159.
- Sladic, D., & Gasic, M. J. (2006). Reactivity and biological activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol and related compounds from sponges of the order Dictyoceratida. *Molecules*, 11(1), 1–33.
- Song, Y., Wagner, B. A., Lehmler, H.-J., & Buettner, G. R. (2008). Semiquinone radicals from oxygenated polychlorinated biphenyls: electron paramagnetic resonance studies. *Chemical Research in Toxicology*, 21(7), 1359–1367.
- Song, R., Yu, B., Friedrich, D., Li, J., Shen, H., Krautscheid, H., ... & Kim, M. H. (2020). Naphthoquinone-derivative as a synthetic compound to overcome the antibiotic resistance of methicillin-resistant *S. aureus*. *Communications biology*, 3(1), 529.
- Soto-Rodriguez, S. A., Roque, A., Lizarraga-Partida, M. L., Guerra-Flores, A. L., & Gomez-Gil, B. (2003). Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53(3), 231–240.
- Sovak, M. A., Bellas, R. E., Kim, D. W., Zanieski, G. J., Rogers, A. E., Traish, A. M., & Sonenshein, G. E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(12), 2952–2960.

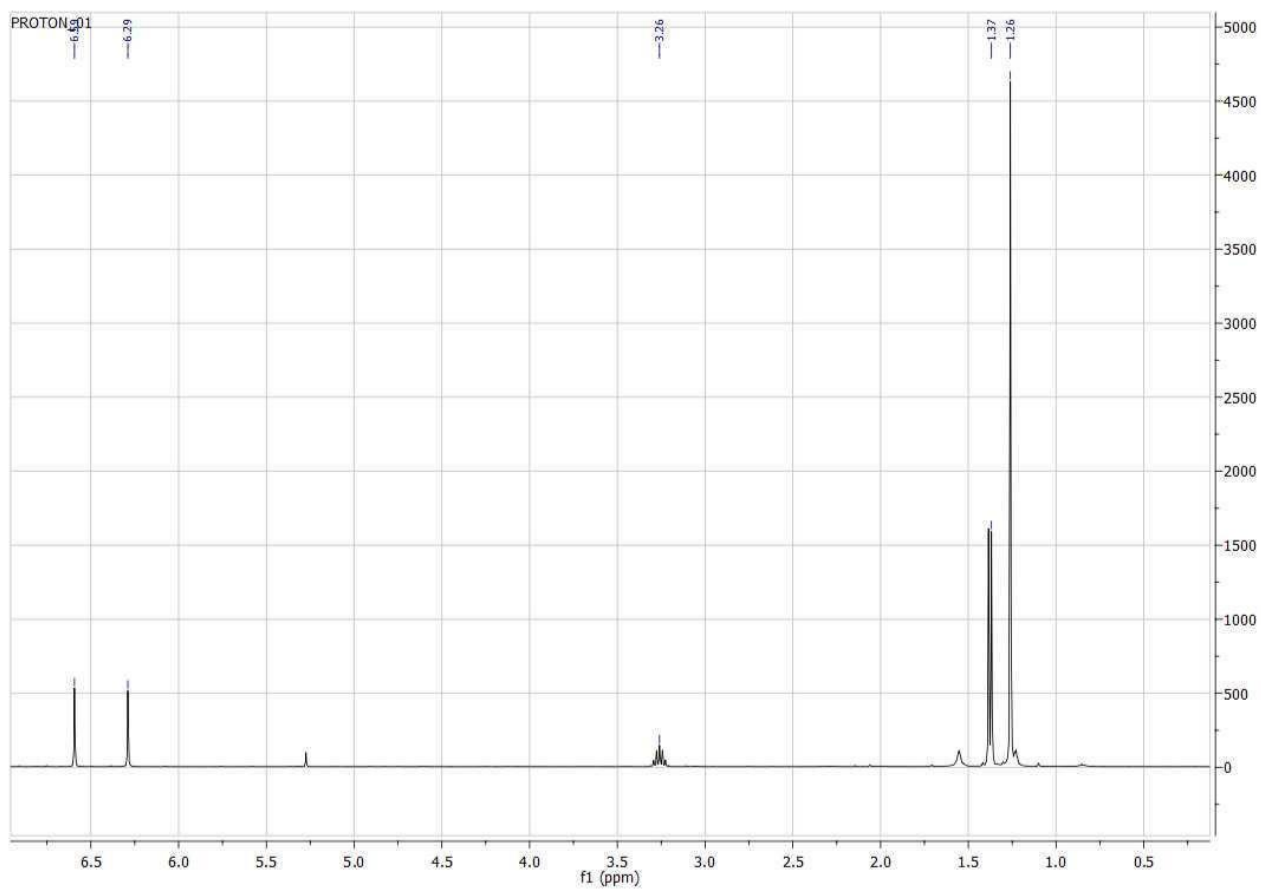
- Stoddard, S. V., Hamann, M. T., & Wadkins, R. M. (2014). Insights and ideas garnered from marine metabolites for development of dual-function acetylcholinesterase and amyloid- β aggregation inhibitors. *Marine Drugs*, *12*(4), 2114–2131.
- Štraser, A., Filipič, M., Novak, M., & Žegura, B. (2013). Double strand breaks and cell-cycle arrest induced by the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in HepG2 cells. *Marine Drugs*, *11*(8), 3077–3090.
- Strickland, F. M., Muller, H. K., Stephens, L. C., Bucana, C. D., Donawho, C. K., Sun, Y., & Pelley, R. P. (2000). Induction of Primary Cutaneous Melanomas in C3H Mice by Combined Treatment with Ultraviolet Radiation, Ethanol and Aloe Emodin¶. *Photochemistry and Photobiology*, *72*(3), 407–414.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249.
- Sutradhar, I., & Zaman, M. H. (2021). Evaluation of the effect of temperature on the stability and antimicrobial activity of rifampicin quinone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *197*, 113941-113941.
- Swift, L. H., & Golsteyn, R. M. (2014). Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(3), 3403–3431.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*(2), 157–170.
- Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Shimada, R., & Kagami, S. (2000). Colitis-related rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy-anthraquinone and methylazoxymethanol acetate. *Oncology Reports*, *7*(3), 501–509.
- Tanamatayarat, P., Limtrakul, P., Chunsakaow, S., & Duangrat, C. (2003). Screening of some rubiaceae plants for cytotoxic activity against cervix carcinoma (KB-3-1) cell line. *Thai J Pharm Sci*, *27*(3–4), 167–172.
- Tao, L., Zhang, J., Liang, Y., Chen, L., Zhen, L., Wang, F., Mi, Y., She, Z., To, K. K. W., & Lin, Y. (2010). Anticancer effect and structure-activity analysis of marine products isolated from metabolites of mangrove fungi in the South China Sea. *Marine Drugs*, *8*(4), 1094–1105.
- Taylor, R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, *6*(1), 35–39.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *35*(3), 206–221.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & Biology*, *2*(9), 575–579.
- Tommonaro, G., Iodice, C., AbdEl-Hady, F. K., Guerriero, G., & Pejin, B. (2015a). The Mediterranean sponge *Dysidea avara* as a 40 year inspiration of marine natural product chemists. *Journal of Biodiversity & Endangered Species*, *5*(1), 001.
- Tommonaro, G., Pejin, B., Iodice, C., Tafuto, A., & de Rosa, S. (2015b). Further in vitro biological activity evaluation of amino-, thio- and ester-derivatives of avarol. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *30*(2), 333–335.

- Toolaram, A. P., Kuemmerer, K., & Schneider, M. (2014). Environmental risk assessment of anti-cancer drugs and their transformation products: a focus on their genotoxicity characterization-state of knowledge and short comings. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 760, 18–35.
- Traber, M. G., & Stevens, J. F. (2011). Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 1000–1013.
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), 579–591.
- Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Chiao, P. J., Achanta, G., Arlinghaus, R. B., & Liu, J. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*, 10(3), 241–252.
- Trapani, J. A., & Darcy, P. K. (2017). Immunotherapy of cancer. *Australian Family Physician*, 46(4), 194–198.
- Tsoukatou, M., Maréchal, J. P., Hellio, C., Novaković, I., Tufegdžic, S., Sladić, D., Gašić, M. J., Clare, A. S., Vagias, C., & Roussis, V. (2007). Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their synthetic derivatives against fouling micro- and macroorganisms. *Molecules*, 12(5), 1022–1034.
- Tully, J. G., & Razin, S. (1996). Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: diagnostic procedures (Vol. 2). *Academic Press*.
- Vanhaecke, P., & Persoone, G. (1984). The ARC-test: A standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. *Ecotoxicol Test Mar Environ*, 2, 588.
- Verrax, J., Beck, R., Dejeans, N., Glorieux, C., Sid, B., C Pedrosa, R., Benites, J., Vasquez, D., A Valderrama, J., & Buc Calderon, P. (2011). Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 11(2), 213–221.
- Vilipic, J. P., Novaković, I. T., Zlatovic, M. v, Vujčić, M. T., Tufegdžic, S. J., & Sladić, D. M. (2016). Interactions of cytotoxic amino acid derivatives of tert-butylquinone with DNA and lysozyme. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(12), 1345–1358.
- Vilipić, J., Novaković, I., Stanojković, T., Matić, I., Šegan, D., Kljajić, Z., & Sladić, D. (2015). Synthesis and biological activity of amino acid derivatives of avarone and its model compound. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(21), 6930–6942.
- Vujčić, M., Tufegdžić, S., Vujčić, Z., Gasic, M. J., & Sladić, D. (2007). Interactions of the anti-tumor sesquiterpene hydroquinone avarol with DNA in vitro. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(12), 1265–1269.
- Weinstein, Z. B., & Zaman, M. H. (2019). Evolution of rifampin resistance in *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis* due to substandard drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1), e01243-18.
- Weng, X. C., & Gordon, M. H. (1992). Antioxidant activity of quinones extracted from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(8), 1331–1336.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175.

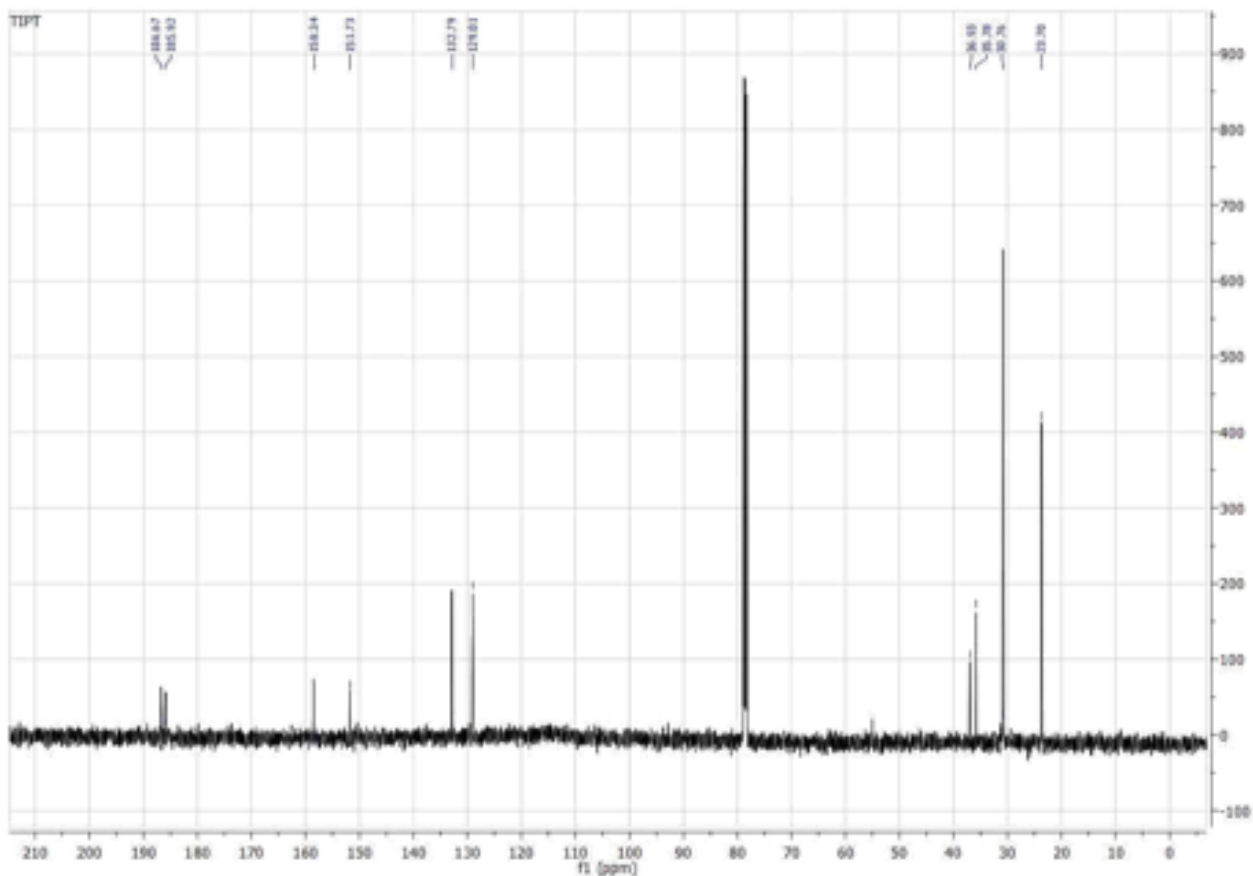
- Wilson, I., Wardman, P., Lin, T. S., & Sartorelli, A. C. (1986). One-electron reduction of 2-and 6-methyl-1, 4-naphthoquinone bioreductive alkylating agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29(8), 1381–1384.
- Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(Pt 1), 17.
- Woods, D., & Turchi, J. J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 14(5), 379–389.
- Worek, F., Eyer, P., & Thiermann, H. (2012). Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Testing and Analysis*, 4(3–4), 282–291.
- Wright, G. D. (2017). Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery. *Natural Product Reports*, 34(7), 694–701.
- Yao, H., Liu, J., Xu, S., Zhu, Z., & Xu, J. (2017). The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(2), 121–140.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., & Mortelmans, K. (1992). Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 19(S21), 2–141.
- Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vette Veterinary Pathology*, 40(5), 481–495.

8. PRILOZI

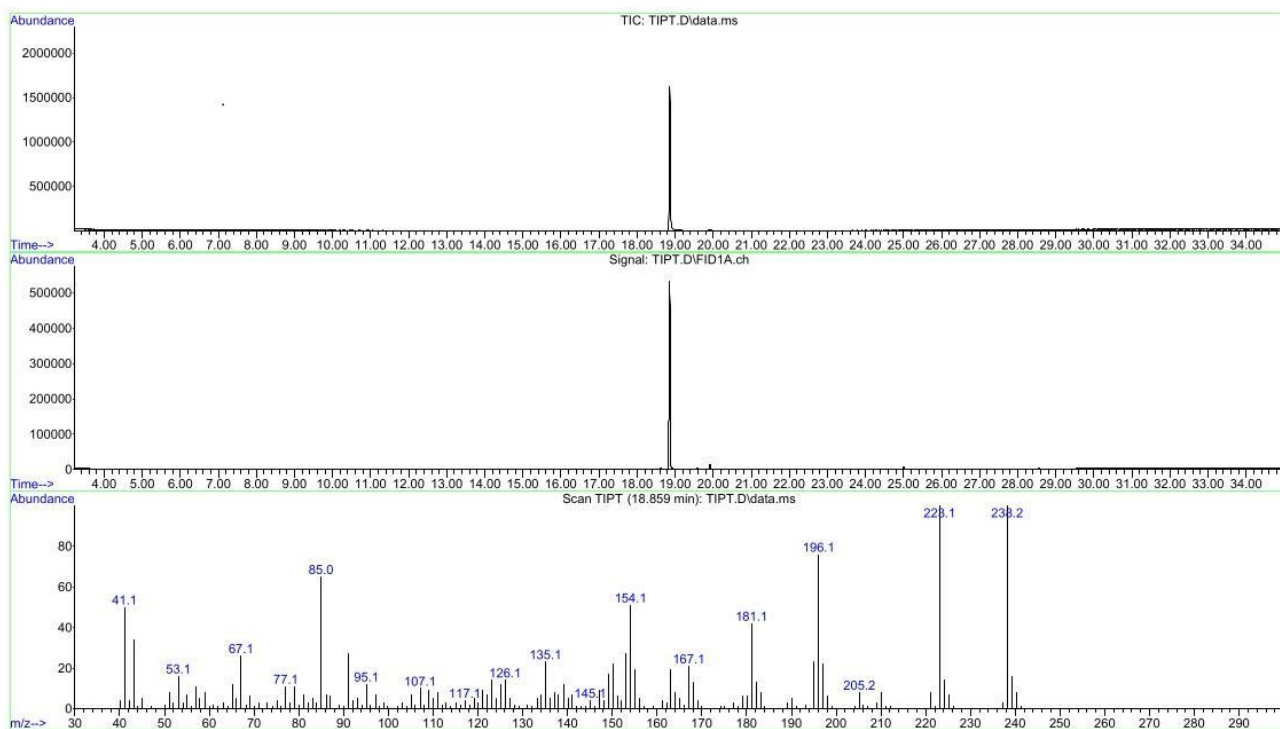
PRILOG 1. ^1H i ^{13}C NMR spektri, EI MS spektri i UV/Vis spektri alkilno i arilno derivata TBQ



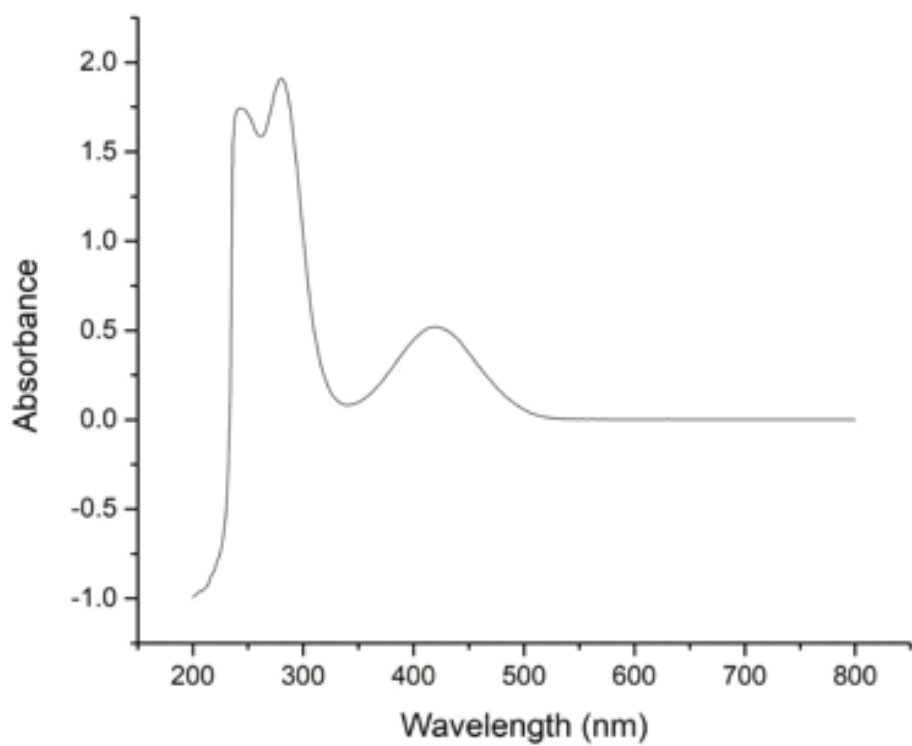
Slika P1. ^1H NMR spektar od 2-*tert*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinona (**2**)



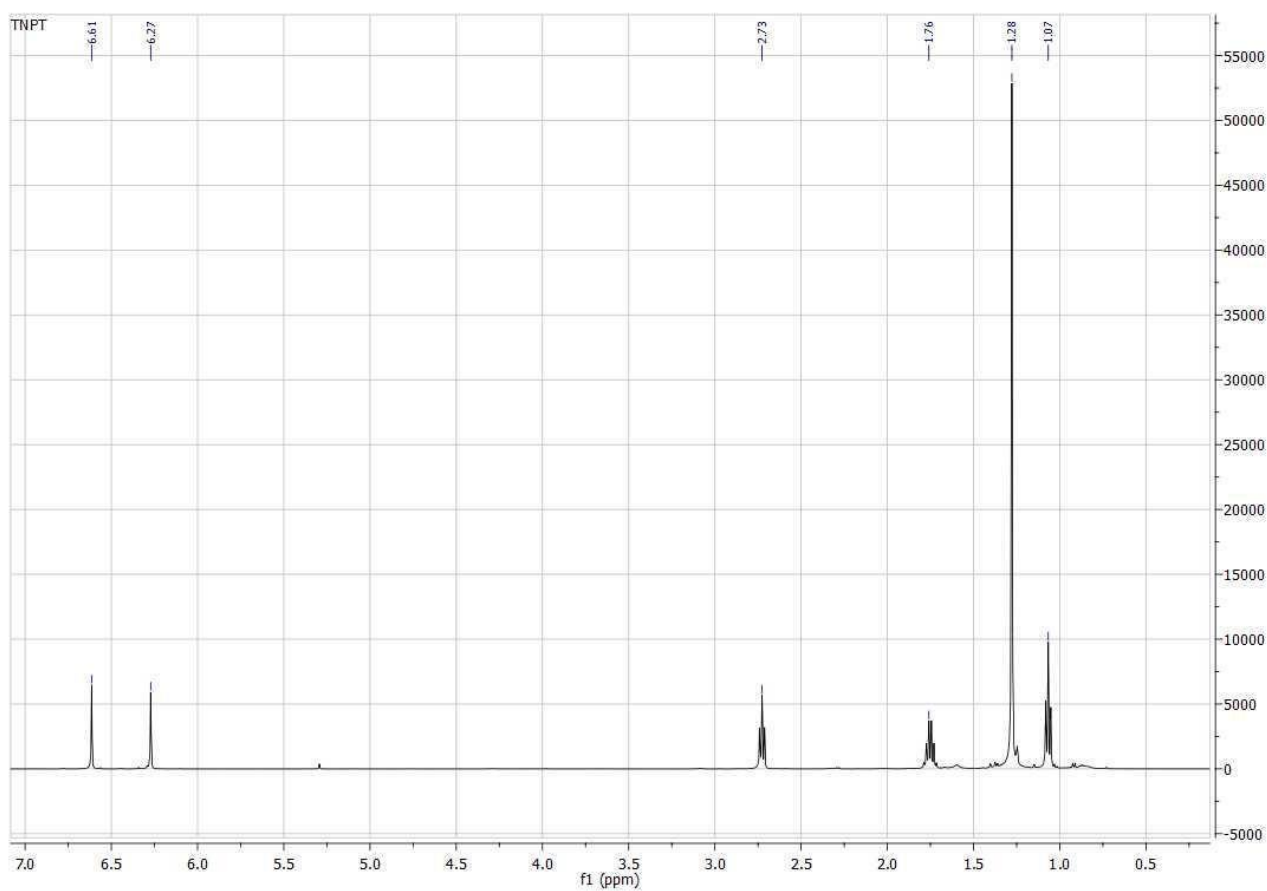
Slika P2. ^{13}C NMR spekter od 2-*terc*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinona (**2**)



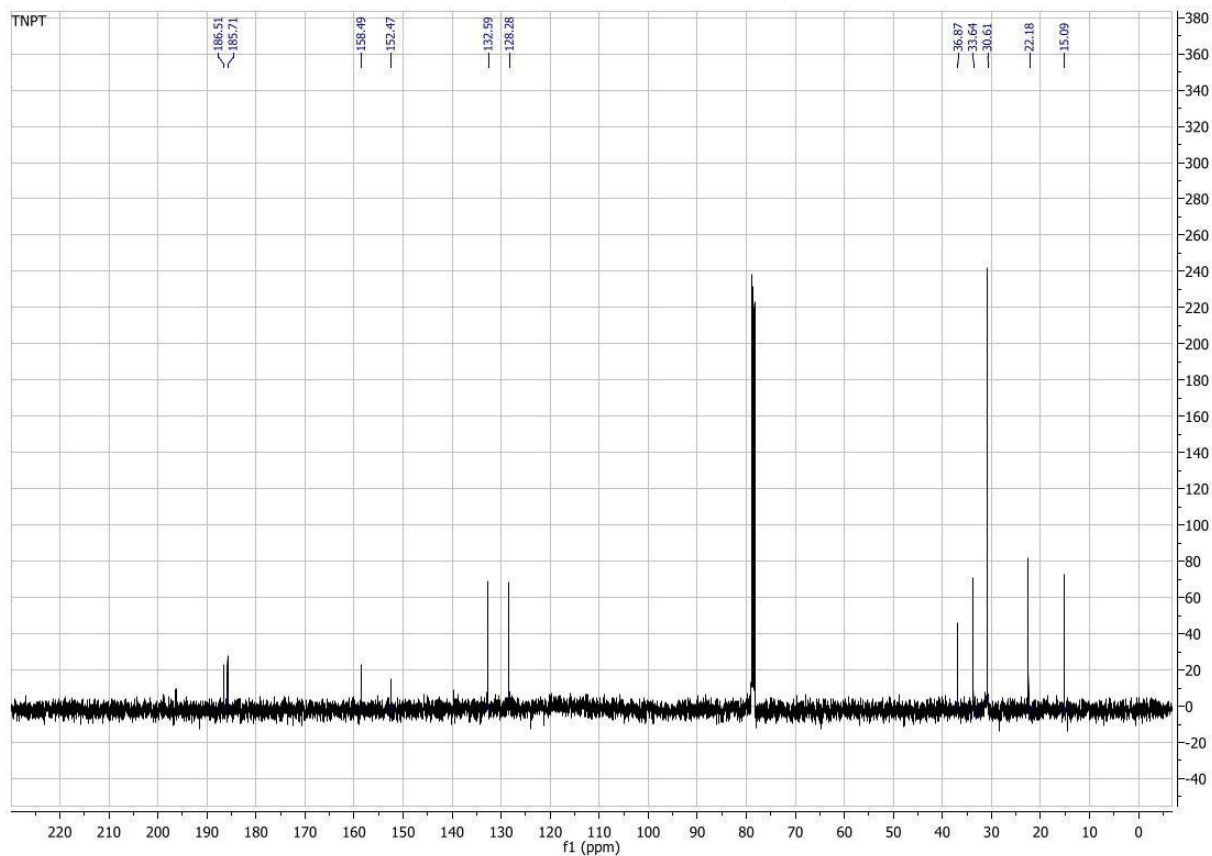
Slika P3. EI MS spekter od 2-*terc*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinona (**2**)



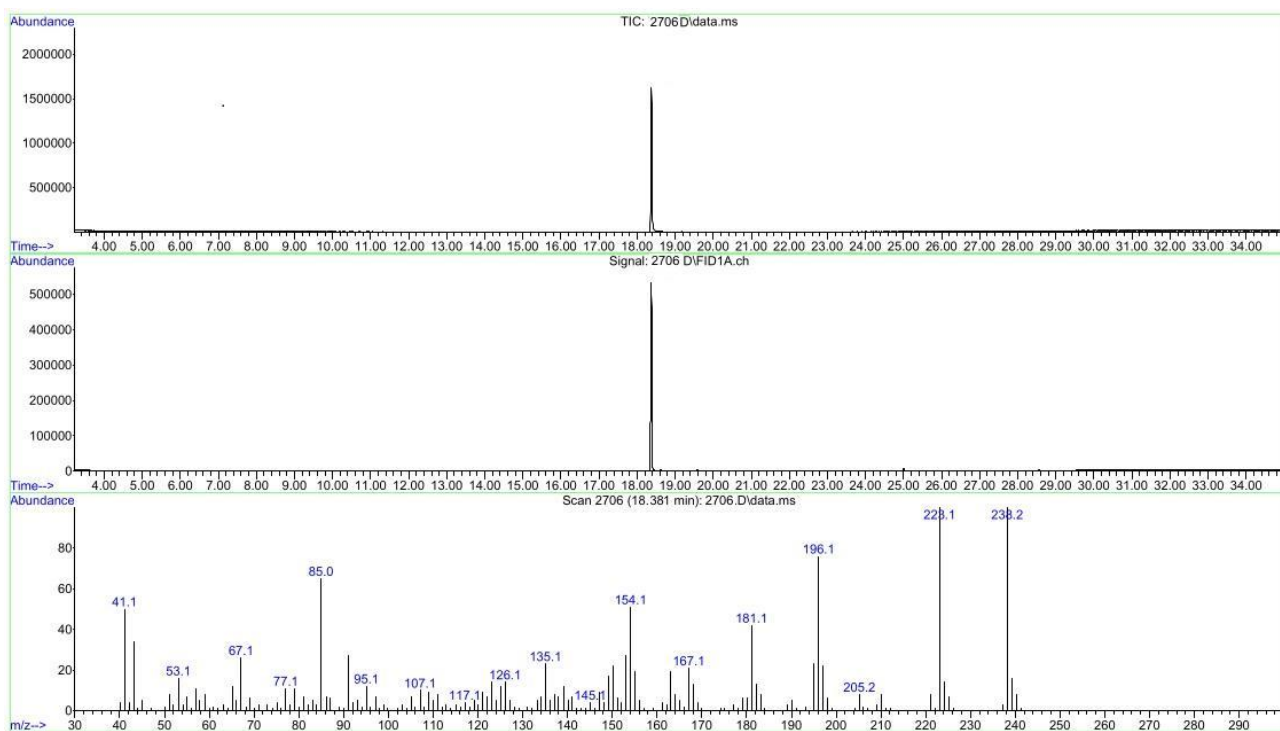
Slika P4. UV/Vis spektar od 2-*tert*-butil-5-(izopropiltio)-1,4-benzohinona (2)



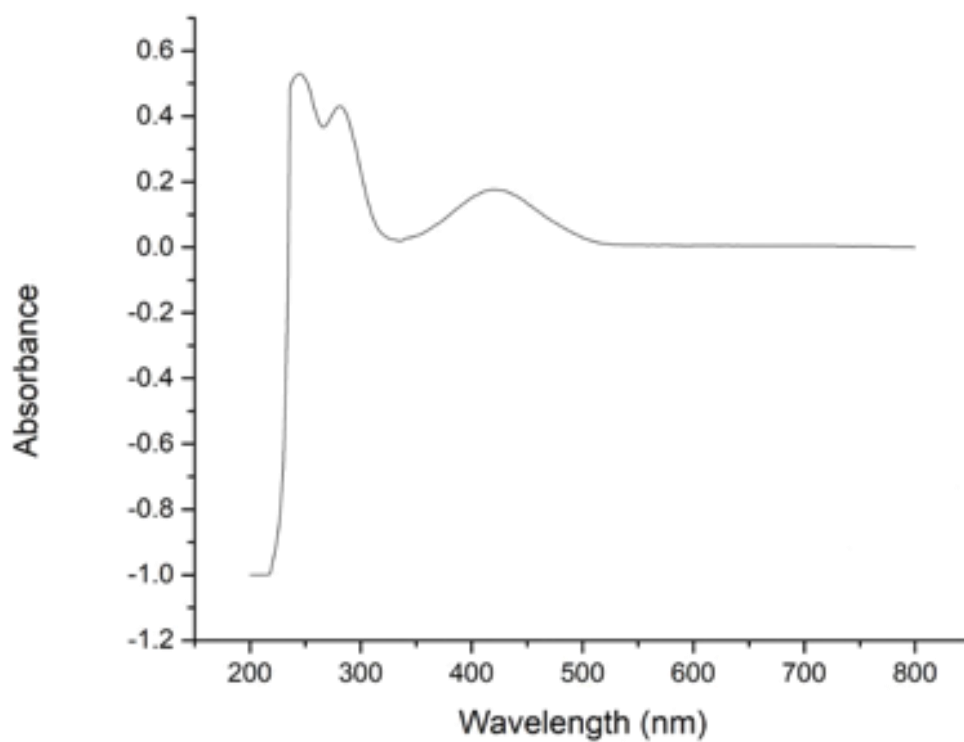
Slika P5. ^1H NMR spektar od 2-*tert*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinona (3)



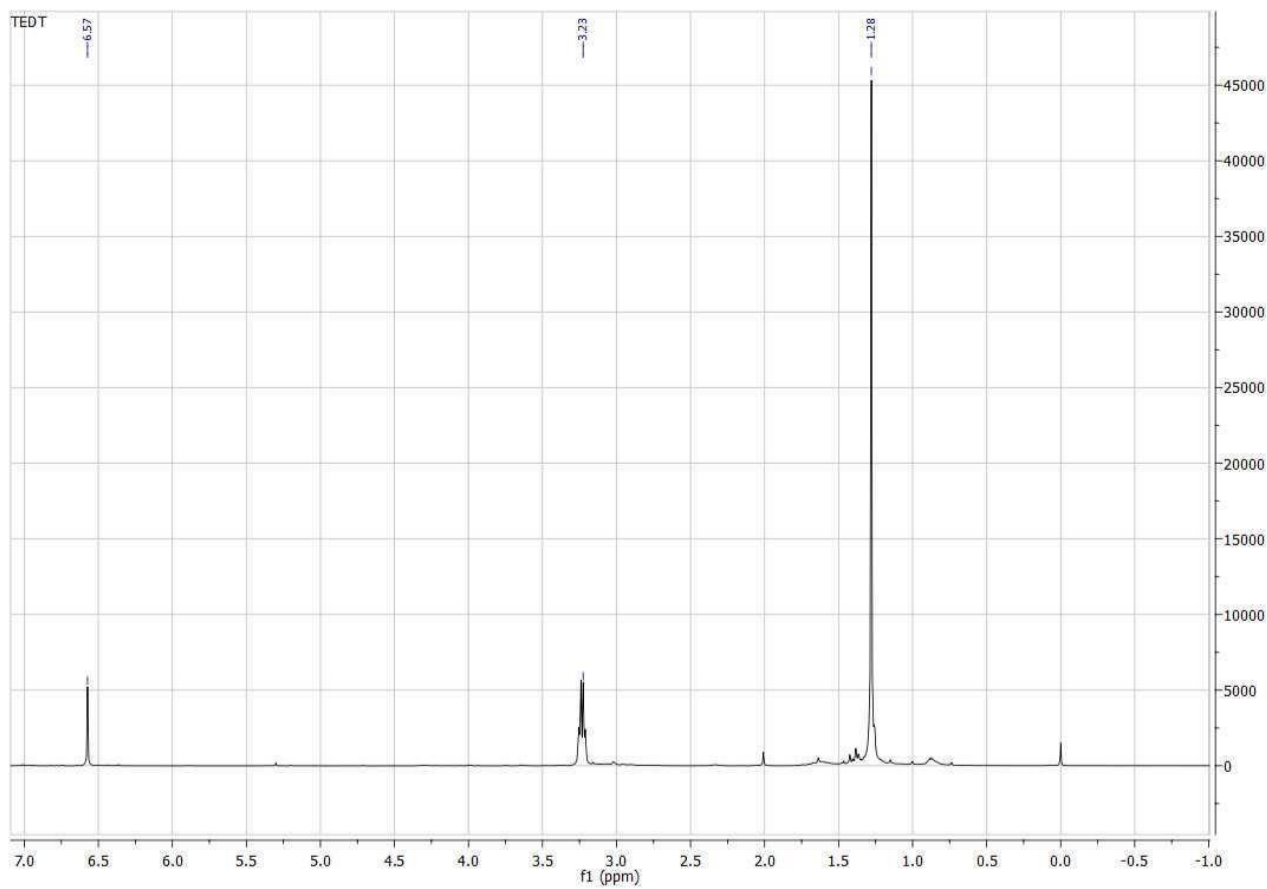
Slika P6. ^{13}C NMR spektar od 2-*tert*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinona (**3**)



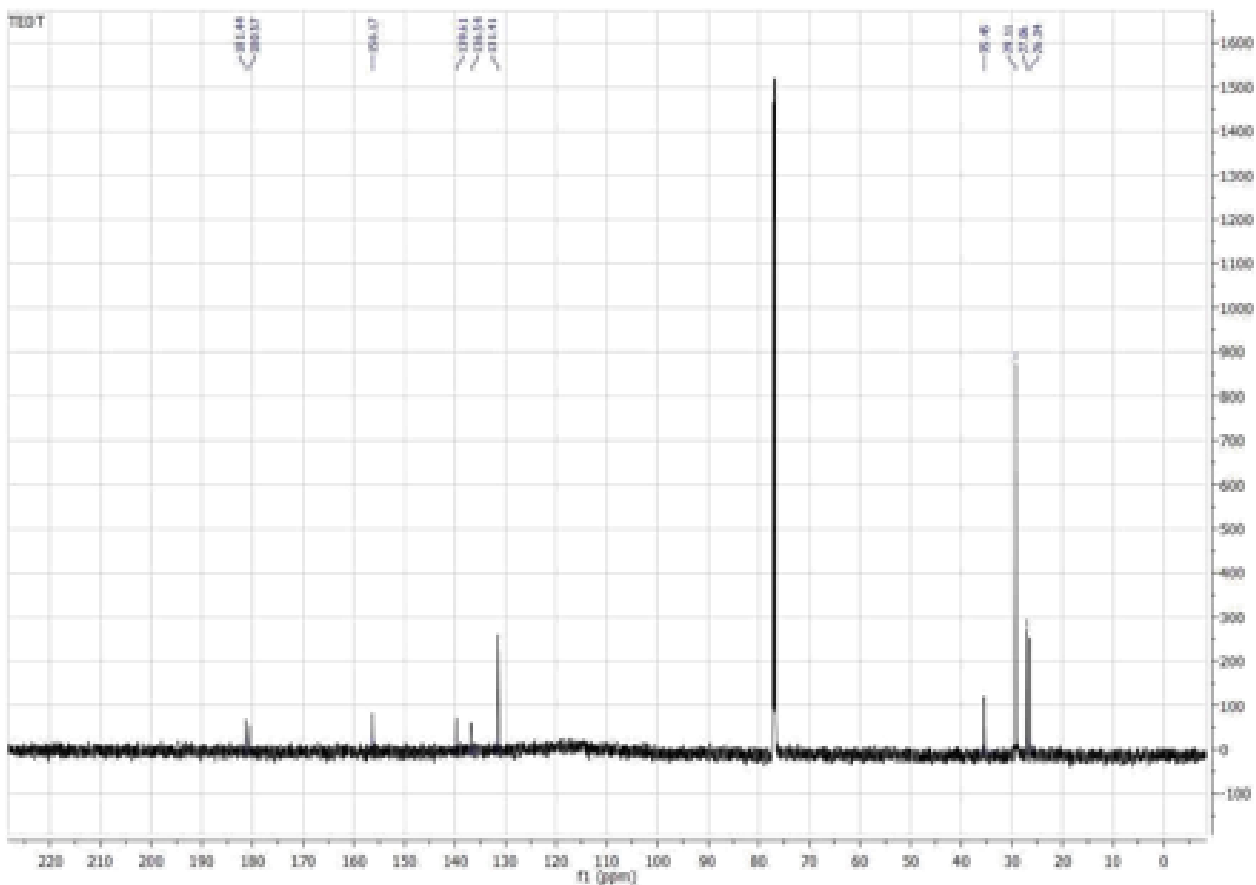
Slika P7. EI MS spektar od 2-*tert*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinona (**3**)



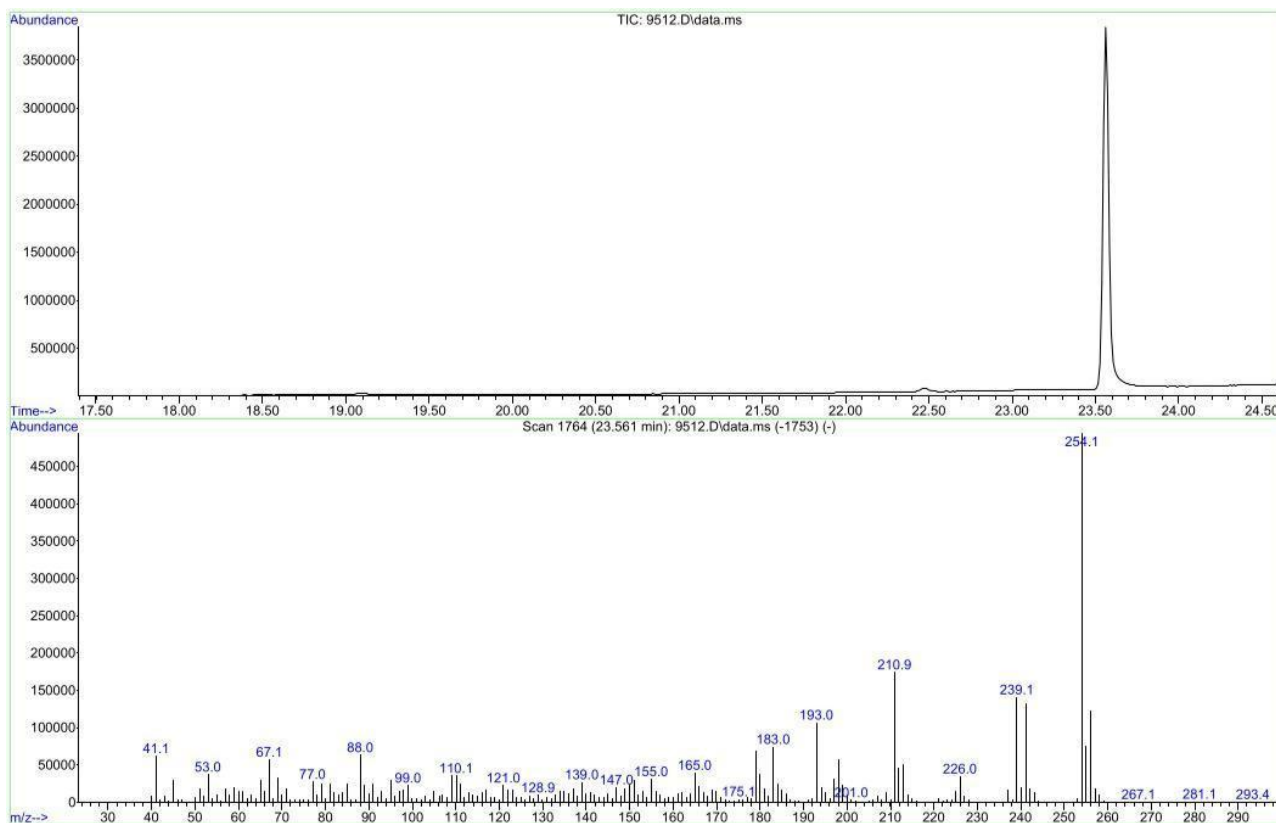
Slika P8. UV/Vis spektar od 2-*terc*-butil-5-(propiltio)-1,4-benzohinona (**3**)



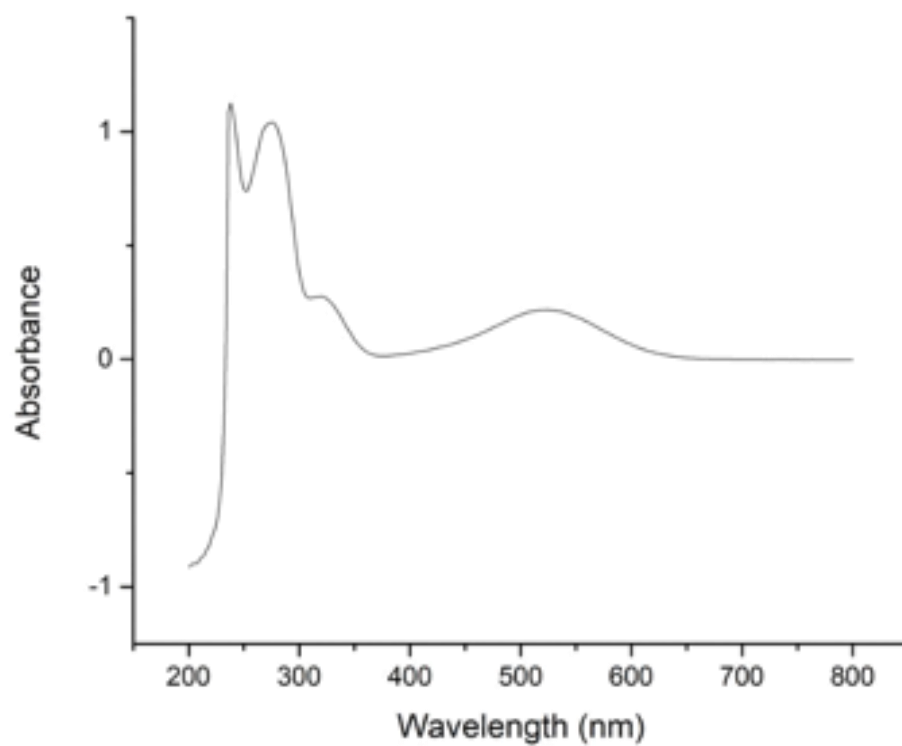
Slika P9. ¹H NMR spektar od 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinona (**4**)



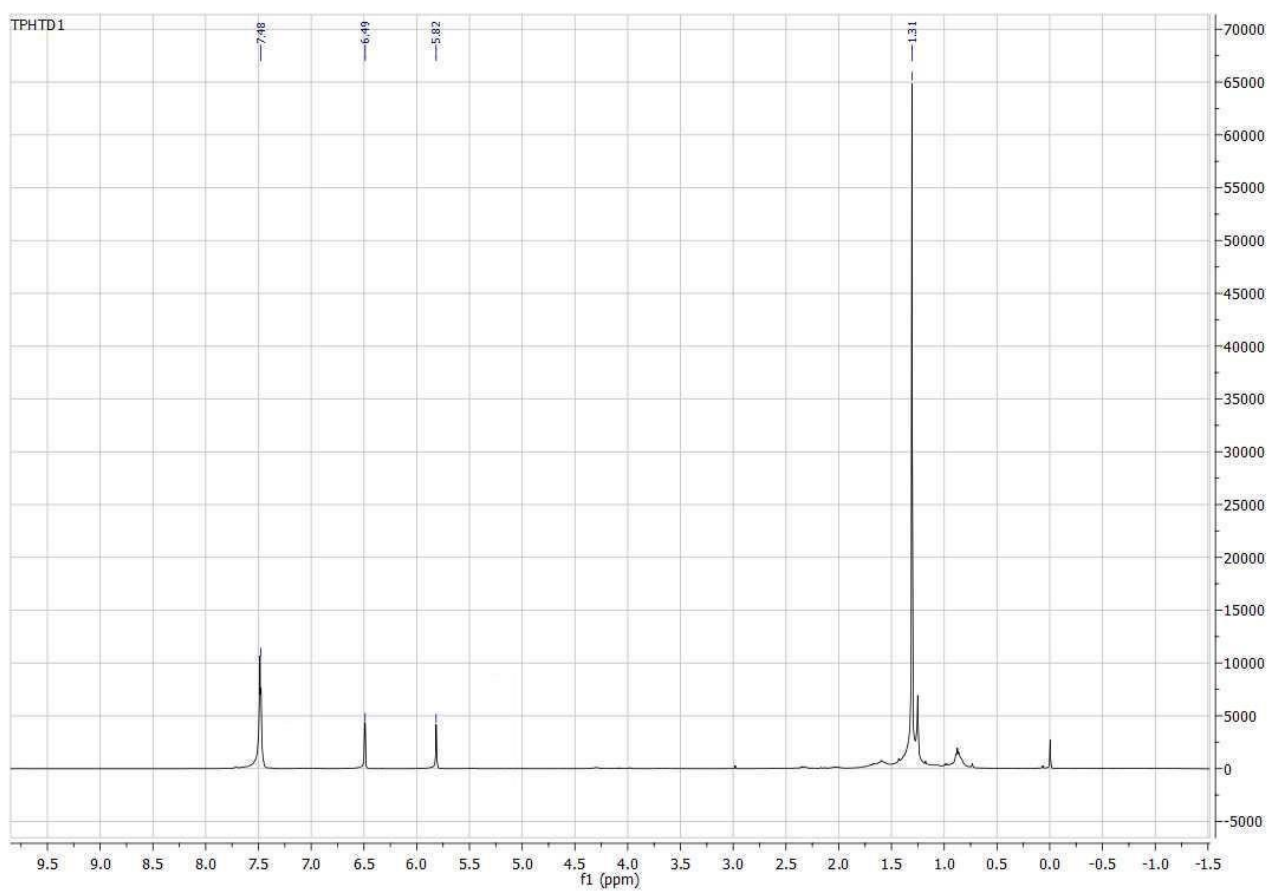
Slika P10. ^{13}C NMR spektar od 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinona (**4**)



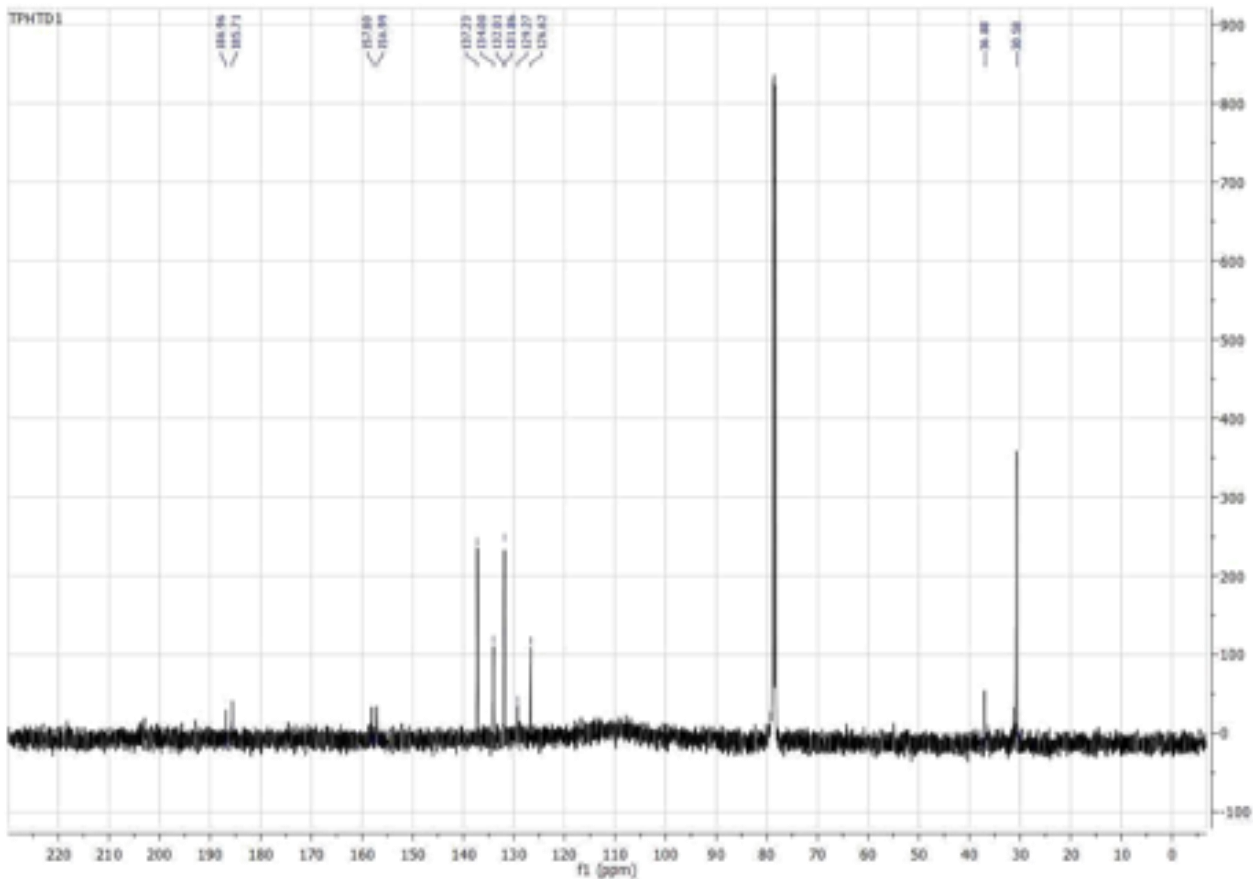
Slika P11. EI MS spektar od 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinona (**4**)



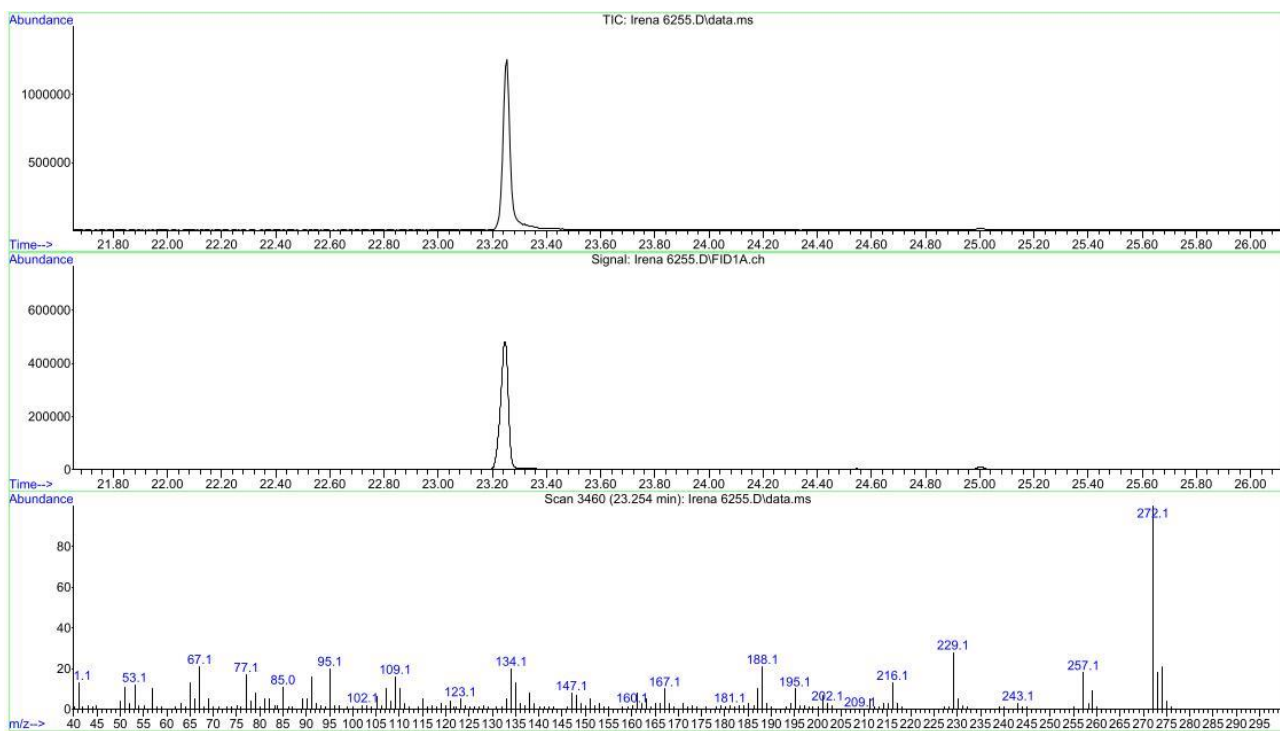
Slika P12. UV/Vis spektar od 2-*terc*-butil-5,6-(etileneditio)-1,4-benzohinona (**4**)



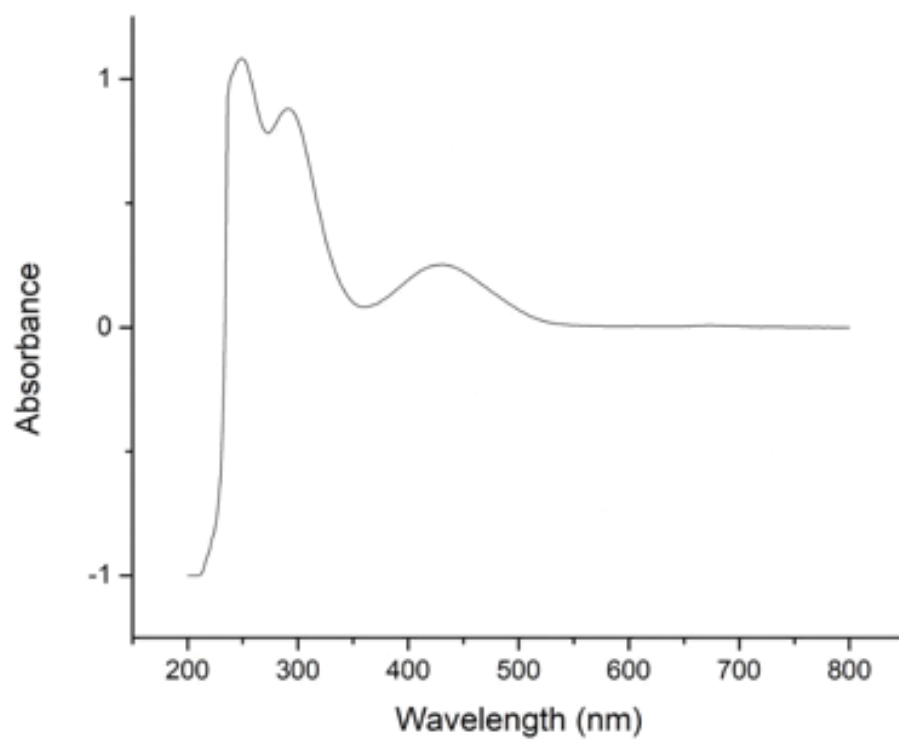
Slika P13. ^1H NMR spektar od 2-*terc*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinona (**5**)



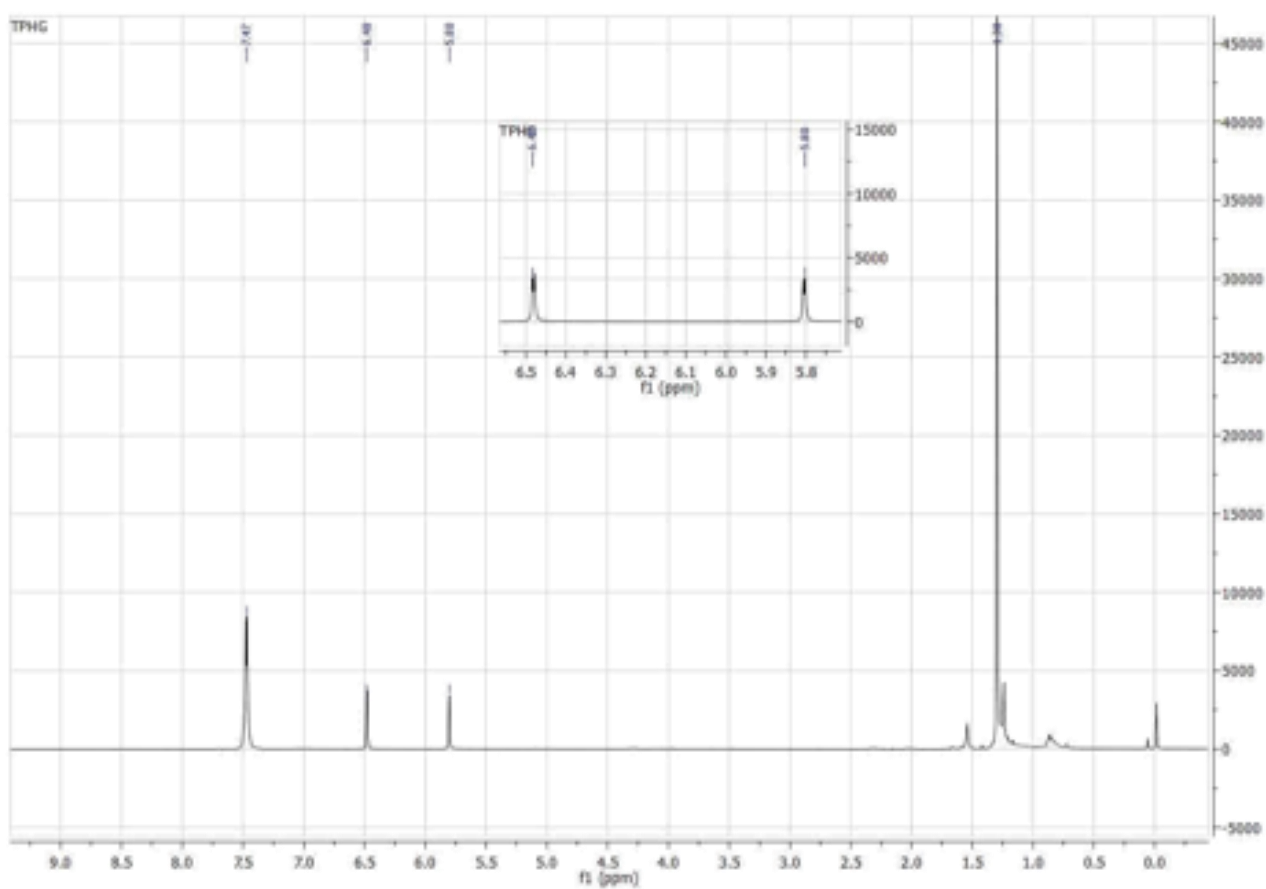
Slika P14. ^{13}C NMR spekter od 2-*tert*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinona (5)



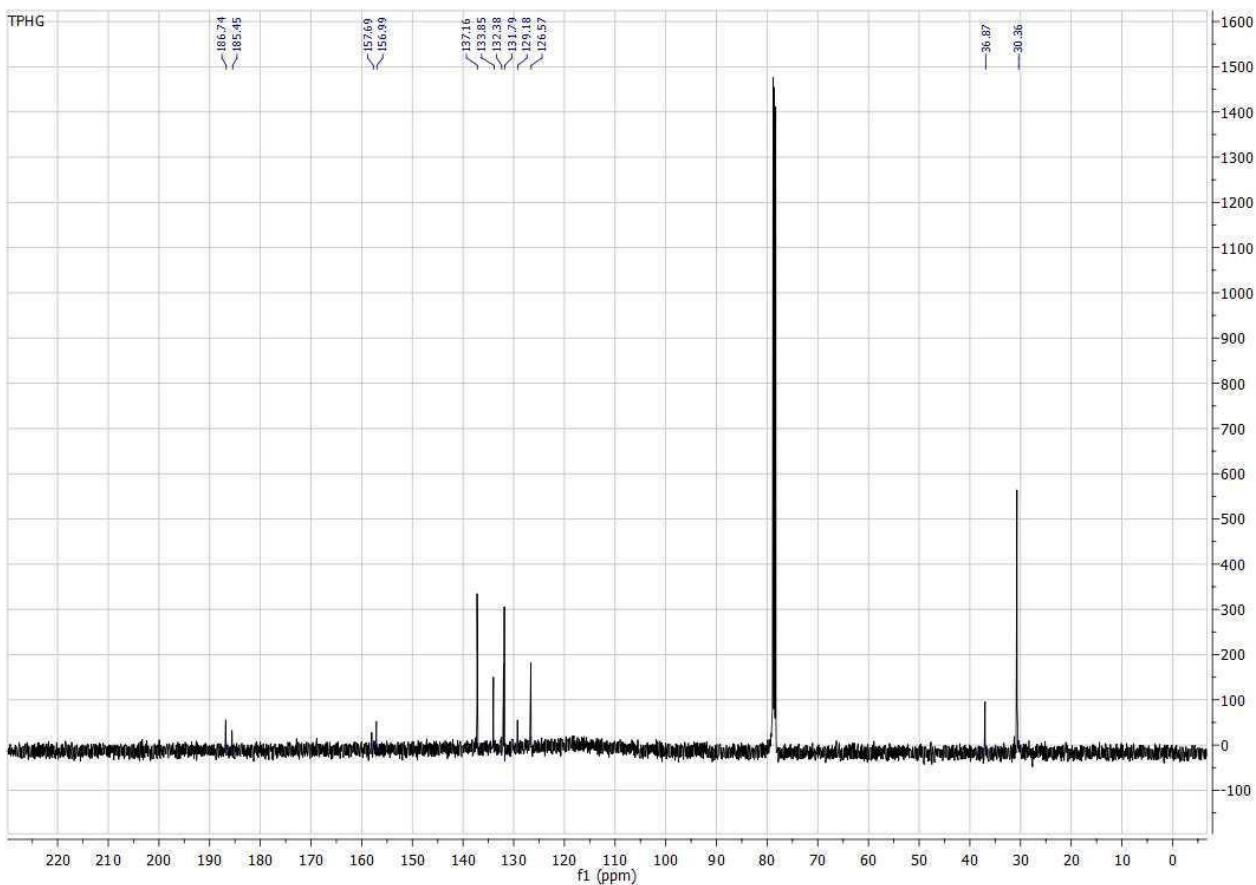
Slika P15. EI MS spekter od 2-*tert*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinona (5)



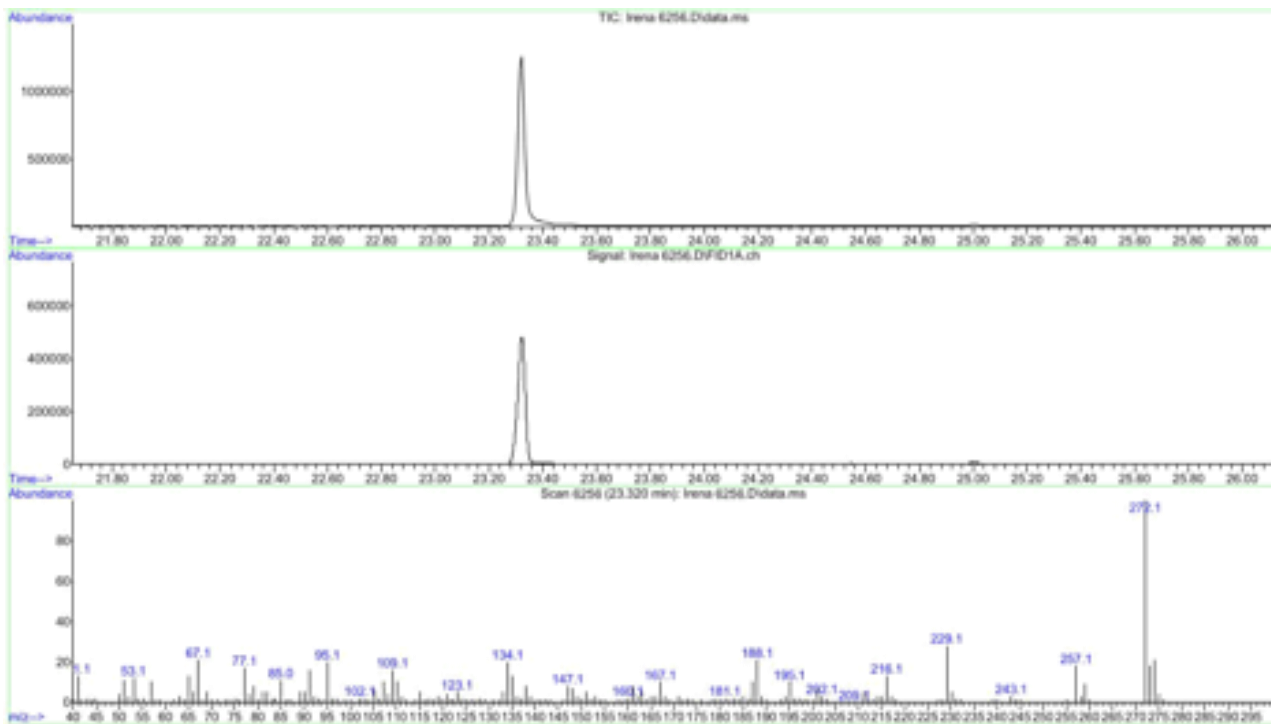
Slika P16. UV/Vis spektar od 2-*terc*-butil-5-(feniltio)-1,4-benzohinona (**5**)



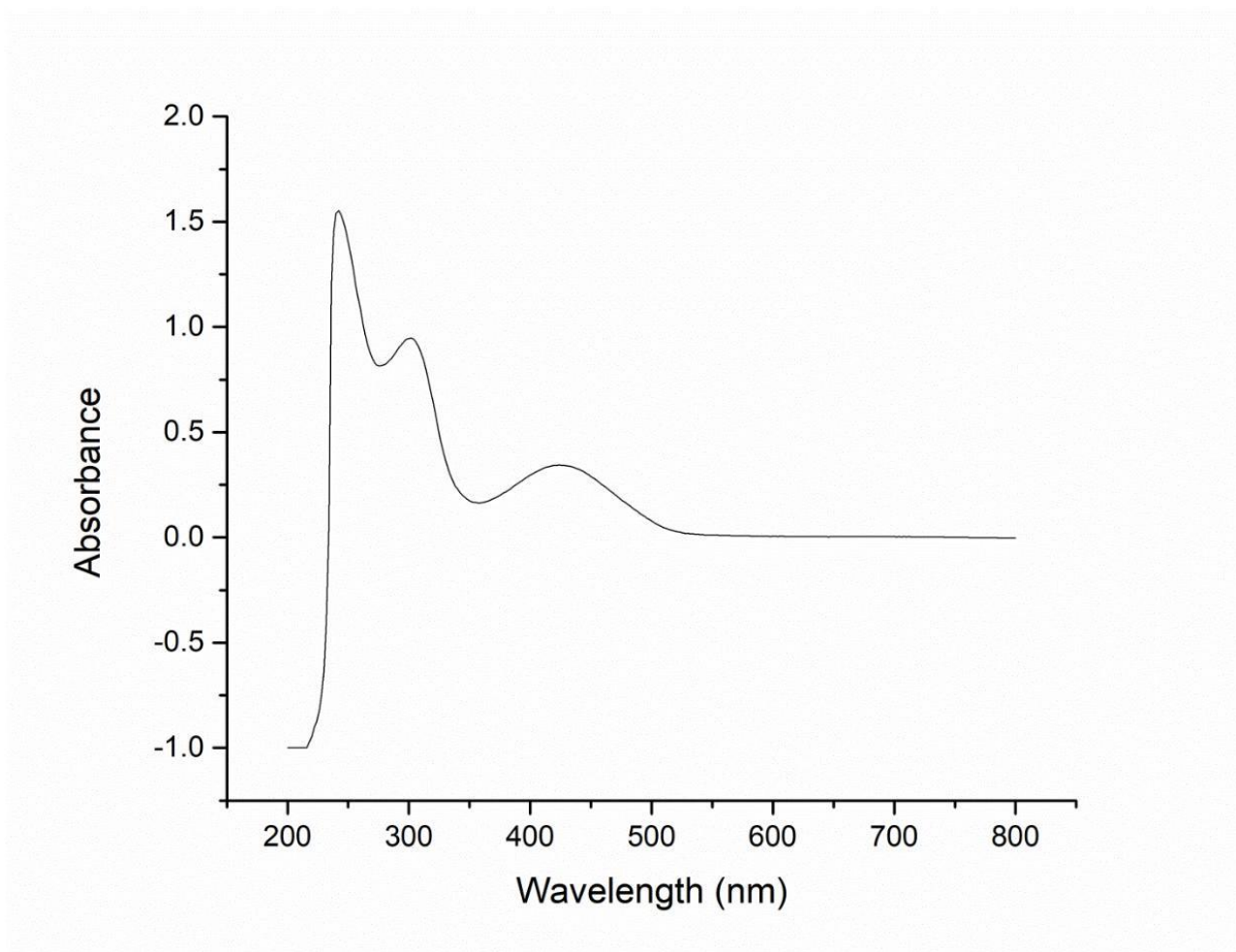
Slika P17. ^1H NMR spektar od 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinona (**6**)



Slika P18. ^{13}C NMR spektar od 2-*tert*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinona (6)

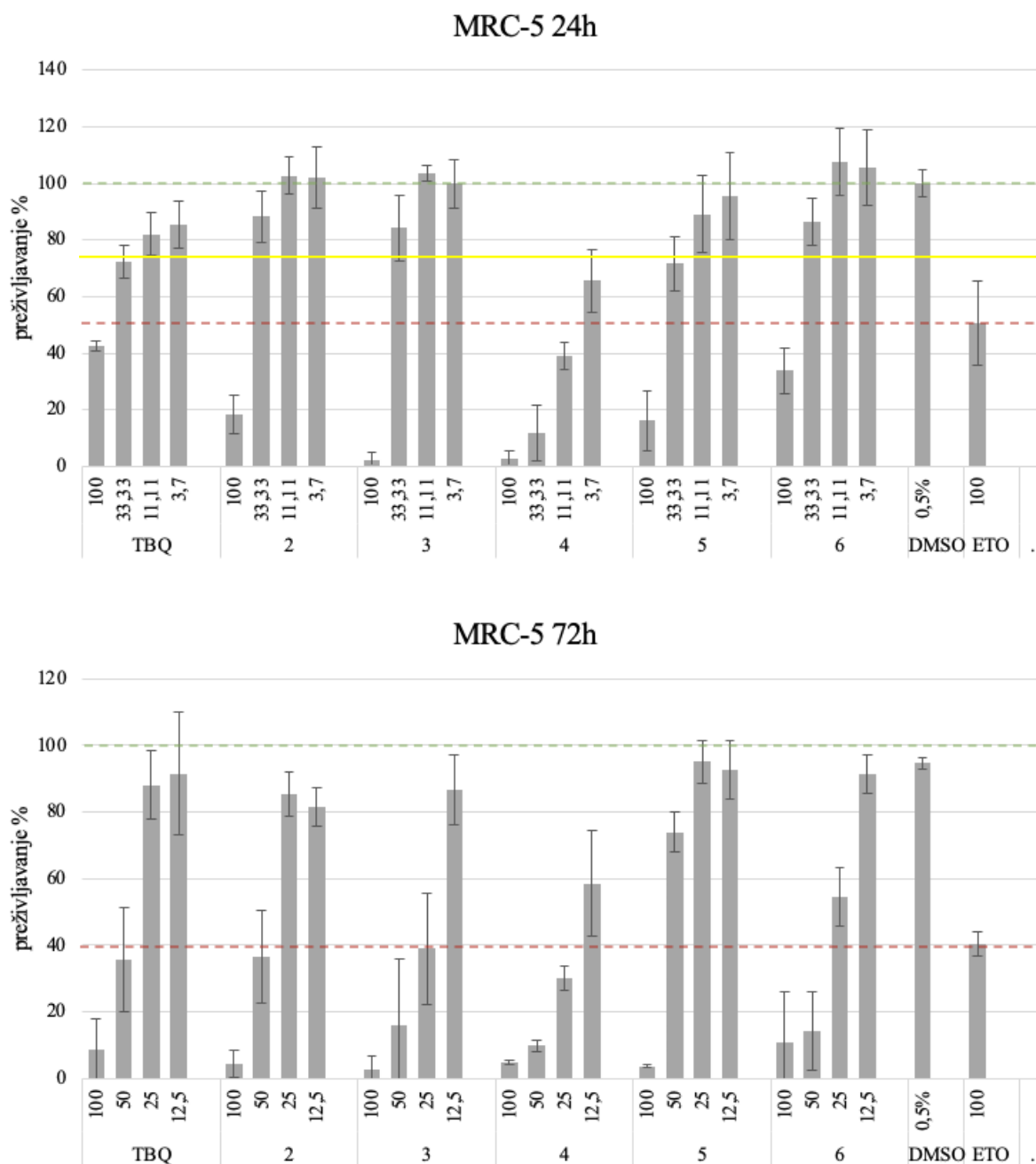


Slika P19. EI MS spektar od 2-*tert*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinona (6)

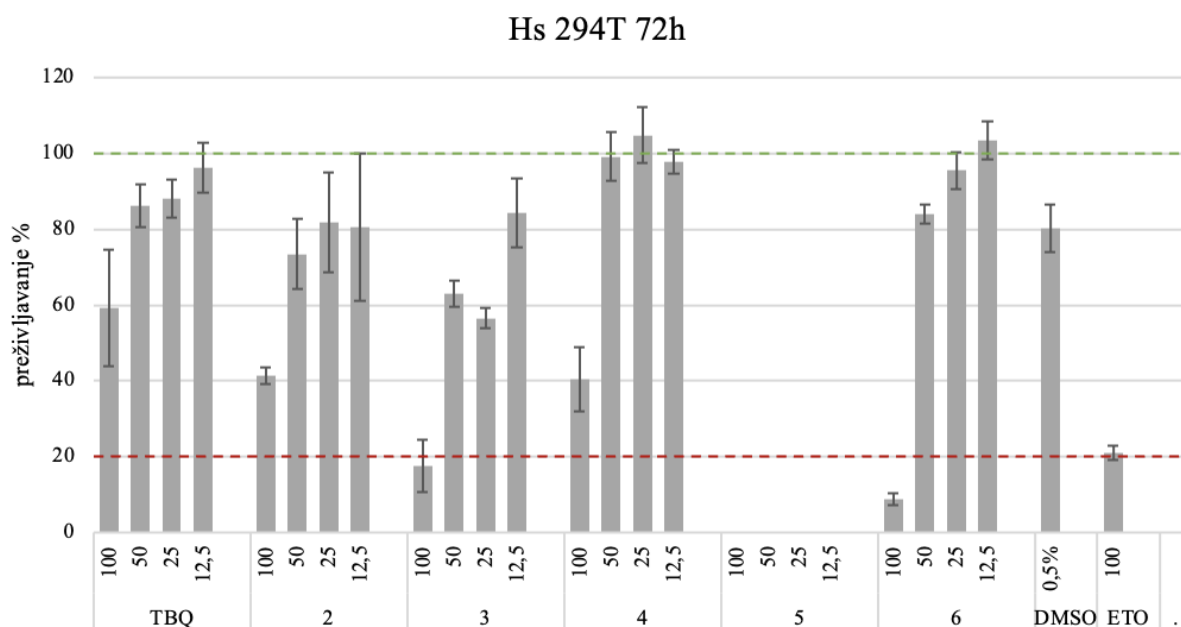
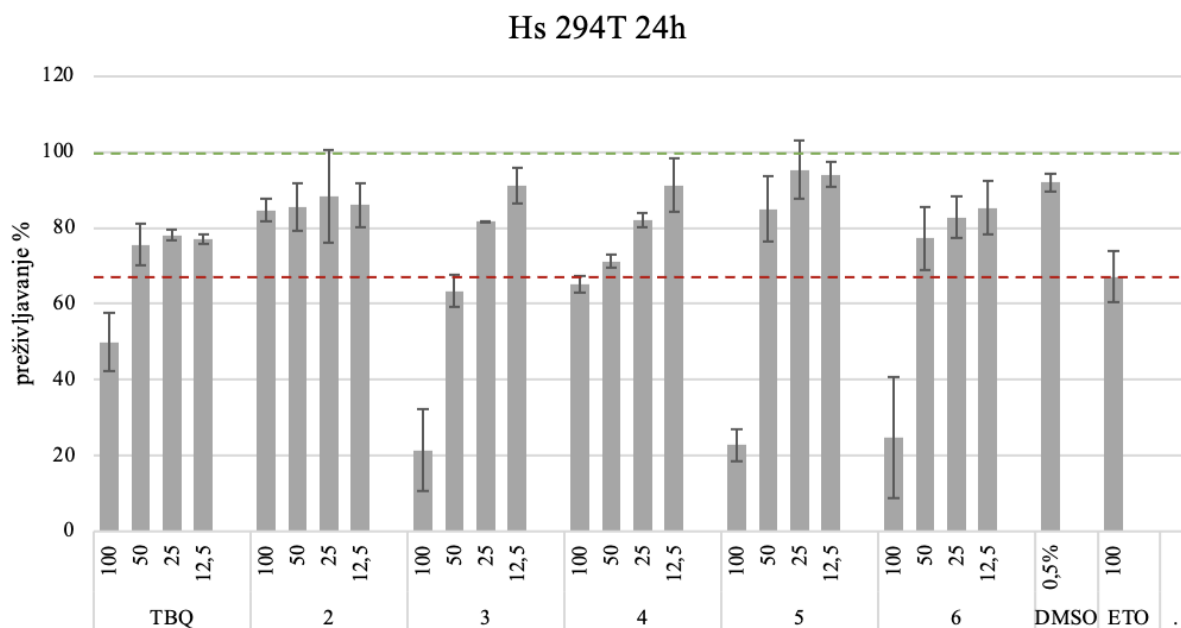


Slika P20. UV/Vis spektar od 2-*terc*-butil-6-(feniltio)-1,4-benzohinona (**6**)

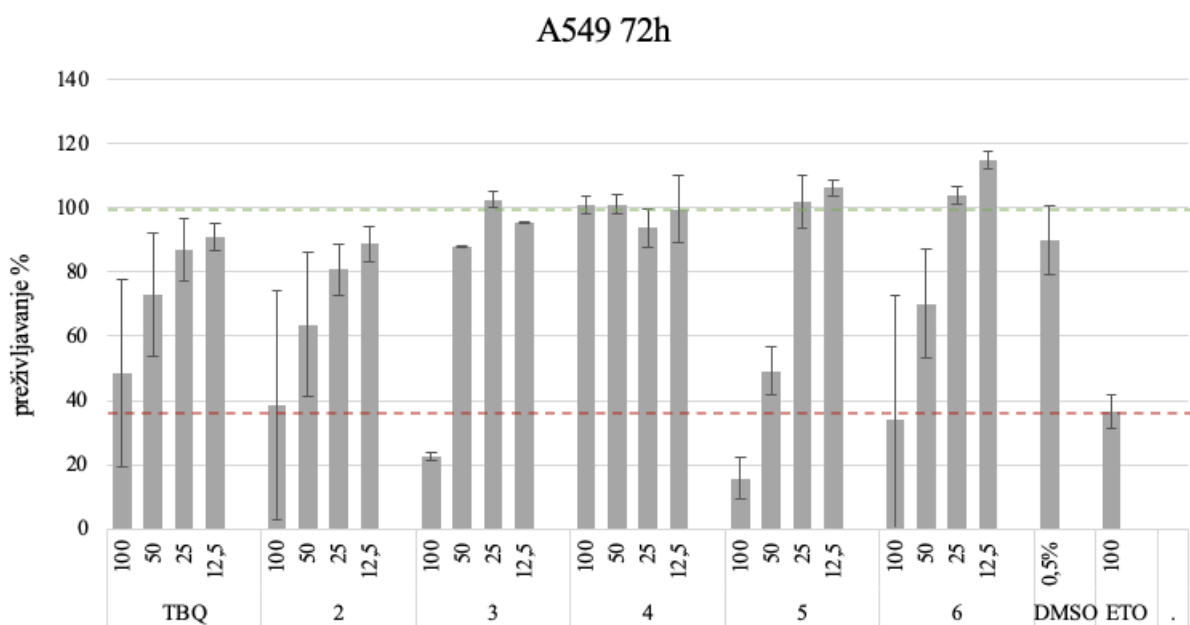
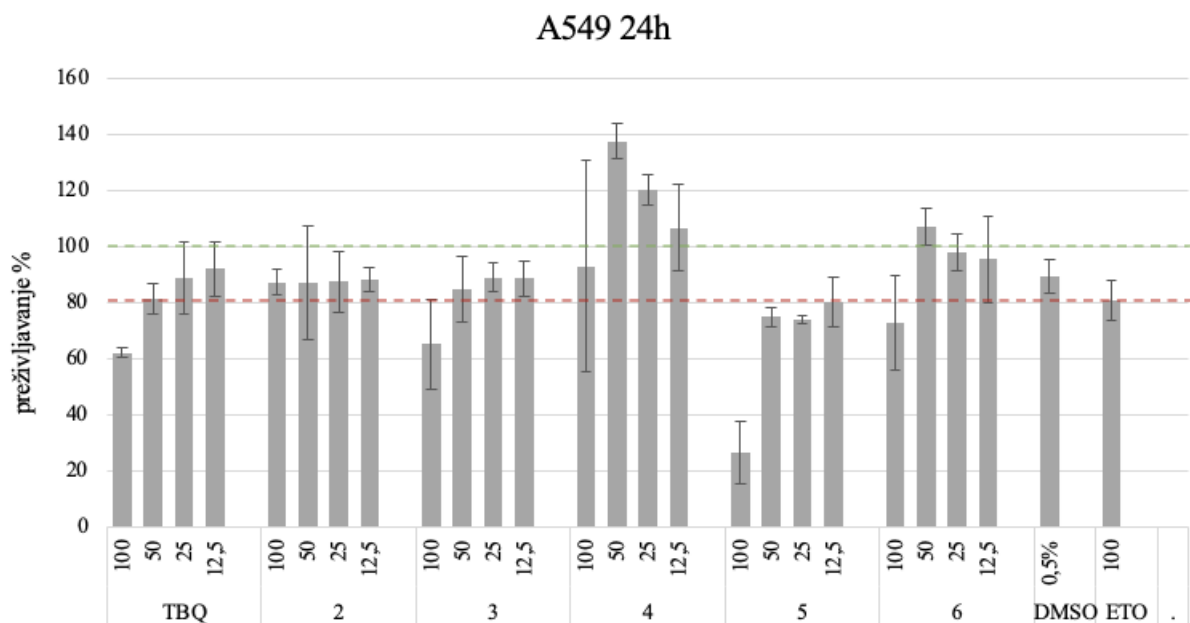
PRILOG 2. Procenat preživljavanja ćelija nakon 24h i 72h tretmana u odnosu na koncentraciju TBQ i njegovih derivata, određen MTT (ćelijske linije: MRC-5, Hs 294T, A549, HCT 116) i MTS testom (ćelijska linija HepG2).



Slika P21. Procenat vijabilnih ćelija MRC-5 ćelijske linije nakon 24h i 72h tretmana TBQ i njegovim alkilno i arilno derivatima. Zelenom isprekidanom linijom je obeleženo preživljavanje ćelija bez tretmana dok je crvenom isprekidanom linijom obeleženo preživljavanje ćelija nakon tretmana sa pozitivnom kontrolom – ETO (etopozid). DMSO – dimetilsulfoksid. Žutom linijom je obeležena vijabilnost od 75% koja predstavlja granicu za ispitivanje genotoksičnosti komet testom.

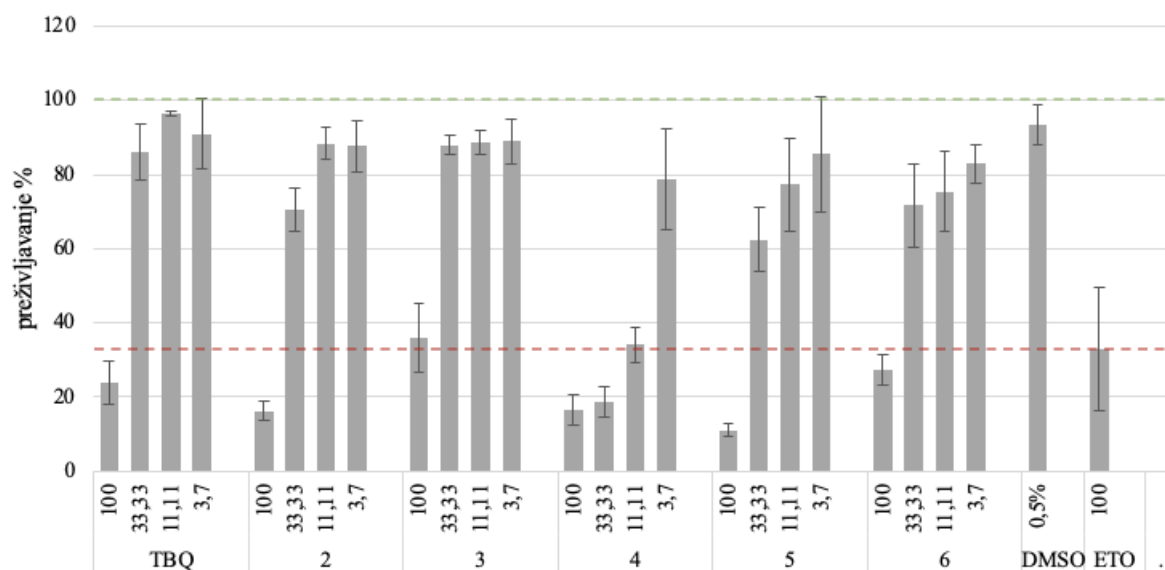


Slika P22. Procenat vijabilnih ćelija Hs 294T ćelijske linije nakon 24h i 72h tretmana TBQ i njegovim alkiltio i ariltio derivatima. Zelenom isprekidanom linijom je obeleženo preživljavanje ćelija bez tretmana dok je crvenom isprekidanom linijom obeleženo preživljavanje ćelija nakon tretmana sa pozitivnom kontrolom – ETO (etopozid). DMSO – dimetilsulfoksid.

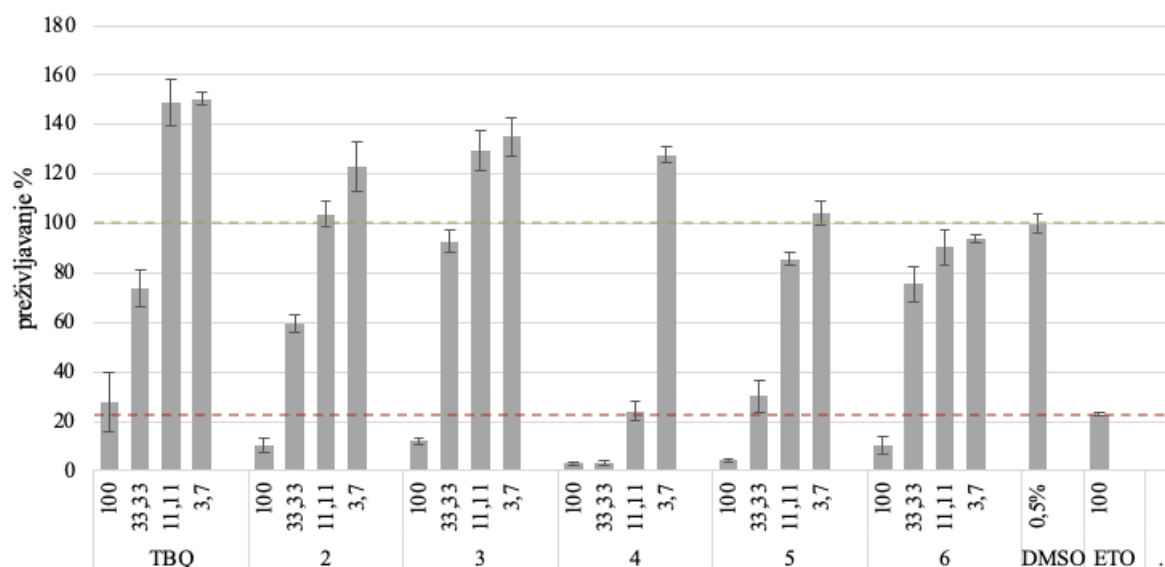


Slika P23. Procenat vijabilnih ćelija A549 ćelijske linije nakon 24h i 72h tretmana TBQ i njegovim alkiltio i ariltio derivatima. Zelenom isprekidanom linijom je obeleženo preživljavanje ćelija bez tretmana dok je crvenom isprekidanom linijom obeleženo preživljavanje ćelija nakon tretmana sa pozitivnom kontrolom – ETO (etopozid). DMSO – dimetilsulfoksid.

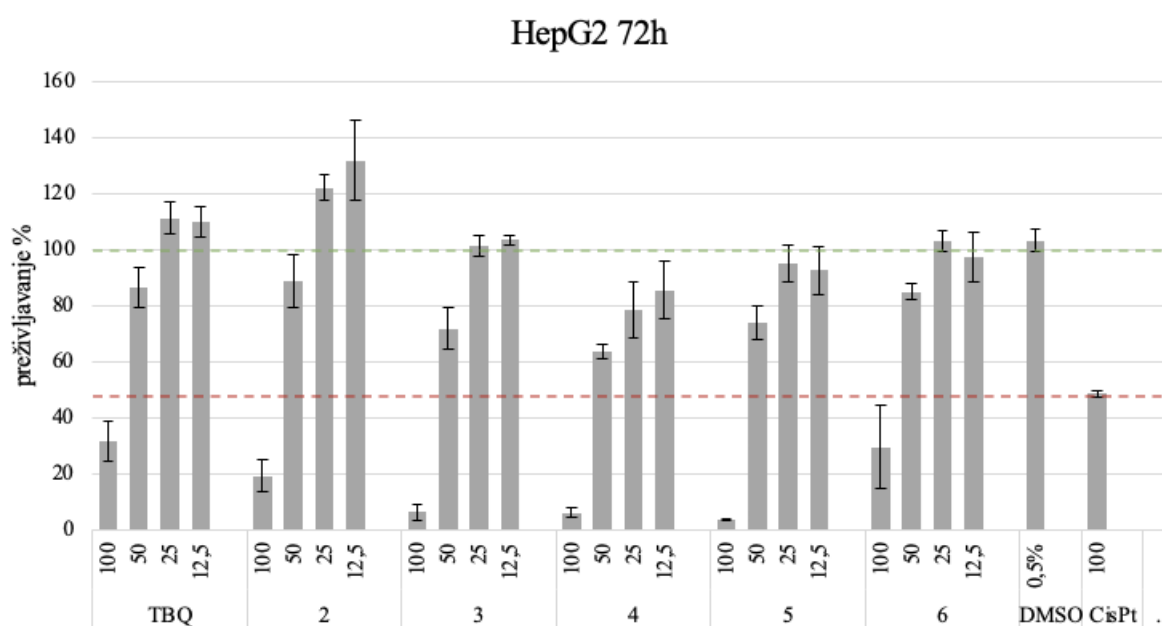
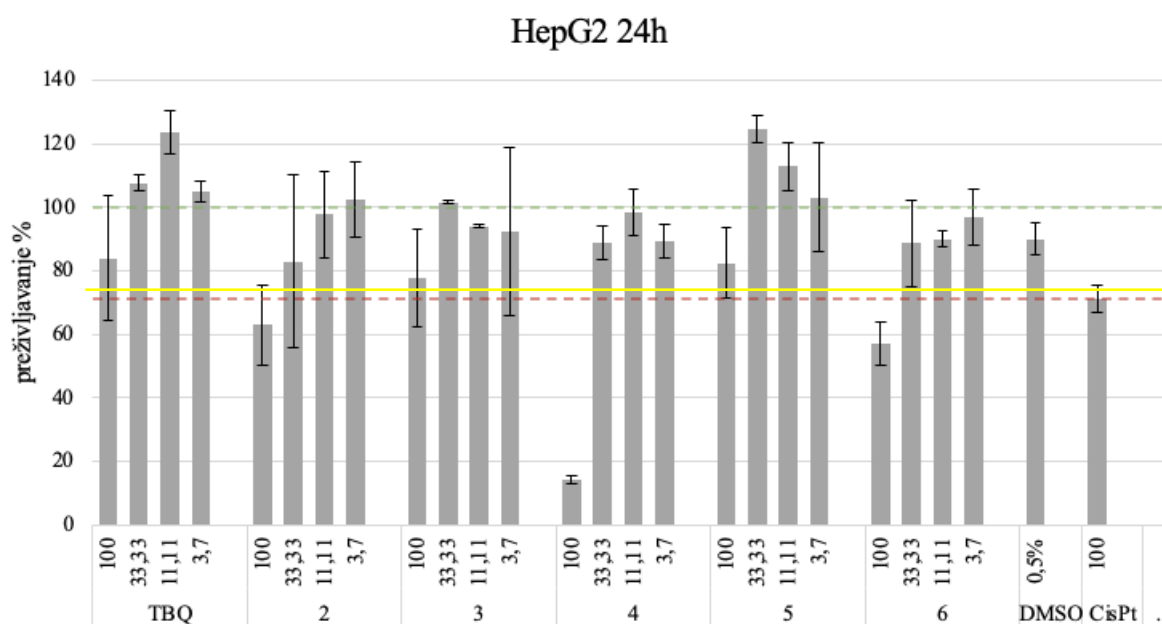
HCT 116 24h



HCT 116 72h

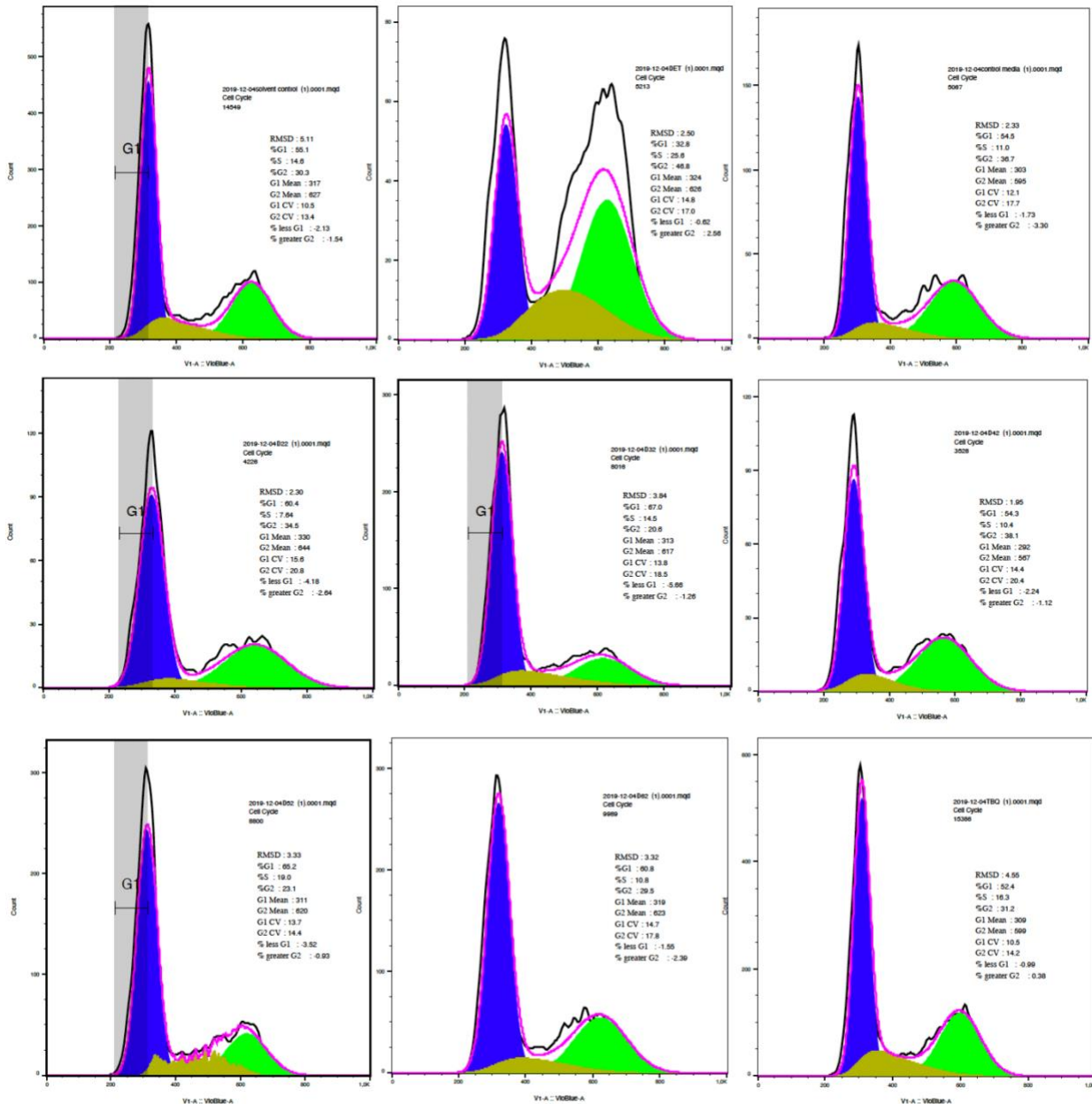


Slika P24. Procenat vijabilnih ćelija HCT 116 ćelijske linije nakon 24h i 72h tretmana TBQ i njegovim alkilto i ariltio derivatima. Zelenom isprekidanom linijom je obeleženo preživljavanje ćelija bez tretmana dok je crvenom isprekidanom linijom obeleženo preživljavanje ćelija nakon tretmana sa pozitivnom kontrolom – ETO (etopozid). DMSO – dimetilsulfoksid.

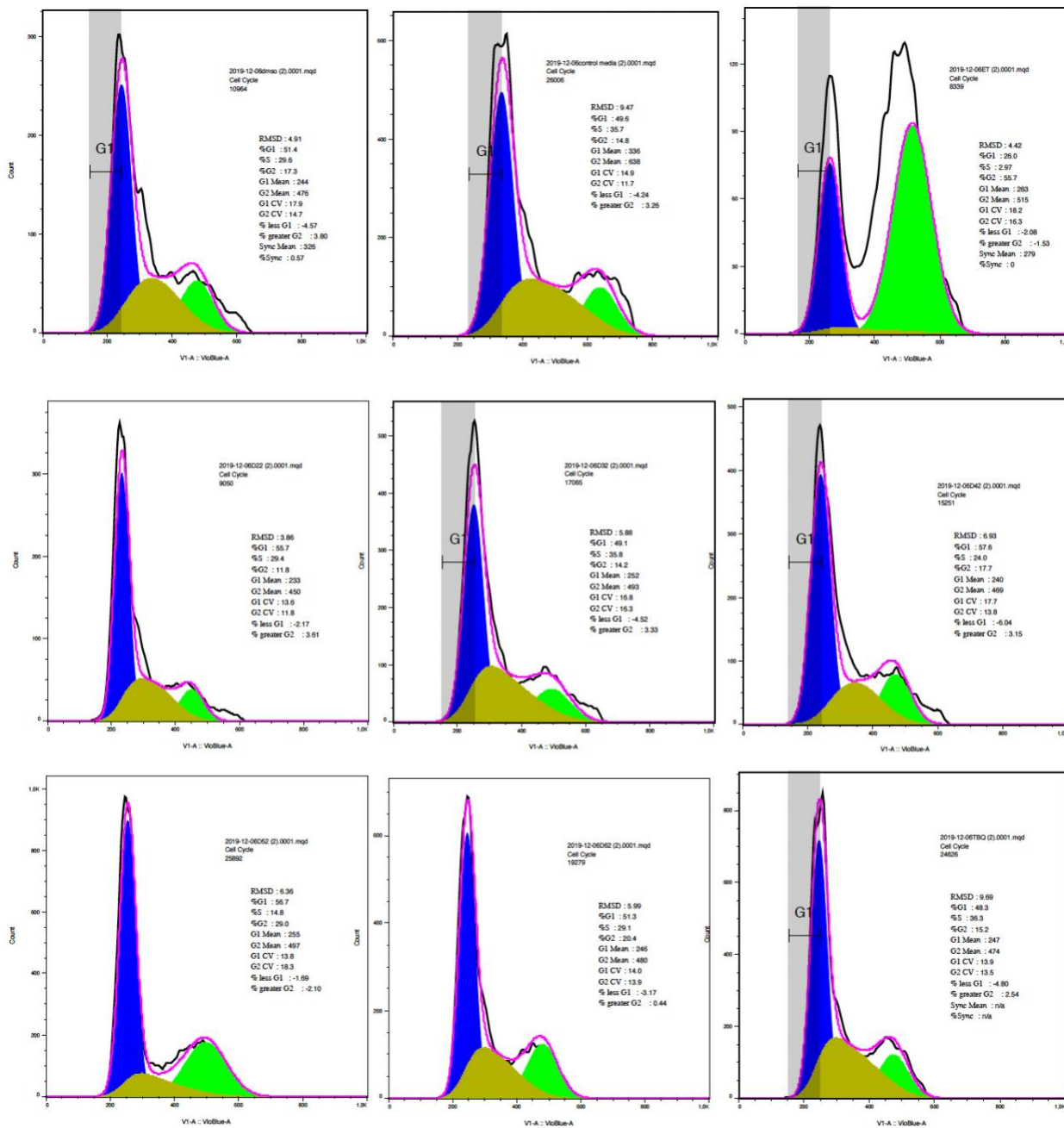


Slika P25. Procenat vijabilnih ćelija HepG2 ćelijske linije nakon 24h i 72h tretmana TBQ i njegovim alkilno i arilno derivatima. Zelenom isprekidanom linijom je obeleženo preživljavanje ćelija bez tretmana dok je crvenom isprekidanom linijom obeleženo preživljavanje ćelija nakon tretmana sa pozitivnom kontrolom – ETO (etopozid). DMSO – dimetilsulfoksid. Žutom linijom je obeležena vijabilnost od 75% koja predstavlja granicu za ispitivanje genotoksičnosti komet testom.

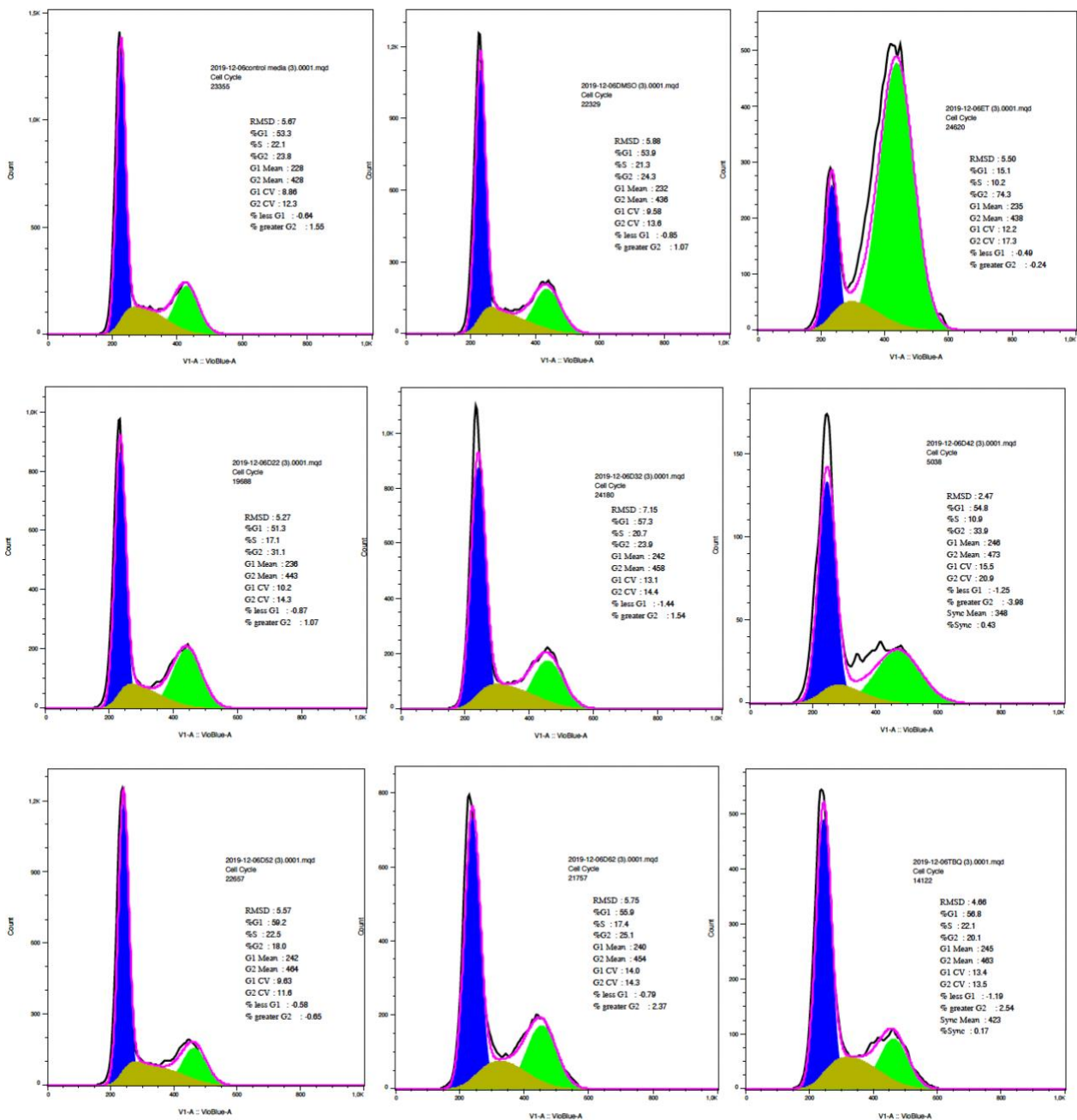
PRILOG 3. Rezultati analize ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom



Slika P26. Rezultati analize ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom, prvi eksperiment



Slika P27. Rezultati analize ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom, drugi eksperiment



Slika P28. Rezultati analize ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom, treći eksperiment

BIOGRAFIJA

Jelena Đorđević Aleksić je rođena 25.06.1991. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu upisala je 2010. god., a od 2013. god. studije nastavlja na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modul Molekularna biologija i fiziologija. Master akademske studije upisuje 2016. god. na istom fakultetu na studijskom programu Biologija mikroorganizama, smer Molekularna biologija i fiziologija. Master rad, pod nazivom „Ispitivanje mutagenog i genotoksičnog potencijala derivata *tert*-butilhinona SOS/*umuC* testom i alkalnim komet testom na MRC-5 i HepG2 ćelijskim linijama“ odbranila je 2017. god. na Katedri za mikrobiologiju, čime je stekla zvanje master biolog. Doktorske akademske studije upisala je iste godine, na istom fakultetu, na studijskoj grupi Biologija, modul Biologija mikroorganizama.

Od 2019. god. zaposlena je na Institutu za Multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu u Odseku za biologiju i zaštitu kopnenih voda. Učestvovala je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: „Ribe kao bioindikator stanja kvaliteta otvorenih voda Srbije” i međunarodnom projektu MEASURES. Od 2023. god. učestvuje na Horizon evropskom projektu DANUBE4all. Učestvovala je na dva bilateralna projekta Republike Srbije sa Slovenijom i Crnom Gorom.

Član je Srpskog biološkog društva, Udruženja mikrobiologa Srbije, Srpskog društva za molekularnu biologiju i European Environmental Mutagen Society.

Kao autor i koautor objavila je 10 radova u međunarodnim naučnim časopisima, jedno poglavlje u monografiji i 15 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Ђорђевић Алексић

број индекса Б3013/2017

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

„Биолошка активност алкилтио и арилтио деривата 2-мерц-бутил-1,4-бензохинона“

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2023.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Ђорђевић Алексић

Број индекса Б3013/2017

Студијски програм Биологија

Наслов рада „Биолошка активност алкилтио и арилтио деривата 2-терци-бутил-1,4-бензохинона“

Ментор проф. др Бранка Вуковић-Гачић, др Ирена Новаковић

Потписани/а Јелена Ђорђевић Алексић


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2023.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Биолошка активност алкилтио и арилтио деривата 2-терц-бутил-1,4-бензохинона“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)


5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2023.



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.