



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Mihajlo Z. Gajić

**INHIBICIJA DEZOKSIRIBONUKLEAZE I I
KSANTIN OKSIDAZE HETEROCIKLIČNIM
JEDINJENJIMA *IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Mihajlo Z. Gajić

***IN VITRO* INHIBITION OF
DEOXYRIBONUCLEASE I AND XANTHINE
OXIDASE BY HETEROCYCLIC
COMPOUNDS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2024.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Андрија Шмелцеровић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Медицински Факултет

Наслов:

Инхибиција дезоксирибонуклеазе I и ксантин оксидазе хетероцикличним једињењима *in vitro*

Резиме:

Овом докторском дисертацијом је испитивана способност *in vitro* инхибиције дезоксирибонуклеазе I и ксантин оксидазе дериватима 2-алкилиден и 2,5-диалкилиден-4-оксотиазолидина, 1-супституисаних и 1,2-дисупституисаних 1,2,3,4-тетрахидроизохинолина, 1-(пиридин-2-ил)пропан-2-она, нафталена, 8-хидроксихинолина, нитроксолина и сродних структура. Способност инхибиције дезоксирибонуклеазе I са IC_{50} вредностима нижим од 200 μM забележена је код 24, а способност инхибиције ксантин оксидазе са IC_{50} вредностима нижим од 150 μM код 2 од укупно 77 тестираних једињења. Најпотентнији инхибитор дезоксирибонуклеазе I, дериват нитроксолина *N*-((1-(бензо[d]тиено-2-илметил)пиперидин-3-ил)метил)-8-хидрокси-5-нитроксолин-7-карбоксамид ($IC_{50} = 23,33 \mu\text{M}$), блиско је праћен дериватима 8-хидроксихинолина *N*-((1-(2,3-дихидро-1*H*-инден-2-ил)пиперидин-3-ил)метил)-*N*-(2-(диметиламино)етил)-8-хидроксихинолин-2-карбоксамидом ($IC_{50} = 25,61 \mu\text{M}$) и *N*-((1-(2,3-дихидро-1*H*-инден-2-ил)пиперидин-3-ил)метил)-*N*-(2-(диметиламино)етил)-8-хидроксихинолин-7-карбоксамидом ($IC_{50} = 30,58 \mu\text{M}$). Дериват 2,5-диалкилиде-4-оксотиазолидина, етил (*Z*)-2-(2-(цијанометил)-4-оксотиазолидин-5-илиден)ацетат, инхибирао је дезоксирибонуклеазу I и ксантин оксидазу са IC_{50} вредностима од 67,94 μM и 97,98 μM . У сврху разјашњавања механизма инхибиције ензима, за најпотентнија једињења је одређено да показују некомпетитивни

тип инхибиције дезоксирибонуклеазе I. Међумолекулске интеракције инхибитора и ензима предвиђене су методом молекуларног *docking*-а, а стабилност ензим-инхибитор комплекса методом молекуларне динамике.

Мултифункционална природа активних деривата 8-хидроксихинолина, нитроксолина и 2,5-диалкилиде-4-оксотиазолидина у складу је са модерним терапијским приступом мултифакторијалних неуродегенеративних болести.

Општи закључак ове докторске дисертације је да најефикаснији инхибитори дезоксирибонуклеазе I из групе нитроксолина и 8-хидроксихинолина представљају најпотентније до сада познате инхибиторе овог ензима у форми малих синтетских органских молекула. Дериват 2,5-диалкилиде-4-оксотиазолидина са способношћу инхибиције дезоксирибонуклеазе I и ксантин оксидазе је једини до сада идентификовани дуални инхибитор ових ензима. Издвојена једињења могу послужити као узор за дизајн још ефикаснијих инхибитора дезоксирибонуклеазе I или дуалних инхибитора дезоксирибонуклеазе I и ксантин оксидазе.

Научна област:	Фармацеутске науке
Научна дисциплина:	Фармацеутска хемија
Кључне речи:	Дезоксирибонуклеаза I, Ксантин оксидаза, Инхибиција, Хетероциклична једињења
УДК:	577.15:547.7/.8:[615.07:543(043.3)]
CERIF класификација:	В 740 Фармаколошке науке, фармагнозија, фармација, токсикологија

Тип
лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Dr. Andrija Šmelcerović, Full Professor, University of Niš, Faculty of
Medicine

Title:

In Vitro Inhibition of Deoxyribonuclease I and Xanthine Oxidase by
Heterocyclic compounds

Abstract:

The doctoral dissertation is concerned with the *in vitro* evaluation of the deoxyribonuclease I and xanthine oxidase inhibitory properties by derivatives of 2-alkyliden, 2,5-dialkyliden-4-oxothiazolidinone, 1-substituted, and 1,2-disubstituted 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, 1-(pyrrolidin-2-yl)propan-2-one, naphthalene, 8-hydroxyquinoline, nitroxoline and related compounds. Out of 77 tested compounds, the activity of deoxyribonuclease I was inhibited by 24 with IC_{50} below 200 μM , while 2 derivatives inhibited xanthine oxidase with IC_{50} below 150 μM . The most potent deoxyribonuclease I inhibitor, the nitroxoline derivative *N*-((1-(benzo[d]thiazol-2-ylmethyl)piperidin-3-yl)methyl)-8-hydroxy-5-nitroquinoline-7-carboxamide ($IC_{50} = 23.33 \mu M$) is closely followed by 8-hydroxyquinoline derivatives, *N*-((1-(2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)piperidin-3-yl)methyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-8-hydroxyquinoline-2-carboxamide ($IC_{50} = 25.61 \mu M$) and *N*-((1-(2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)piperidin-3-yl)methyl)-*N*-(2-(dimethylamino)ethyl)-8-hydroxyquinoline-7-carboxamide ($IC_{50} = 30.58 \mu M$). A derivative of 2,5-dialkyliden-4-oxothiazolidinone, ethyl (*Z*)-2-(2-(cyanomethylene)-4-oxothiazolidin-5-ylidene)acetate, inhibited deoxyribonuclease I and xanthine oxidase with IC_{50} of 67.94 and 97.98, respectively.

The most potent compounds exhibited noncompetitive type of deoxyribonuclease I inhibition. Molecular docking studies were conducted to predict intermolecular interactions between inhibitors and

enzymes, while molecular dynamics studies were employed to predict stability of enzyme-inhibitor complexes.

The multifunctional nature of assessed active 8-hydroxyquinoline, nitroxoline and 2,5-dialkyliden-4-oxothiazolidinone derivatives is in accordance with the modern therapeutic approach of treating multifactorial neurodegenerative diseases.

The general conclusion of this doctoral dissertation is that the most potent deoxyribonuclease I inhibitors derived from nitroxoline and 8-hydroxyquinoline are the most potent small synthetic deoxyribonuclease I inhibitors reported so far. A 2,5-dialkyliden-4-oxothiazolidinone derivative with inhibitory properties against deoxyribonuclease I and xanthine oxidase is the first reported dual inhibitor of these enzymes. Selected compounds could guide the development of more potent single-target deoxyribonuclease I or dual-target deoxyribonuclease and xanthine oxidase inhibitors.

Scientific Field:	Pharmaceutical Sciences
Scientific Discipline:	Pharmaceutical Chemistry
Key Words:	Deoxyribonuclease I, Xanthine oxidase, Inhibition, Heterocyclic compounds
UDC:	577.15:547.7/.8:[615.07:543(043.3)
CERIF Classification:	B 740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Doktorska disertacija „Inhibicija dezoksiribonukleaze I i ksantin oksidaze heterocikličnim jedinjenjima in vitro“ izrađena je na Katedri Farmacija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, kao deo projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom „Dobijanje, fizičko-hemijska karakterizacija, analitika i biološka aktivnost farmakološki aktivnih supstanci“ (OI 172044) pod rukovodstvom prof. dr Andrije Šmelcerović, i Internog projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu „Dizajn, sinteza i biološka evaluacija novih inhibitora medicinski značajnih enzima“ pod rukovodstvom prof. dr Jelene Lazarević.

Iskrenu i duboku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Andriji Šmelcerović, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na rukovođenju izradom ove disertacije, na neizmernoj podršci, strpljenju i entuzijazmu. Zahvaljujem se i dr Nataši Milić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, dr Ivani Damjanović, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, dr Nikoli Stefanović, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i dr Katarini Tomović-Pavlović, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na konstruktivnim sugestijama koje su obogatile sadržaj ovog istraživanja.

Veliku zahvalnost dugujem dr Budimiru Iliću, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, za doprinos pri izradi ove disertacije izvođenjem studije molekularnog docking-a i molekularne dinamike. Zahvaljujem dr Bojanu Bondžiću, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, i dr Marku Anderluhu, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani na obezbeđivanju supstanci koje su testirane u ovoj disertaciji. Zahvaljujem se dr Holger Starku, redovnom profesoru Heinrich Heine Univerziteta u Dizeldorfu na obezbeđivanju bioloških testiranja na histaminskim i dopaminskim receptorima. Zahvaljujem se dr Dieteru Steinhilberu, redovnom profesoru Goethe Univerziteta Frankfurta na Majni, na obezbeđivanju testiranja na enzimu 5-lopoksigenazi. Iskreno se zahvaljujem dr Ani Marković, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na pomoći i savetima prilikom izvođenja testova inhibicije enzima.

Neizmerno sam zahvalan svojim roditeljima, svojoj sestri i svojoj devojci na bezrezervnoj podršci, razumevanju i ljubavi koju su mi pružili tokom mog akademskog putovanja.

Skraćenice i simboli

ACN – Acetonitril

BChE – Butirilholinesteraza

Bcl-2 – B-ćelijski limform 2

CatB – Katepsin B

CI-MPR – Katjon-nezavisni manoza-6-fosfat receptor

DDQ – 2,3-Dihloro-5,6-dicijano-1,4-benzohinon

DMF – Dimetilformamid

DMSO – Dimetil sulfoksid

DNaza I – Dezoksiribonukleaza I

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

EndoG – Endonukleaza G

ER – Endoplazmatski retikulum

FAD – Redukovana forma flavin adenin dinukleotid

FADH₂ – Oksidovana forma flavin adenin dinukleotida

FDA – Američka Agencija za hranu i lekove

IBX – 2-Jodobenzojeva kiselina

IC₅₀ – Koncentracija inhibitora koja inhibira 50% enzimske aktivnosti

IL-1 β – Interleukin-1 β

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza

MOE – *Molecular Operating Environment*

NAD⁺ – Oksidovana forma nikotinamid adenin dinukleotida

NADH – Redukovana forma nikotinamid adenin dinukleotida

PAINS – *Pan-Assay Interference Compounds*

PAMPA-BBB – *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay – Blood Brain Barrier*

PDB – Banka podataka o proteinima

PHBP – Piridinijum hidrobromid perbromid

ROS – Reaktivne kiseonične vrste

RIP – Relativni inhibitorni potencijal

RIP_A – Relativni inhibitorni potencijal u odnosu na alopurinol

RIP_F – Relativni inhibitorni potencijal u odnosu na febuksostat

RIP_T – Relativni inhibitorni potencijal u odnosu na topiroksostat

RNK – Ribonukleinska kiselina

TFA – Trifluorosirćetna kiselina

TMSCN – Trimetilsilicijamid

TNF-R1 – Receptor 1 faktora tumorske nekroze

Tris – tri(hidroksimetil)aminometan

XDH – Ksantin dehidrogenaza

XO – Ksantin oksidaza

SADRŽAJ:

1.	UVOD.....	1
1.1.	Enzimi, inhibicija enzima i njen značaj	1
1.2.	Dezoksiribonukleaza I: opšte karakteristike, mehanizam aktivnosti i značaj	6
1.3.	Ksantin oksidaza: opšte karakteristike, mehanizam aktivnosti i značaj.....	11
1.4.	Potencijalni sinergistički efekti inhibicije DNaze I i ksantin oksidaze na apoptozu ...	16
1.5.	Pregled novijih inhibitora dezoksiribonukleaza I	20
1.6.	Pregled novijih inhibitora ksantin oksidaze	24
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	31
3.	MATERIJAL I METODE	32
3.1.	Ispitivana jedinjenja	32
3.2.	<i>In vitro</i> test inhibicije DNaze I.....	45
3.3.	Određivanje kinetike inhibicije DNaze I.....	46
3.4.	<i>In vitro</i> test inhibicije ksantin oksidaze.....	46
3.5.	Ispitivanje afiniteta prema humanim H ₃ , H ₄ i dopaminskim D ₂ i D ₃ receptorima.....	47
3.6.	Određivanje inhibicije 5-lipoksigenaze.....	48
3.7.	Molekularni <i>docking</i>	48
3.8.	Simulacija molekularne dinamike.....	48
3.9.	<i>In silico</i> predviđanje ADMET i PAINS osobina.....	49
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	50
4.1.	Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 2-alkiliden- i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina	50
4.2.	Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina	64
4.3.	Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona	77

4.4.	Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima naftalena, 8-hidroksihinolina, nitroksolina i srodnih struktura	83
4.5.	Ispitivanje inhibicije 5-lipoksigenaze i određivanje afiniteta vezivanja odabranih jedinjenja za dopaminske D ₂ i D ₃ i histaminske H ₃ i H ₄ receptore	99
4.6.	Razmatranje ispitivanih 8-hidroksihinolina kao potencijalnih multifunkcionalnih liganada protiv Alchajmerove bolesti	100
5.	ZAKLJUČAK.....	102
6.	LITERATURA	104
	BIOGRAFIJA AUTORA.....	127
	BIBLIOGRAFIJA AUTORA	128
	IZJAVE AUTORA	130

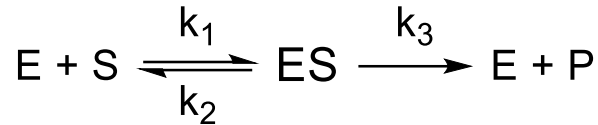
1. UVOD

1.1. Enzimi, inhibicija enzima i njen značaj

Enzimi su biološki katalizatori koji obezbeđuju osnovu za postojanje života obavljajući esencijalnu funkciju ubrzavanja hemijskih reakcija u živim organizmima. Reaktanti i proizvodi jedne hemijske reakcije razdvojeni su energetsom barijerom koja se naziva slobodna energija aktivacije. Ova barijera predstavlja energetska razliku između reaktanata i visokoenergetskog prelaznog stanja (međuproizvoda) na putu do formiranja proizvoda. Ubrzavanje hemijskih reakcija u prisustvu katalizatora zasniva se na snižavanju slobodne energije aktivacije. Enzimi obavljaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze i kontroli metaboličkih puteva, dok njihov značaj najbolje opisuje podatak da jedna četvrtina gena u humanom genomu kodira enzime. Mogućnost obavljanja funkcije bioloških katalizatora se gotovo isključivo vezuje za proteine, uz nekoliko poznatih izuzetaka RNK molekula. Osnova visoke specifičnosti enzima u pogledu tipa reakcije koju katalizuju i tipa supstrata koji je podvrgnut enzimskoj reakciji nalazi se u kompleksnoj trodimenzionalnoj strukturi proteina [Berg i saradnici, 2019].

Iako su enzimi ključni za održavanje života, poremećaji u njihovoj aktivnosti mogu rezultirati brojnim bolestima, čineći ih izuzetno važnim metama za terapijske intervencije. Njihova specifična struktura, posebno aktivnih centara, dodatno doprinosi osetljivosti enzima na inhibiciju od strane molekula malih molekulskih masa, te kao prominentna razlika u odnosu na druge biološke makromolekule, čini enzime optimalnim metama za razvoj novih terapijskih mogućnosti [Copeland, 2013]. Istraživanjem iz 2011. godine na temu terapijskih targeta odobrenih lekova utvrđeno je da oko 30% odobrenih lekova deluje upravo na enzime čineći ih drugom najzastupljenijom grupom targeta, odmah nakon receptora povezanih sa G proteinom (~36%) [Rask-Andersen i saradnici, 2011]. Na osnovu prethodnih trendova, procenjuje se da danas između 40 i 50% lekova u upotrebi ostvaruje svoje efekte delujući na enzime.

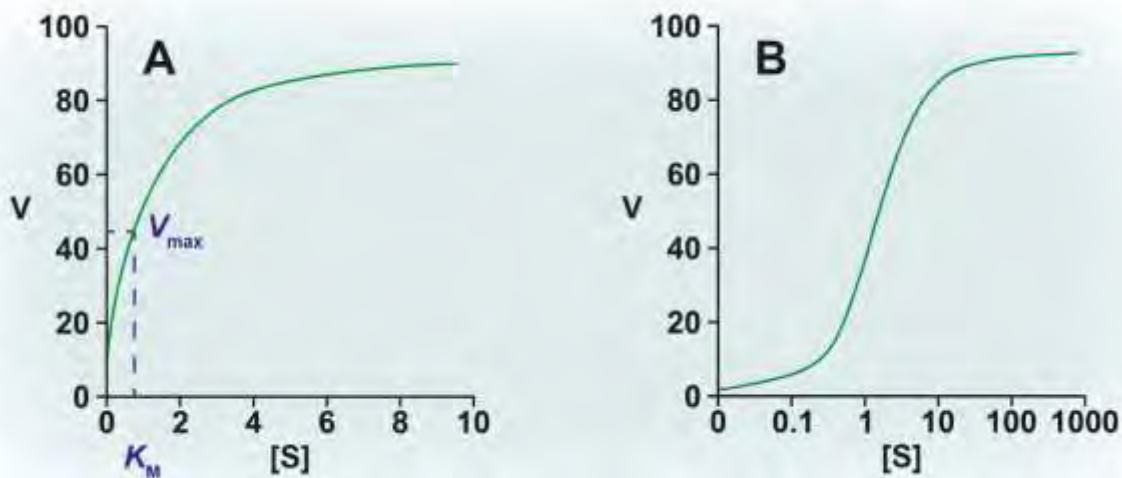
Inicijalni korak svih enzimskih reakcija predstavlja formiranje binarnog enzim-supstrat kompleksa (ES) usled nekovalentnih interakcija (vodoničnih veza, *van der Waals*-ovih, elektrostatičkih i hidrofobnih sila) između enzima (E) i supstrata (S). Slabe međumolekulske sile omogućavaju reverzibilnost procesa, te ES kompleks može disosovati do enzima i neizmenjenog supstrata. Alternativno, ukoliko do katalitičke reakcije dođe, kompleks će se rastaviti oslobađajući enzim i novonastali proizvod reakcije (P) [Rufer, 2021].



Proučavanje enzimskih reakcija najčešće se vrši u ravnotežnom stanju tokom koga, usled velikog viška supstrata u odnosu na enzim, koncentracija ES kompleksa ostaje konstantna kao posledica izjednačenih brzina njegovog formiranja i razgradnje. Brzina odvijanja enzimske reakcije (v) se pri definisanim uslovima matematički može predstaviti *Michaelis-Menten*-ovom jednačinom.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

V_{\max} predstavlja maksimalnu brzinu enzimske reakcije, dok se K_M definiše kao *Michaelis-Menten*-ova konstanta i ima vrednost koncentracije supstrata pri kojoj se dostiže polovina maksimalne brzine enzimske reakcije. Grafički prikaz uticaja koncentracije supstrata na brzinu enzimske reakcije ukazuje na njihovu logaritamsku zavisnost (Slika 1). Inicijalno, povećanje koncentracije supstrata rezultira naglim povećanjem brzine reakcije, kao posledica povezivanja supstrata sa još uvek dostupnim molekulima enzima. Kako koncentracija supstrata raste, a koncentracija raspoloživih molekula enzima usled povezivanja sa supstratom opada, brzina reakcije postaje gotovo konstantna što se grafički manifestuje zaravnjavanjem krive zavisnosti [Copeland, 2013].

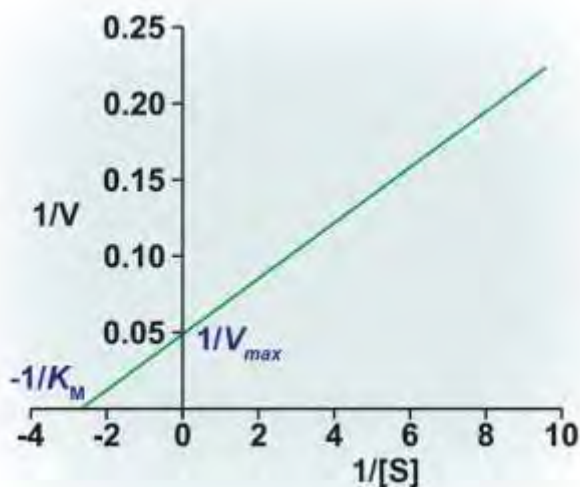


Slika 1. Dijagrami zavisnosti brzine enzimske reakcije od koncentracije supstrata izraženoj na linearnoj (A) i logaritamskoj (B) skali.

Logaritamska zavisnost parametara sa prikazanih dijagrama (Slika 1) bila je razlog za transformaciju *Michaelis-Menten*-ove jednačine u linearni oblik kojim je pojednostavljeno određivanje V_{\max} i K_M vrednosti.

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

Iz prikazane formule je moguće konstruisati dijagram linearne zavisnosti recipročnih vrednosti brzine i koncentracije supstrata (Slika 2). Nagib dobijene prave odgovara K_M/V_{\max} vrednosti, dok tačke u kojoj prava preseca x i y ose redom odgovaraju $-1/K_M$ i $1/V_{\max}$ vrednostima [Copeland, 2013].

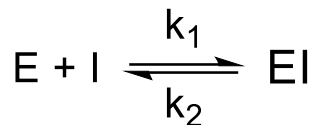


Slika 2. *Lineweaver-Burk*-ov dijagram zavisnosti recipročnih vrednosti brzine i koncentracije supstrata.

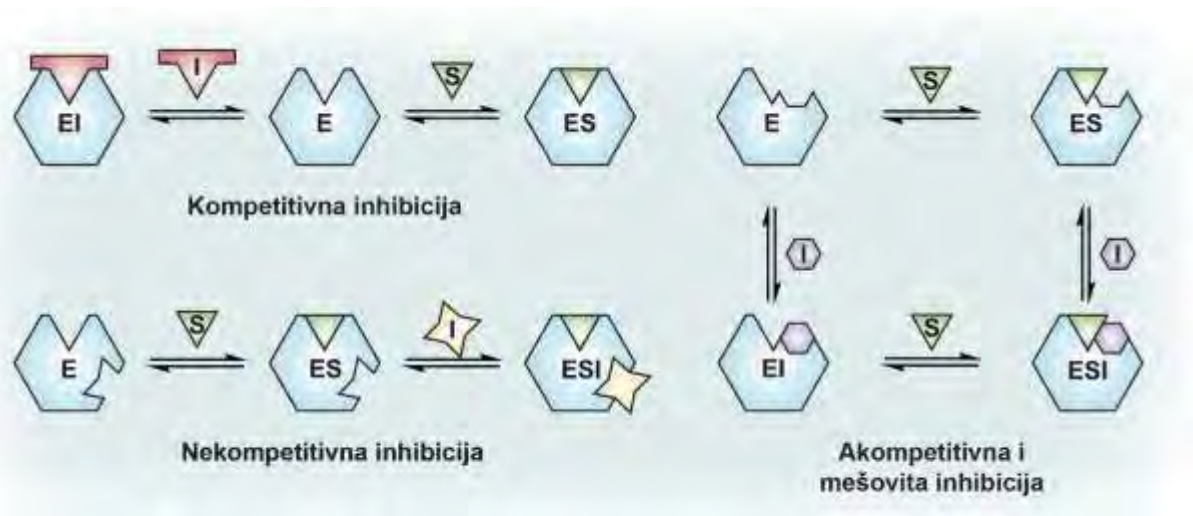
Prikazani dijagram nosi naziv duplo recipročni ili *Lineweaver-Burk*-ov dijagram i danas se najčešće koristi u svrhu određivanja tipa inhibicije enzima.

Inhibitori enzima čine raznorodnu grupu jedinjenja čija je zajednička osobina sposobnost smanjivanja enzimske aktivnosti koja nastaje kao posledica njihovog vezivanja za molekul enzima. Prema hemijskim osobinama koje poseduju, inhibitori enzima se mogu razvrstati na jone teških metala, male organske molekule i makromolekule. Kako hemijska klasifikacija inhibitora

ne odaje informacije u vezi mehanizma inhibicije enzima, inhibitori se dalje mogu podeliti na ireverzibilne i reverzibilne. Prema analogiji sa reakcijom enzima i supstrata, interakcija inhibitora (I) sa enzimom rezultira formiranjem enzim-inhibitor kompleksa (EI).



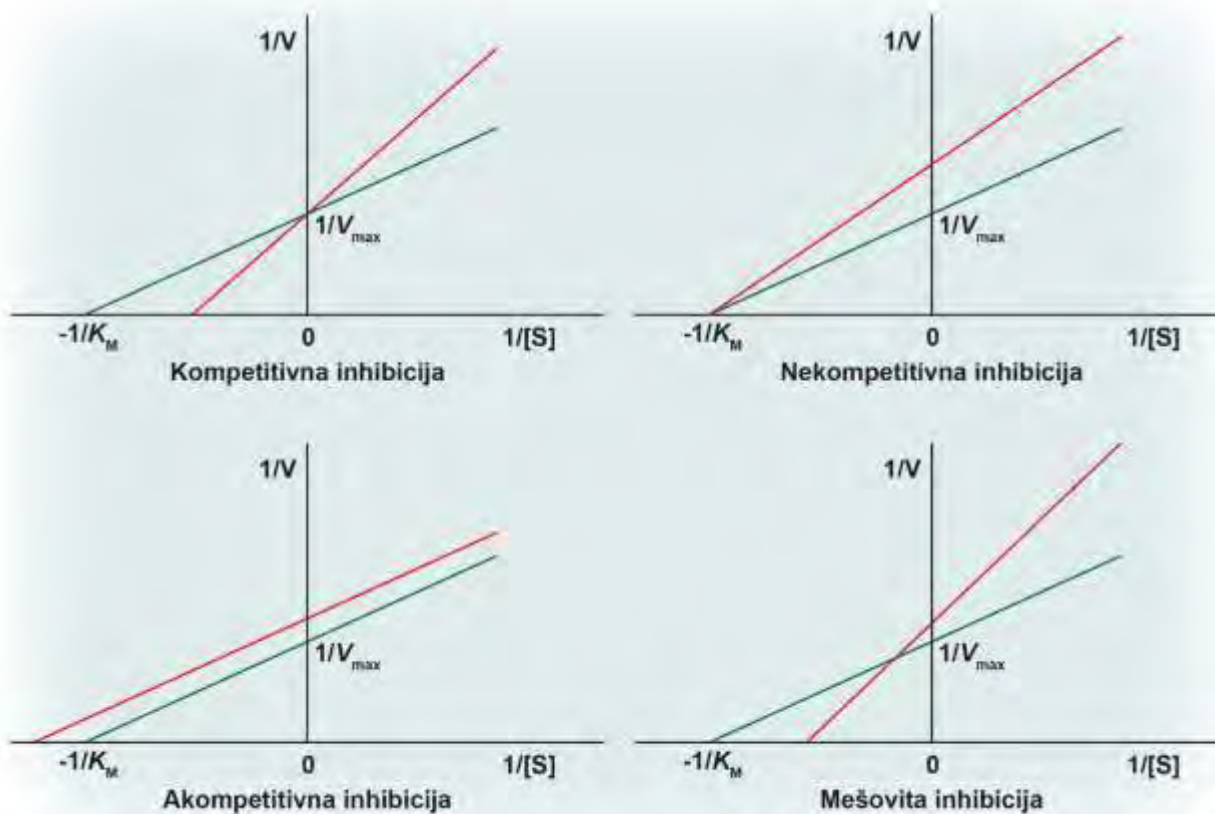
Ireverzibilne inhibitore karakterišu reaktivne funkcionalne grupe koje najčešće formiraju kovalentne veze sa bočnim lancima aminokiselina neophodnih za enzimsku aktivnost. Posledično je disocijacija EI kompleksa minimalna, usled snažnog vezivanja inhibitora za enzim. Nasuprot ireverzibilnim inhibitorima, EI kompleksi reverzibilnih inhibitora i enzima nastaju usled nekovalentnih interakcija, poput vodoničnih ili jonskih veza. Među reverzibilnim inhibitorima dalje razlikujemo kompetitivne, nekompetitivne, akompetitivne i mešovite inhibitore, zavisno od tipa inhibicije (Slika 3) [Copeland, 2013; Lopina, 2017].



Slika 3. Prikaz tipova reverzibilne inhibicije enzima.

Kompetitivni inhibitori se vezuju isključivo za slobodan enzim i konkurišu za isto mesto vezivanja sa supstratom, pri čemu V_{max} ostaje nepromenjena, dok K_M vrednost raste. Inhibicija enzima može biti uklonjena povećanjem koncentracije supstrata, obzirom da inhibitor biva istisnut iz EI kompleksa. Nekompetitivni inhibitori se vezuju isključivo za enzim-supstrat kompleks, sprečavajući njegovu disocijaciju, što rezultira smanjenim V_{max} i K_M vrednosti. Akompetitivni

inhibitori pokazuju afinitet za slobodan enzim i ES kompleks, usled čega K_M ostaje nepromenjena, ali V_{\max} opada. Mešoviti tip inhibicije se javlja u slučaju kada se inhibitor istovremeno vezuje za slobodan enzim i ES kompleks. Povećanjem koncentracije supstrata inhibicija može biti samo delimično smanjena, ali ne i potpuno uklonjena. Mešoviti inhibitori smanjuju V_{\max} , a povećavaju K_M vrednosti [Copeland, 2013; Lopina, 2017]. *Lineweaver-Burk*-ovi dijagrami kompetitivne, nekompetitivne, akompetitivne i mešovite inhibicije enzima su prikazani na Slici 4. Tip reverzibilne inhibicije može biti određen na osnovu izgleda pravih koje se dobijaju konstruisanjem *Lineweaver-Burk*-ovih dijagrama.

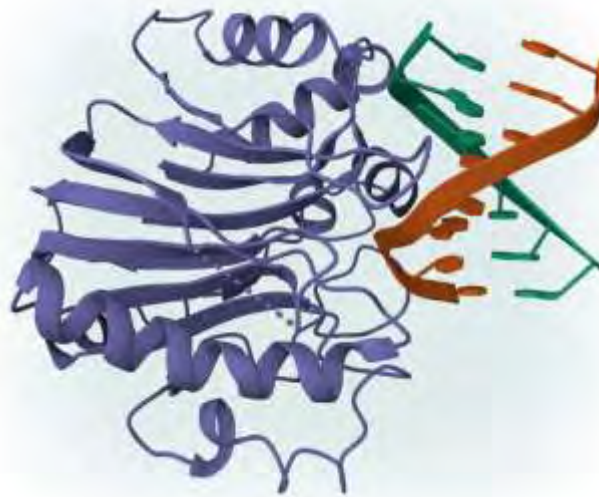


Slika 4. *Lineweaver-Burk*-ovi dijagrami različitih tipova reverzibilne inhibicije. Zelenom bojom je prikazana zavisnost recipročnih vrednosti brzine i koncentracije supstrata u odsustvu, a crvenom u prisustvu inhibitora.

1.2. Dezoksiribonukleaza I: opšte karakteristike, mehanizam aktivnosti i značaj

Dezoksiribonukleaza I (DNaza I) (EC 3.1.21.1) je enzim koji vrši Ca^{2+} -zavisno endonukleolitičko raskidanje fosfodiesterarnih veza u molekulu dvolančane DNK, pri tom produkujući oligonukleotide sa 5'-fosfatnim i 3'-hidroksilnim završecima [Yasuda i saradnici, 1990]. Primarno je sekretorni enzim koji u najvećoj meri proizvode organi digestivnog sistema, prevashodno pankreas i parotidne pljuvačne žlezde, te se posledično prema poreklu razlikuju tri tipa DNaze I: pankreasna, parotidna i pankreasno-parotidna DNaza I [Takeshita i saradnici, 2000].

Humana DNaza I nastaje kao produkt ekspresije gena *DNASE1* koji se sastoji od 3200 baznih parova, sa lokalizacijom na kraćem p13.3 kraku hromozoma 16 [Yasuda i saradnici, 1995a; Yasuda i saradnici, 1995b]. Ovaj monomerni protein molekulske mase od 30 kD je sačinjen od 260 aminokiselina [Shak i saradnici, 1990]. Oko trećina aminokiselina izgrađuje hidrofobno jezgro enzima formirajući dve gusto pakovane β -ploče, koje okružuju osam α -heliksa i nekoliko sporednih petlji, predstavljajući osnovu strukturne stabilnosti i rigidnosti DNaze I (Slika 5) [Oefner i Suck, 1986].



Slika 5. Kristalografska struktura DNaze I u kompleksu sa dvolančanom DNK (PDB: 1DNA). Trodimenzionalna struktura DNaze I sa uočljivim α -heliksima i β -pločama prikazana je ljubičastom bojom, dok su zeleno i narandžasto prikazani individualni lanci DNK.

Ispitivanje kristalografske strukture kompleksa humane DNaze I sa oligonukleotidima utvrđeno je da 22 aminokiseline učestvuju u prepoznavanju i raskidanju DNK lanaca. Prema svojoj

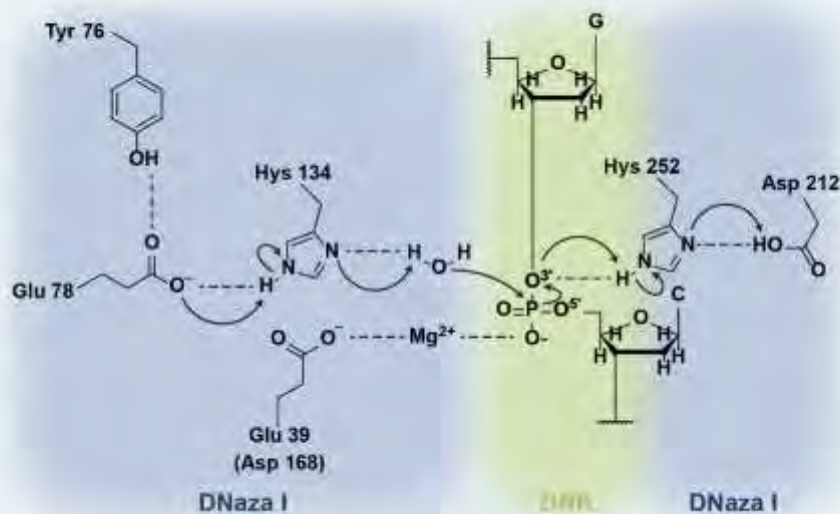
ulozi u ovom procesu aminokiseline se mogu razvrstati na četiri klase. Prvu klasu čine aminokiseline aktivnog centra, His 134, His 252, Glu 78 i Asp 212, koje obavljaju ključnu ulogu tokom kiselo-bazne hidrolize fosfodiesterarskih veza. Od posebnog značaja za odvijanje ovog procesa je postojanje vodoničnih veza između karboksilnih funkcionalnih grupa glutaminske i asparaginske kiseline sa pomenutim ostacima histidina, povećavajući njihove pK_a vrednosti [Perutz i saradnici 1985]. Drugoj klasi pripadaju tri aminokiseline, Glu 39, Asp 168 i Asp 251, sa ulogom liganada za helatizaciju jona dvovalentnih metala, prvenstveno Mg^{2+} i Ca^{2+} jona, čime se omogućava stabilizacija prelaznog stanja supstrata prilikom raskidanja fosfodiesterarskih veza. Neophodne za aktivnost DNaze I su i sedam aminokiselina, Gln 9, Arg 41, Tyr 76, Arg 111, Asn 170, Tyr 175, Tyr 211, sa lokalizacijom u neposrednoj blizini aktivnog centra, koje pripadaju trećoj klasi. Njihova funkcija se ogleda u ostvarivanju ključnih kontakata sa DNK molekulom, omogućavajući delovanje aktivnog centra. Preostalih osam aminokiselinskih ostataka, Glu 13, Thr 14, Ser 43, His 44, Asn 74, Ser 75, Pro 206 i Thr 207 pripadaju četvrtoj klasi i ostvaruju interakcije sa DNK molekulom distalno od aktivnog centra DNaze I. Smatra se da četvrta klasa aminokiselina doprinosi generalnoj stabilnosti DNaza I – DNK kompleksa jer se kontakti ostvaruju sa nukleotidima koji su udaljeni od mesta presecanja DNK lanaca, te stoga aminokiseline četvrte klase ne utiču značajno na aktivnost DNaze I [Pan i saradnici 1998].

DNaza I isključivo prepoznaje i stupa u interakciju sa malim navojem B-forme DNK molekula. Selektivnost DNaze I prema B-formi u odnosu na A- i Z-formu DNK proističe iz geometrije njihovih lanaca. Naime, jedino je širina malog navoja B-forme odgovarajućih dimenzija za interakciju sa bočnim lancima Arg 41 i Tyr 76, omogućavajući dodatne interakcije hidrofилnih i pozitivno naelektrisanih aminokiselina sa fosfatnim ostacima oba lanca. Stoga, DNaza I može biti okarakterisana kao enzim koji specifično prepoznaje strukturne varijacije DNK molekula koje proizilaze iz redosleda baznih parova, ali ne poseduje specifičnost prema određenim sekvencama [Suck, 1994].

Prilikom formiranja DNaza I – DNK kompleksa ne dolazi do konformacionih promena enzima, dok DNK molekul podleže značajnim deformacijama. Kontakt nastaje usled preovlađujućih elektrostatičkih dipol-dipol interakcija, *van der Waals*-ovih i π - π interakcija. Aminokiseline Arg 9, Arg 13, Thr 14, Glu 39, Ser 43, Asn 74, Tyr 175, Ser 206 i Tyr 211 formiraju vodonične veze, a Arg 111 soni most sa fosfodezoksiriboznom okosnicom DNK molekula. Arg 41 je jedina aminokiselina koja ostvaruje direktan kontakt sa azotnim bazama. Interakcija se

zasniva na formiranju vodnoničnih veze sa O2- i N3- atomima purinskih i pirimidinskih baza, na pozicijama 3 i 4 intaktnog lanca u 5'-smeru od mesta presecanja. Dodatno, π - π interakcija između Tyr 76 i prstena dezoksiriboze značajno deformiše DNK molekul, menjajući konformaciju napadnutog atoma fosfora i posledično povećavajući širinu malog navoja sa 12 na 15 Å. Pomenute interakcije rezultiraju deformacijom DNK molekula koji se usled svoje fleksibilnosti prilagođava rigidnoj strukturi enzima, savijajući se za 20° u smeru suprotnom od interakcije sa DNazom I, odnosno ka velikom navoju [Suck, 1994; Baranovskii i saradnici, 2004].

Molekularni mehanizam delovanja DNaze I je prikazan na Slici 6. Presecanje polinukleotidnih lanaca DNK se odvija mehanizmom kiselo-bazne hidrolize koja uključuje dva histidina iz prve klase aminokiselina. His 134 deluje kao baza, preuzimajući proton molekula vode, dok His 252 deluje kao kiselina koja daje proton O3'-odlazećoj grupi. Aktivirani molekul vode vrši nukleofilni napad (S_N2 mehanizmom) na atom fosfora, raskidajući P-O3' vezu [Suck, 1994]. Odvijanje nukleofilne supstitucije olakšano je prisustvom Mg^{2+} jona koji ostvaruje interakciju sa kiseonikom fosfatne grupe, na taj način povećavajući elektronegativnost atoma fosfora i čineći ga boljim targetom za nukleofilni napad [Baranovskii i saradnici, 2004].



Slika 6. Molekularni mehanizam presecanja fosfodiesterarskih veza DNK molekula delovanjem enzima DNaze I [adaptirano iz Baranovskii i saradnici, 2004].

DNaza I je, kao sekretorni enzim, najzastupljenija nukleaza u krvi i telesnim tečnostima [Eulitz i Mannherz, 2007], gde obavlja važnu funkciju razgradnje ekstracelularne DNK [Samejima i Earnshaw, 2005]. Povećanje i smanjenje aktivnosti DNaze I je primećeno u brojnim patološkim stanjima. Sistemski eritemski lupus je bolest kompleksne etiopatogeneze u kojoj smanjena aktivnost DNaze I predstavlja važan patološki činilac. Usled nagomilavanja nerazgrađene DNK poreklom iz oštećenih ćelija imunotolerancija biva kompromitovana, te se javljaju, za sistemski eritemski lupus, karakteristična antinuklearna antitela [Martínez Valle i saradnici, 2008; Lauková i saradnici, 2020]. Nasuprot tome, značajno povećanje enzimske aktivnosti zabeleženo je kod pacijenata sa idiopatskom dilatiranom kardiomiopatijom [Yao i saradnici, 1996], u mozgu pacijenata sa Alchajmerovom bolešću [Schatzmann-Turhani i saradnici, 1999], kod ishemijske bolesti bubrega [Basnakian i saradnici, 2002], u prvim satima nakon infarkta [Kwai i saradnici, 2004], nakon perkutane koronarne intervencije u terapiji stabilne angine pektoris [Arakawa i saradnici, 2005], u serumu i pankreasu pacijenata sa dijabetesom tip 2 [Zhu i saradnici, 2014] i u serumu pacijenata koji boluju od nefrolitijaze [Yusof i saradnici, 2015].

Korisni efekti inhibicije DNaze I dokumentovani su u stanjima masivnog oštećenja tkiva i organa spoljnim faktorima poput ksenobiotika i zračenja. Toksični efekti cisplatina na bubrege se ostvaruju posredstvom DNaze I. Ispitivanjem sprovedenim na *knock-out* (KO) miševima (*Dnase1*^{-/-}) sa potpuno inaktiviranom DNazom I je zabeleženo značajno niže oštećenje bubrega u poređenju sa kontrolnom grupom, ukazujući na protektivno dejstvo inhibicije DNaze I prema nefrotoksičnim efektima cisplatina [Basnakian i saradnici, 2005]. Na istom modelu *knock-out* miševa je ispitivan uticaj DNaze I na hepatocelularnu nekrozu jetre izazvanu visokim dozama paracetamola. Nekroza pericentralno lokalizovanih hepatocita je nastupila i u eksperimentalnoj i u kontrolnoj grupi, ali je progresija oštećenja ka okolnim ćelijama bila značajno smanjena na modelu KO miševa sa inaktiviranom DNazom I [Napirei i saradnici, 2006]. Inaktivacija DNaze I delovala je radioprotektivno kod oštećenja slezine, kosne srži i sluzokože malog creva nakon izlaganja jonizujućem γ -zračenju [Apostolov i saradnici, 2009]. Fragmentacija DNK molekula uzrokovana intoksikacijom grafenskim nanomaterijalima posredovana je DNazom I. Citotoksični efekti na epitelne ćelije bubrega su gotovo u potpunosti izostali istovremenom primenom specifičnih inhibitora DNaze I [Fahmi i saradnici, 2017].

Sva pomenuta stanja u kojima povećanje aktivnosti DNaze I predstavlja značajan patološki faktor u osnovi imaju masovno odumiranje ćelija, bilo apoptozom ili nekrozom. Apoptoza je

fiziološka forma genetski programirane ćelijske smrti. Energetski je zavisian proces tokom koga dolazi do naglog smanjenja volumena citoplazme i jedra, usled razgradnje intracelularnih struktura, kondenzacije hromatina i fragmentacije DNK. Tokom apoptotskog programa vođenog proteazama i nukleazama, razgrađeni ćelijski sadržaj biva okružen delovima ćelijske membrane, formirajući apoptotska tela, koja dalje preuzimaju i razgrađuju makrofazi i okolne ćelije. Visoko organizovani redosled događaja tokom apoptoze ima za cilj uklanjanje ćelija bez kontakta ćelijskog sadržaja sa ekstracelularnim prostorom, čime se sprečava nastanak inflamacije [Hetts, 1998]. Nasuprot apoptozi, nekroza je patološka forma ćelijske smrti do koje dolazi nakon izraženog oštećenja ćelija fizičkim, hemijskim ili drugim faktorima. Karakteriše se bubrenjem ćelije usled nekontrolisanog ulaska vode i posledičnom rupturom ćelijske membrane, koja je praćena rasipanjem ćelijskog sadržaja u ekstracelularni prostor i inflamacijom [Van Cruchten i Van den Broeck, 2002]. Uloga DNaze I u apoptozi i nekrozi je dobro dokumentovana [Peitsch i saradnici, 1993; Mannherz i saradnici, 1995; Oliveri i saradnici, 2001; Napirei i saradnici, 2006; Li i saradnici, 2009; Zhu i saradnici, 2016]. Smatra se da je DNaza I svojom endonukleolitičkom aktivnošću odgovorna za inicijalnu degradaciju hromatina, bilo tokom apoptoze ili nekroze, na taj način omogućavajući dejstvo sekundarnih nukleaza i dalju razgradnju genetskog materijala do oligonukleotida [Thiyagarajan i saradnici, 2015].

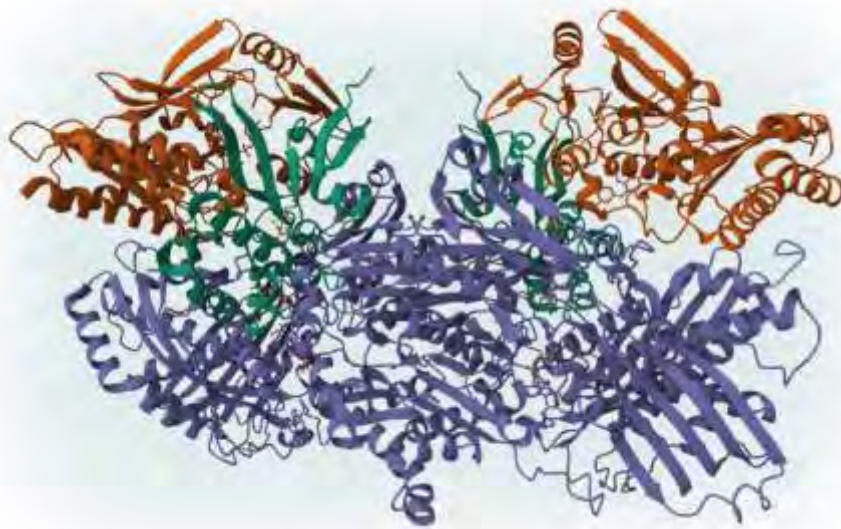
Pored uklanjanja nepotrebnih ostataka (engl. *Waste-management nuclease*) vanćelijske DNK, DNaza I takođe pripada grupi ćelijsko-autonomnih nukleaza (engl. *Cell-autonomous nuclease*) koje vrše razgradnju DNK unutar ćelija tokom odvijanja apoptotskog procesa [Oliveri i saradnici, 2001; Samejima i Earnshaw, 2005]. Ipak, DNaza I ne obavlja samo efektornu ulogu tokom sprovođenja programirane ćelijske smrti, već je pokazano da vrši i njeno pripremanje modulacijom genske ekspresije Fas receptora, povećavajući na taj način osetljivost ćelija na apoptotske stimuluse [Oliveri i saradnici, 2004; Thiyagarajan i saradnici, 2018]. Dodatno, Fahmi i saradnici [2020] su ukazali na regulatornu ulogu DNaze I u ekspresiji drugih apoptotskih nukleaza. DNaza I je jedina poznata nukleaza sa funkcijom tokom čitavog procesa ćelijske smrt. Njeni efekti se protežu od događaja koji prethode apoptozi kroz pripremanje ćelije za programiranu smrt, preko inicijalne fragmentacije, sve do finalne faze uklanjanja ostataka DNK molekula.

1.3. Ksantin oksidaza: opšte karakteristike, mehanizam aktivnosti i značaj

Ksantin oksidoreduktaza je enzim koji pripada familiji flavoproteina i sastoji se iz dve interkonvertibilne forme - ksantin oksidaze (engl. *Xanthine Oxidase* – XO) (EC 1.1.3.22) i ksantin dehidrogenaze (engl. *Xanthine Dehydrogenase* – XDH) (1.17.1.14) [Stirpe i Della Corte, 1969]. Obe forme obavljaju ključnu ulogu u katabolizmu purinskih baza katalizujući reakcije oksidacije hipoksantina u ksantin i ksantina u mokraćnu kiselinu, uz posledičnu redukciju nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) ili molekuskog kiseonika [Nishino, 1994; Hille i Nishino, 1995]. Najviši nivo enzimske aktivnosti prisutan je u jetri i crevima, dok je u mlečnim žlezdama, bubrezima, plućima, srcu, mozgu, plazmi i drugim tkivima ta aktivnost niža [Linder i saradnici, 1999; Borges i saradnici, 2002]. Enzim je u svojoj nativnoj XDH formi primarno lokalizovan u citozolu i na površini ćelijskih membrana [Berry i Hare, 2004] ćelija poput epitela mlečnih žlezdi i endotela krvnih sudova [Hellstein-Westing, 1993]. Izlaganje metaboličkom stresu rezultira prevođenjem XDH u XO formu i njenim oslobađanjem u krvotok, gde slobodno cirkuliše ili se vezuje visokim afinitetom za površinu endotelne ćelije [Radi i saradnici, 1997].

Aktivne forme XO i XDH su po svojoj strukturi homodimeri molekulske mase 290 kDa, u formi leptira (Slika 7), gde svaka od monomernih jedinica nezavisno obavlja katalitičku funkciju [Berry i Hare, 2004; Pacher i saradnici, 2006]. Sekvenca gena ksantin oksidoreduktaze pokazuje visok stepen homologije među sisarima (~ 90%) [Harrison, 2002; Berry i Hare 2004]. Monomerne subjedinice humanog enzima sadrže 1330 aminokiselina i nastaju kao produkt ekspresije gena koji se nalazi na kraćem kraku drugog hromozoma [Xu i saradnici, 1994; Xu i saradnici, 1996; Nishino i saradnici, 2008].

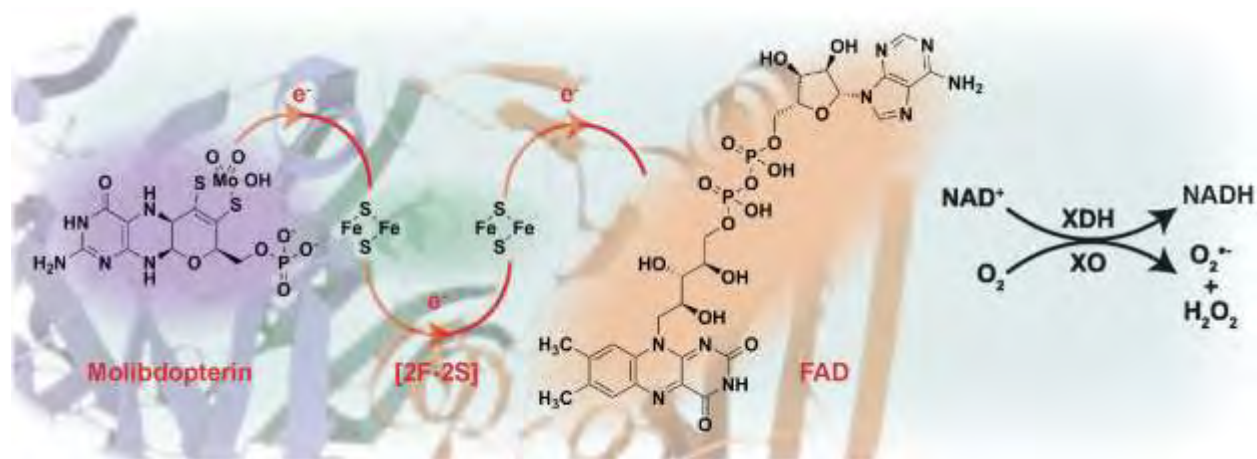
Subjedinice enzima se sastoje iz tri uzajamno povezana domena, od kojih svaki poseduje specifični kofaktor. Najkraći od njih, N-terminalni domen (aminokiselina 1-165) svojim sastavom obuhvata dva međusobno različita [2F-2S] centra, okruženih sa po četiri bočna niza cisteina. Na N-terminalni domen se, preko kraćeg polipeptidnog veznika, nastavlja središnji domen (aminokiseline 226-531) unutar koga se nalazi flavin adenin dinukleotid (FAD). U produžetku se preko polipeptidnog veznika dalje nadovezuje najduži, C-terminalni domen (aminokiseline 590-1332) koji sadrži kofaktor molibdopterin [Enroth i saradnici, 2000; Berry i Halle, 2004]. Gotovo linearni raspored četiri redoks centra u trodimenzionalnoj strukturi enzima ima za cilj olakšani prenos elektrona tokom obavljanja oksido-redukcionog procesa [Pacher i saradnici, 2006].



Slika 7. Kristalografska struktura ksantin oksidaze (PDB: 1FIQ). C-terminalni kraj polipeptidnih lanaca označen je plavom bojom, središnji domen narandžastom, a N-terminalni kraj zelenom bojom.

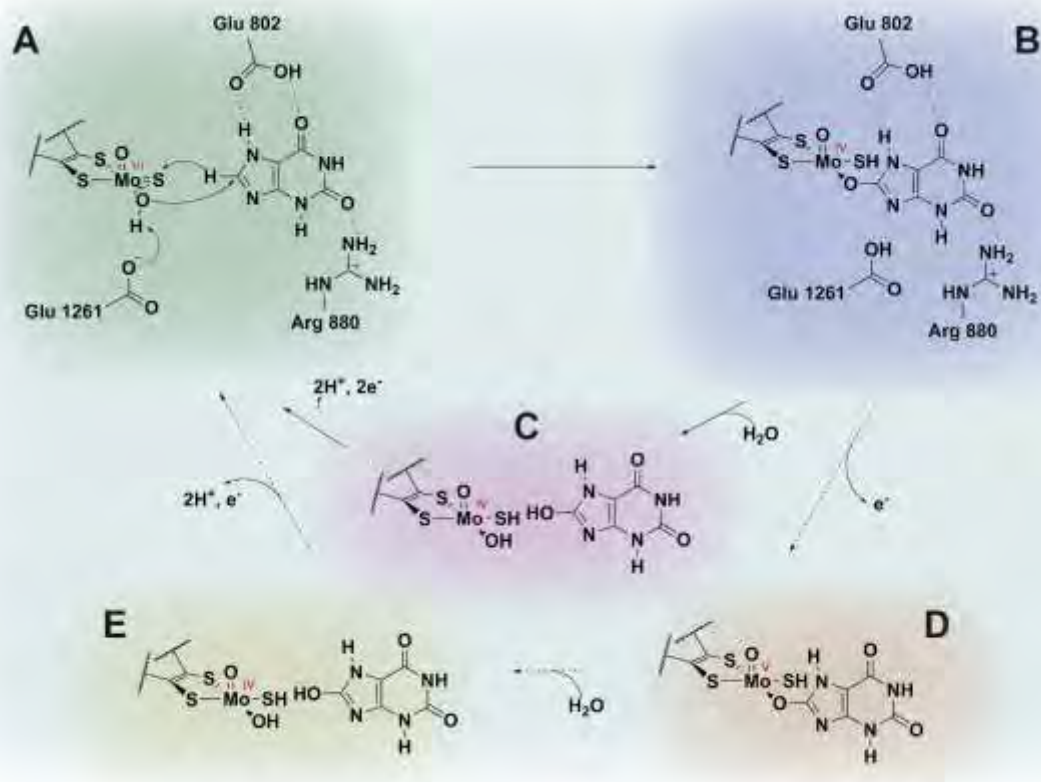
Aktivne forme ksantin oksidoreduktaze učestvuju u hidrosilaciji većeg broja endogenih i egzogenih supstrata, poput purina, pterina, aromatičnih heterociklusa, aromatičnih i alifatičnih aldehida, na taj način omogućavajući bilo njihovu aktivaciju ili detoksifikaciju [Pacher i saradnici, 2006]. Ipak, osnovna funkcija ksantin oksidoreduktaze u organizmu predstavlja prevođenje hipoksantin u ksantin i ksantina dalje u mokraćnu kiselinu, time sprovodeći završne korake u metaboličkom putu razgradnje purinskih baza [Berry i Halle, 2004].

Pre vezivanja supstrata, ksantin oksidoreduktaza se nalazi u oksidovanoj formi. Polureakcija redukcije započinje na molibdopterinskom kofaktoru, sa jonom molibdena u najvišem oksidacionom stanju Mo^{VI} , koji se nakon preuzimanja dva elektrona ksantina redukuje do oksidacionog stanja Mo^{IV} . Reoksidacija molibdena omogućena je prenosom elektrona preko [2F-2S] centra do FAD koenzima, koji zatim učestvuje u finalnom transferu elektrona do odgovarajućeg akceptora (O_2 ili NAD^+) (Slika 8) [Pauff i saradnici, 2008; Okamoto i saradnici, 2013].



Slika 8. Linearni raspored redoks centara ksantin oksidoreduktaze i smer transfera elektrona.

Katalitička reakcija oksidacije ksantina započinje uklanjanjem protona Mo-OH grupe ostatkom glutaminske kiseline u neposrednoj blizini. Formirani Mo-O⁻ nukleofil istovremeno vrši nukleofilni napad na C8 ugljenikov atom supstrata koji će biti oksidovan, što je ujedno praćeno transfer protona na Mo=S grupu (Slika 9, A). Tokom odvijanja katalitičkog procesa nastaje međuproizvod u kome je supstrat preko atoma kiseonika kovalentno vezan za Mo^{IV} (Slika 9, B i D). U narednom koraku, produkt biva istisnut iz koordinacione sfere molibdena okolnim molekulima vode. Preuzeti elektroni se preko [2Fe-2S] centara prenose do FAD-a, dok Mo^{IV} biva reoksidovan do početnog Mo^{VI} stanja, bilo direktno ili preko Mo^V prelaznog stanja, pripremajući enzim za naredni katalitički ciklus. Čitav proces se odvija uz pomoć aminokiselinskih ostataka Glu 802, Arg 880 i Glu 1261 koje vrše stabilizaciju prelaznih stanja enzim-supstrat kompleksa formiranjem vodoničnih veza [Pauff i saradnici, 2008; Okamoto i saradnici, 2013].



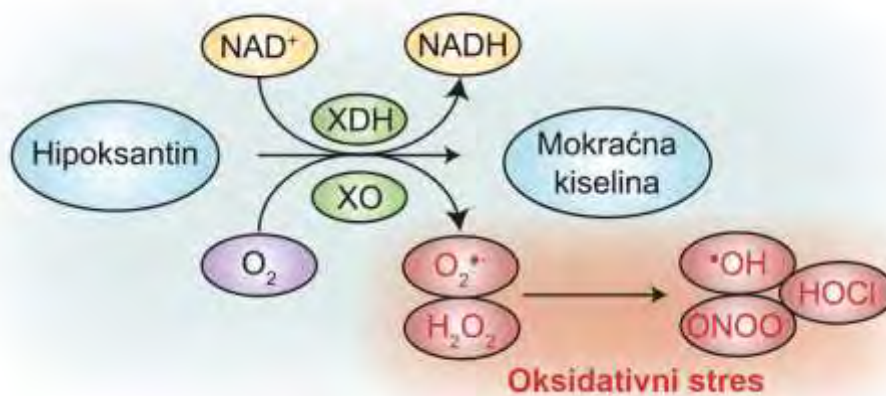
Slika 9. Mehanizam katalitičkog dejstva enzima ksantin oksidoreduktaze prikazan kroz primer hidroksilacije ksantina do mokraćne kiseline [adaptirano iz Okamoto i saradnici, 2013].

Ksantin dehidrogenaza je fiziološki predominantna forma ksantin oksidoreduktaze. Iako obe forme vrše oksidaciju istih supstrata, osnovna razlika između XDH i XO je u njihovoj sklonosti ka finalnom akceptoru koji preuzima elektrone iz FAD domena. U slučaju XDH to je NAD^+ , dok XO elektrone predaje molekulsom kiseoniku. Utvrđeno je da konverzija jedne forme ksantin oksidoreduktaze u drugu može biti ireverzibilna i reverzibilna. Izlaganje XDH proteolitičkim enzimima, poput tripsina, rezultira ireverzibilnim prevođenjem enzima u formu XO [Stirpe i Della Corte, 1969]. Enzimaska aktivnost XO opstaje i nakon ograničene proteolize usled snažnog međusobnog povezivanja nastalih fragmenata, koji po svojim molekulskim masama odgovaraju prethodno pomenutim domenima (20, 40, 85 kDa) sa odgovarajućim redoks centrima [Amaya i saradnici, 1990]. Reverzibilna konverzija XDH u XO je posledica oksidacije tiolnih grupa bočnih lanaca Cys 535 i Cys 992 različitim uzročnicima [Nishino i Nishino, 1997] i može se prevazići izlaganjem enzima tiolnim jedinjenjima, poput ditioeritritolu [Waud i Rajagopalan, 1976]. Uzrok različite sklonosti XDH i XO ka različitim akceptorima elektrona je strukturne prirode. Naime,

prevođenje XDH u XO dovodi do strukturnih promena unutar FAD vezujućeg domena, usled gubitka kontakta između aminokiselinskih ostataka Phe 549 i Trp 336, gotovo potpuno onemogućavajući transfer elektrona sa FAD-a na NAD^+ [Kuwabara i saradnici, 2003]. Stoga, fiziološki predominantna XDH poseduje visok afinitet za transfer elektrona na NAD^+ , redukujući ga do NADH forme, dok strukturno izmenjena XO elektrone predaje O_2 molekulu, što rezultira stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species* – ROS), $\text{O}_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 . Ipak, ROS produkcija nije isključivo posledica aktivnosti XO, obzirom da XDH u uslovima nedostatka NAD^+ koristi molekularni kiseonik kao akceptor elektrona [Berry i Halle, 2004]. Izuzev pomenutih primarnih funkcija ksantin oksidoreduktaze, zabeležena je i sposobnost da pod određenim uslovima deluje kao NADH oksidaza [Zhang i saradnici, 1998a] i nitrit reduktaza [Zhang i saradnici, 1998b]. Kompromitovana mitohondrijalna oksidacija u uslovima izražene ishemije ili hipoksije, i posledično nagomilavanja NADH može rezultirati NADH oksidaznom aktivnošću XDH, koje se karakteriše retrogradnim prenosom elektrona sa NADH na FAD, uz posledično nastajanje reaktivnih formi kiseonika [Cantu-Medellin i Kelley, 2013]. Pri uslovima anoksije i niske pH vrednosti, može doći do redukcije NO_2^- do NO na molibdopterinskom centru. Tom prilikom kao donori elektrona služe bilo ksantin ili NADH kroz pomenuti retrogradni transfer elektrona. Ipak, funkcije NADH oksidaze i nitrit reduktaze nisu od velikog značaja, obzirom na gotovo ekstremne uslove pri kojima se javljaju [Kelley, 2015].

Poremećena funkcija ksantin oksidoreduktaze rezultira nastankom brojnih patoloških stanja. Nasledna deficijencija ovog enzima ima za posledicu autozomno-recesivno oboljenje ksantinuriju, koje se karakteriše visokim koncentracijama ksantina u urinu, njegovom depozicijom u tkivima i pratećim oštećenjima organa [Ichida i saradnici, 2012]. Ipak, daleko veća važnost pridaje se stanjima koja nastaju usled povećane aktivnosti ksantin oksidoreduktaze. Posledična povećana oksidacija ksantina prevazilazi kapacitete organizma da izluči formiranu mokraćnu kiselinu, te dolazi do njenog zadržavanja i stanja koje se naziva hiperurikemija. Pri fiziološkim vrednostima pH, mokraćna kiselina se nalazi u rastvornoj jonizovanoj formi urata. Međutim, usled prekomerne produkcije mokraćne kiseline i ograničene rastvorljivost urata u telesnim tečnostima, dolazi do neminovnog taloženja mokraćne kiseline prvenstveno u zglobovima, vezivnom tkivu i bubrezima. Pokretanje inflamatornog odgovora usled nagomilavanja kristala mokraćne kiseline i njenih soli u zglobovima, hiperurikemija progredira do stanja inflamatornog artritisa koje se naziva giht [Zhu i saradnici, 2011; Petreski i saradnici, 2020]. Povećana aktivnost ksantin oksidaze

dovodi i do povećanog stvaranja superoksid anjon radikala i vodonik peroksida koji, kroz inicijaciju stvaranja ROS, rezultiraju oksidativnim stresom (Slika 10) [Berry i Hare, 2004]. Naime, nastali $O_2^{\bullet-}$ podleže *Haber-Weiss*-ovoj reakciji sa Fe(III) jonom, produkujući O_2 i Fe(II) jon, koji zatim stupa u *Fenton*-ovu reakciju sa H_2O_2 , dajući ekstremno reaktivan hidroksil radikal ($\bullet OH$). Dodatno, reakcijom $O_2^{\bullet-}$ sa NO nastaje peroksinitrit anjon ($ONOO^-$) sa jako izraženim oksidacionim sposobnostima [Borges i saradnici, 2002].



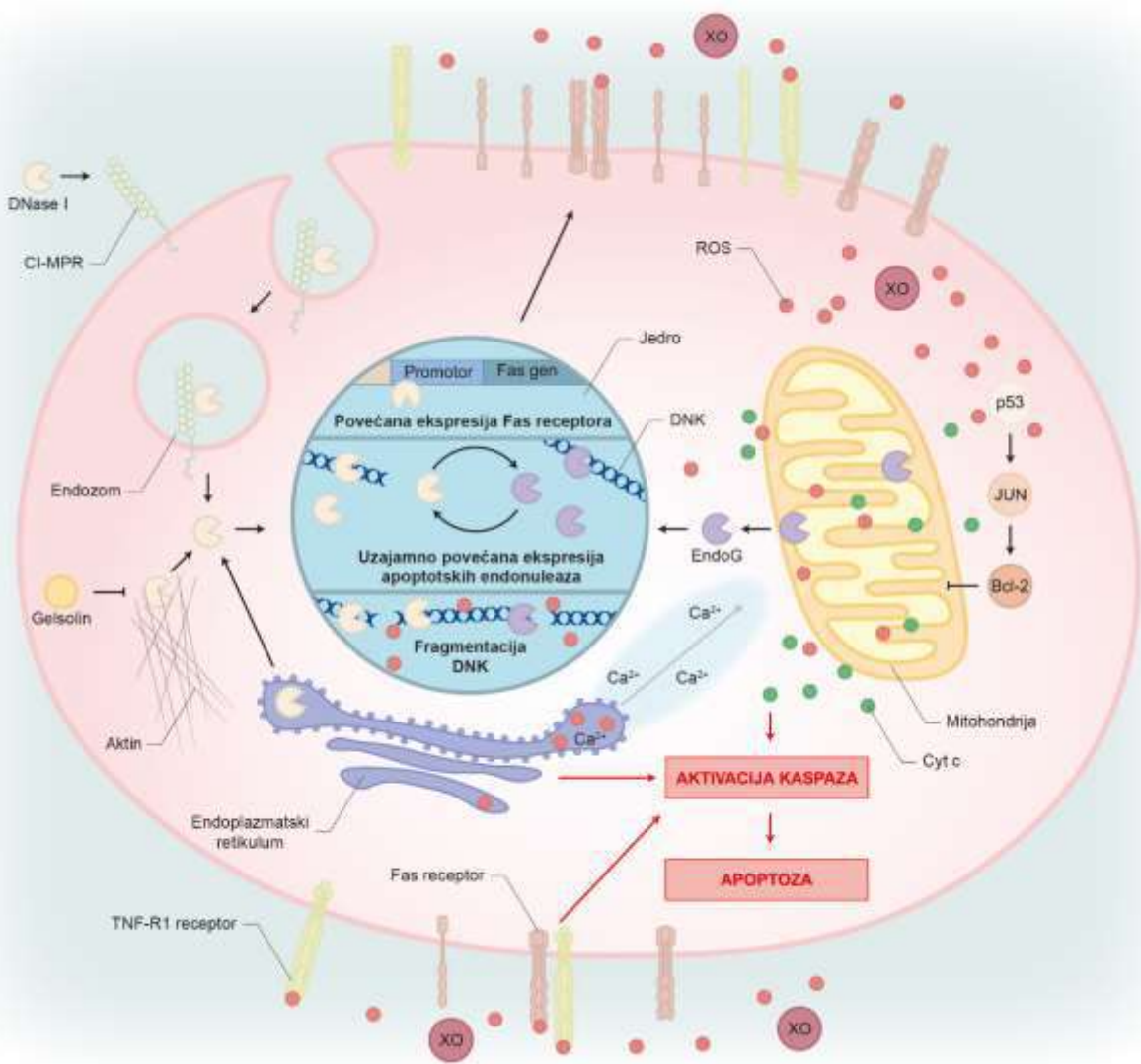
Slika 10. Šematski prikaz nastanka reaktivnih formi kiseonika koje reaguju sa ćelijskim makromolekulima, oštećujući subcelularne strukture i remeteći funkcionisanje ćelija.

Povećano stvaranje slobodnih radikala praćeno je nastankom oksidativnog stresa koji doprinosi nastanku brojnih patoloških stanja poput kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, karcinoma, neuroloških i drugih poremećaja [Vlako i saradnici, 2006; Chen i saradnici, 2016].

1.4. Potencijalni sinergistički efekti inhibicije DNaze I i ksantin oksidaze na apoptozu

Ravnoteža između ćelijske deobe (proliferacije) i kontrolisane ćelijske smrti (apoptoze) je visoko regulisan proces obnavljanja starih i oštećenih ćelija. Svake sekunde oko 100 000 ćelija u ljudskom organizmu biva obnovljeno obezbeđujući homeostazu tkiva. Onemogućeno ili smanjeno odvijanje apoptotskog programa narušava pomenutu ravnotežu i vodi nastanku proliferativnih bolesti, dok prekomerna i nekontrolisana apoptoza doprinosi nastanku neurodegenerativnih bolesti [Thompson, 1995; Dadeel i Orrenius, 2005].

Prilikom programirane ćelijske smrti dolazi do preklapanja štetnih efekata povećane aktivnosti DNaze I i XO (Slika 11). DNaza I povećava osetljivost ćelija na apoptotske stimulse, delujući kao transkripcioni faktor Fas receptora [Olivieri i saradnici, 2004; Thiyagarajan i saradnici, 2018], dok povećavana aktivnost XO produkuje reaktivne forme kiseonika koje, kroz oštećenja subcelularnih struktura i makromolekula, obezbeđuju stimulus za pokretanje apoptoze [Circu i Aw, 2010; Sinha i saradnici, 2013; Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016].



Slika 11. Pojednostavljeni prikaz mehanizama pokretanja apoptoze DNazom I i XO.

Ekstracelularna DNaza I ulazi u ćeliju difuzijom [Eulitz i Mannherz, 2007] ili vezivanjem za katjon-nezavisni manozu-6-fosfat receptor (CI-MPR), nakon čega biva internalizovana

endocitozom. U citoplazmi se DNaza I nalazi u neaktivnoj formi vezana za aktinske komponente citoskeleta [Eulitz i Mannherz, 2007]. Gelsolin je aktin-vezujući protein, čiji N-terminalni fragment može kompetitivno istisnuti DNazu I iz kompleksa sa aktinom, time doprinoseći nastanku apoptoze [Chhabra i saradnici, 2006; Li i saradnici, 2009]. Kada se nađe u velikim količinama u citoplazmi, DNaza I prevazilazi kapacitete aktina za vezivanjem. Slobodna DNaza I u citoplazmu može dospeti i slučajnim oslobađanjem iz endoplazmatskog retikuluma [Thiyagarajan i saradnici, 2015]. Bez obzira na poreklo, DNaza I stiže do jedra, najverovatnije pasivnom difuzijom kroz pore jedrove membrane ili usled njenog narušenog integriteta tokom apoptoze [Peitsch i saradnici, 1993], u kome može vršiti fragmentaciju DNK, ili se u ulozi transkripcionog faktora vezuje za promotorni region fas gena, ushodno regulišući produkciju Fas receptora [Oliveri i saradnici, 2004]. Nuklearna translokacija DNaze I u cilju regulacije ekspresije fas gena posredovana je IL-1 β [Thiyagarajan i saradnici, 2018]. Endonukleaza G (EndoG) je ćelijski-autonoma nukleaza sa lokalizacijom u mitohondrijama [Schafer i saradnici, 2004], iz kojih nakon inicijacije apoptoze prelazi u jedro gde vrši fragmentaciju DNK [Li i saradnici, 2001; Samejima i Earnshaw, 2005]. Prekmerna ekspresija DNaze I povećava ekspresiju ostalih apoptotskih nukleaza, uključujući i EndoG [Yin i saradnici, 2007; Fahmi i saradnici, 2020]. Uz to EndoG ispoljava iste efekte ushodne regulacije na DNazu I i ostale nukleaze, čineći *circulus vitiosus* [Zhdanov i saradnici, 2015]. Do ushodne regulacije endonukleaza najverovatnije dolazi usled relaksacije DNK molekula kontrolisanim zasecanjem bilo DNazom I ili EndoG nukleazom, čime se olakšava pristup transkripcionih proteina [Zhdanov i saradnici, 2015; Fahmi i saradnici, 2020]. ROS mogu uzrokovati oslobađaju EndoG iz mitohondrija, što je praćeno nuklearnom translokacijom endonukleaze [Kim i saradnici, 2008].

Reaktivne kiseonične vrste unutar mitohondrija izazivaju stanje oksidativnog stresa usled koga membranski potencijal mitohondrija i njihova aktivnost bivaju kompromitovani oslobađajući molekule koji pokreću unutrašnji, mitohondrijalni put programirane ćelijske smrti. Među oslobođenim molekulima najznačajniji je citohrom *c* (Cyt *c*), koji aktivira kaspaze i pokreće kaspaza-zavisni mitohondrijalni put apoptoze. Do oslobađanja Cyt *c* dolazi kao posledica smanjenog afiniteta kardiolipina usled ROS-uzrokovane oksidacije [Orrenius i saradnici, 2007]. Uz to biva oslobođen i EndoG, koji prelazi u jedro i vrši ushodnu regulaciju ostalih endonukleaza i fragmentaciju DNK molekula u kaspaza-nezavisnom mitohondrijalnom putu apoptoze [Sinha i saradnici, 2013]. Oksidativni stres rezultira aktivacijom p53 proteina i Jun N-terminalne kinaze

(JNK), čime se pokreće set proapoptotskih proteina iz B-ćelijski limform 2 (Bcl-2) familije koji nadvladavaju zaštitne efekte antiapoptotskih proteina i narušavaju integritet mitohondrijalne membrane [Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016]. Apoptoza može biti inicirana spoljnim putem aktivacijom receptora na površini ćelije, čime biva pokrenuta signalna kaskada prevođenja prokaskaza u aktivne kaspaze odgovorne za sprovođenje programirane smrti. ROS mogu aktivirati Fas i TNF-R1 receptore ćelijske smrti [Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016]. Oksidativni stres remeti normalno savijanje polipeptidnih lanaca unutar endoplazmatskog retikuluma (ER), što za posledicu ima nagomilavanje nefunkcionalnih proteina narušene trodimenzionalne strukture i posledično javljanje stresa endoplazmatskog retikuluma. Do pokretanja apoptotskog programa dolazi ukoliko stres prevazilazi kompenzatorne kapacitete ER i onemogućavaju homeostazu. Tada zaštitni mehanizmi pokreću apoptozu samostalno ili uz pomoć mitohondrija, aktivacijom kaspaza, JNK i Bcl-2 proteina ili masivnim oslobađanjem jona Ca^{2+} iz ER koji narušava mitohondrijalni membranski potencijal [Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016].

Izražena i nekontrolisana apoptoza ima važnu ulogu u razvoju ishemijskih bolesti organa, traumatske povrede mozga, doprinosi nastanku hroničnih neurodegenerativnih oboljenja poput su Alzheimerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti, amiotrofične lateralne skleroze i multipla skleroze, kao i degenerativnih oštećenja retine i skeletnog sistema uključujući osteoartritis i osteoporozu [Li i saradnici, 2021]. Podložnost nervnog sistema degenerativnim promenama leži u samoj prirodi neurona kao post-mitotskih ćelija bez proliferativnog kapaciteta, usled čega su oštećenja ireverzibilna i trajna. Terapijske strategije u prevenciji gubitka neurona se zasnivaju na sprečavanju uzroka koji dovodi do oštećenja i smrti neurona, ili na ometanju efektorskih mehanizama kojima se realizuje ćelijska smrt [Cummings, 2017]. Imajući u vidu međusobnu povezanost direktnih i indirektnih efekata DNaze I i XO na apoptotske mehanizme i signalne puteve, istovremena inhibicija ovih enzima potencijalno može biti korisna u terapiji poremećaja uzrokovanih ekscisivnom apoptozom. Razvoj dualnih inhibitora DNaze I i XO bio bi u skladu sa modernim terapijskim pristupom u tretmanu multifaktorijalnih neurodegenerativnih bolesti, u kome se terapija pojedinačnim lekom usmerenim na jedan patološki mehanizma sve više napušta u korist kombinovane terapije zasnovane na sinergističkim efektima više lekova na više mehanizama ili pojedinačnih multi-target usmerenih liganada (engl. *MLTD – Multi-Target-Directed Ligands*) [Huo i saradnici, 2019].

1.5. Pregled novijih inhibitora dezoksiribonukleaza I

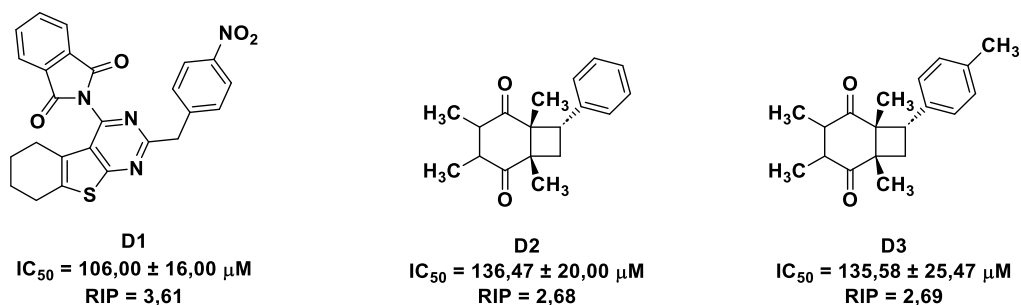
Nakon više od 70 godina od izolovanja DNaze I [Kunitz, 1950] broj poznatih inhibitora ovog enzima je i dalje relativno ograničen. Najskoriji literaturni pregled inhibitora DNaze I sproveden je 2014. godine od strane Kolarević i saradnika, koji su ih tom prilikom na osnovu porekla razvrstali na prirodne, sintetske i neorganske [Kolarević i saradnici, 2014].

Najpotentniji do sada identifikovani inhibitor DNaze I je globularni protein aktin, koji izgrađuje mikrofilamente citoskeleta i filamente mišićnih vlakana. Morrison i Dawson su zabeležili IC_{50} vrednost u opsegu od 10-60 nM, u zavisnosti od forme aktina [Morrison i Dawson, 2007]. Visok afinitet aktina prema DNazi I važan je protektivni mehanizam kojim se sprečava DNazom I uzrokovana degradacija hromatina i posledična smrt ćelija [Eulitz i Mannherz, 2007].

Poslednjih godina se kroz povećani broj radova beleži porast interesovanja za malim sintetskim molekulima sa sposobnošću inhibicije DNaze I.

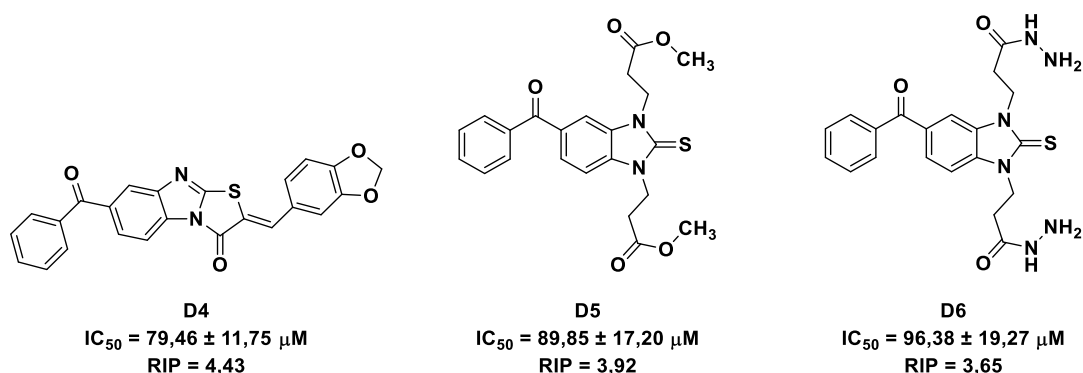
Rad Mavrove i saradnika [2018] je iznedrio više inhibitora DNaze I, koji se prema svojim strukturnim karakteristikama mogu razvrstati na derivate tieno[2,3-d]pirimidin-4-amina i tieno[2,3-d]pirimidin-4-ftalimida. Analizom dobijenih rezultata, autori su uočili izvesnu pravilnost, po kojoj su niže IC_{50} vrednost zabeležene kod derivata ftalimida u odnosu na svoje odgovarajuće prekursorske amine. Strukturna formula najpotentnijeg derivata **D1**, sa IC_{50} vrednošću od $106,0 \pm 16,0 \mu\text{M}$, prikazana je na Slici 12.

Bondžić i saradnici [2019] sintetisali su i ispitali inhibitorski potencijal derivata benzociklobutan-2,5-diona prema DNazi I izolovanoj iz goveđeg pankreasa. Među ispitivanim jedinjenjima, IC_{50} vrednost niža od $150 \mu\text{M}$ zabeležena je kod dva derivata (**D2**, **D3**) (Slika 12). Sprovedenjem studije kinetike inhibicije enzima utvrđeno je da oba derivata deluju kao nekompetitivni inhibitori.



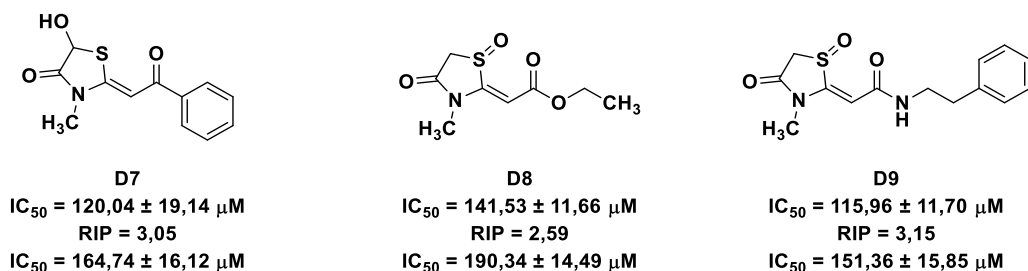
Slika 12. Strukturne formule derivata tieno[2,3-d]pirimidin-4-ftalimida [Mavrova i saradnici, 2018] i benzociklobutan-2,5-diona I [Bondžić i saradnici, 2019] sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema DNazi i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na kristal violet.

Nešto potentniji inhibitori DNaze I, sa IC_{50} vrednostima ispod $100 \mu M$, zabeleženi su među derivatima benzimidazola [Kolarević i saradnici, 2018]. U ispitivanoj seriji benzimidazola, 2-supstituisani derivat 1,3-tiazol[3,2-a]benzimidazolona (**D4**, Slika 13) sa najnižom IC_{50} vrednosti od $79,46 \pm 11,75 \mu M$ praćen je derivatima 1,3-benzimidazol-tionima (**D5** i **D6**, Slika 13).



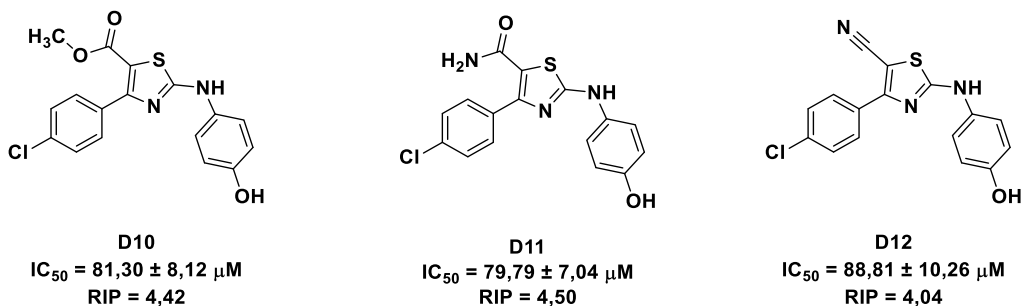
Slika 13. Strukturne formule derivata benzimidazola sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema DNazi I i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na kristal violet [Kolarević i saradnici, 2018].

U seriji od 53 derivata 4-tiazolidinona *in vitro* inhibitorna aktivnost prema DNazi I izolovanoj iz goveđeg pankreasa zabeležena je kod njih 10 [Kolarević i saradnici, 2019a]. Od toga tri najpotentnija inhibitora (**D7-9**, Slika 14) su pokazala sposobnost inhibicije DNaze I u homogenatu jetre pacova sa IC_{50} vrednostima ispod $200 \mu M$.



Slika 14. Strukturne formule derivata 4-tiazolidinona sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema DNazi I i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na kristal violet. Prikazane niže vrednosti odgovaraju *in vitro* testiranju na izolovanom enzimu, dok su više vrednosti dobijene prilikom testiranja korišćenjem homogenata jetre pacova [Kolarević i saradnici, 2019a].

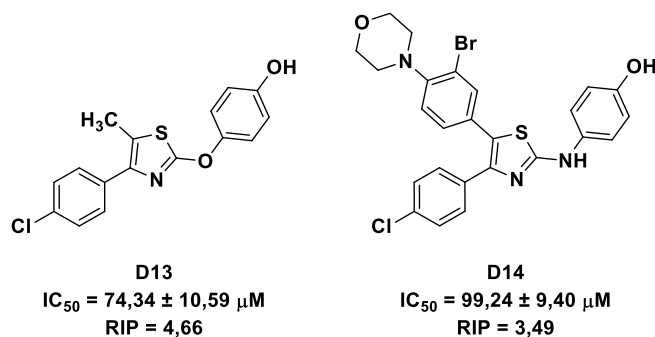
Među derivatima 4-(4-hlorofenil)tiazol-2-amina, ispitanim od strane Šmelcerović i saradnika [2020] inhibitorna aktivnost prema DNazi I je zabeležena kod većeg broja njih, od kojih su 3 derivata pokazala IC_{50} vrednosti niže od $100 \mu M$ (**D10-12**, Slika 15). Aktivni derivati, ne samo da su među potentnijim poznatim inhibitorima DNaze I, već pokazuju sposobnost inhibicije 5-lipoksigenaze (5-LO) u submikromolarnom opsegu. Jedinjenja **D10-12** su prvi do sada identifikovani dualni inhibitori DNaze I i 5-LO, te predstavljaju dobru polaznu osnovu za dalji razvoj sličnih dualnih inhibitora, posebno imajući u vidu značaj DNaze I i 5-LO u patogenezi neurodegenerativnih bolesti.



Slika 15. Strukturne formule 4-(4-hlorofenil)tiazol-2-amina sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema DNazi I i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na kristal violet [Smelcerovic i saradnici, 2020].

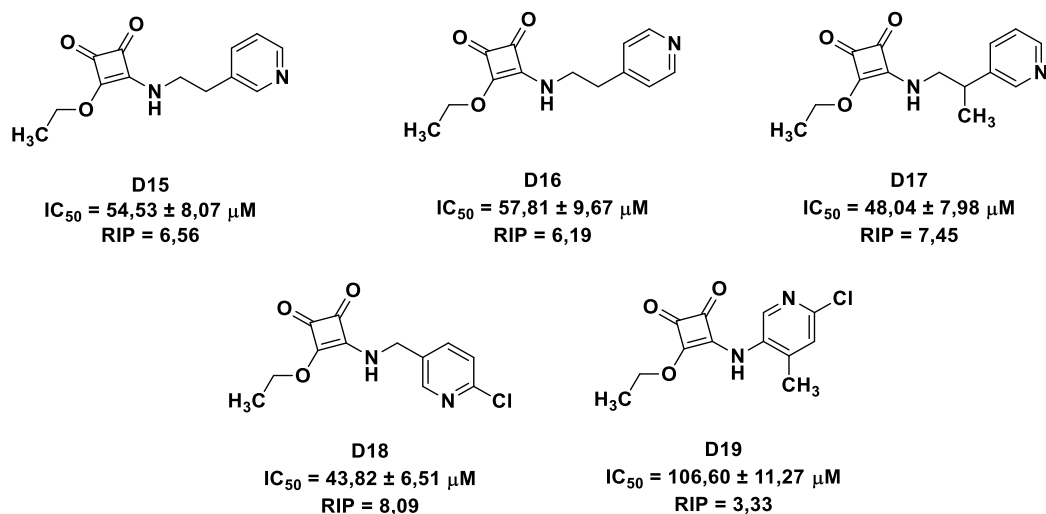
Daljim radom istih autora na molekulima koji u osnovi imaju tiazolov prsten proširen je spektar poznatih dualnih inhibitora DNaze I i 5-LO [Marković i saradnici, 2023]. Inhibitorni

potencijal novih derivata tiazola [Marković i saradnici, 2023] prema DNazi I bio je u skladu sa prethodno ispitanim derivatima [Smelcerovic i saradnici, 2020]. Najpotentnije među ispitivanim strukturama (**D13** i **D14**, Slika 16) su takođe pokazale IC_{50} vrednosti ispod 100 μM .



Slika 16. Strukturne formule 4-(4-hlorofenil)tiazola sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema DNazi I i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na kristal violet [Marković i saradnici, 2023].

Ruseva i saradnici [2023a i 2023b] ispitali su inhibitorni potencijal ukupno 5 derivata skvaramida prema DNazi I (**D15-19**, Slika 17). Uprkos malom broju ispitanih predstavnika ove serije, rezultati testiranja pokazali su da sve analizirane supstance dovode do smanjenja aktivnosti DNaze I. Četiri derivata (**D15-19**) inhibiralo je DNazu I sa IC_{50} vrednostima ispod 60 μM , čineći skvaramide jednim od najpotentnijih do sada poznatih malih sintetskih organskih molekula sa sposobnošću inhibicije DNaze I.



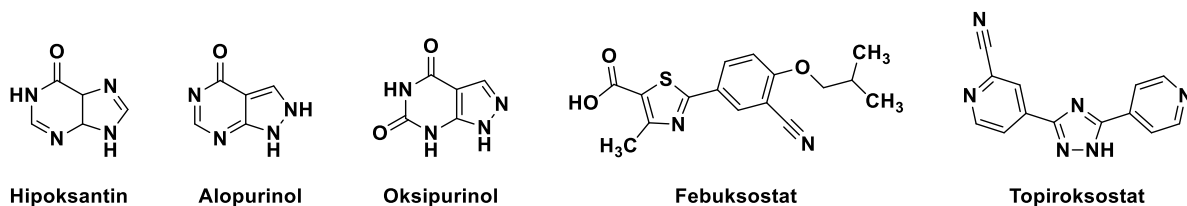
Slika 17. Strukturne formule derivata skvaramida sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema DNazi I i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na kristal violet [Ruseva i saradnici 2023a; Ruseva i saradnici, 2023b].

Interesovanje za malim sintetskim inhibitorima DNaze I, iako u porastu, i dalje je relativno ograničeno. Verovatan razlog manjka interesovanja u osnovi ima nepostojanje terapijske indikacije u kojoj je DNaza I prepoznata i odobrena kao validan terapijski target. Posledično, rad na pronalaženju potentnih inhibitora DNaze I, kojima bi se omogućilo bolje razumevanje patofiziološke uloge enzima, ostaje ograničen. Navedene okolnosti stavljaju DNazu I u svojevrsan „začarani krug“, gde nedostatak potentnih inhibitora proizilazi iz nedostatka podataka o DNaze I kao validnom targetu, koji za uzrok ima upravo pomenuti nedostatak potentnih inhibitora. Uprkos tome, trend porasta inhibitornog potencijala prema DNazi I jasno se uočava među do sada identifikovanim inhibitorima.

1.6. Pregled novijih inhibitora ksantin oksidaze

Terapijski potencijal inhibicije ksantin oksidaze prepoznat je još sredinom dvadesetog veka. Prvi inhibitor enzima odobren za terapiju gihta od strane američke Agencije za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration* – FDA) bio je alopurinol 1966. godine [Kumar i saradnici, 2017]. Kao strukturni izomer ksantina, alopurinol (Slika 18) pod dejstvom XO biva konvertovan u oksipurinol, koji inhibira enzimsku aktivnost kovalentnim vezivanjem za molibden unutar

aktivnog centra [Okamoto i saradnici, 2008]. Terapijska primena alopurinola je značajno ograničena brojim neželjenim efektima koji se javljaju usled strukturne sličnosti sa hipoksantinom. Pored osipa i hipersenzitivnih reakcija, kontinuirana upotreba alopurinola može dovesti do teških i životno ugrožavajućih komplikacija poput gastrointestinalnih poremećaja, fulminantnog hepatitisa, otkazivanja bubrega ili *Stevens-Johnson*-ovog sindroma [Pacher i saradnici, 2006; Shalom i saradnici, 2008]. Više od četiri decenije nakon alopurinola odobrenje za terapijsku primenu su dobili febuksostat (2009. godine) i topiroksostat (2013. godine) (Slika 18) [Kumar i saradnici, 2017]. U postmarketinškoj fazi praćenja febuksostata uočeno je povećanje mortaliteta uzrokovanog kardio-vaskularnim problemima u odnosu na alopurinol [White i saradnici, 2018], te je FDA 2019. godine izdala upozorenje u kome se ističu nove smernice i ograničena za primenu ovog leka [FDA, 2019]. Takođe je uočeno da topiroksostat može povećati incidencu javljanja gihta kod pacijenata sa hiperurikemijom [Hosoya i saradnici, 2016]. Imajući u vidu ozbiljne neželjene efekte koji se dovode u vezu sa terapijskom primenom alopurinola, febuksostata i topiroksostata, nesumnjiva je potreba za pronalaženjem novih inhibitora XO sa povoljnijim bezbednosnim profilom.

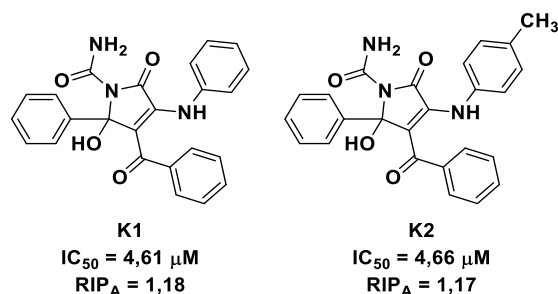


Slika 18. Strukturne formule hipoksantina, alopurinola, oksipurinola, febuksostata i topiroksostata.

Nasuprot DNazi I, kod koje je broj poznatih inhibitora relativno ograničen, terapijska primena čini istraživanje novih inhibitora XO mnogo atraktivnijim. Interesovanje za inhibitorima XO najbolje se ilustruje činjenicom da se svakih 5-6 godina javlja realna potreba za opsežnim literaturnim pregledima novih inhibitora [Šmelcerović i saradnici, 2017; Kumar i saradnici, 2017; Singh i saradnici, 2023; Agrawal i saradnici, 2023], s ciljem da se kroz sistematičan pregled trenutnih saznanja pruže smernice za njihov dalji razvoj. U nastavku će biti prikazani odabrani predstavnici novih potentnih malih sintetskih inhibitora ovog enzima.

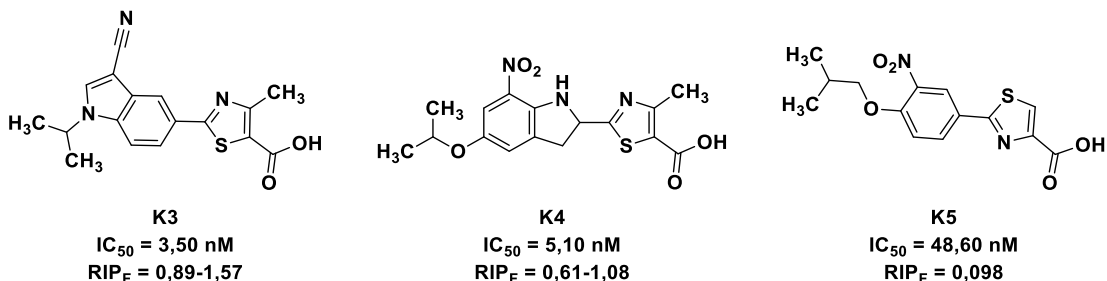
Poslednjih godina, među zapaženim inhibitorima XO sa petočlanim heterocikličnim prstenom našli su se derivati pirola, tiazola, imidazola, triazola i tetrazola.

Kıbrız i saradnici [2018] sintetisali su i ispitali inhibitorski potencijal serije derivata pirola prema ksantin oksidazi. IC_{50} vrednosti svih ispitivanih derivata bile su u niskom mikromolarnom opsegu. *In silico* studija molekularnog *docking*-a najpotentnijih inhibitora (**K1** i **K2**) (Slika 19) ukazala je na značaj hidrofobnih interakcija za inhibiciju ksantin oksidaze.



Slika 19. Strukturne formule derivata pirazola sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema XO i relativnim inhibitorskim potencijalom u odnosu na alopurinol [Kıbrız i saradnici, 2018].

Tiazolov heterociklus se, po uzoru na feboksostat, nalazi u osnovi većeg broja novosintetisanih inhibitora XO. Određivanje inhibitorskog potencijala je pokazalo da se izosternom zamenom benzenovog prstena feboksostata indolom (**K3** i **K4**) [Song i saradnici, 2015; Song i saradnici, 2016] zadržava niska nanomolarna aktivnost (Slika 20). Isti efekat je postignut bioizosternom zamenom tiazolovog prstena feboksostata 2-feniltiazol-4-karboksilnom kiselinom (**K5**) [Xu i saradnici, 2019] (Slika 20).



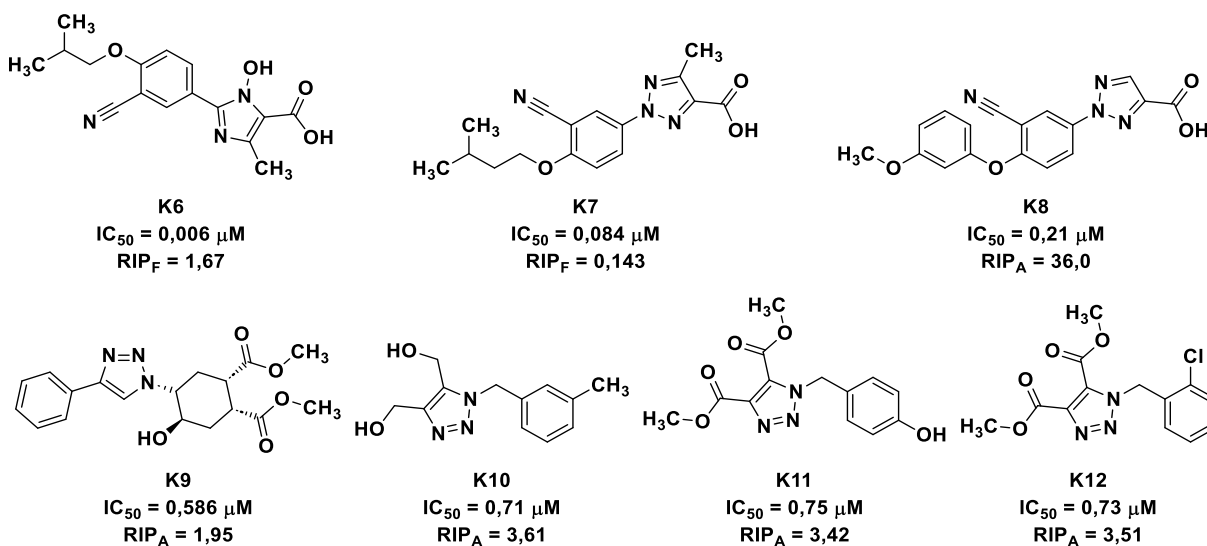
Slika 20. Strukturne formule derivata tiazola sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema XO i relativnim inhibitorskim potencijalom u odnosu na feboksostat [Song i saradnici, 2015; Song i saradnici, 2016; Xu i saradnici, 2019].

Chen i saradnici [2015] su sintetisali seriju derivata 1-hidroksi/metoksi-4-metil-2-fenil-1*H*-imidazol-5-karboksilne kiseline, sa imidazolovim prstenom u osnovi. *Lineweaver-Burk*-ovim dijagramom je utvđeno da najpotentniji inhibitor **K6** (Slika 21), sa IC_{50} vrednošću od 0,006 μ M, pokazuje mešoviti tip inhibicije XO.

Među zapaženim predstavnicima triazola su jedinjenja **K7** [Shi i saradnici, 2016] i **K8** [Zhang i saradnici, 2017] (Slika 21), kao mešoviti inhibitori XO pripremljeni takođe po ugledu na febeksostat. Derivat **K8** sa metoksi supstuentom u *meta* poziciji benzenovog prstena je bio efikasniji u odnosu na svoje *orto* i *para* analoge.

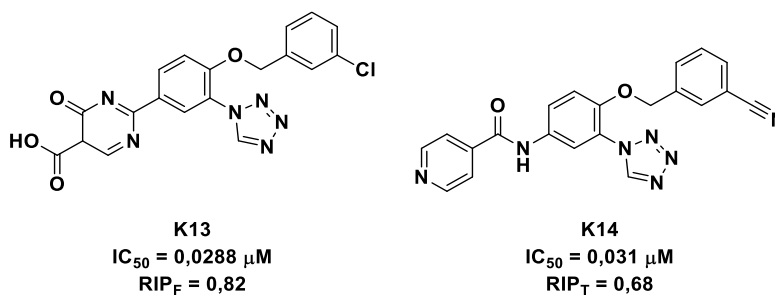
Odstupanje od uobičajenog pristupa izosternih modifikacija febeksostata pri dizajnu novih XO inhibitora zabeleženo je u radu Tan i saradnika [2020], koji su sintetisali i ispitali inhibitornu aktivnost prema XO derivata dobijenih povezivanjem triazola sa strukturnim fragmentima karbašecera. Najpotentniji predstavnik **K9** (Slika 21) pokazao je veću potentnost inhibicije XO u odnosu na alopurinol.

Yagiz i saradnici [2021] su sintetisali serije derivata dimetil *N*-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4,5-dikarboksilata i odgovarajućih derivata dimetanola. Snažnija sposobnost inhibicije XO uočena je kod derivata dikarboksilata u odnosu na derivate dimetanola. Najpotentniji predstavnici obe serije (**K10-12**) sa odgovarajućim IC_{50} i RIP vrednostima prikazani su na Slici 21.



Slika 21. Strukturne formule derivata imidazola i triazola sa odgovarajućim IC₅₀ vrednostima prema XO i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na febuksostat/alopurinol [Chen i saradnici, 2015; Shi i saradnici, 2016; Zhang i saradnici, 2017; Tan, 2020; Yagiz i saradnici 2021].

Nepurinski inhibitori XO sa tetrazolovim prstenom su pokazali zapaženu aktivnost. Inhibicija enzima u mikromolarnom opsegu zabeležena je kod svih 26 predstavnika seriji pripremljenih od strane Zhang B i saradnika [2019]. Najpotentnije jedinjenje **K13**, okarakterisano kao mešoviti inhibitor, ne samo da je pokazalo uporedivu IC₅₀ vrednost sa febuksostatom, već je uspešno snižavalo nivo urata kod eksperimentalnog modela hiperurikemije pacova. Analizom odnosa struktura-aktivnost uočen je značaj alkoksi supstitucije u *para* poziciji središnjeg benzenovog prstena. Sličnu seriju tetrazola sintetisali su Zhang TJ i saradnici [2019] zamenivši fragment 4-okso-4,5-dihidropirimidi-5-karboksilne kiseline izonikotinamidom. Najpotentniji predstavnik (**K14**) takođe je ispoljio mešoviti tip inhibicije XO, sa IC₅₀ vrednošću koja je bila jako bliska vrednosti topiroksostata korišćenog kao pozitivna kontrola.



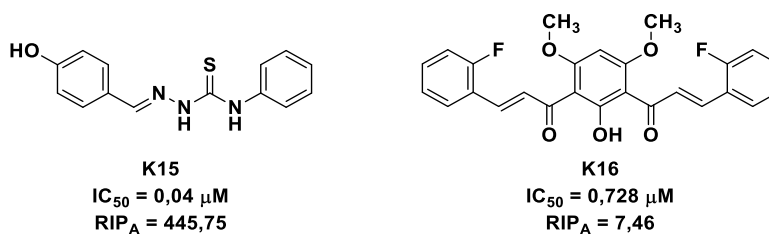
Slika 22. Strukturne formule derivata tetrazola sa odgovarajućim IC₅₀ vrednostima prema XO i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na febuksostat/topiroksostat [Zhang B i saradnici, 2019; Zhang TJ i saradnici, 2019].

Među novosintetisanim inhibitorima XO sa šestočlanim prstenom po svojoj aktivnosti se izdvajaju derivati benzena, pirimidina i piridazina.

Li i saradnici [2018] su sintetisali i ispitali inhibitorni potencijal manje serije derivata benzaldehid tiosemikarbazona. Najpotentniji predstavnik **K15** (Slika 23) je inhibirao XO sa IC₅₀ vrednošću od 0,04 μM, premašivši više od 400 puta referentni inhibitor alopurinol. Pored mešovitog tipa inhibicije, studijom molekularnog *docking*-a je utvrđeno da *para* -OH supstituent

benzenovog prstena formira vodonične veze, a fenil supstituent na terminalnoj amino grupi π - π interakcije sa XO, doprinoseći visokom inhibitornom potencijalu.

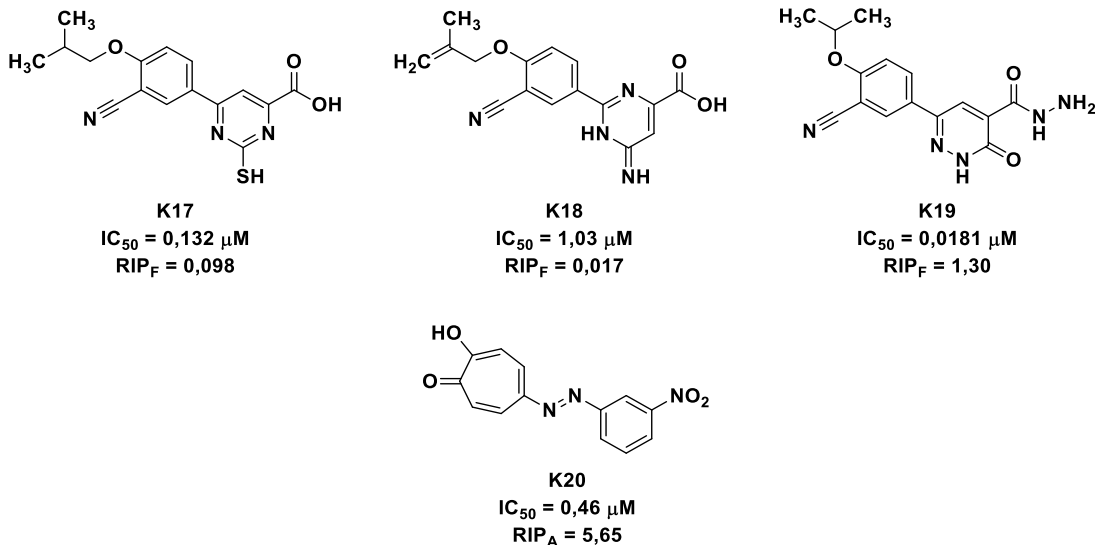
Predstavnici simetričnih mono- i difluoro supstituisanih derivata bis-halkona ispoljili su sposobnost inhibicije ksantin oksidaze u mikromolarnom i submikromolarnom opsegu [Burmaoglu i saradnici, 2019]. Pozicija atoma fluora na aromatičnom prstenu uticala je na tip inhibicije, te su pojedini predstavnici okarakterisani kao kompetitivni, a drugi kao nekompetitivni inhibitori. Najpotentniji predstavnik, 2-fluoro derivat (**K16**) (Slika 23), nekompetitivno je inhibirao enzim.



Slika 23. Strukturne formule derivata benzena sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema XO i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na alopurinol [Li i saradnici, 2018, Burmaoglu i saradnici, 2019].

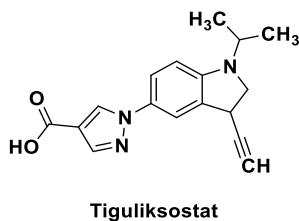
Veći broj inhibitora ksantin oksidaze dobijen je izosternom zamenom petočlanog tiazolovog prstena febuksostata šestočlanim pirimidinom ili piridazinom. Najpotentniji predstavnici **K17** [Shi i saradnici, 2018], **K18** [Mao i saradnici, 2019] i **K19** [Zhang L i saradnici, 2019] (Slika 24) ispoljili su mešoviti tip inhibicije.

Noviji predstavnici inhibitora ksantin oksidaze sa sedmočlanim prstenom dobijeni su iz α -tropolona [Sato i saradnici, 2018]. Većina aktivnih derivata je inhibirala enzim sa IC_{50} vrednostima u niskom mikromolarnom opsegu, izuzev najaktivnijeg **K20** (Slika 24) koji je pokazao submikromolarnu vrednost.



Slika 24. Strukturne formule derivata pirimidina, piridazina i α -tropolona sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima prema XO i relativnim inhibitornim potencijalom u odnosu na febuksostat/alopurinol [Shi i saradnici, 2018, Mao i saradnici, 2019; Zhang L i saradnici, 2019; Sato i saradnici, 2018].

Veliko interesovanje i posvećeni rad na pronalaženju novih inhibitora ksantin oksidaze je doveo nekoliko kandidata do pretkliničkih i kliničkih faza ispitivanja [Shi i saradnici, 2023]. Najperspektivniji među njima je tiguliksostat (Slika 25), selektivni nepurinski inhibitor ksantin oksidaze čija je *in vitro* aktivnost uporediva sa febuksostatom. Nakon uspešno sprovedene II faze kliničkih ispitivanja, kojom je utvrđeno značajno sniženje koncentracije serumskih urata u poređenju sa placebo, uz prihvatljivi bezbednosni profil [Terkeltaub i saradnici, 2023], topiroksostat se trenutno nalazi u III fazi kliničkih ispitivanja, koje imaju za cilj određivanje efikasnosti i bezbednosti terapije tiguliksostatom kod pacijenata sa gihtom udruženim sa hiperurikemijom [Lee, 2022; Lee, 2023].



Slika 25. Strukturna formula tiguliksostata.

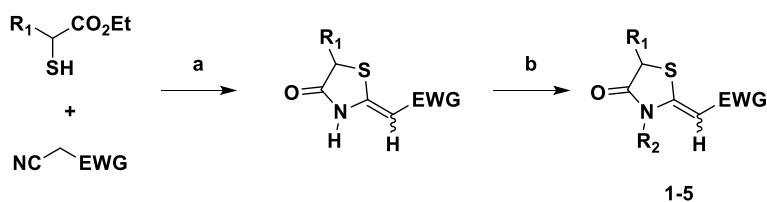
2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje inhibitornog potencijala dostupnih sintetisanih heterocikličnih derivata 2-alkiliden i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina, 1-supstituisanih i 1,2-disupstituisanih 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina, derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona i derivata 8-hidroksihinolina i srodnih struktura na aktivnost enzima dezoksiribonukleaze I i ksantin oksidaze *in vitro*, u poređenju sa referentnim inhibitorima kristal violetom i alopurinolom. Najefikasniji heterociklični inhibitori dezoksiribonukleaze I i/ili ksantin oksidaze podvrgnuti su određivanju kinetike enzimske inhibicije, dok su metode molekuskog *dockinga* i dinamike iskorišćene za predviđanje najznačajnijih interakcija ispitivanih jedinjenja sa DNazom I i ksantin oksidazom.

3. MATERIJAL I METODE

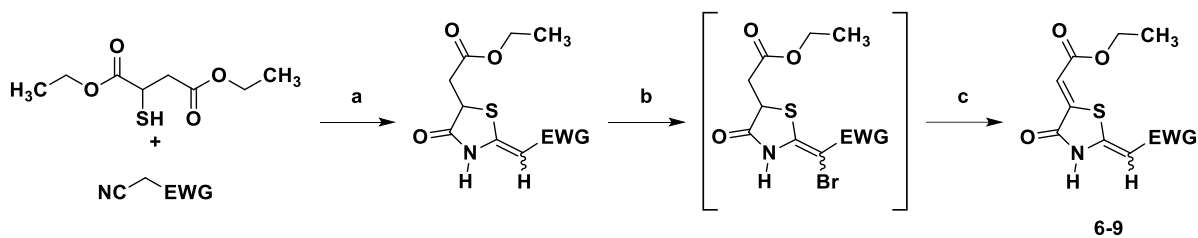
3.1. Ispitivana jedinjenja

Ispitivanjem inhibitorne aktivnosti prema enzimima DNazi I i XO su obuhvaćeni derivati 2-alkiliden-4-oksotiazolidina (**1-5**, Šema 1) i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina (**6-9**, Šema 2; **10-14** Šema 3), 1-supstituisanih (**15 i 16**, Šema 3) i 1,2-disupstituisanih 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina (**17-38**, Šema 4), derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona (**39 i 40**, Šema 5), derivati naftalena (**41**, Šema 6; **42 i 43**, Šema 7, **44-48**, Šema 8), derivati 8-hidroksihinolina (**49 i 50**, Šema 9; **51**, Šema 10), derivati nitroksolina (**52**, Šema 11; **53-56**, Šema 12; **61-63**, Šema 13; **64-67**, Šema 15; **68 i 69**, Šema 16), derivati triptofana (**70 i 71**, Šema 17), derivati *N*-alkilpiperidin karbamata (**72 i 73**, Šema 18) i četiri strukturno nesvrstana derivata (**74-77**, Šema 19).



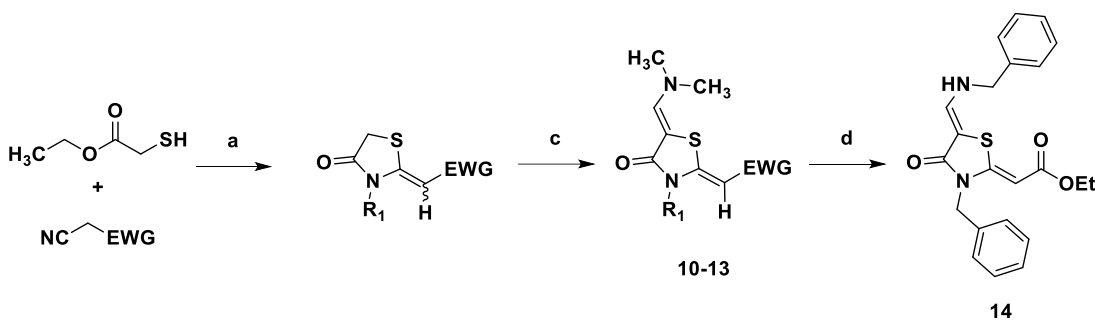
Jedinjenje	R ₁	R ₂	EWG	Referenca
1	H	CH ₃	CN	Gajić i saradnici, 2021a
2	H	CH ₂ CO ₂ Et	CO ₂ Et	Džambaski i saradnici, 2013
3	H	Bn	CONHPh	Džambaski i saradnici, 2013
4	H	Bn	CONH(CH ₂) ₂ Ph	Gajić i saradnici, 2021a
5	CH ₂ CO ₂ Et	CH ₃	COPh	Marković i saradnici, 2004a

Šema 1. Sintaza derivata 2-alkiliden-4-oksotiazolidina (**1-5**). Reagensi i uslovi: a) K₂CO₃ kat., EtOH, refluks; b) MeI, BnBr ili BrCH₂CO₂Et (1,1–1,5 ekvivalenta), K₂CO₃ (1–1,2 ekvivalenta), DMF, sobna temperatura.



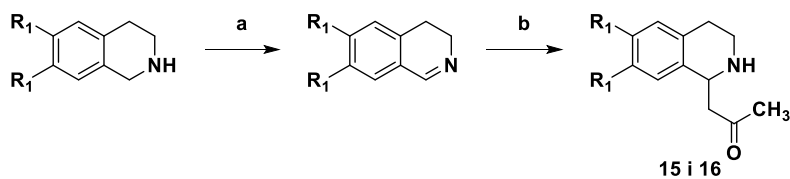
Jedinjenje	EWG	Referenca
6	CN	Marković i saradnici, 2004b
7	CO ₂ Et	Marković i saradnici, 2004b
8	CONHPh	Marković i saradnici, 2004b
9	COPh	Marković i saradnici, 2004b

Šema 2. Sinteza derivata 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina (**6-9**). Reagensi i uslovi: a) K₂CO₃ kat., EtOH, refluks [Marković i saradnici, 2003]; b) PHBP, ACN, 0°C, 30 min; c) 80-85°C, 2-3 h [Marković i saradnici 2004b].



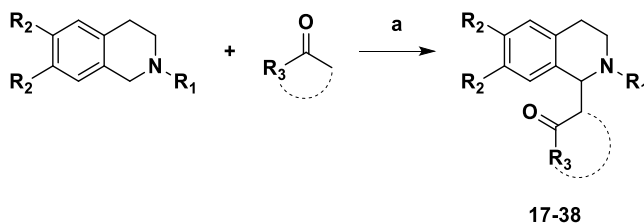
Jedinjenje	R ₁	EWG	Referenca
10	CH ₃	CO ₂ Et	Gajić i saradnici, 2021a
11	CH ₃	CONHPh	Gajić i saradnici, 2021a
12	Bn	CONH(CH ₂) ₂ Ph	Gajić i saradnici, 2021a
13	<i>o</i> -Br-Bn	CO ₂ Et	Gajić i saradnici, 2021a
14	Bn	CO ₂ Et	Gajić i saradnici, 2021a

Šema 3. Sinteza derivata 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina (**6-14**). Reagensi i uslovi: a) K₂CO₃ kat., EtOH, refluks; b) MeI, BnBr ili *o*-BrC₆H₄CH₂Br (1,1-1,5 ekvivalenata), K₂CO₃ (1-1,2 ekvivalenta), DMF, sobna temperatura; c) ^tBuOCH(NMe)₂ (1,5 ekvivalenata), toluen, sobna temperatura; d) BnNH₂ (10 ekvivalenata), DMF, 60°C.



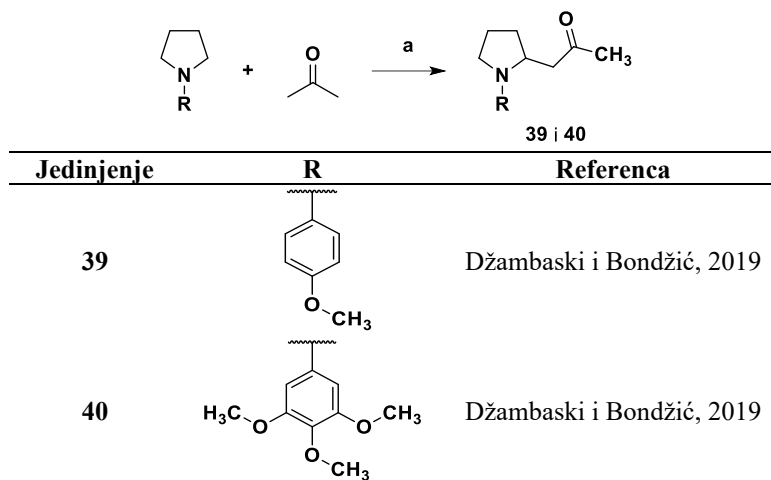
Jedinjenje	R ₁	Referenca
15	H	Džambaski i Bondžić, 2019
16	OCH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019

Šema 4. Sinteza 1-supstituisanih derivata 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina (**15 i 16**). Reagensi i uslovi: a) IBX 1 ekvivalent, DMSO, sobna temperatura, 20 min b) L-prolin 0,3 ekvivalenta, TFA 0,3 ekvivalenta, aceton, 4 h.

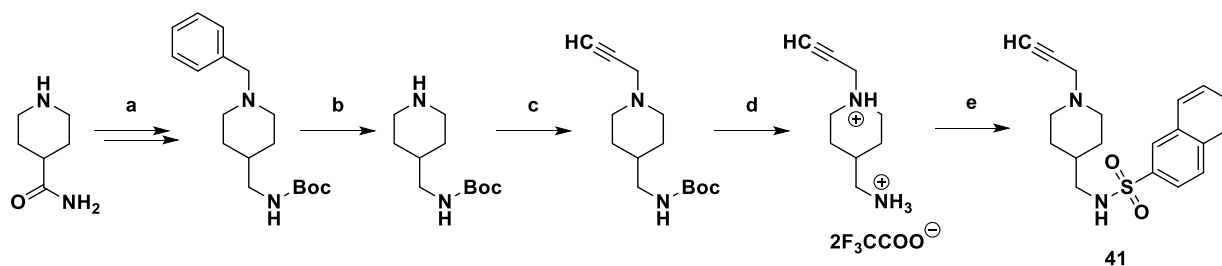


Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	Referenca
17	Ph	H	CH ₂ COCH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
18	Ph	OCH ₃	CH ₂ COCH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
19	Ph	H	CH ₂ COCH ₂ CH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
20	Ph	OCH ₃	CH ₂ COCH ₂ CH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
21	Ph	H	CH ₂ COPh	Džambaski i Bondžić, 2019
22	Ph	OCH ₃	CH ₂ COPh	Džambaski i Bondžić, 2019
23	Ph	H	2-oksocikloheksil	Džambaski i Bondžić, 2019
24	2-CH ₃ -C ₆ H ₄	H	CH ₂ COCH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
25	4-F-C ₆ H ₄	H	CH ₂ COCH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
26	4-F-C ₆ H ₄	OCH ₃	CH ₂ COCH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
27	4-F-C ₆ H ₄	H	CH ₂ COCH ₂ CH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
28	4-F-C ₆ H ₄	OCH ₃	CH ₂ COCH ₂ CH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
29	4-F-C ₆ H ₄	H	CH ₂ COPh	Džambaski i Bondžić, 2019
30	4-F-C ₆ H ₄	H	CN	Džambaski i Bondžić, 2019
31	4-F-C ₆ H ₄	OCH ₃	CN	Džambaski i Bondžić, 2019
32	4-F-C ₆ H ₄	H	2-oksocikloheksil	Džambaski i Bondžić, 2019
33	4-F-C ₆ H ₄	OCH ₃	2-oksocikloheksil	Džambaski i Bondžić, 2019
34	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	H	CH ₂ COCH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
35	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	H	CH ₂ COPh	Džambaski i Bondžić, 2019
36	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	OCH ₃	2-oksocikloheksil	Džambaski i Bondžić, 2019
37	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	OCH ₃	CH ₂ COCH ₂ CH ₃	Džambaski i Bondžić, 2019
38	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	OCH ₃	CN	Džambaski i Bondžić, 2019

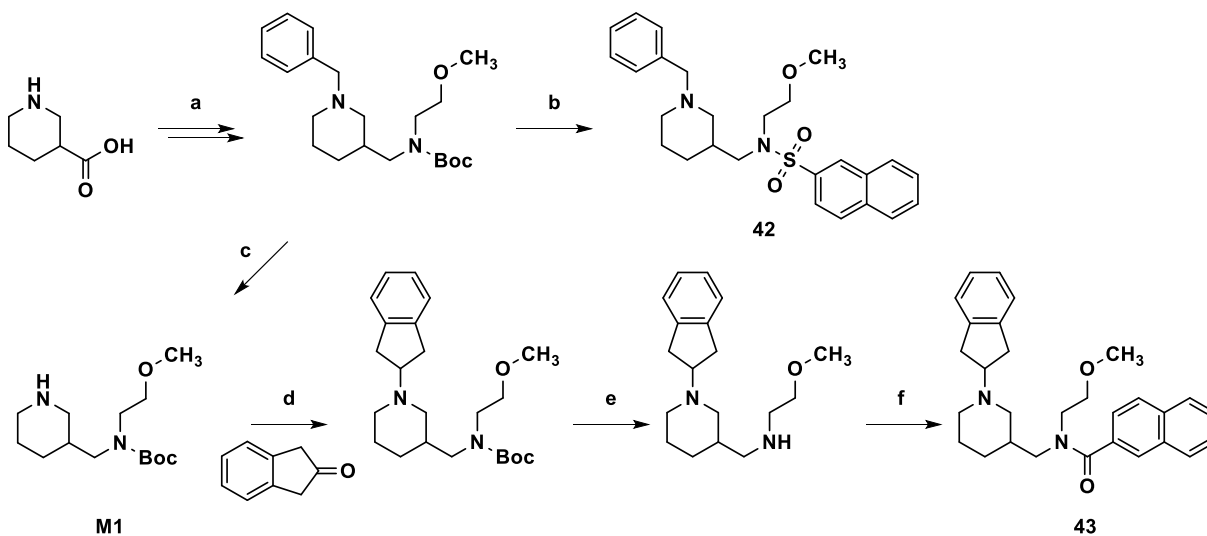
Šema 5. Sinteza 1,2-disupstituisanih derivata 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina (**17-38**). Reagensi i uslovi: a) L-prolin 30 mol%, TFA 30 mol%, DDQ 1,05 ekvivalenta, odgovarajući CH₃COR₃ rastvarač, ACN.



Šema 6. Sinteza derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona (**39** i **40**). Reagensi i uslovi: a) svetlost, L-prolin 30 mol%, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, ACN.

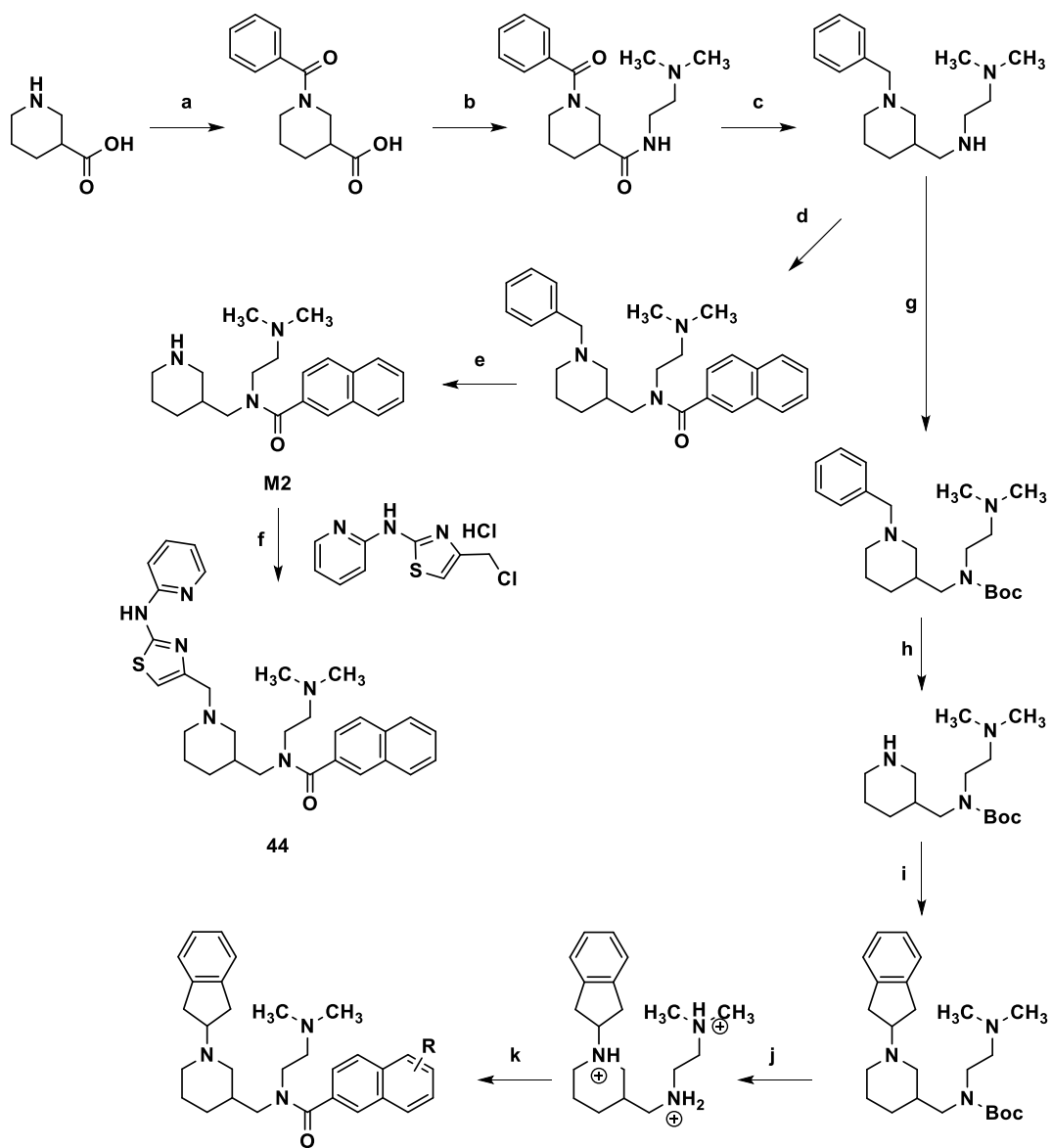


Šema 7. Sinteza derivata naftalena (**41**). Reagensi i uslovi: a) (i) PhCOCl , Et_3N , THF, 0°C do sobne temperature, 22-25 h; (ii) LiAlH_4 , anhidrovani THF, sobna temperatura do refluksa, atmosfera argona, 2-3 h; (iii) Boc_2O , Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C do sobne temperature, 21-24 h b) cikloheksan, $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ cat., metanol, sobna temperatura, atmosfera argona, 20 h c) propargil bromid, Cs_2CO_3 , aceton, sobna temperatura, 24 h d) 2 M rastvor HCl u Et_2O , metanol, 0°C do sobne temperature, atmosfera argona, 24 h e) naftalen-2-sulfonil hlorid, Et_3N , CH_2Cl_2 0°C do sobne temperature, atmosfera argona, 24 h [Kořak i saradnici, 2017].



Jedinjenje	Referenca
42	Košak i saradnici, 2016
43	Brus i saradnici, 2014

Šema 8. Sinteza derivata naftalena (**42** i **43**) i međuproizvoda **M1**. Reagensi i uslovi: a) (i) PhCOCl, K₂CO₃, THF–H₂O, 0°C do sobne temperature, 22 h; (ii) 6 M HCl (aq), 0°C; (iii) H₂N-CH₂-CH₂-OMe, TBTU, Et₃N, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 22 h; (iv) LiAlH₄, anhidrovani THF, sobna temperatura do refluksa, atmosfera argona, 3 h; (v) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C do sobne temperature, 20 h [Košak i saradnici, 2014]; b) naftalen-2-sulfonyl hlorid, Et₃N, CH₂Cl₂ 0°C do sobne temperature, atmosfera argona, 24 h [Košak i saradnici, 2016]; c) cikloheksan, Pd(OH)₂/C cat., metanol, sobna temperatura, atmosfera argona, 17 h; d) NaBH(OAc)₃, AcOH, 1,2-dihloretan, sobna temperatura, atmosfera argona, 72 h; e) (i) TFA, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 22 h; (ii) 1 M aq NaOH, 0°C; d) 2-naftojeva kiselina, TBTU, Et₃N, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 19 h [Brus i saradnici, 2014].

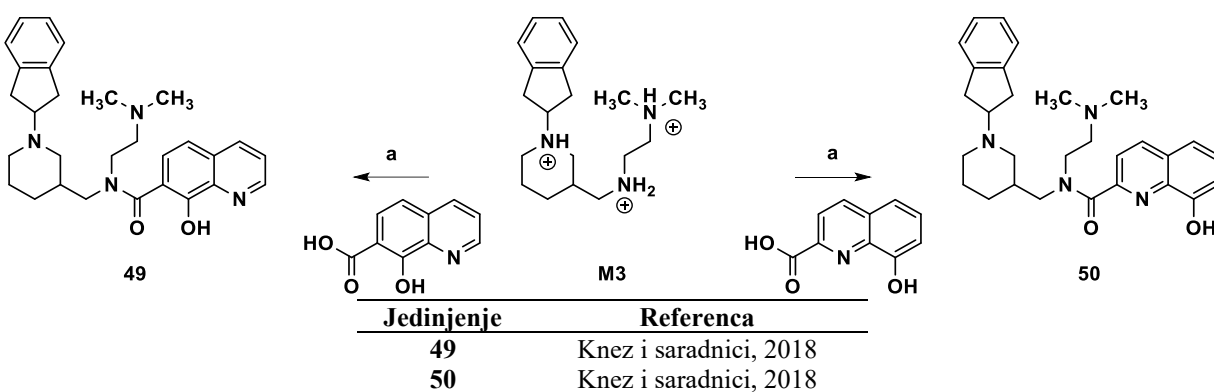


45: -H
 46: 4-OH
 47: 1-OH
 48: 8-OH

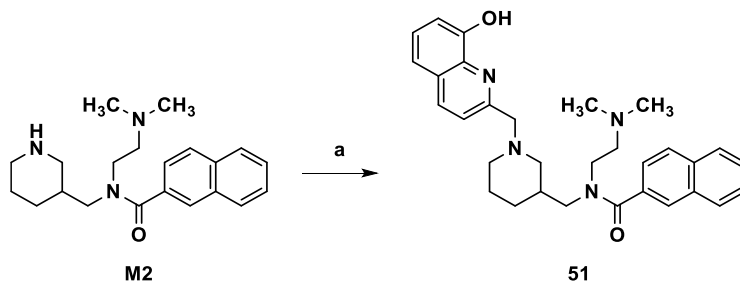
Jedinjenje	Referenca
44	Knez i saradnici, 2018
45	Košak i saradnici, 2018
46	Gajić i saradnici, 2022
47	Gajić i saradnici, 2022
48	Gajić i saradnici, 2022

Šema 9. Sinteza derivata naftalena (**44-48**) i međuproizvoda (**M2** i **M3**). Reagensi i uslovi: a) (i) PhCOCl, K₂CO₃, THF-H₂O, 0°C do sobne temperature, 22 h; (ii) 6 M HCl (aq), 0°C; b) H₂N-CH₂-CH₂-NMe₂, TBTU, Et₃N, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 24 h; c) LiAlH₄, anhidrovani THF, sobna temperatura do refluksa, atmosfera argona, 3,5 h; d) 2-naftoil hlorid, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C do

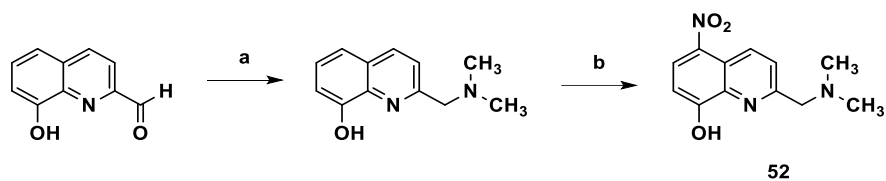
sobne temperature, 24 h [Košak i saradnici, 2018]; e) cikloheksan, Pd(OH)₂/C cat., metanol, 75°C, 18 h; f) K₂CO₃, anhidrovani DMF, 50°C, 16 h [Knez i saradnici, 2018]; g) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C do sobne temperature, 24 h; h) cikloheksan, Pd(OH)₂/C cat., metanol, sobna temperatura, atmosfera argona, 24 h; i) 1,3-dihidro-2*H*-inden-2-on, NaBH(OAc)₃, AcOH, 1,2-dihloretnan, atmosfera argona, 24 h; j) TFA, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 24 h [Košak i saradnici, 2018]; k) (i) odgovarajući derivat naftojve kiseline, HATU, K₂CO₃, MeCN, 50°C, 48-72 h; (ii) za **46**: K₂CO₃, MeOH, H₂O, sobna temperatura, 6 h [Gajić i saradnici, 2022].



Šema 10. Sinteza derivata 8-hidroksihinolina (**49** i **50**) iz međuproizvoda **M3** čija je sinteza prikazana Šemom 9. Reagensi i uslovi: a) HATU, Et₃N, MeCN, sobna temperatura, 30 min [Knez i saradnici, 2018].



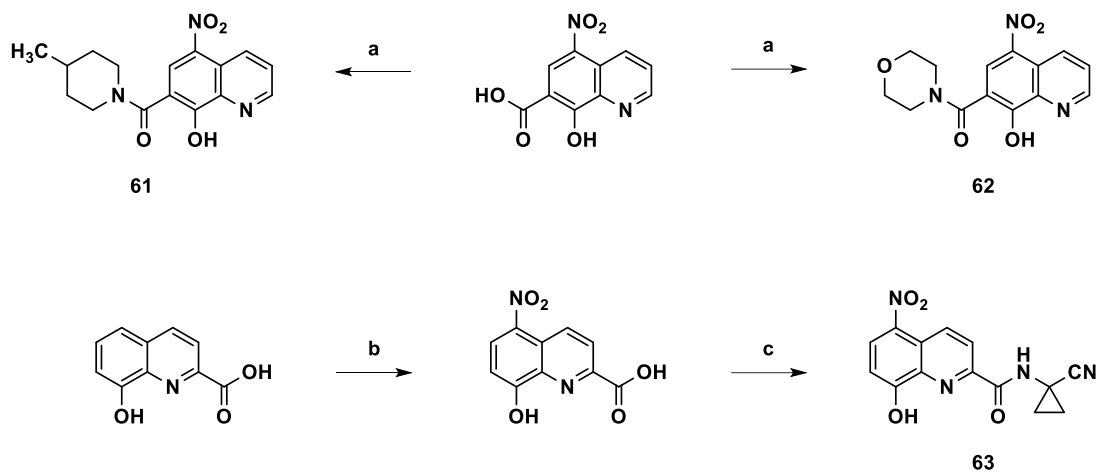
Šema 11. Sinteza derivata 8-hidroksihinolina (**51**) iz međuproizvoda **M2** čija je sinteza prikazana Šemom 9. Reagensi i uslovi: a) 8-hidroksihinolin-2-karbaldehid, NaB(OAc)₃, AcOH, 1,2-dihloretnan, sobna temperatura, 24 h [Knez i saradnici, 2018].



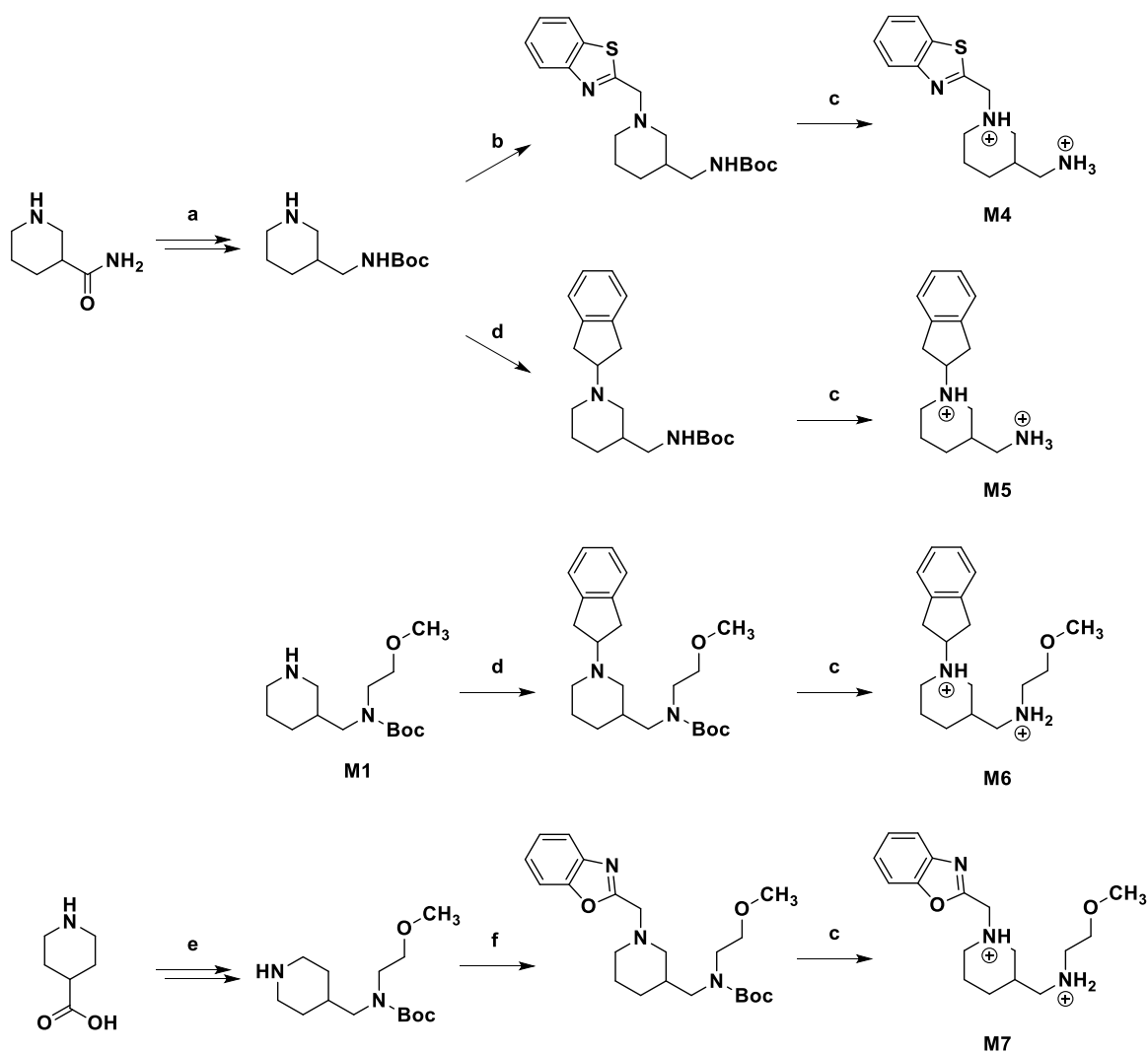
Šema 12. Sinteza derivata nitroksolina (8-hidroksi-5-nitrohinolina) (**52**). Reagensi i uslovi: a) dimetilamin hidrohlorid, Na(OAc)BH₃, DIPEA, 1,2-dihloretan, sobna temperatura, 24 h; b) KNO₃, 97% H₂SO₄, CH₃COOH, sobna temperatura, 3 h [Knez i saradnici, 2019].

Jedinjenje	R	Referenca
	<p style="text-align: center;">Nitroksolin 53-60</p>	
53		Sosić i saradnici, 2013
54		Sosić i saradnici, 2013
55		Sosić i saradnici, 2013
56		Mirković i saradnici, 2011
57		Mirković i saradnici, 2011
58		Sosić i saradnici, 2013
59		Sosić i saradnici, 2013
60		Gajić i saradnici, 2022

Šema 13. Sinteza derivata nitroksolina (**53-60**). Reagensi i uslovi: a) odgovarajući amin, HCHO, piridin, 55-60°C, 90 min.

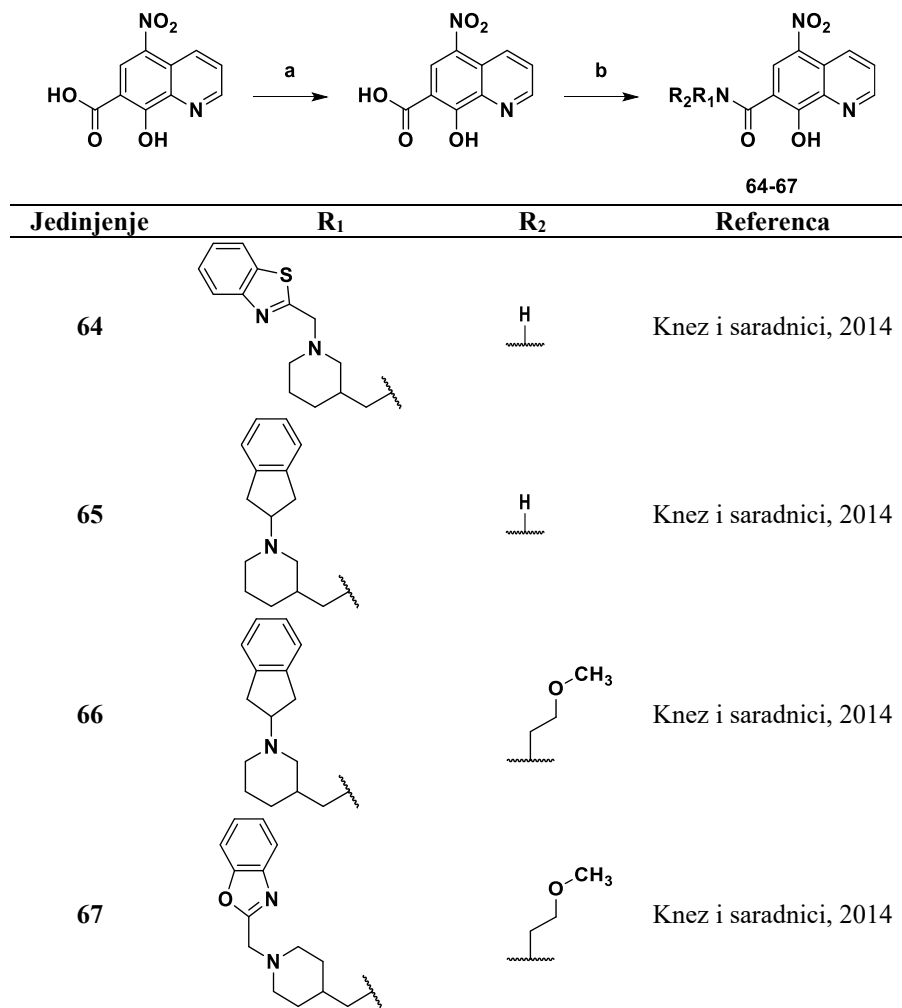


Šema 14. Sinteza derivata nitroksolina (**61-63**). Reagensi i uslovi: a) (i) SOCl₂, toluen, 80°C, 4 h; (ii) odgovarajući amin, THF, 0°C do sobne temperature, 24 h; b) KNO₃/97% H₂SO₄, CH₃COOH, 16°C do sobne temperature, 1 h; c) odgovarajući amin, HATU, DIPEA, ACN, sobna temperatura, 24 h [Sosič i saradnici, 2018].

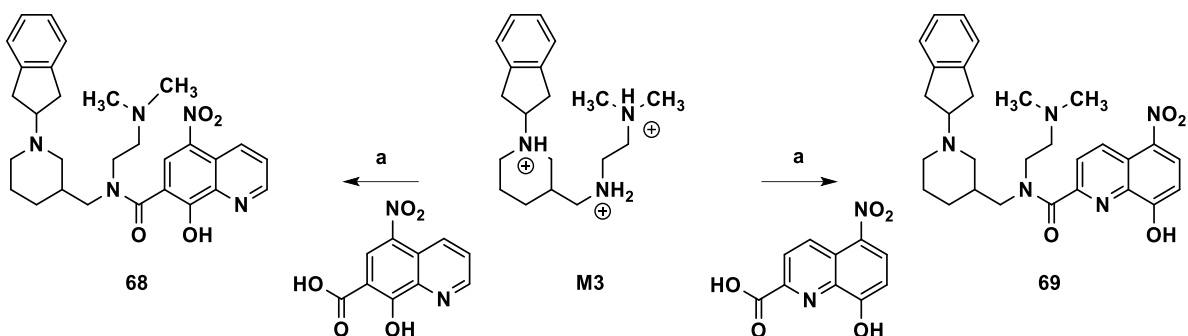


Šema 15. Sinteza međuproizvoda (**M4-M8**) uz upotrebu međuproizvoda **M1** čija je sinteza prikazana Šemom 8. Reagensi i uslovi: a) (i) PhCOCl, Et₃N, THF, 0°C do sobne temperature, 22 h; (ii) LiAlH₄, anhidrovani THF, sobna temperatura do refluksa, atmosfera argona, 3 h; (iii) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C do sobne temperature, 24 h; iv) cikloheksan, Pd(OH)₂/C cat., metanol, sobna temperatura, atmosfera argona, 20 h; b) 2-(hlorometil)benzo[d]tiazol, K₂CO₃, DMF, sobna temperatura, 72 h; c) TFA, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 1,5 h; d) 1*H*-inden-2(3*H*)-on, Na(AcO)₃BH, AcOH, CH₂Cl₂, aceton, sobna temperatura, atmosfera argona, 20 h; e) (i) PhCOCl, K₂CO₃, THF-H₂O, 0 °C do sobne temperature, 22 h; (ii) 6 M HCl (aq), 0°C, 85%; (iii) H₂N-CH₂-CH₂-OMe, TBTU, Et₃N, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 22 h; (iv) LiAlH₄, anhidrovani THF, sobna temperatura do refluksa, atmosfera argona, 2 h; (v) Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C do sobne temperature, 22 h; (vi) cikloheksan, Pd(OH)₂/C cat., metanol, sobna temperatura, atmosfera

argona, 20 h; e) 2-(hlorometil)benzo[*d*]oksazol, K₂CO₃, DMF, sobna temperatura, 24 h [Kořak i saradnici, 2014; Knez i saradnici, 2015].

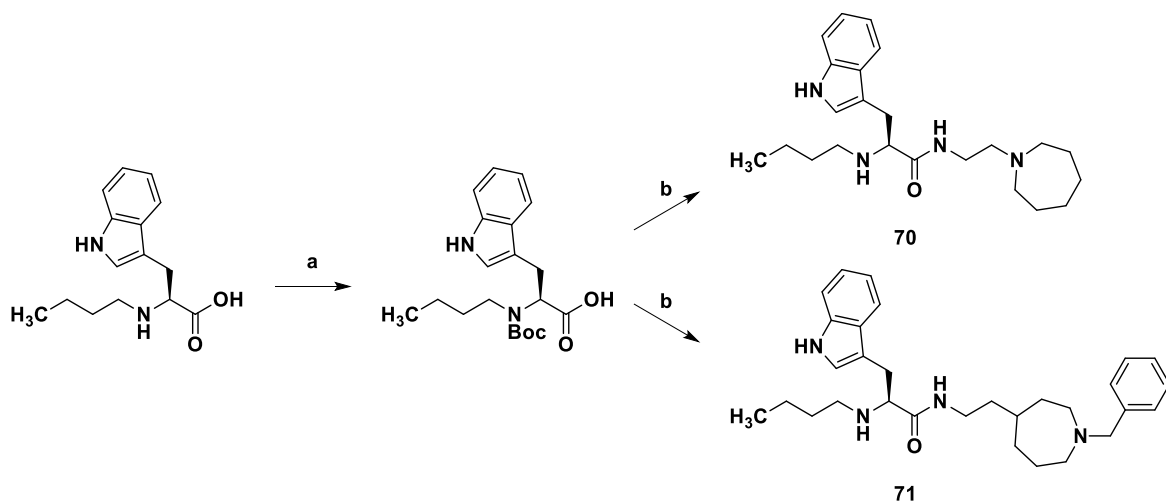


Šema 16. Sintaza derivata nitroksolina (**64-67**) iz korišćenjem međuproizvoda **M4-M8** čija je sintaza prikazana Šemom 15. Reagensi i uslovi: a) HNO₃/H₂SO₄ = 1/1 (v/v), H₂SO₄, 0°C, 20 min; (b) (i) SOCl₂, toluen, 85°C, atmosfera argona, 24 h; (ii) odgovarajući amin (**M4-M8**), Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C do sobne temperature, atmosfera argona, 24 h [Knez i saradnici, 2015].



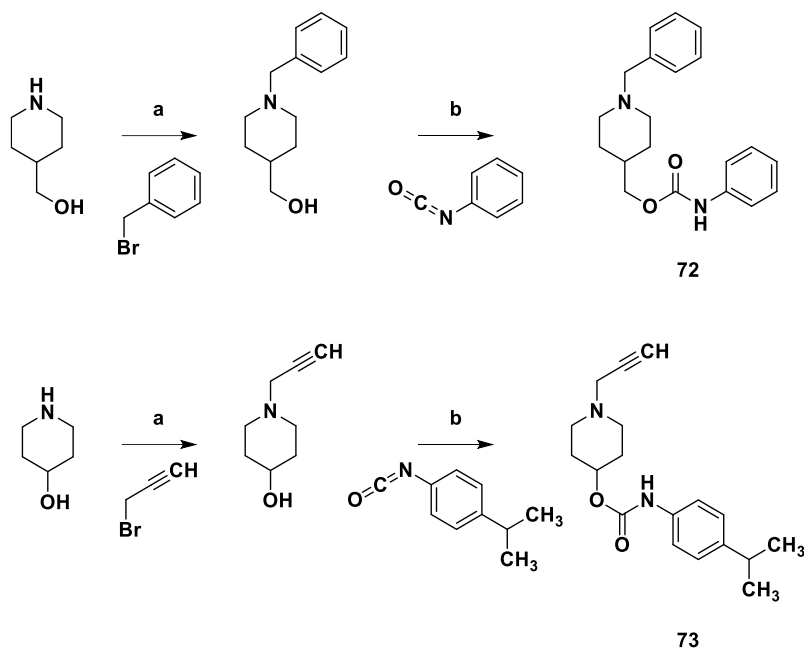
Jedinjenje	Referenca
68	Knez i saradnici, 2018
69	Knez i saradnici, 2018

Šema 17. Sinteza derivata nitroksolina (**68** i **69**) iz međuproizvoda **M3** čija je sinteza prikazana Šemom 9. Reagensi i uslovi: a) HATU, Et₃N, MeCN, sobna temperatura, 30 min [Knez i saradnici, 2018].

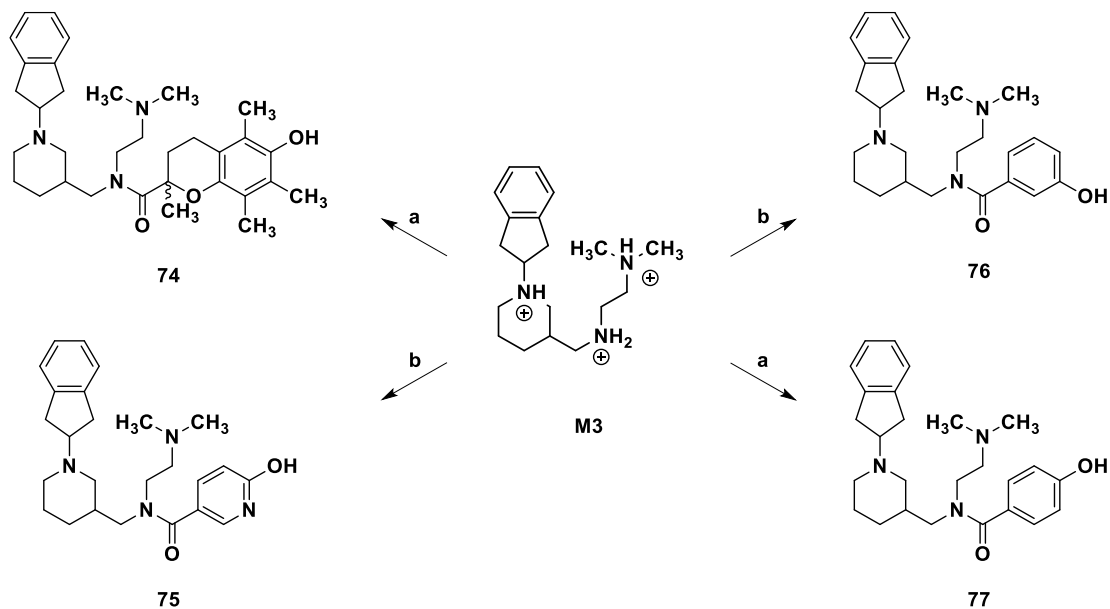


Jedinjenje	Referenca
70	Meden i saradnici, 2019
71	Meden i saradnici, 2020

Šema 18. Sinteza derivata triptofana (**70** i **71**). Reagensi i uslovi: a) Boc₂O, TEA, THF/H₂O, sobna temperatura, 12 h; b) (i) za **70** - 2-cikloheptiletan-1-amin, za **71** - 2-(1-benzilazepan-4-il)etan-1-amin, CDI, anhidrovani THF, atmosfera argona, sobna temperatura, 12 h; (ii) TFA, CH₂Cl₂, sobna temperatura, 1,5 h.



Šema 19. Sinteza derivata *N*-alkilpiperidin karbamata (**72** i **73**). Reagensi i uslovi: a) Cs_2CO_3 , aceton, sobna temperatura, 24 h; b) cat. 4-DMAP, CH_2Cl_2 , sobna temperatura, 24 h [Košak i saradnici, 2020].



Šema 20. Sinteza derivata (**74-77**) iz međuproizvoda **M3** čija je sinteza prikazana Šemom 9. Reagensi i uslovi: a) odgovarajuća kiselina, TBTU, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C , 30 min; b) odgovarajuća kiselina, HATU, Et_3N , MeCN, sobna temperatura, 30 min [Knez i saradnici, 2018].

3.2. *In vitro* test inhibicije DNaze I

Uticaj ispitivanih jedinjenja na aktivnost enzima DNaze I ispitivan je *in vitro* korišćenjem komercijalno dostupne DNaze I (tip IV, liofilizovani prašak, ≥ 2000 Kunitz jedinica/mg proteina; *Sigma-Aldrich*) izolovane iz goveđeg pankreasa. Test je sproveden kao spektrofotometrijsko određivanje apsorbance formiranih nukleotida na 260 nm [Kolarević i saradnici, 2018]. Očitavanje apsorbance je vršeno na spektrofotometru *Beckman DU[®] 530*.

Ispitivanje je vršeno u epruvetama. Ukupna zapremina reakcione smeše iznosila je 1040 μL i sastojala se od 80 μL rastvora DNaze I u destilovanoj vodi (80 Kunitz jedinica DNaze I), 40 μL rastvora ispitivane supstance u dimetil sulfoksidu (DMSO; čistoće $\geq 99,5\%$; *Sigma-Aldrich*), 0,0077% DNK (natrijumova so dezoksiribonukleinske kiseline iz timusa teleta, tip I; *Sigma-Aldrich*) i 80,77 mM Tris-HCl pufera (pH 7,6). U cilju ispitivanja uticaja rastvarača pripreman je sličan uzorak koji se sastojao istih količina DNaze I, DNK i Tris-HCl pufera, sa izuzetkom rastvora ispitivane supstance umesto koga je dodavan čist DMSO. Pripremljeni uzorci podvrgnuti su periodu predinkubacije u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi, nakon čega bi usledio period inkubacije u trajanju od 30 min na 37°C. Po isticanju inkubacionog vremena, enzimska reakcija je zaustavljena dodatkom 80 μL ledene perhlorne kiseline. Za svaku od ispitivanih analiza pripreman je kontrolni uzorak koji je bio izložen identičnim uslovima kao i analiza, uz razliku što je DNK dodavan u reakcionu smešu nakon deaktivacije enzima dodatkom ledene perhlorne kiseline. Po zaustavljanju enzimske reakcije usledilo bi zamrzavanje u trajanju od 2 h na -20°C, zatim centrifugiranje (10 min brzinom od 3600 obrtaja/min) i konačno spektrofotometrijsko očitavanje rezultata. Ukupan udeo DMSO rastvarača u finalnoj zapremini reakcione smeše, u iznosu od 3,85% v/v, ne utiče na enzimsku aktivnost DNaze I. Prilikom izvođenja eksperimenta korišćen je kristal violet (*Sigma-Aldrich*) kao pozitivna kontrola. Ispitivanja svih supstanci sprovedena su u triplikatu [Kolarević i saradnici, 2018].

Procenat inhibicije enzima preračunavan je kao odnos razlike apsorbanci analiza i njihovih odgovarajućih kontrolnih uzoraka i kontrolnih uzoraka koji su umesto ispitivanih supstanci sadržali čist rastvarač. Inhibitorni potencijal jedinjenja najpre je vršen inicijalnim ispitivanjem u koncentraciji od 200 μM u ukupnoj zapremini reakcione smeše. Supstance koje su pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji od 200 μM inhibirale više od 50% enzimske aktivnosti podvrgnute su određivanju IC_{50} vrednosti dodatnim određivanjem procenta inhibicije enzimske aktivnosti pri koncentracijama od 150, 100 i 50 μM .

3.3. Određivanje kinetike inhibicije DNaze I

Određivanje tipa kinetike inhibicije enzima dezoksiribonukleaze I najaktivnijih jedinjenja vršeno je pomoću *Lineweaver-Burk*-ovih dijagrama. Ispitivanje je izvedeno korišćenjem različitih koncentracija DNK kao supstrata, u prisustvu i odsustvu inhibitora enzima. Eksperiment je izvođen sa četiri različite koncentracije ispitivanih inhibitora, zavisno od prethodno određenih IC_{50} vrednosti (0, 12,5, 25, i 50 μ M, odnosno 0, 50, 100 i 150 μ M) uz variranje koncentracije DNK (0,003%, 0,005%, 0,007%, 0,010%, 0,015% i 0,020%).

3.4. *In vitro* test inhibicije ksantin oksidaze

Određivanje inhibitorne aktivnosti ispitivanih supstanci vršeno je *in vitro* na komercijalno dostupnom enzimu ksantin oksidazi (*Sigma-Aldrich*) izolovanom iz kravljeg mleka. Utvrđivanje stepena inhibicije enzima vršeno je na osnovu rezultata spektrofotometrijskog merenja apsorbance formirane mokraćne kiseline na 293 nm [Smelcerovic i saradnici, 2015].

Ispitivani uzorci ukupnih zapremina 2150 μ L pripremani su u epruvetama i sastojali su se od 100 μ L rastvora analiziranih supstanci u dimetil sulfoksidu (čistoća $\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich), 50 μ L rastvora 0,01 jedinice ksantin oksidaze u destilovanoj vodi, 232,5 μ M ksantina (čistoća $\geq 99,5\%$; Sigma-Aldrich) i 46,5 mM Tris-HCl pufera (pH = 7.8). Dodatno, u cilju ispitivanja uticaja rastvarača pripreman je uzorak koji se sastojao istih količina ksantin oksidaze, ksantina i Tris-HCl pufera, sa izuzetkom rastvora ispitivane supstance umesto koga je dodavan čist DMSO. Nakon perioda od 15 minuta predinkubacije na sobnoj temperaturi, pripremljeni uzorci su podvrgavani inkubaciji u periodu od 15 min na temperaturi od 37°C. Po isteku inkubacionog vremena, enzimska reakcija je zaustavljena denaturacijom enzima dodatkom ledene perhlorne kiseline (100 μ L). Za svaki od analiziranih uzoraka pripreman je kontrolni uzorak koji je bio podvrgnut istim uslovima kao i odgovarajuća analiza, uz razliku što je supstrat enzimske reakcije (ksantin) dodavan u reakcionu smešu tek nakon inaktivacije ksantin oksidaze dodatkom perhlorne kiseline. Nakon zaustavljanja reakcije usledilo bi zamrzavanje uzoraka u trajanju od 2 h na -20°C, zatim centrifugiranje (10 minuta na 3600 obrtaja/min korišćenjem cetrifuge Centric 322A Tehnica) i potom spektrofotometrijsko merenje rezultata. Finalna koncentracija dimetil sulfoksida u reakcionoj smeši od 4,65% v/v ne utiče na enzimsku aktivnost. Kao pozitivna kontrola prilikom izvođenja eksperimenta korišćen je alopurinol (čistoća $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich). Sva ispitivanja su rađena u triplikatu.

Procenat inhibicije enzima preračunavan je kao odnos razlike apsorbanci analiza i njihovih odgovarajućih kontrolnih uzoraka i kontrolnih uzoraka koji su umesto ispitivanih supstanci sadržali čist rastvarač. Inhibitorni potencijal jedinjenja najpre je vršen inicijalnim ispitivanjem u koncentraciji od 150 μM u ukupnoj zapremini reakcione smeše. Supstance koje su pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji od 150 μM inhibirale više od 50% enzimske aktivnosti podvrgnute su određivanju IC_{50} vrednosti dodatnim određivanjem procenta inhibicije enzimske aktivnosti pri koncentracijama od 100, 50 i 25 μM .

3.5. Ispitivanje afiniteta prema humanim H_3 , H_4 i dopaminskim D_2 i D_3 receptorima

Određivanje vezivanja ispitivanih supstanci za H_3 , H_4 , D_2 i D_3 receptorima sprovedeno je *in vitro* [Kottke i saradnici, 2011; Frank i saradnici, 2018; Corrêa i saradnici, 2020]. Jedinjenja su testirana u opsegu od 7 do 11 koncentracija u eseju istiskivanja radioliganda. Afinitet prema rekombinovanim humanim histaminskim i dopaminskim receptorima određivan je inkubacijom ispitivanih jedinjenja i odgovarajućih radioliganada sa izolovanim ćelijskim membranama ćelijskih linija koje eksprimiraju odgovarajući receptor. Stabilna ekspresija humanog H_3 receptora prisutna je kod HEK293 ćelija, prolazna ekspresija humanog H_4 receptora kod Sf9, a stabilna ekspresija humanih D_2/D_3 receptora kod CHO-K1 ćelija. Vreme inkubaciju u slučaju H_3 receptora iznosilo je 60 minuta, u slučaju H_4 90, a u slučaju D_2/D_3 iznosilo je 120 minuta. U svrhu određivanja afiniteta prema H_3 receptoru korišćen je tricijumom obeleženi radioaktivni ligand [^3H]N α -metilhisamin, u slučaju H_4 receptora [^3H]hisamin, dok je za određivanje afiniteta prema D_2/D_3 receptorima kao radioaktivni ligand korišćen [^3H]spiperon. Vezani radioligandi sakupljeni su filtracijom kroz GF/B filtre (Perkin Elmer) ispiranjem tri puta destilovanom vodom i merenjem radioaktivnosti korišćenjem tečnog scintilacionog brojača. Nespecifično vezivanje određivano je korišćenjem pitolizanta u koncentraciji od 10 μM (H_3 receptor), jedinjenja JNJ-7777120 u koncentraciji od 100 μM (H_4 receptor), odnosno haloperidola u koncentraciji od 10 μM (D_2 i D_3 receptori). Dobijeni rezultati tri nezavisna eksperimenta sprovedenih najmanje u duplikatu analizirani su programom GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, USA) korišćenjem nelinearne regresije. *Cheng-Prusoff*-ova jednačina upotrebljena je za pretvaranje IC_{50} u K_i vrednosti [Cheng i Prusoff, 1973]. Statistička analiza sprovedena je na $\text{p}K_i$ vrednostima i transformisana je u srednje K_i vrednosti i odgovarajuće 95% intervale poverenja.

3.6. Određivanje inhibicije 5-lipoksigenaze

Sveže izolovani polimorfonuklearni leukociti korišćeni su u eseju sa intaktnim ćelijama u svrhu određivanja inhibitornih osobina prema 5-lipoksigenazi kroz praćenje formiranja produkata enzimske reakcije HPLC metodom, prema proceduri koju su objavili Kretschmer i saradnici [2016].

3.7. Molekularni *docking*

Studija molekularnog *docking*-a derivata 2-alkiliden i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina, 1-supstituisanih i 1,2-disupstituisanih 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina i 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona sprovedena je korišćenjem programa *Molecular Operating Environment* (MOE, verzija 2019.0101). U tu svrhu su kristalografske strukture enzima DNaze I (PDB kod: 1DNK) i XO (PDB kod: 1N5X), koje su preuzete iz Banke podataka proteina (engl. *Protein Data Bank*), optimizovane i iskorišćena za simulaciju vezivanja ispitivanih supstanci za najbolje rangirano vezujuće mesto na svakom od enzima [Ilić i saradnici, 2021; Gajić i saradnici, 2021a].

Studija molekularnog *docking*-a derivata 8-hidroksihinolina i nitroksolina sprovedena je prema prethodno opisanoj proceduri [Gajić i saradnici, 2022] uz primenu *FRED Docking software*-a (OEDocking, verzija 3.0.1.) i kristalne strukture goveđe DNaze I u kompleksu sa *N*-acetilglukozaminom i DNK (PDB kod: 2DNJ).

3.8. Simulacija molekularne dinamike

Studija simulacije molekularne dinamike sprovedena je na odabranim molekulima korišćenjem programa *Desmond Molecular Dynamics System* (*Desmond*, verzija 2018.4) [Desmond, 2018] prema prethodno opisanim procedurama [Ilić i saradnici, 2021; Gajić i saradnici 2021a] sa ciljem utvrđivanja stabilnosti *docking* kompleksa formiranih između odabranih molekula i vezujućih mesta odgovarajućih enzima.

3.9. *In silico* predviđanje ADMET i PAINS osobina

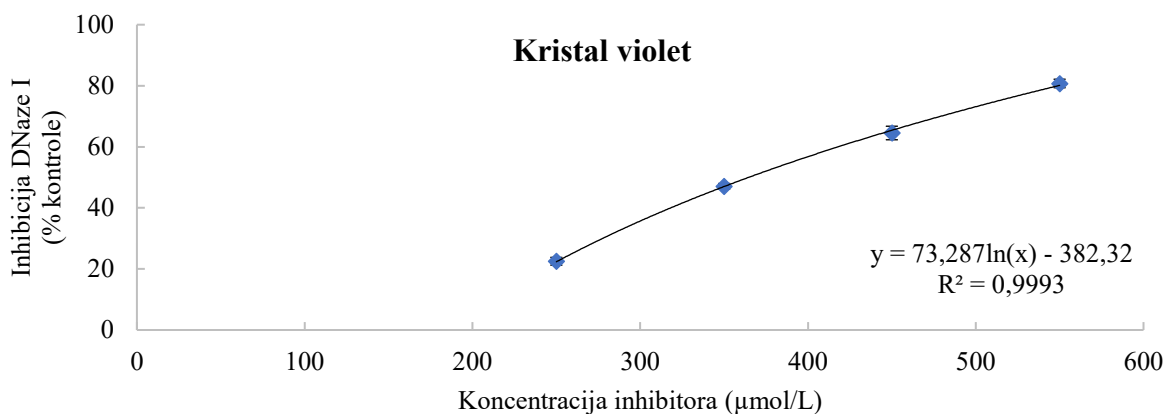
U svrhu *in silico* predviđanja fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina ispitivanih supstanci korišćene su Web platforme *SwissADME* [Diana i saradnici, 2017; <http://www.swissadme.ch>] i *ADMETlab* [Dong i saradnici, 2018; <http://admet.scbdd.com>], dok je program *OSIRIS Data Warrior* (verzija v06.00.00) [Sander i saradnici, 2015] upotrebljen za predikciju toksikoloških osobina.

Ispitivanje prisustva molekulskih obrazaca koji se dovode u vezu sa ometanjem eseja (engl. *PAINS – Pan-Assay Interference Compounds*) sprovedeno je korišćenjem Web platforme *Hit Dexter 2.0* [Stork i saradnici, 2019; <https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de/hitdexter>].

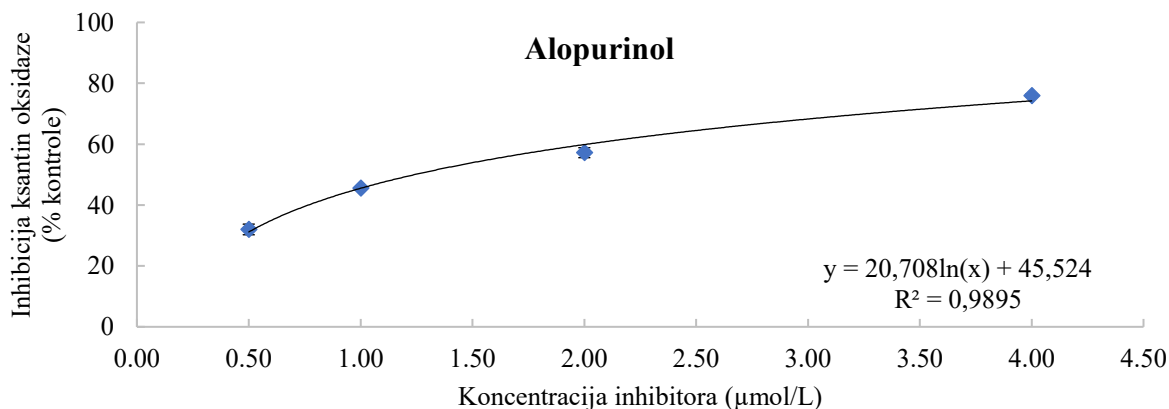
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 2-alkiliden- i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina

Uticaj derivata 2-alkiliden- (**1-5**) i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina (**6-14**) na aktivnost enzima DNaze I i ksantin oksidaze vršen je *in vitro* na komercijalno dostupnim enzimima. Među 14 ispitivanih jedinjenja, jedan derivat 2-alkiliden-4-oksotiazolidina (**1**) (Tabela 1) i jedan derivat 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina (**6**) (Tabela 2) inhibirali su DNazu I sa IC_{50} vrednošću nižom od 200 μ M. Sposobnost inhibicije ksantin oksidaze sa IC_{50} vrednošću nižom od 150 μ M zabeležena samo kod jedinjenja **6** (Tabela 2). Kao referentni inhibitor enzima DNaze I korišćen je kristal violet ($IC_{50} = 364,64 \pm 16,56$, Slika 26), dok je kao standardni inhibitor enzima ksantin oksidaze korišćen alopurinol ($IC_{50} = 1,24 \pm 0,18$ μ M, Slika 27).

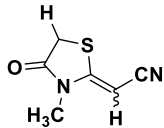
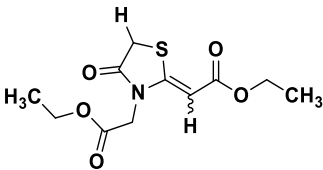
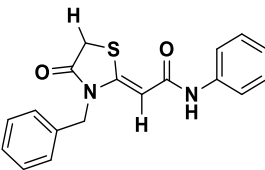
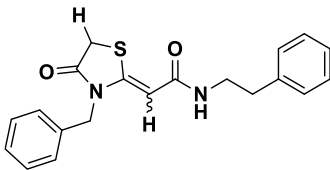
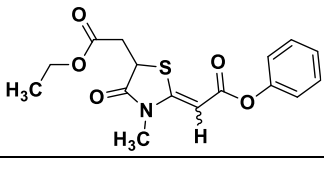


Slika 26. Inhibicija DNaze I kristal violetom.



Slika 27. Inhibicija ksantin oksidaze alopurinolom.

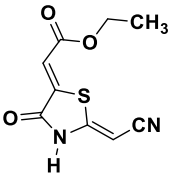
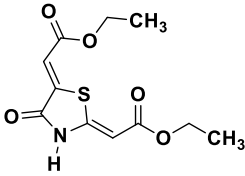
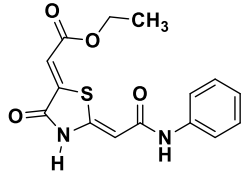
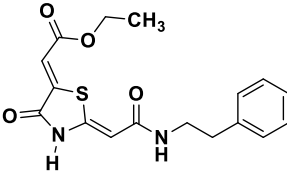
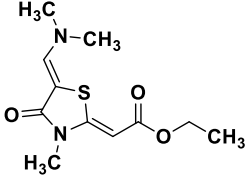
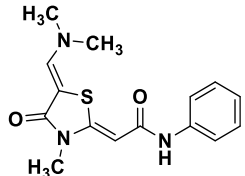
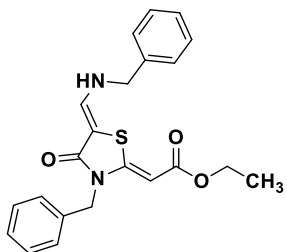
Tabela 1. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 2-alkiliden-4-oksotiazolidina 1-5 [Gajić i saradnici, 2021a].

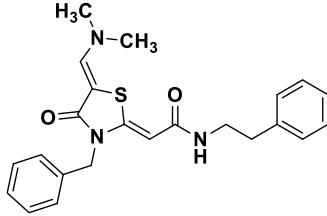
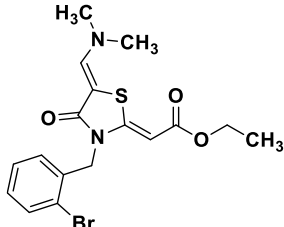
Jedinjenje	Struktura	DNaza IC ₅₀ ± SD (μM)	XO IC ₅₀ ± SD (μM)
1		162,63 ± 16,56	> 150
2		> 200	> 150
3		> 200	> 150
4		> 200	> 150
5		> 200	> 150

Pozitivna kontrola za DNazu I – kristal violet, IC₅₀ = 364,64 ± 13,64 μM

Pozitivna kontrola za XO – alopurinol, IC₅₀ = 1,24 ± 0,18 μM

Tabela 2. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina 6-14 [Gajić i saradnici, 2021].

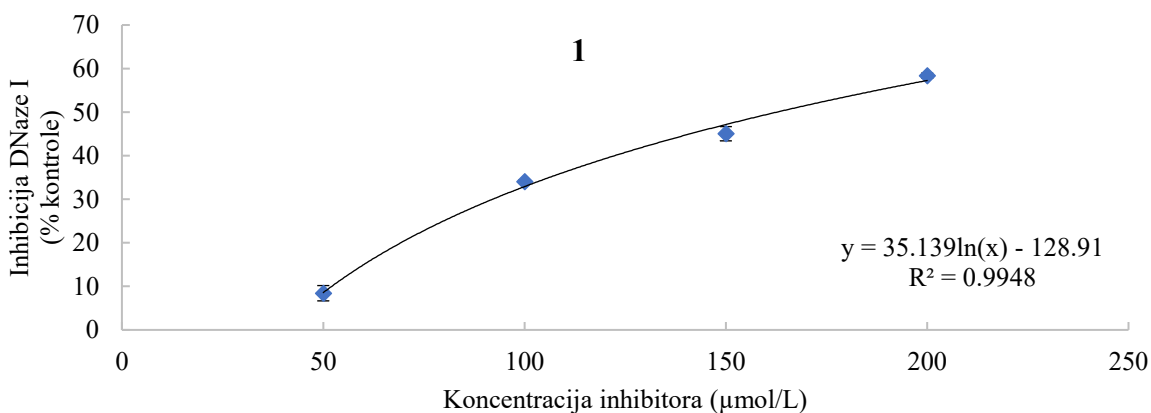
Jedinjenje	Struktura	DNaza IC ₅₀ ± SD (μM)	XO IC ₅₀ ± SD (μM)
6		67,94 ± 5,99	97,98 ± 13,47
7		> 200	> 150
8		> 200	> 150
9		> 200	> 150
10		> 200	> 150
11		> 200	> 150
12		> 200	> 150

13		> 200	> 150
14		> 200	> 150

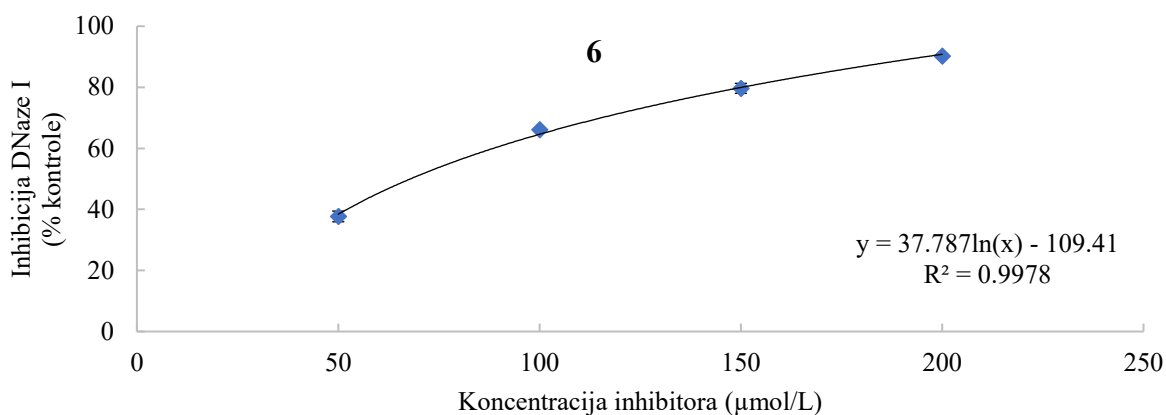
Pozitivna kontrola za DNazu I – kristal violet, $IC_{50} = 364,64 \pm 13,64 \mu\text{M}$

Pozitivna kontrola za XO – alopurinol, $IC_{50} = 1,24 \pm 0,18 \mu\text{M}$

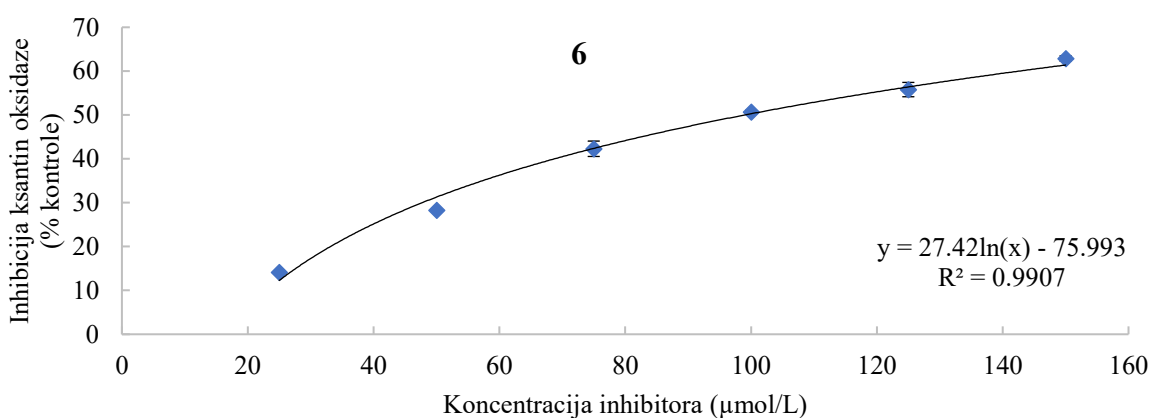
Jedinjenja **1** i **6** (Slike 28 i 29) pokazala su bolji inhibitorski potencijal prema DNazi I u poređenju sa kristal violetom. Jedinjenje **6** je pored inhibicije DNaze I sa IC_{50} vrednošću od $67,94 \pm 5,99 \mu\text{M}$ inhibiralo i enzim ksantin oksidazu ($IC_{50} = 97,98 \pm 13,47 \mu\text{M}$, Slika 30), što ga čini ne samo jedinim derivatom 4-oksatriazolidina, već i jedinim do sada poznatim dualnim inhibitorom enzima DNaze I i ksantin oksidaze [Gajić i saradnici, 2021a]. Prema sposobnost inhibicije DNaze I ovaj dualni inhibitor zaostaje jedino za derivatima skvaramida (**D15-18**, Slika 12 [Ruseva i saradnici, 2023a; Ruseva i saradnici, 2023b]), što ga svrstava među potentnije poznate inhibitore DNaze I u formi malih sintetskih molekula.



Slika 28. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **1**.

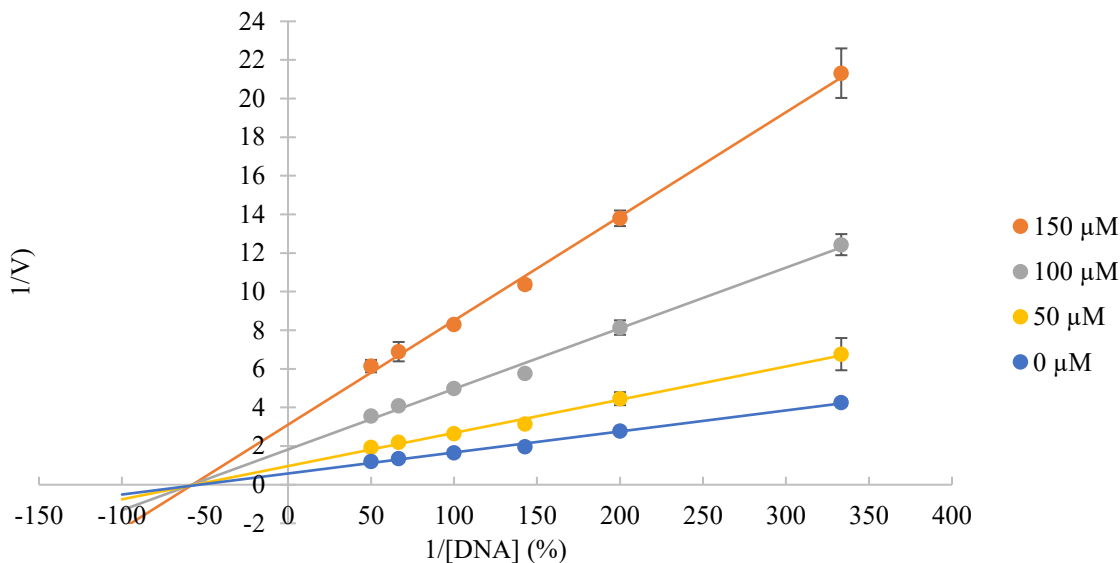


Slika 29. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 6.



Slika 30. Inhibicija ksantin oksidaze jedinjenjem 6.

U cilju dalje karakterizacije jedinjenja 6, koje se u ispitivanoj seriji derivata 4-oksotiazolidina pokazalo kao najefikasniji inhibitor DNaze I, sprovedeno je ispitivanje kinetike inhibicije enzima. Dobijeni *Lineweaver-Burk*-ov dijagram (Slika 31) ukazuje da jedinjenje 6 deluje kao nekompetitivni inhibitor DNaze I.



Slika 31. *Lineweaver-Burk*-ov dijagram inhibicije DNaze I jedinjenjem **6** [Gajić i saradnici, 2021a].

Dobijeni eksperimentalni rezultati jedinjenja **1** i **6** dalje su upotpunjeni *in silico* predikcijama molekularnog *docking*-a i simulacijom molekularne dinamike sa odgovarajućim enzimima.

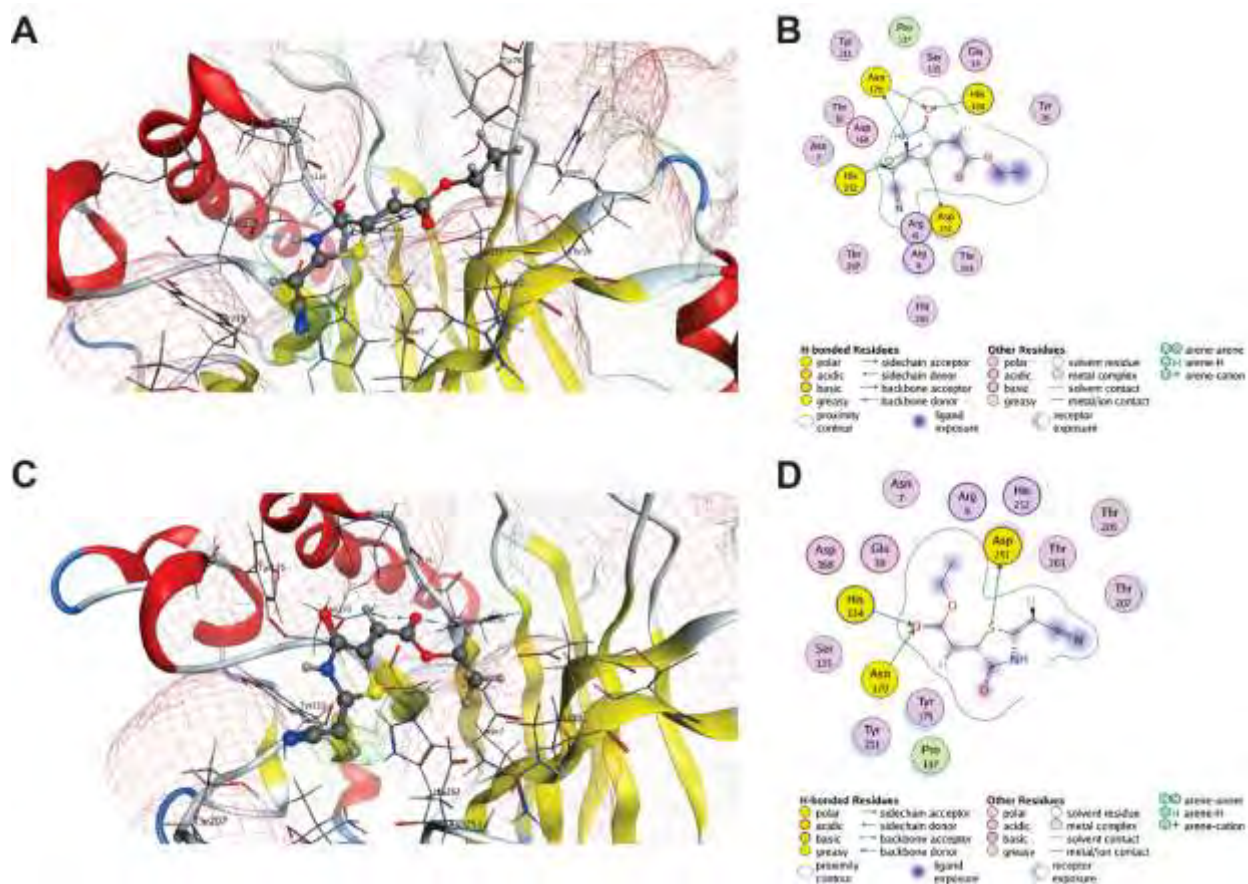
Predviđene intermolekularne interakcije između 4-oksoiazolidina i DNaze I prikazane su Tabelom 3 i Slikama 32 i 33. Diastereoizomeri potentnijeg inhibitora **6**(2*Z*, 5*Z*) i **6**(2*E*, 5*Z*) prevashodno ostvaruju interakcije putem vodoničnih veza sa katalitičkim His 134, dok samo petočlani prsten diastereoizomera **6**(2*Z*, 5*Z*) ostvaruje π -katjonske interakcije sa His 252 (Tabela 3, Slika 32A–D). Interakcije sa aminokiselinama His 134 i His 252 od posebnog su značaja imajući u vidu njihovu esencijalnost u procesu raskidanja fosfodiesteraskih veza [Jones i saradnici, 1996; Pan i saradnici, 1998, Guérault i saradnici, 2010]. Dodatno, diastereoizomeri **6**(2*Z*, 5*Z*) i **6**(2*E*, 5*Z*) potencijalno ostvaruju interakcije sa aminokiselinama Asn 170 i Asp 251 (Tabela 3, Slika 32A–D) koje se dovode u vezu sa smanjenom aktivnošću DNaze I [Jones i saradnici, 1996; Pan i saradnici, 1998]. Prema predviđenim interakcijama diastereoizomera **1**(2*Z*) i **1**(2*E*) (Tabela 3, Slika 33A–D) do smanjenja aktivnosti DNaze I najverovatnije dolazi usled interakcija sa aminokiselinama udaljenim od katalitičkih histidina [Pan i saradnici, 1998].

Tabela 3. Predviđene intermolekulske interakcije 4-oksotiazolidina sa aminokiselinskim ostacima DNaze I [Gajić i saradnici, 2021a].

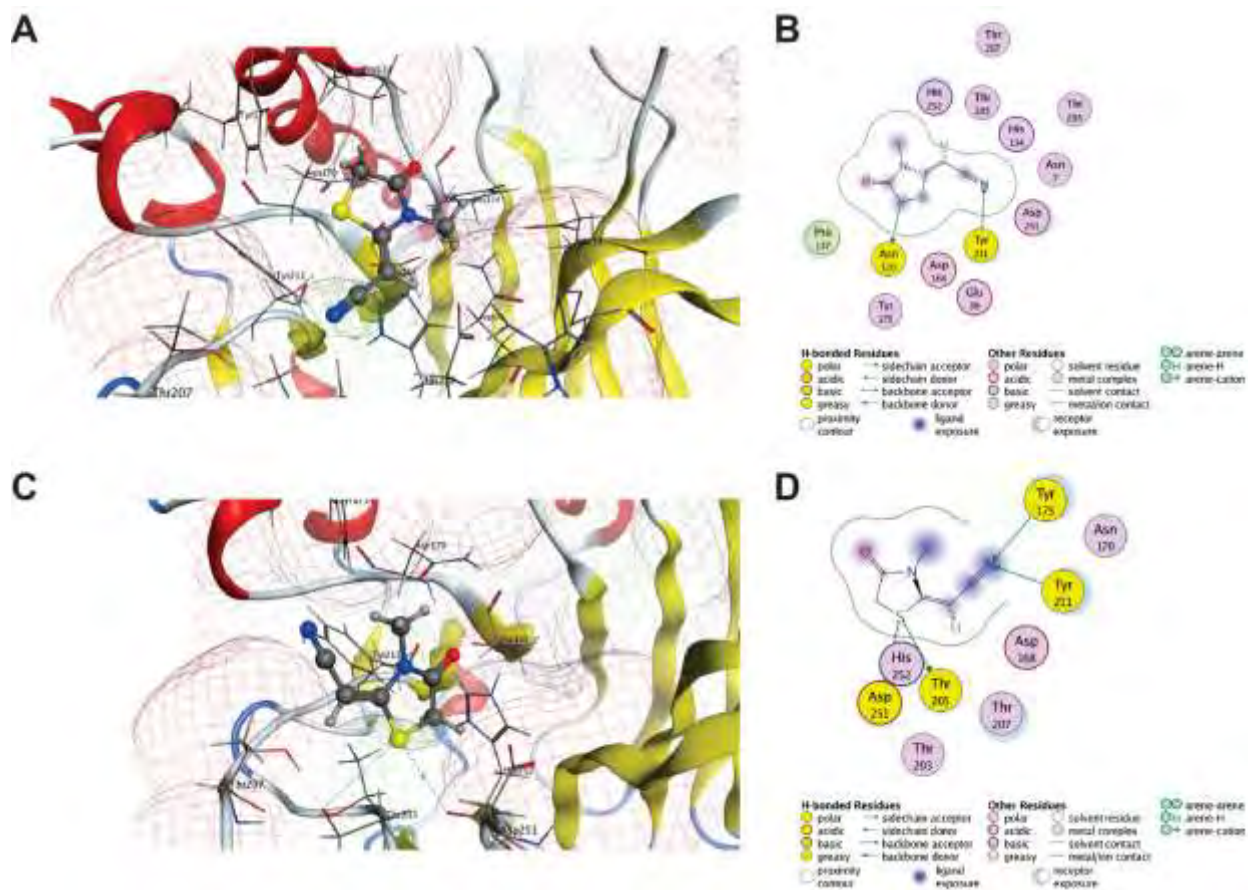
Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
6(2Z, 5Z)	N3	Asn 170	H-donor	3,14	-4,8	-5,84
	S5	Asp 251	H-donor	3,61	-0,9	
	O6	His 134	H-akceptor	3,03	-2,6	
	O6	Asn 170	H-akceptor	3,29	-1,9	
	prsten	His 252	π -katjonske	3,51	-0,4	
6(2E, 5Z)	S5	Asp 251	H-donor	4,01	0,1	-6,13
	O10	His 134	H-akceptor	3,21	-5,2	
	O10	Asn 170	H-akceptor	3,20	-1,7	
1(2Z)	C1	Asn 170	H-donor	3,17	-0,6	-4,82
	N10	Tyr 211	H-akceptor	3,64	-0,3	
1(2E)	S5	Thr 205	H-donor	3,63	-1,0	-4,80
	S5	Asp 251	H-donor	3,71	-0,8	
	N10	Tyr 175	H-akceptor	3,94	-0,2	
	N10	Tyr 211	H-akceptor	3,71	-0,1	

* ΔG – Gibsova slobodna energija

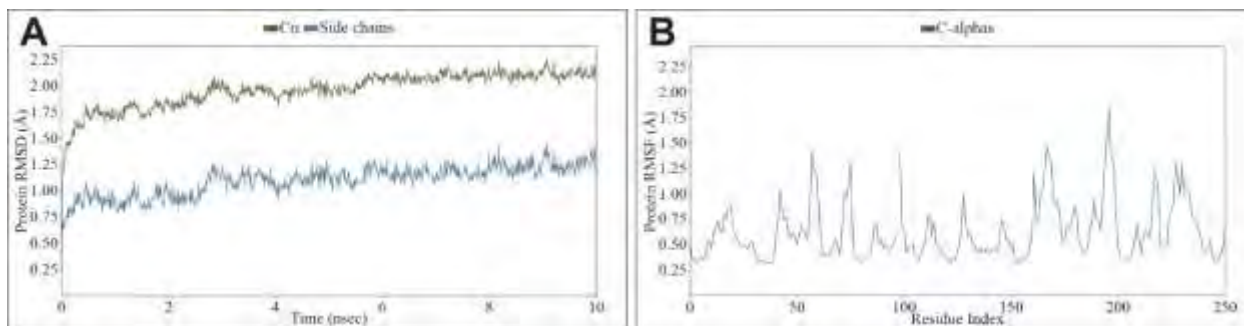
Stabilnost interakcije ispitivanih jedinjenja i enzima dodatno je okarakterisana simulacijom molekularne dinamike. Dobijene vrednosti srednjeg kvadratnog odstupanja (RMSD – engl. *Root-mean-square deviation*) i srednje kvadratne fluktuacije (RMSF – engl. *Root-mean-square fluctuation*) ukazuju na stabilnost kompleksa enzim-inhibitor tokom 10 ns trajanja simulacije, tokom kojeg su C α atomi, bočni nizovi i heteroatomi ostali u granicama prihvatljivog odstupanja od 3 Å (Slike 34-36). Interne fluktuacije atoma diastereoizomera **6(2Z, 5Z)** i **6(2E, 5Z)**, prikazane kroz RMSD vrednosti, dostižu stanje ravnoteže nakon 4 ns i ostaju relativno stabilne do tokom preostalog vremena trajanja simulacije (Slika 35A i 35B). Nasuprot tome, odgovarajuće RMSD vrednosti diastereoizomera **1(2Z)** i **1(2E)** ispoljavaju veću sklonost ka oscilacijama (Slika 35C i 35D) što može biti posledica većeg neokupiranog volumena unutar vezujućeg mesta, koji obezbeđuje više prostora za konformaciono prilagođavanje manje voluminoznih diastereoizomera jedinjenja **1**. Fluktuacije pozicija individualnih atoma diastereoizomera **6(2Z, 5Z)** i **6(2E, 5Z)** u odnosu na vezujuće mesto DNaze I ukazuju da je funkcionalna grupa nitrila najmobilnija (Slika 36A i 36B). Rezultati dobijeni simulacijom molekularne dinamike ukazuju stabilnost kompleksa 4-oksotiazolidina/DNaze I usled minimalnih intra- i intermolekularnih pomeranja [Gajić i saradnici, 2021a].



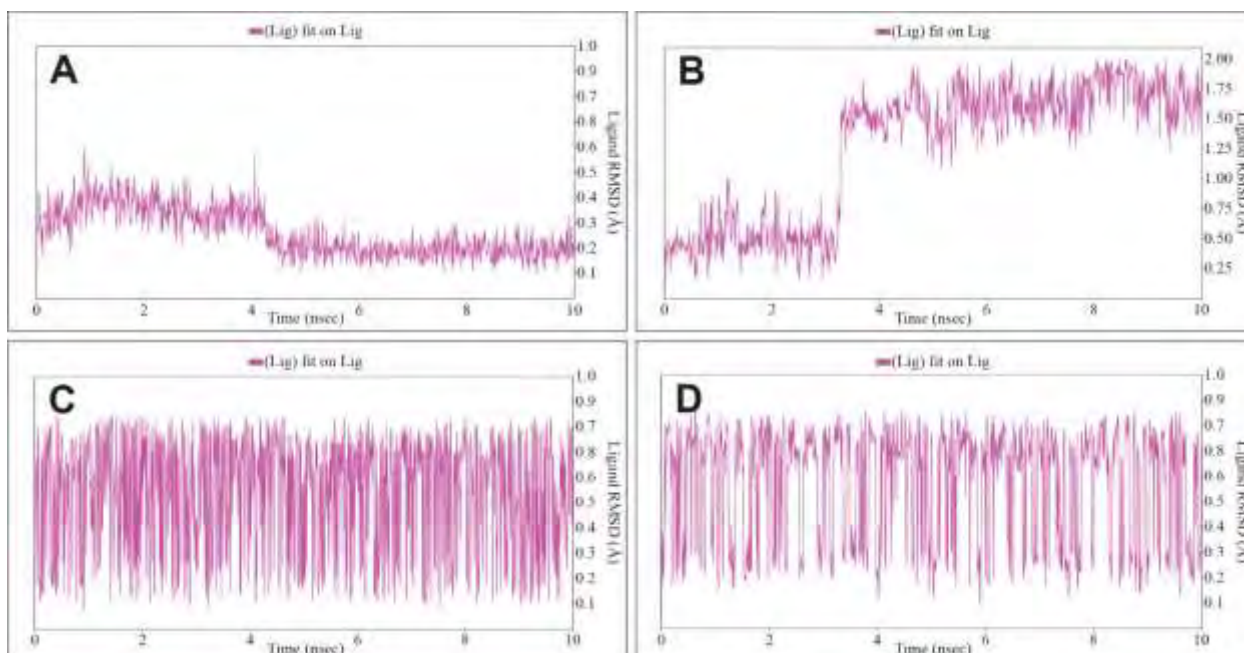
Slika 32. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija diastereoizomera $6(2Z, 5Z)$ (A, B) i $6(2E, 5E)$ (C, D) sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni regioni vezujućeg mesta označeni su roze, hidrofobni regioni zelenom, a regioni izloženi rastvaraču crvenom bojom [Gajić i saradnici, 2021a].



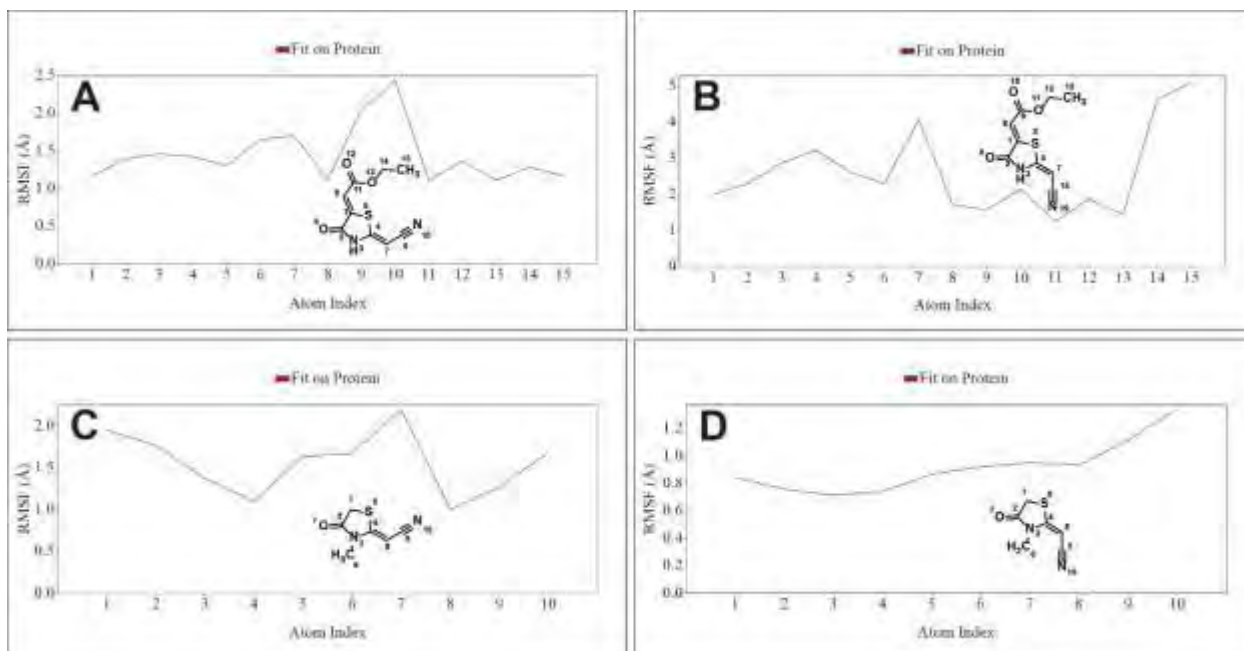
Slika 33. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija diastereoizomemra **1** (*2Z*) (A, B) i **1** (*2E*) (C, D) sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni regioni vezujućeg mesta označeni su roze, hidrofobni regioni zelenom, a regioni izloženi rastvaraču crvenom bojom [Gajić i saradnici, 2021a].



Slika 34. RMSD (A) i RMSF (B) dijagrami DNaze I dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Gajić i saradnici, 2021a].



Slika 35. RMSD dijagrami jedinjenja **6(2Z, 5Z)** (A), **6(2E, 5Z)** (B), **1(2Z)** (C) i **1(2E)** (D) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike unutar aktivnog mesta DNaze I [Gajić i saradnici, 2021a].



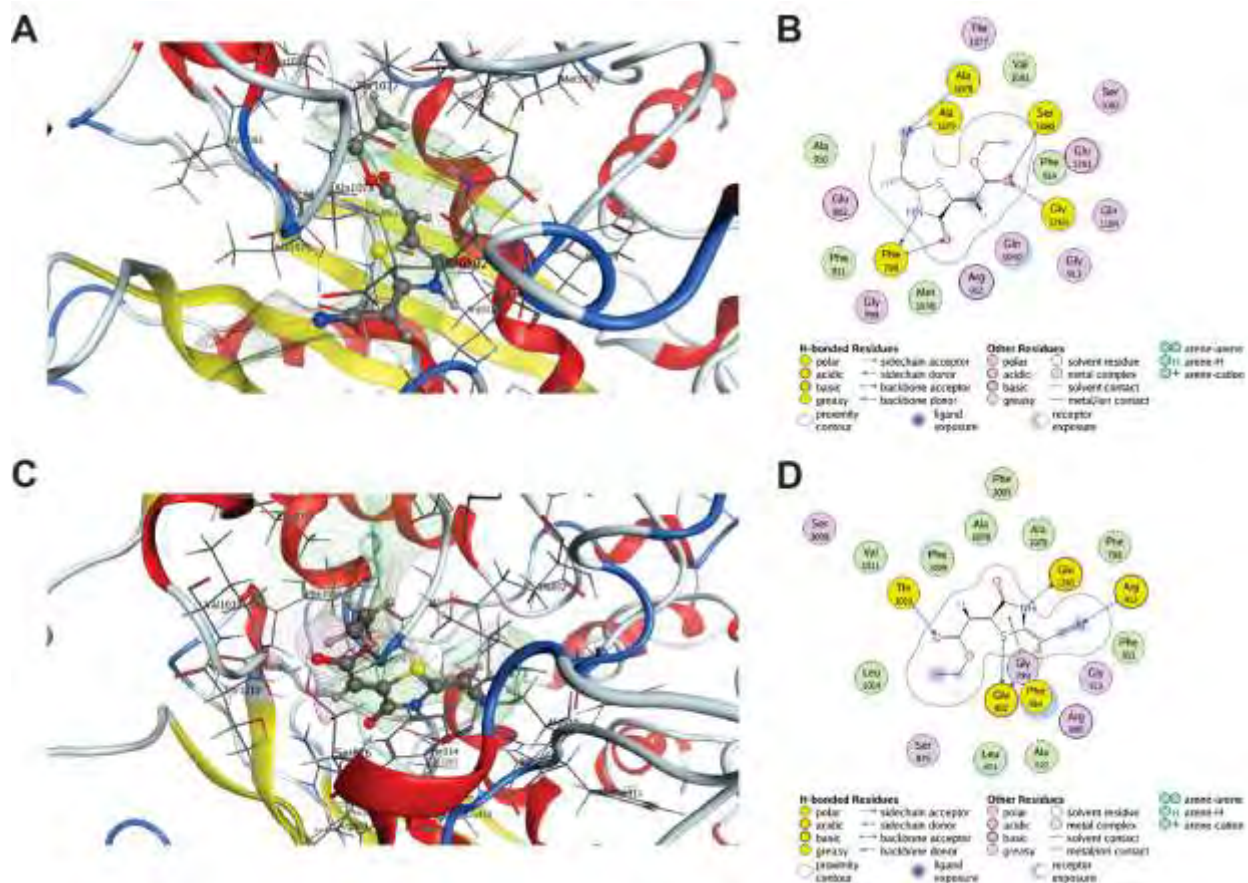
Slika 36. RMSF dijagrami jedinjenja **6(2Z, 5Z)** (A), **6(2E, 5Z)** (B), **1(2Z)** (C) i **1(2E)** (D) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike unutar aktivnog mesta DNaze I [Gajić i saradnici, 2021a].

Profili predviđenih interakcija diastereoizomera **6**(2*Z*, 5*Z*) i **6**(2*E*, 5*Z*) sa ksantin oksidazom prikazani su Tabelom 4 i Slikom 37. Jedinjenje **6**(2*Z*, 5*Z*) prevashodno formira vodonične veze sa katalitičkim Ala 1079, dok se vodonične veze jedinjenja **6**(2*E*, 5*Z*) ostvaruju sa katalitičkim ostacima aminokiselina Glu 802, Thr 1010 i Glu 1261 (Tabela 4, Slika 37). Pored interakcija sa aminokiselinama neophodnim za katalitičku aktivnost enzima XO, zabeleženo je i nekoliko interakcija sa nekatalitičkim aminokiselinama (Tabela 4, Slika 37) [Gajić i saradnici, 2021a].

Tabela 4. Predviđene intermolekulske interakcije 4-oksotiazolidina **6** sa aminokiselinskim ostacima ksantin oksidaze [Gajić i saradnici, 2021a].

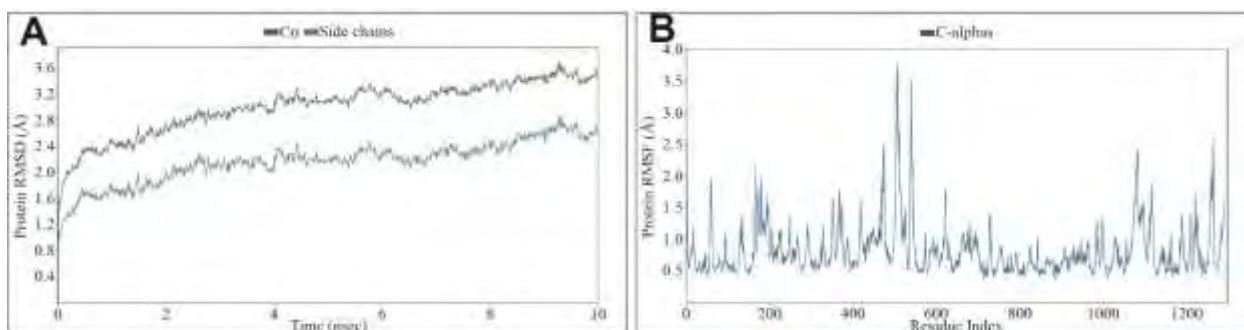
Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
6 (2 <i>Z</i> , 5 <i>Z</i>)	N3	Phe 798	H-donor	3,42	-0,4	-7,74
	O6	Phe 798	H-akceptor	3,33	-0,5	
	N10	Ala 1078	H-akceptor	3,78	-0,2	
	N10	Ala 1079	H-akceptor	3,29	-1,6	
	O12	Ser 1080	H-akceptor	3,65	-0,2	
	O12	Gly 1260	H-akceptor	3,39	-0,4	
6 (2 <i>E</i> , 5 <i>Z</i>)	N3	Glu 1261	H-donor	2,81	-8,3	-7,94
	S5	Glu 802	H-donor	3,14	-7,1	
	C7	Glu 802	H-donor	3,13	-1,4	
	O10	Thr 1010	H-akceptor	3,11	-2,8	
	N15	Arg 912	H-akceptor	3,58	-0,8	
	prsten	Phe 914	π - π	3,51	-0,1	

* ΔG – Gibsova slobodna energija

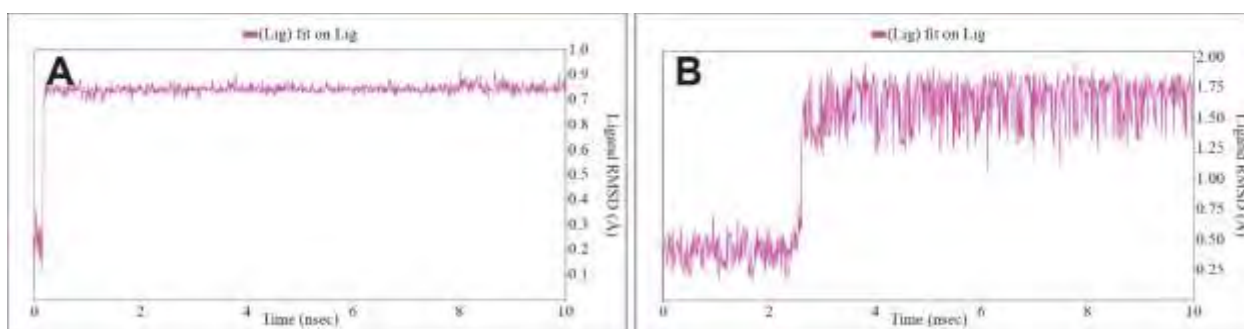


Slika 37. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija diastereoizomera **6(2Z, 5Z)** (A, B) i **6(2E, 5E)** (C, D) sa vezujućim mestom ksantin oksidaze. Polarni regioni vezujućeg mesta označeni su roze, hidrofobni regioni zelenom, a regioni izloženi rastvaraču crvenom bojom [Gajić i saradnici, 2021a].

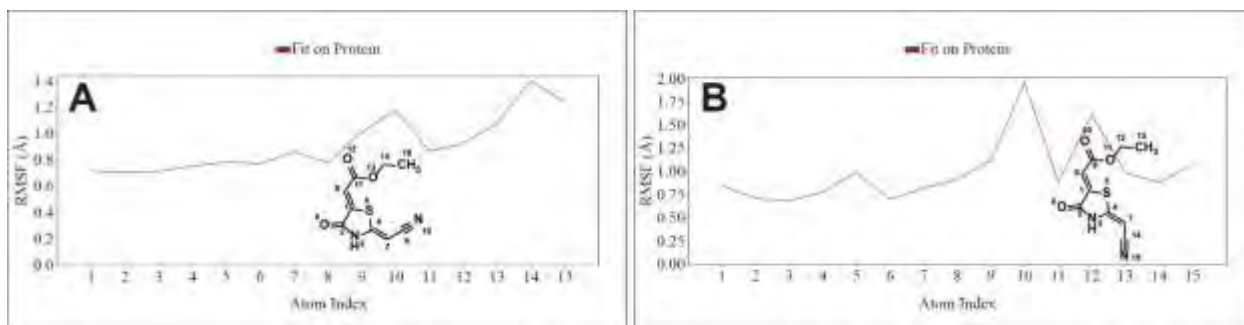
U cilju karakterizacije stabilnosti *docking* kompleksa enzima ksantin oksidaze i diastereoizomera **6(2Z, 5Z)** i **6(2E, 5Z)** sprovedena je simulacija molekularne dinamike (Slike 38-40). Dobijene RMSD vrednosti za **6(2Z,5Z)** ukazuju da je ravnotežno stanje postignuto nakon 1 ns, a u slučaju **6(2E,5Z)** nakon 3 ns simulacije (Slika 39). Položaji individualnih atoma oba stereoizomera menjali su se unutar RMSF vrednosti koji odgovaraju stabilnoj interakciji liganada i enzima (Slika 40). Prikazani rezultati ukazuju da je formirani kompleksa ksantin oksidaze i diastereoizomera **6(2Z, 5Z)** i **6(2E, 5Z)** stabilan tokom ukupnog trajanja simulacije molekularne dinamike [Liu i saradnici, 2017].



Slika 38. RMSD (A) i RMSF (B) dijagrami ksantin oksidaze dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Gajić i saradnici, 2021a].



Slika 39. RMSD dijagrami jedinjenja **6(2Z, 5Z)** (A) i **6(2E, 5Z)** (B) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike unutar aktivnog mesta ksantin oksidaze [Gajić i saradnici, 2021a].



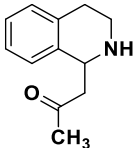
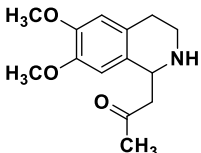
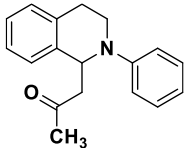
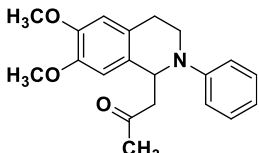
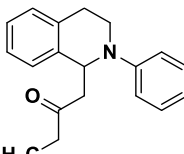
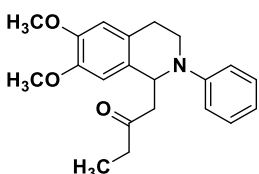
Slika 40. RMSF dijagrami jedinjenja **6(2Z, 5Z)** (A) i **6(2E, 5Z)** (B) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike unutar aktivnog mesta ksantin oksidaze [Gajić i saradnici, 2021a].

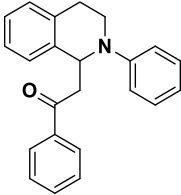
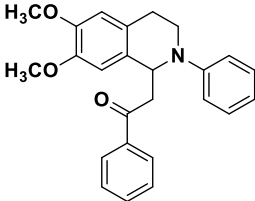
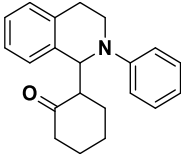
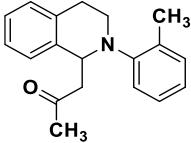
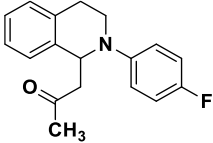
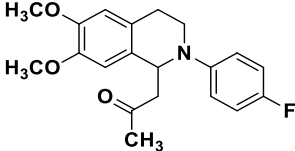
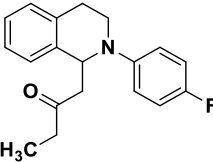
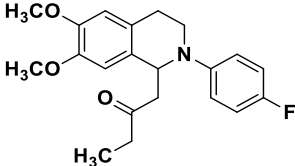
Derivati 2-alkiliden- i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina sa sposobnošću inhibicije DNaze I potencijalno mogu ostvariti korisne efekte u patološkim stanjima koja su praćena povećanom aktivnošću DNaze I, poput pomenutih ishemijskih bolesti organa [Basnakian i saradnici, 2002; Kwai i saradnici, 2004; Arakawa i sradnici, 2005; Yusof i saradnici, 2015]. Imajući u vidu prethodno izložene direktne i indirektne efekte DNaze I i ksantin oksidaze na inicijaciju i odvijanje procesa apoptoze, dualnom inhibicijom ovih enzima, koja je po prvi put zabeležena kod jedinjenja **6**, mogli bi se potencijalno postići aditivni ili čak sinergistički efekti u kontroli prekomerne apoptoze koja se susreće kod traumatskih povreda, hroničnih neurodegenerativnih bolesti, degenerativnih promena lokomotornog sistema i drugih poremećaja [Li i saradnici, 2021].

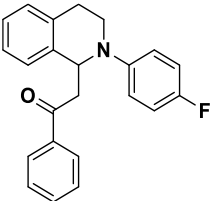
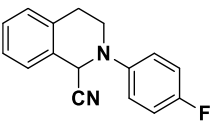
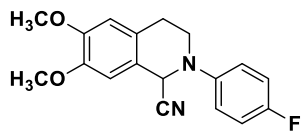
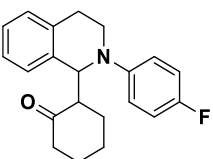
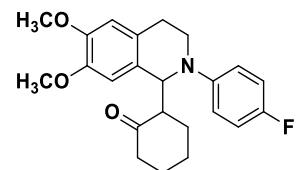
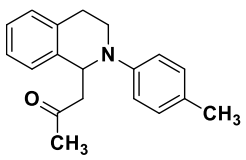
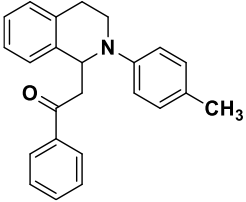
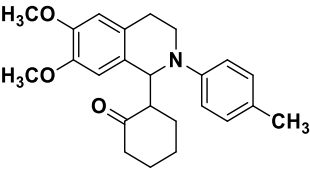
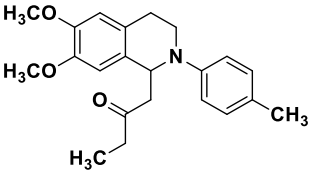
4.2. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina

Inhibitorski potencijal derivata 1-supstituisanih (**15** i **16**) i 1,2-disupstituisanih 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina (**17-38**) ispitivan je *in vitro* na komercijalno dostupnim enzimima DNazi I i ksantin oksidazi. Među 24 ispitivanih jedinjenja (Tabela 5) IC₅₀ vrednost niža od 200 μM prema DNazi I zabeležena je kod četiri supstance (**16**, **29**, **32** i **36**), dok je IC₅₀ vrednost niža od 150 μM prema ksantin oksidazi zabeležena samo kod jedinjenja **30**.

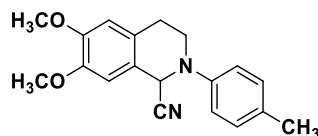
Tabela 5. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina **6-14** [Gajić i saradnici, 2021b, Gajić i saradnici, 2021c].

Jedinjenje	Struktura	DNaza IC ₅₀ ± SD (μM)	XO IC ₅₀ ± SD (μM)
15		> 200	> 150
16		134,35 ± 11,38	> 150
17		> 200	> 150
18		> 200	> 150
19		> 200	> 150
20		> 200	> 150

21		> 200	> 150
22		> 200	> 150
23		> 200	> 150
24		> 200	> 150
25		> 200	> 150
26		> 200	> 150
27		> 200	> 150
28		> 200	> 150

29		$147,51 \pm 14,87$	> 150
30		> 200	$135,72 \pm 2,71$
31		> 200	> 150
32		$149,07 \pm 2,98$	> 150
33		> 200	> 150
34		> 200	> 150
35		> 200	> 150
36		$148,31 \pm 2,96$	> 150
37		> 200	> 150

38



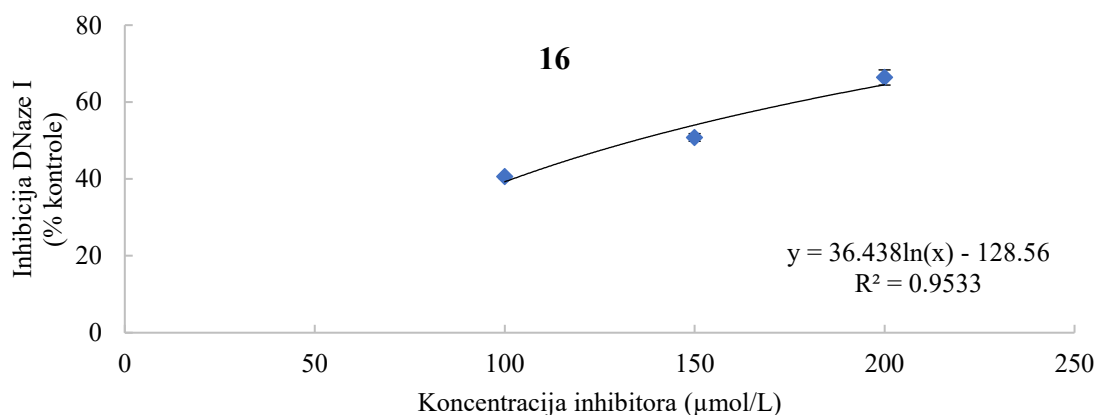
> 200

> 150

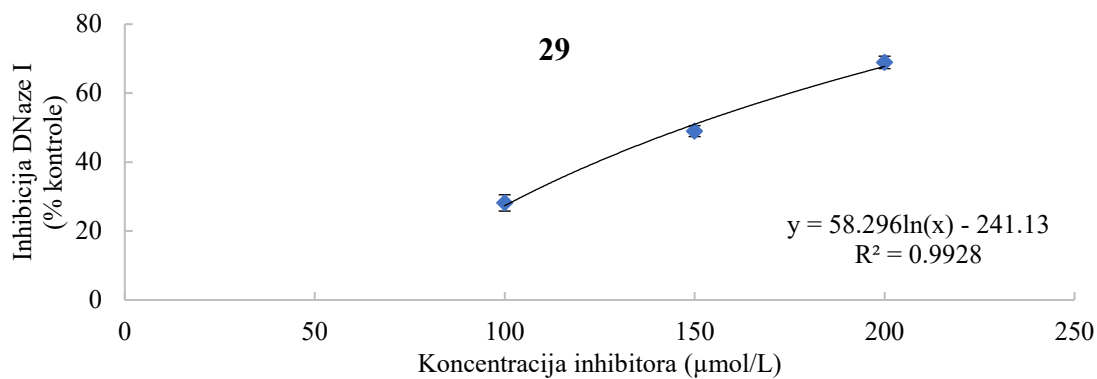
Pozitivna kontrola za DNazu I – kristal violet, $IC_{50} = 362,45 \pm 35,55 \mu\text{M}$

Pozitivna kontrola za XO – alopurinol, $IC_{50} = 1,24 \pm 0,18 \mu\text{M}$

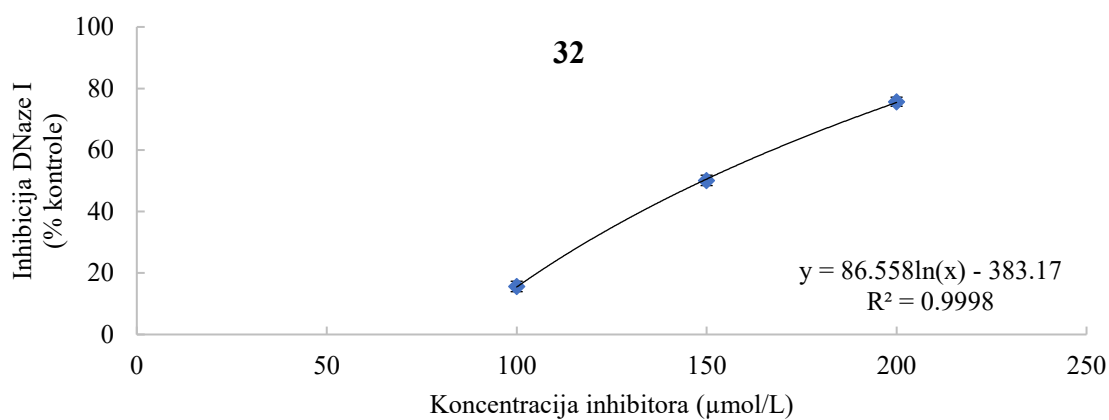
U ispitivanoj seriji 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina kao najpotentniji inhibitor DNaze I pokazao se derivat **16** ($IC_{50} = 134,35 \pm 11,38 \mu\text{M}$, Slika 41) sa nešto nižom IC_{50} vrednošću u odnosu na preostala 3 aktivna derivata **29** ($IC_{50} = 147,51 \pm 14,87 \mu\text{M}$, Slika 42), **32** ($IC_{50} = 149,07 \pm 2,98 \mu\text{M}$, Slika 43) i **36** ($IC_{50} = 148,31 \pm 2,96 \mu\text{M}$, Slika 44). Dobijene vrednosti nadmašuju više od 2 puta IC_{50} vrednost kristal violeta koji je korišćen kao pozitivna kontrola, i u skladu su sa brojnim malim organskim inhibitorima DNaze čije se IC_{50} vrednosti nalaze u opsegu od $70 \mu\text{M}$ do $150 \mu\text{M}$ [Mavrova i saradnici, 2018; Kolarević i saradnici, 2018; Kolarević i saradnici, 2019a; Kolarević i saradnici, 2019b; Bondžić i saradnici, 2019; Smelcerovic i saradnici, 2020; Ilić i saradnici, 2021]. Inhibitorski potencijal prema ksantin oksidazi zabeležen je jedino kod derivata **30** ($IC_{50} = 135,72 \pm 2,71 \mu\text{M}$, Slika 45). Analiziranjem strukturnih karakteristika aktivnog derivata **30** i njegovog najsrodnijeg neaktivnog analoga **31** može se zaključiti da 7,8-dimetoksi supstitucija na 1,2,3,4-tetrahidroizohinolinskom jezgru može biti potencijalni uzročnik izostanka inhibitorskog potencijala jedinjenja **31** [Gajić i saradnici, 2021c].



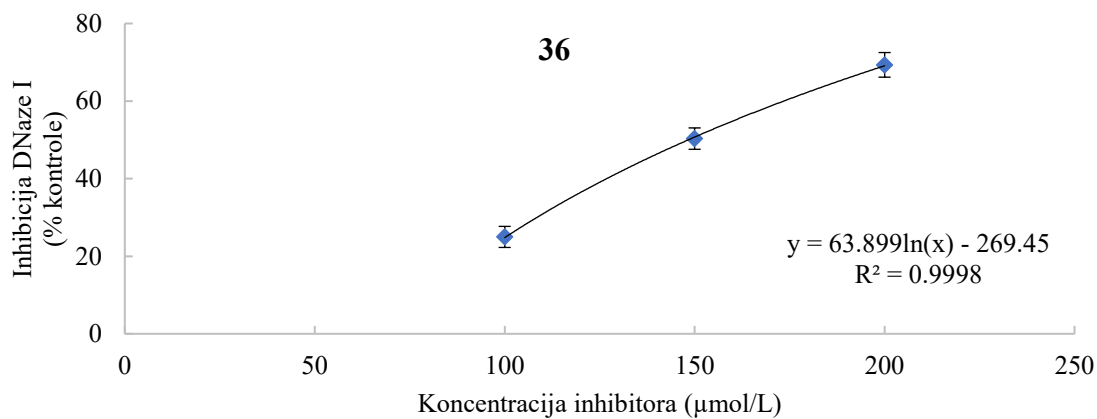
Slika 41. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **16**.



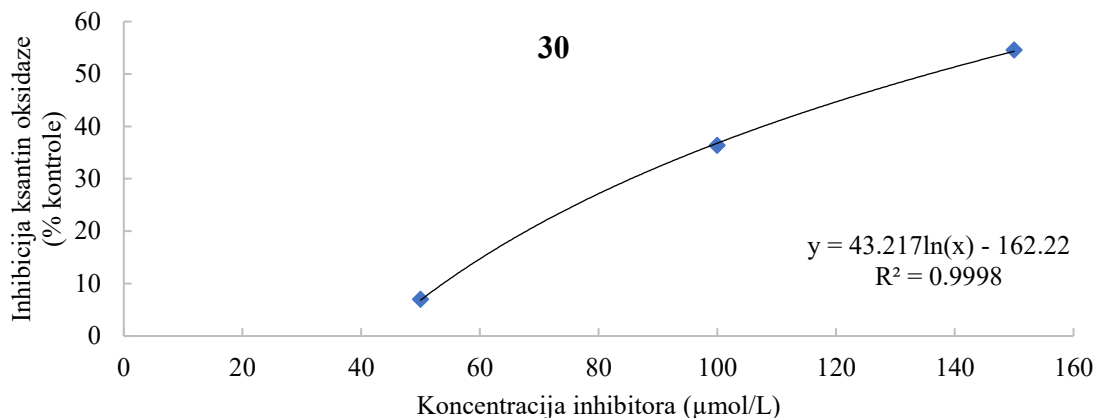
Slika 42. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 29.



Slika 43. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 32.



Slika 44. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 36.



Slika 45. Inhibicija ksantin oksidaze jedinjenjem **30**.

U svrhu boljeg razumevanja interakcije aktivnih derivata 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina sa odgovarajućim enzimima sprovedena je *in silico* studija molekularnog *docking*-a i simulacija molekularne dinamike.

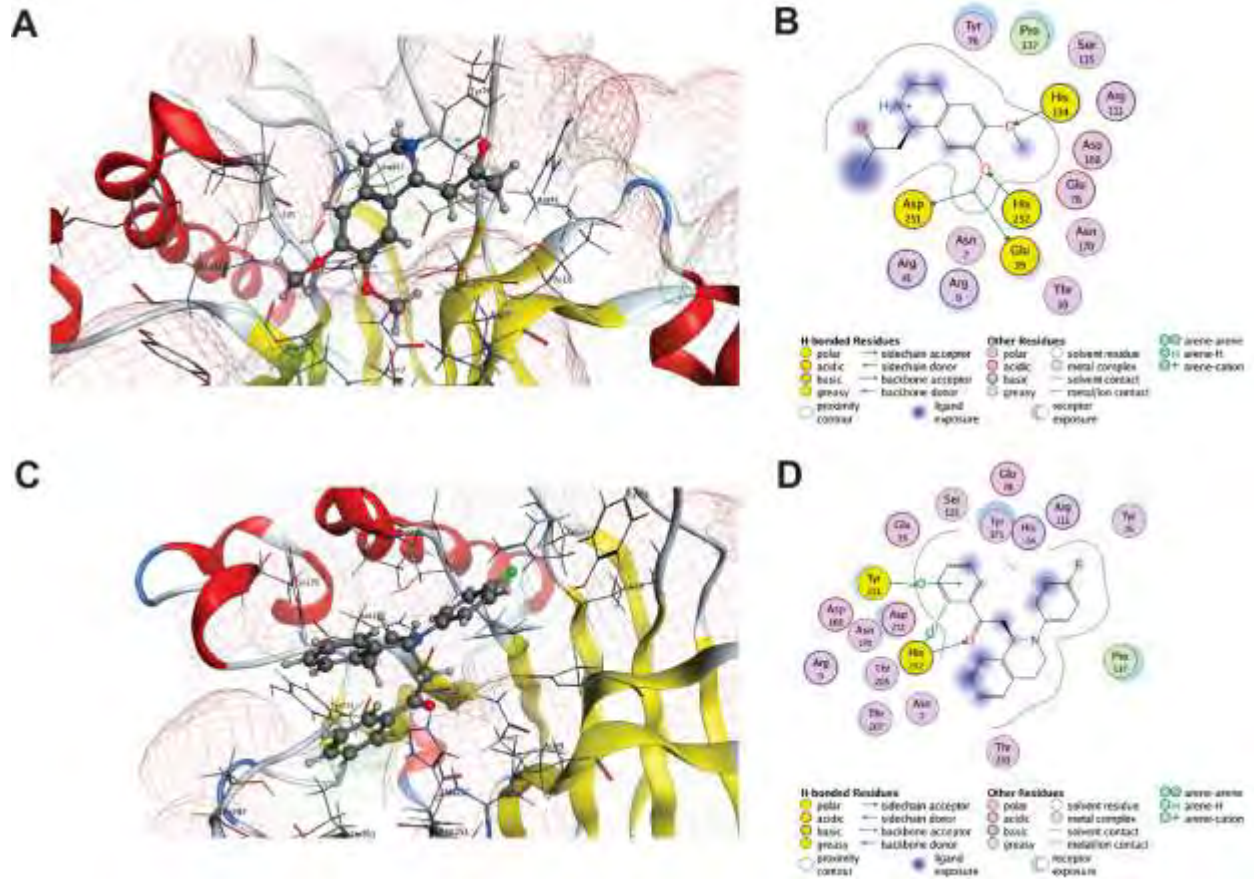
Dobijeni rezultati ukazuju da inhibitori DNaze I (**16**, **29**, **32** i **36**) ostvaruju kontakt sa aminokiselinama poput Glu 39, His 134, Asn 170, Tyr 211, Asp 251 i His 252, koje se nalaze unutar regiona odgovornog za interakciju sa d(GGTATACC)₂ oktamerom DNK molekula [Gajić i saradnici, 2021b]. Tip interakcija inhibitora i aminokiselinskih ostataka, dužina i energija veza, kao i slobodna energija vezivanja date su u Tabeli 4. Najučestaliji tip interakcija čine vodonične veze i H- π interakcije sa katalitičkim histidinima His 134 i His 252. Dodatne interakcije se ostvaruju preko Glu 39 i Asp 251, odgovornih za koordinisanje jona dvovalentnih metala unutar aktivnog centra enzima, ili Asp 170 i Tyr 211 u neposrednoj blizini aktivnog centra, čije mutacije rezultiraju smanjenjem ili potpunim izostankom enzimske aktivnosti. Šematski prikaz interakcija inhibitora **16**, **29**, **32** i **36** sa aktivnim centrom DNaze I prikazan je Slikama 46 i 47.

Rezultati dobijeni simulacijom molekularne dinamike, u vidu RMSD i RMSF dijagrama, ukazuju na stabilnost *docking* kompleksa DNaze I i ispitivanih 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina tokom čitavog perioda simulacije (Slike 48-50). Vrednosti RMSD i RMSF za Ca atome, bočne lance i heteroatome nalaze se unutar granice od 2 Å, ukazujući na prihvatljive konformacione promene i strukturalna rearanžiranja, što za posledicu ima stabilnost formiranih kompleksa [Gajić i saradnici, 2021].

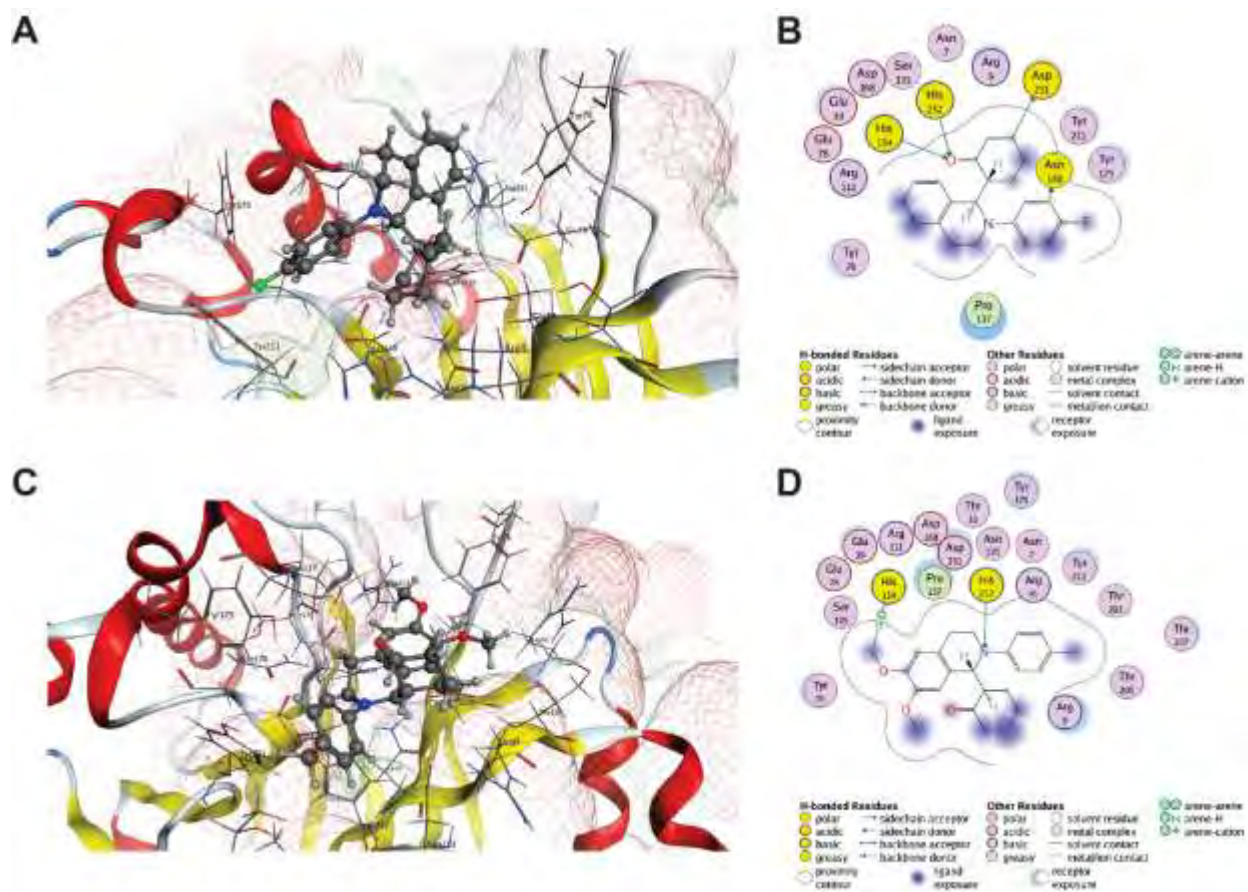
Tabela 4. Predviđene intermolekulske interakcije 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina sa aminokiselinskim ostacima DNaze I [Gajić i saradnici, 2021b].

Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
16	C18	Glu 39	H-donor	3,13	-0,4	-6,37
	C18	Asp 251	H-donor	3,51	-0,3	
	O15	His 134	H-akceptor	3,01	-1,2	
	O17	His 252	H-akceptor	3,44	-0,3	
29	O20	His 252	H-akceptor	2,94	-1,4	-6,92
	C21	His 252	H- π	4,27	-1,0	
	prsten	Tyr 211	π -H	4,49	-0,2	
32	C13	Asn 170	H-donor	3,29	-0,4	-6,53
	C21	Asp 251	H-donor	3,34	0,1	
	O24	His 134	H-akceptor	3,38	-1,1	
	O24	His 252	H-akceptor	3,30	-3,8	
36	N8	His 252	H-akceptor	3,21	3,7	-7,87
	C26	His 134	H- π	4,80	-0,2	

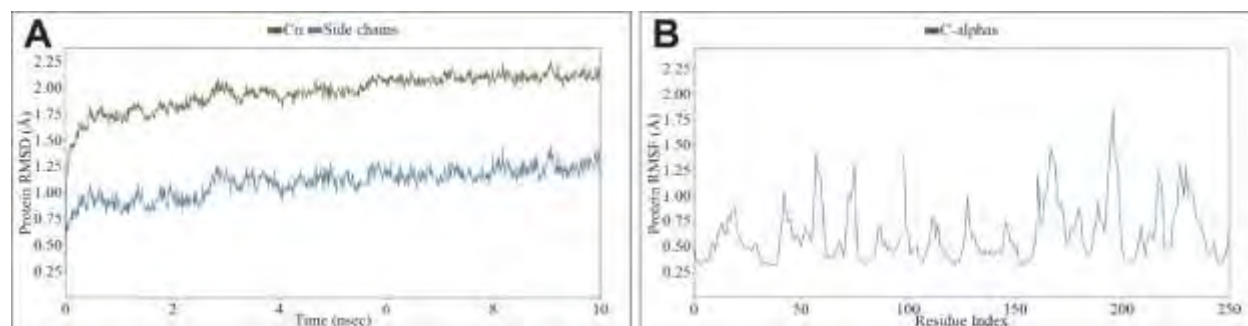
* ΔG – Gibsova slobodna energija



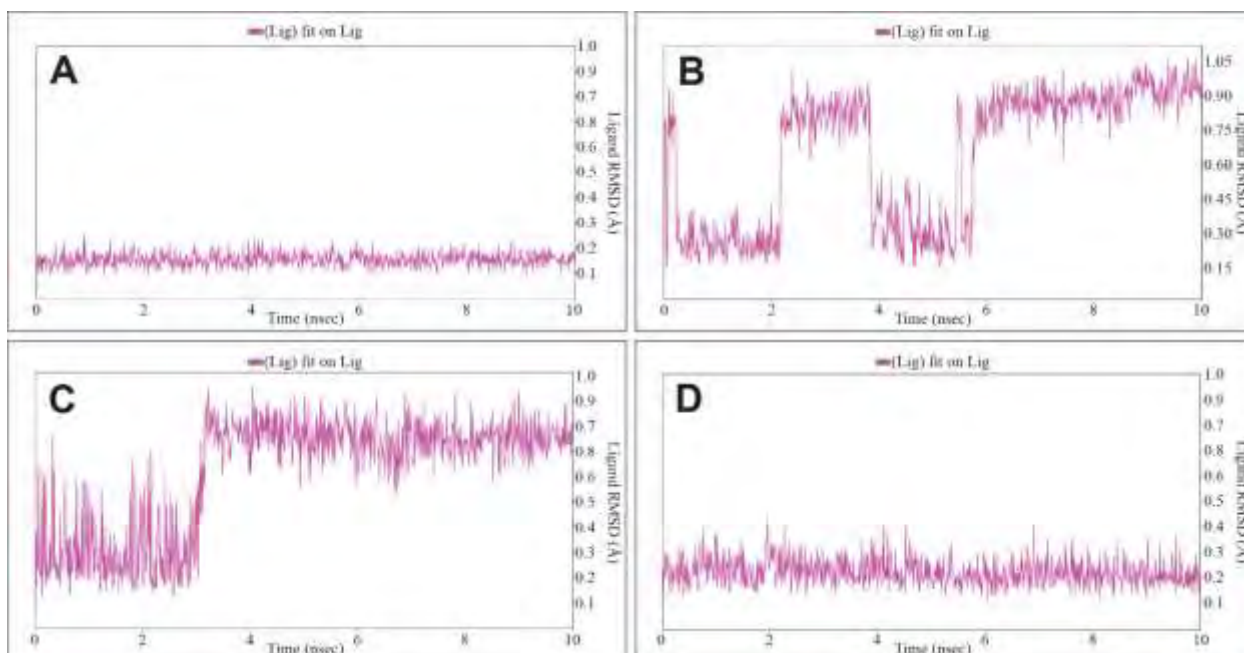
Slika 46. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **16** (A, B) i **29** (C, D) sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni regioni vezujućeg mesta označeni su roze, hidrofobni regioni zelenom, a regioni izloženi rastvaraču crvenom bojom [Gajić i saradnici, 2021b].



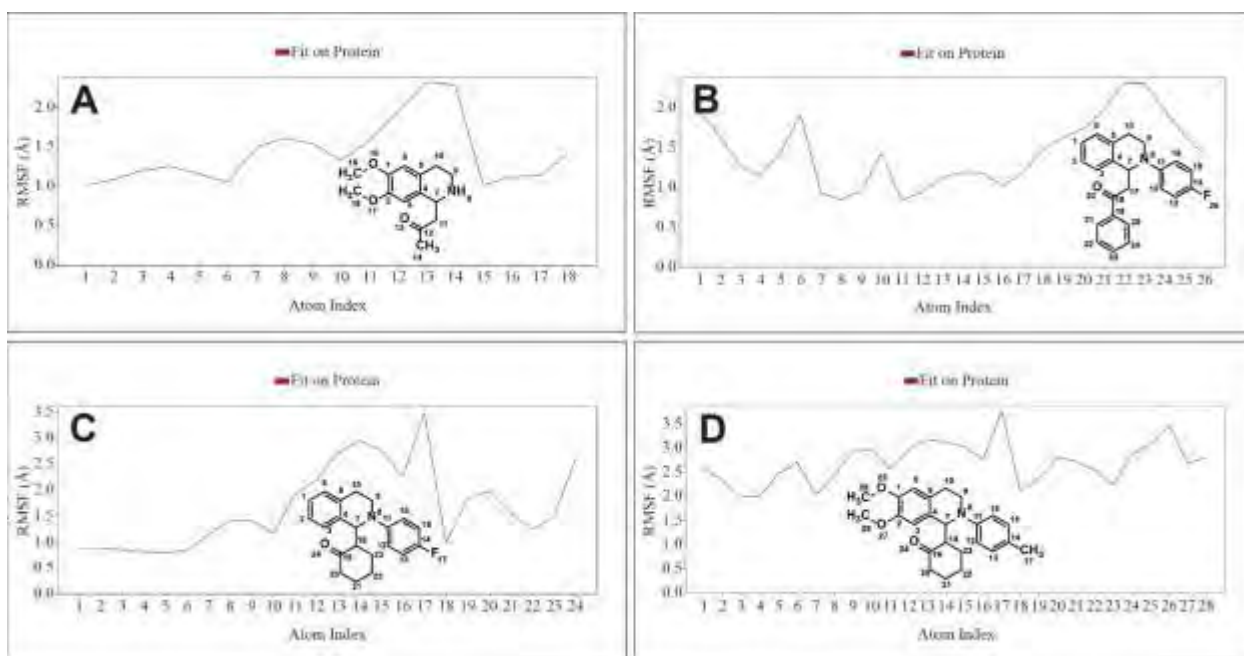
Slika 47. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **32** (A, B) i **36** (C, D) sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni regioni vezujućeg mesta označeni su roze, hidrofobni regioni zelenom, a regioni izloženi rastvaraču crvenom bojom [Gajić i saradnici, 2021b].



Slika 48. RMSD (A) i RMSF (B) dijagrami DNaze I dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Gajić i saradnici, 2021b].



Slika 49. RMSD dijagrami jedinjenja 16 (A), 29 (B), 32 (C) 36 (D) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike unutar aktivnog mesta DNaze I [Gajić i saradnici, 2021b].



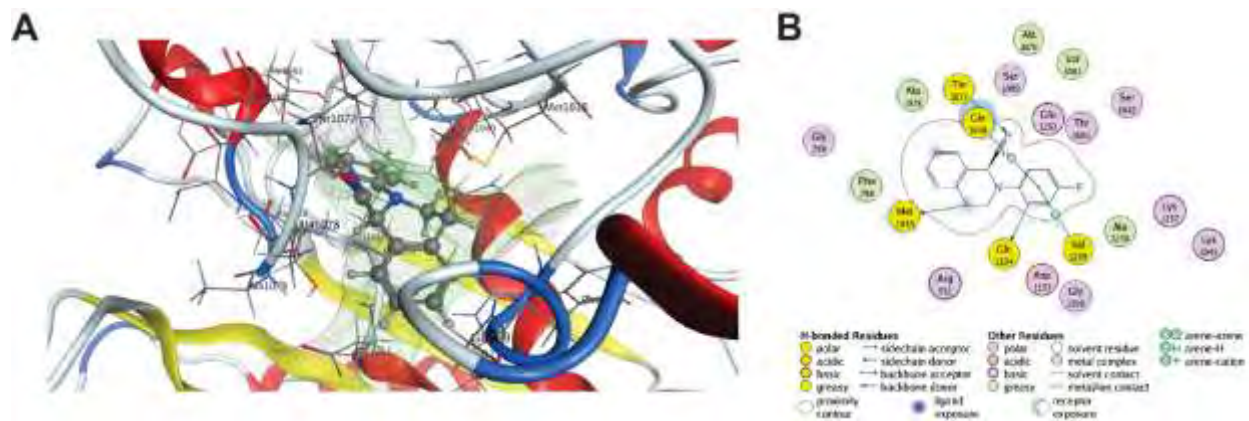
Slika 50. RMSF dijagrami jedinjenja 16 (A), 29 (B), 32 (C) i 36 (D) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike unutar aktivnog mesta DNaze I [Gajić i saradnici, 2021b].

Predviđene intermolekularne interakcije inhibitora **30** i enzima ksantin oksidaze prikazane su Tabelom 5 i Slikom 51. Zasnivaju se na vodnoničnim vezama i π -H interakcijama sa nekatalitičkim aminokiselinama Met 1038, Gln 1040, Thr 1077, Gln 1194 i Val 1259 ključenim u interakciju sa nepurinskim inhibitorima ksantin oksidaze [Li i saradnici, 2013; Wan i saradnici, 2016; Malik i saradnici, 2019; Cao i saradnici, 2020]. Neki od derivata pirazola inhibiraju ksantin oksidazu preko aminokiselinskih ostataka Met 1038, Gln 1040 i Gln 1194 [Li i saradnici, 2013]. Inhibitorski efekat verbaskozida na ksantin oksidazu se može pripisati formiranju vodoničnih veza sa aminokiselinom Gln 1194 [Wan i saradnici, 2016]. Dodatno, molekulske simulacije su ukazale da neki od nosintetisanih derivata hesperidina interaguju sa ostacima Met 1038, Gln 1040, Thr 1077, Gln 1194 i Val 1259 [Malik i saradnici, 2019], dok derivat kafeine ostvaruje interakciju sa Gln 1040 i Thr 1077 [Cao i saradnici, 2020].

Tabela 5. Predviđene intermolekulske interakcije 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina **30** sa aminokiselinskim ostacima ksantin oksidaze [Gajić i saradnici, 2021c].

Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
30	C10	Met 1038	H-donor	4,29	-0,3	-8,36
	C12	Gln 1194	H-donor	3,06	-0,5	
	N19	Thr 1077	H-akceptor	3,47	2,2	
	prsten	Gln 1040	π -H	4,41	-0,2	
	prsten	Val 1259	π -H	4,64	-0,4	

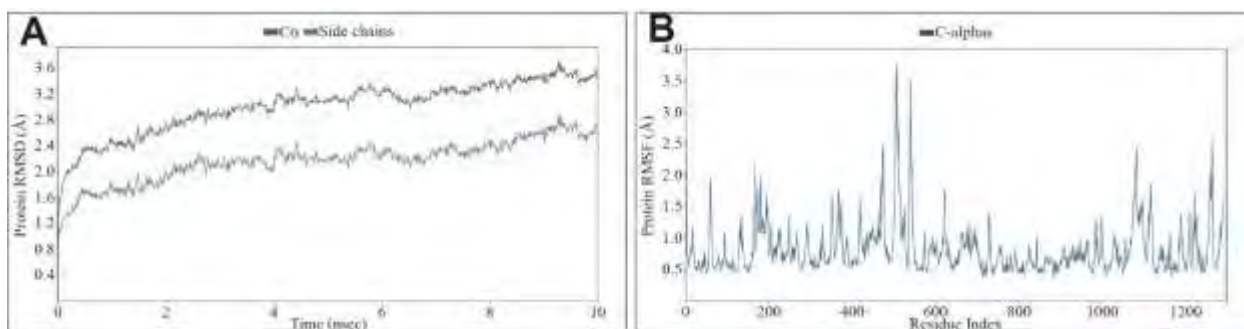
* ΔG – Gibbsova slobodna energija



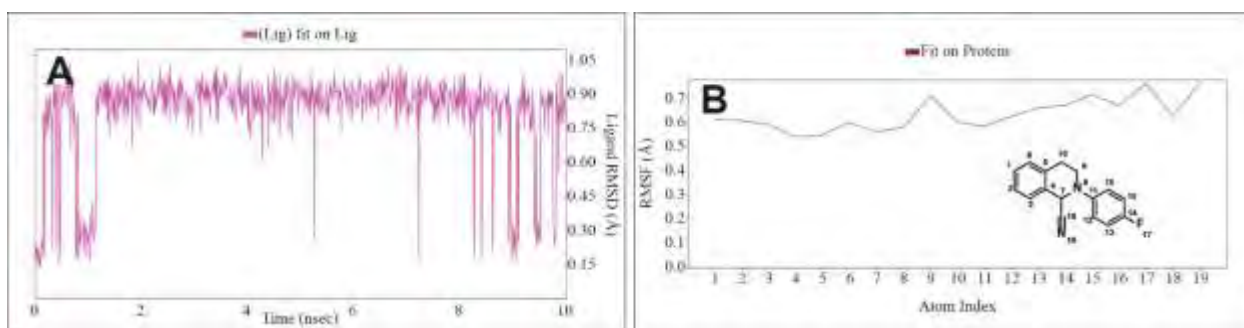
Slika 51. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **30** (A, B) sa aktivnim mestom ksantin oksidaze. Polarni regioni vezujućeg mesta označeni su roze,

hidrofobni regioni zelenom, a regioni izloženi rastvaraču crvenom bojom [Gajić i saradnici, 2021c].

Stabilnost kompleksa inhibitora **30** i ksantin oksidaze evaluirana je simulacijom molekularne dinamike. RMSD i RMSF dijagrami ksantin oksidaze i ispitivanog inhibitora ukazuju da je *docking* kompleks enzim-inhibitor ostao stabilan tokom čitavog trajanja simulacije (Slike 52 i 53). RMSD vrednosti C α atoma, bočnih lanaca i heteroatoma ostale su unutar granice od 2 Å. Ista tendencija je zabeležena i kod RMSF vrednosti. Dobijeni rezultati ukazuju na minimalne konformacione promene i strukturna rearanžiranja, što za posledicu ima stabilnost ispitivanog enzim-inhibitor kompleksa [Gajic i saradnici 2021c].



Slika 52. RSMD (A) i RMSF (B) dijagrami ksantin oksidaze dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Gajić i saradnici, 2021c].



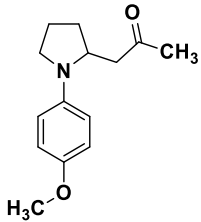
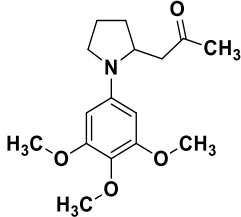
Slika 53. RSMD (A) i RMSF (B) dijagrami jedinjenja **30** dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Gajić i saradnici, 2021c].

Inhibicija DNaze I derivatima 1,2,3,4-tetrahidroizohinolina može potencijalno ispoljiti protektivne efekte u stanjima masivnog oštećenja tkiva i organa koja su direktno posredovana povećanom aktivnošću DNaze I, poput nefrotoksičnih efekata cisplatina [Basnakian i saradnici, 2005], hepatocelularne nekroze uzrokovane visokim dozama paracetamola [Napirei i saradnici, 2006], nakon izlaganja jonizujućem γ -zračenju [Apostolov i saradnici, 2009] ili grafenskim nanomaterijalima [Fahmi i saradnici, 2017]. Korisni efekti inhibicije DNaze I ovim derivatima bi se verovatno mogli očekivati i u stanjima koja su udružena sa povećanom enzimskom aktivnošću, odnosno stanjima kod kojih prekomerna i nekontrolisana apoptoza predstavlja značajan patološki činilac.

4.3. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona

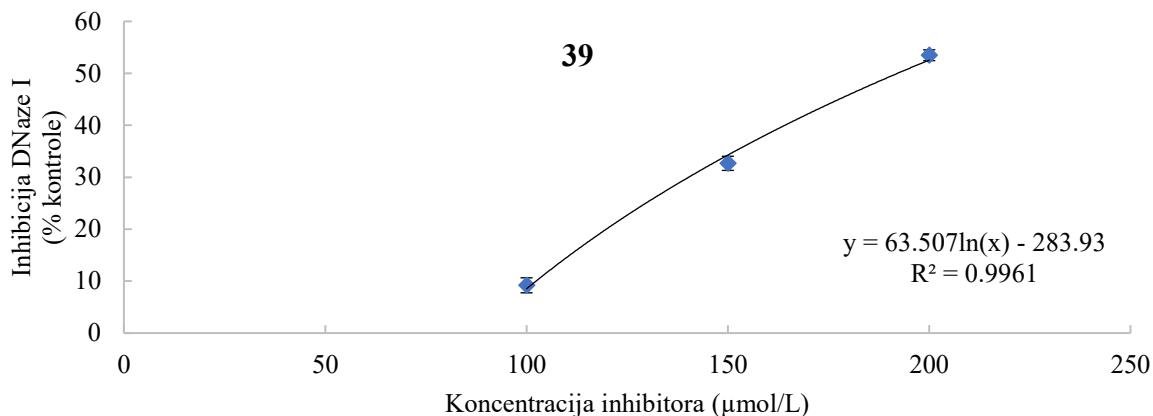
Dva dostupna derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona, **39** i **40**, podvrgnuta su testiranju inhibitornog potencijala prema DNazi I i ksantin oksidazi (Tabela 6). Oba jedinjenja su ispoljila inhibitorni potencijal prema DNazi I, dok je inhibitorni potencijal prema ksantin oksidazi izostao. Niža IC_{50} vrednost zabeležena je kod 3,4,5-trimetoksifenil supstituisanog derivata **40** ($IC_{50} = 132,62 \pm 9,92 \mu\text{M}$, Slika 54) u odnosu na 4-metoksifenil supstituisani derivat **39** ($IC_{50} = 193,13 \pm 16,95 \mu\text{M}$, Slika 55). Dobijene IC_{50} vrednosti derivata **39** i **40** su 1,88 u 2,73 puta niže od IC_{50} vrednosti kristal violeta koji je korišćen kao pozitivna kontrola, i u skladu su sa IC_{50} vrednostima većine poznatih malih organskih inhibitora DNaze I [Ilić i saradnici, 2021].

Tabela 6. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona **39** i **40** [Gajić i saradnici, 2021a].

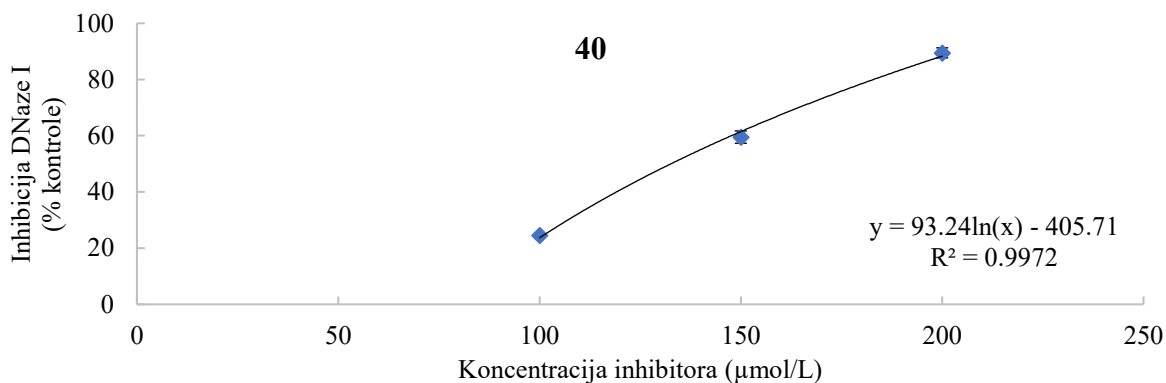
Jedinjenje	Struktura	DNaza $IC_{50} \pm$ SD (μM)	XO $IC_{50} \pm$ SD (μM)
39		$193,13 \pm 16,95$	> 150
40		$132,62 \pm 9,92$	> 150

Pozitivna kontrola za DNazu I – kristal violet, $IC_{50} = 362,45 \pm 35,55 \mu\text{M}$

Pozitivna kontrola za XO – alopurinol, $IC_{50} = 1,24 \pm 0,18 \mu\text{M}$



Slika 54. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **39**.



Slika 55. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **40**.

Ispitivani derivati 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona dalje su podvrgnuti *in silico* predviđanju ADMET profila, molekularnih i fizičko-hemijskih deskriptora kako bi se utvrdilo u kojoj meri osobine ispitivanih molekula potencijalno odgovaraju poželjnim osobinama lekova [Sander i saradnici, 2015; Diana i saradnici, 2017; Dong i saradnici, 2018]. Jedinjenja **39** i **40** ispunjavaju pravilo Lipinskog u pogledu broja akceptora i donora vodoničnih veza, molekulske mase i particionog koeficijenta oktanol-voda [Lipinski i saradnici, 1997], te se posledično može očekivati da ispoljavaju visok nivo gastrointestinalne apsorpcije (Tabele 6 i 7). Posebno vredna pažnje je predviđena sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, imajući u vidu da bi primarno mesto delovanja inhibitora DNaze I moglo biti u centralnom nervnom sistemu, usled brojnih neurodegenerativnih poremećaja koji se karakterišu povećanjem nivoa DNaze I ili izraženom apoptozom [Smelcerovic i saradnici, 2020].

Tabela 7. Odabrani molekularni deskriptori i ADME osobine derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona **39** i **40** predviđene SwissADME platformom [Ilić i saradnici, 2021].

Jedinjenje	MW ^[a]	N _{roth} ^[b]	HBA ^[c]	HBD ^[d]	TPSA ^[e]	LogP ^[f]	GIA ^[g]	BBB ^[h]
39	233,31	4	2	0	29,54	2,33	Visok	+
40	239,36	6	4	0	48,00	2,29	Visok	+

^[a] Molekulska masa; ^[b] Broj rotirajućih veza; ^[c] Broj akceptora vodoničnih veza; ^[d] Broj donora vodoničnih veza;

^[e] Polarna topološka površina; ^[f] LogP proračunata SwissADME platformom; ^[g] Gastrointestinalna apsorpcija;

^[h] Permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru.

Tabela 8. Odabrane ADMET osobine derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona **39** i **40** predviđene ADMETlab platformom [Ilić i saradnici, 2021].

Jedinjenje	P-gp ^[a] inhibitor	P-gp supstrat	HIA ^[b]	BBB ^[c]	CYP3A4 inhibitor	CYP3A4 supstrat	CYP2D6 inhibitor	CYP2D6 supstrat
39	+	--	++	+++	-	+	-	++
40	-	--	+	+++	-	+	-	+

^[a] P-glikoprotein; ^[b] Humana intestinalna apsorpcija; ^[c] Permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru.

Nalik na 90% poznatih lekova, prema predikciji, ispitivani derivati 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona mogu biti supstrat enzima citohrom P450 3A4 i 2D6, ali bez sposobnosti da inhibišu njihovu aktivnost. Dodatno, za jedinjenja se predviđa da su nemutageni, netumorigeni i da ne ispoljavaju reproduktivnu toksičnost. Korišćenjem HitDexter 2.0 platforme koja kombinuje metode zasnovane na sličnosti, primeni pravila i mašinskom učenju, u strukturama ispitivanih jedinjenja nisu detektovani molekularni obrasci koji se dovode u vezu sa ometanjem esejja [Stork i saradnici, 2019].

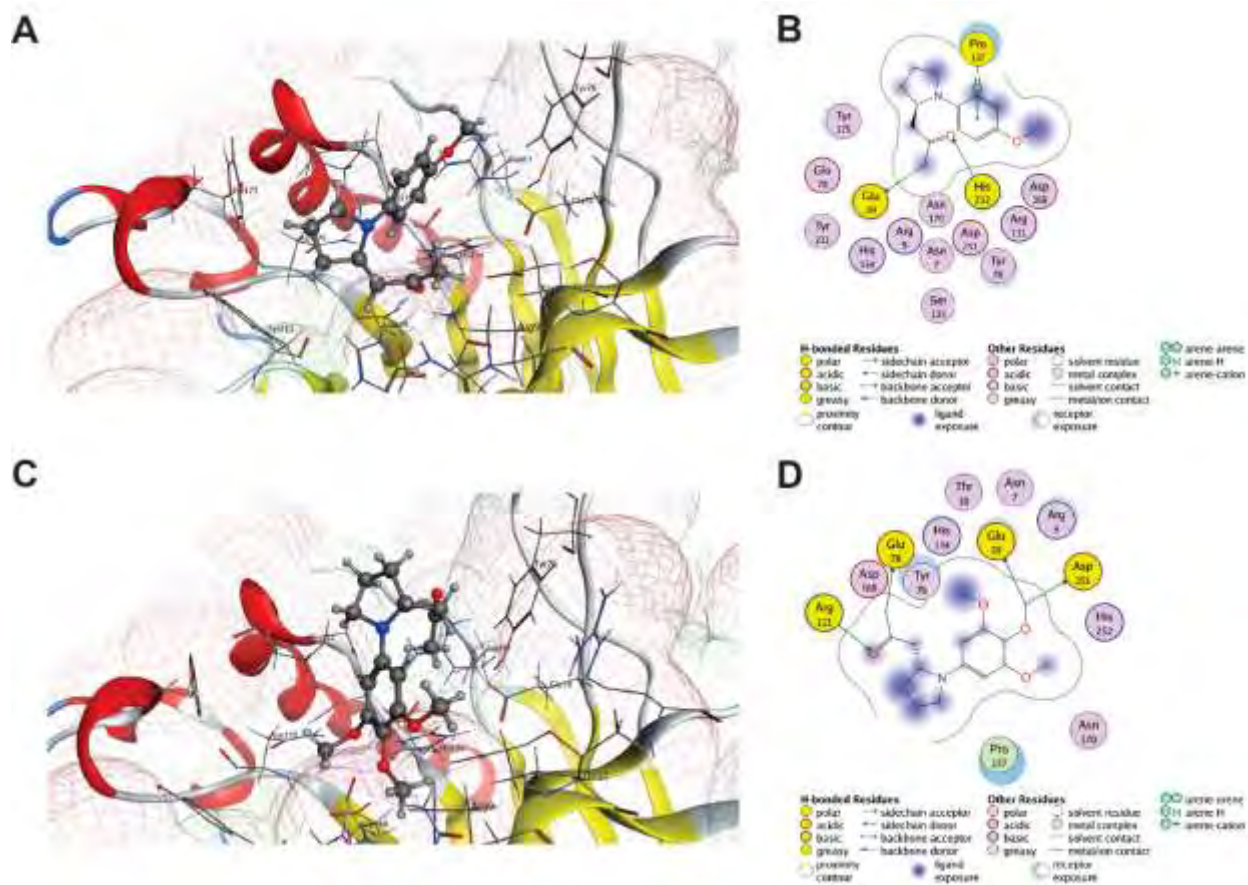
Korišćenjem MOE *software*-a analizirana je interakcija derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona i DNaze I. Intermolekularni kontakt inhibitora i DNaze I se ostvaruje putem vodoničnih veza i π -H interakcija (Tabela 9, Slika 56), koji za posledicu ima smanjenje enzimske aktivnosti usled interakcije sa aminokiselinskim ostacima neophodnim za enzimsku aktivnost, poput Glu 78 i His 252, kordinaciju jona dvovalentnih metala (Glu 39 i Asp 251) ili stabilizaciju enzim-supstrat kompleksa usled blizine aktivnom mestu enzima (Arg 111) [Ilić i saradnici, 2021].

Tabela 9. Predviđene intermolekulske interakcije derivata 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona **39** i **40** sa aminokiselinskim ostacima DNaze I [Ilić i saradnici, 2021].

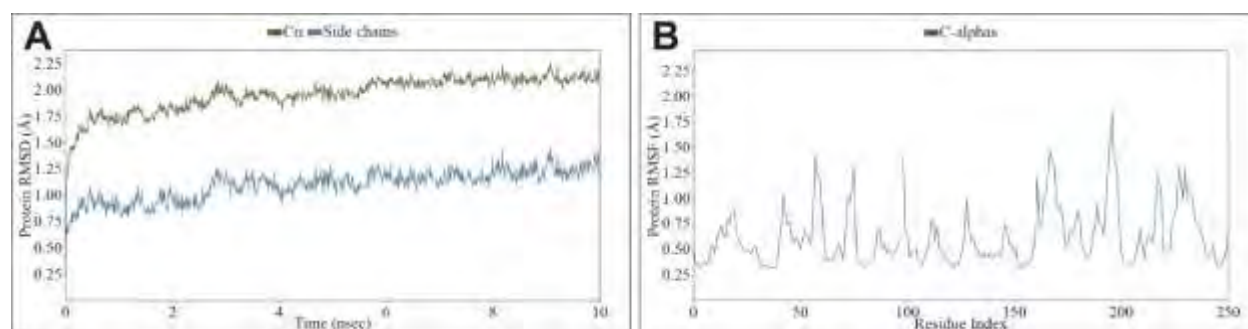
Inhibitor	Atom inhibitora	Amino-kiselina	Tip interakcije	Dužina veze (Å)	Energija veze (kcal/mol)	ΔG^* (kcal/mol)
39	C14	Glu 39	H-donor	3,47	-0,3	-5,99
	O15	His 252	H-akceptor	3,01	-4,1	
	prsten	Pro 137	π -H	3,48	-0,2	
40	C14	Glu 78	H-donor	3,23	-0,4	-6,59
	C17	Glu 39	H-donor	3,49	-0,6	
	C17	Asp 251	H-donor	3,59	-0,3	
	O15	Arg 111	H-akceptor	3,59	-0,2	

* ΔG – Gibsova slobodna energija

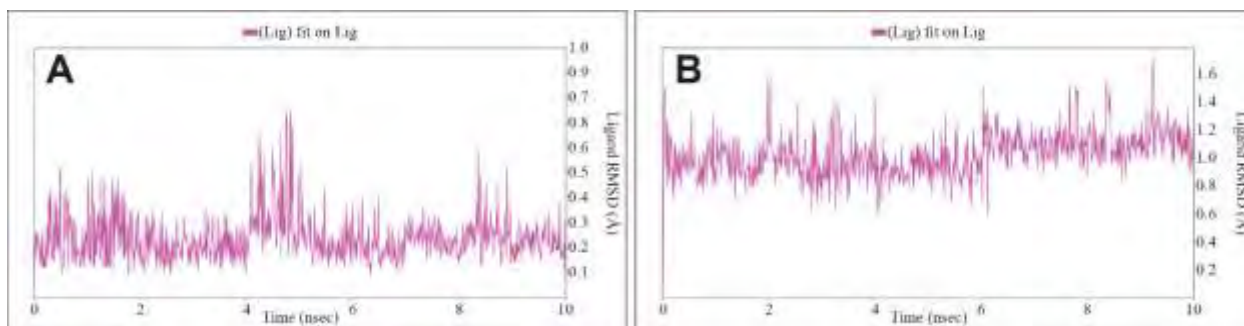
Stabilnost kompleksa inhibitor-enzim dalje je evaluirana simulacijom molekularne dinamike. Dijagrami RMSD i RMSF vrednosti ispitivanih 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona i DNaze I ukazuju na stabilnost *docking* kompleksa tokom perioda trajanja simulacije. Predviđene RMSD vrednosti za Ca atome, bočne lance i heteroatome, kao i RMSF vrednosti (Slike 57-59), nalaze se unutar prihvatljive granice od 2 Å, sugerišući postojanje minimalnih strukturnih rearanžiranja i ograničenih konformacionih promena, koje za posledicu imaju stabilnost kompleksa 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona i DNaze I [Ilić i saradnici, 2021].



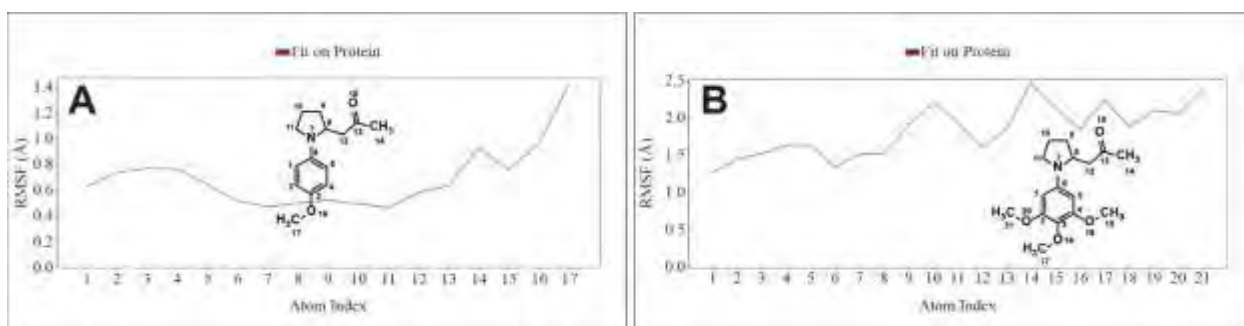
Slika 56. Trodimenzionalni i dvodimenzionalni prikaz predviđenih interakcija jedinjenja **39** (A, B) i **40** (C, D) sa aktivnim mestom DNaze I. Polarni regioni vezujućeg mesta označeni su roze, hidrofobni regioni zelenom, a regioni izloženi rastvaraču crvenom bojom [Ilić i saradnici, 2021].



Slika 57. RMSD (A) i RMSF (B) dijagrami DNaze I dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Ilić i saradnici, 2021].



Slika 58. RMSD dijagrami inhibitora **39** (A) i **40** (B) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Ilić i saradnici, 2021].



Slika 59. RSMF dijagrami inhibitora **39** (A) i **40** (B) dobijeni tokom 10 ns trajanja simulacije molekularne dinamike [Ilić i saradnici, 2021].

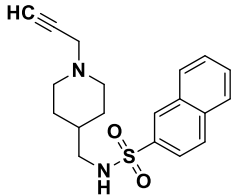
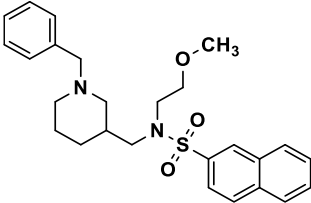
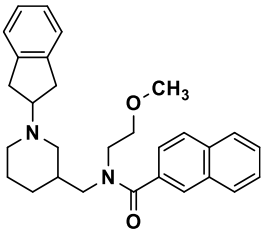
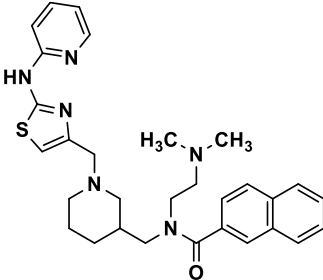
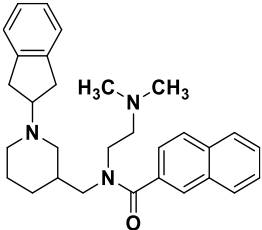
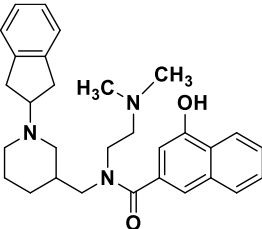
Derivati 1-(pirolidin-2-il)propan-2-ona kroz svoju sposobnost inhibicije DNaze I potencijalno mogu ispoljiti korisne efekte u prethodno razmatranim stanjima koja su bilo uzrokovana ili praćena povećanom enzimskom aktivnošću DNaze I [Yao i saradnici, 1996; Schatzmann-Turhani i saradnici, 1999; Basnakian i saradnici, 2002; Kwai i saradnici, 2004; Arakawa i saradnici, 2005; Basnakian i saradnici, 2005; Napirei i saradnici, 2006; Apostolov i saradnici, 2009; Zhu i saradnici, 2014; Yusof i saradnici, 2015; Fahmi i saradnici, 2017].

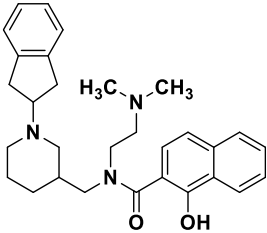
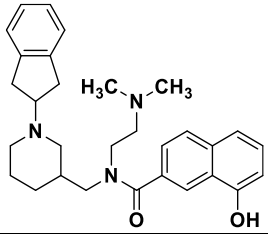
4.4. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima naftalena, 8-hidroksihinolina, nitroksolina i srodnih struktura

Inhibitorna aktivnost serija od 37 inhibitora (**41-77**) butirilholin esterase (BChE) [Brus i saradnici, 2014; Knez i saradnici, 2015; Knez i saradnici, 2018; Košak i saradnici, 2018; Knez i saradnici, 2019, Gajić i saradnici, 2022] i katepsina B (CatB) [Mirković i saradnici, 2011; Sosić i saradnici, 2013; Sosić i saradnici, 2018; Knez i saradnici, 2020], dizajniranih kao multi-target usmereni ligandi, ispitana je *in vitro* prema DNazi I i ksantin oksidazi u cilju proširivanja broja targeta na koje ispoljavaju dejstvo. Derivata naftalena i naftola (**41-48**) (Tabela 10) nisu ispoljili inhibitorni potencijal prema DNazi i ksantin oksidazi pri maksimalnim koncentracijama izvođenja eseja. Nasuprot njima, šesnaest (**49-51, 53, 54, 56-65 i 67**) (Tabela 11, Slike 60-75) od ukupno dvadeset jednog derivata 8-hidroksihinolina i nitroksolina (**49-69**) (Tabela 11) inhibiralo je DNazu I sa IC_{50} vrednostima nižim od 100 μ M, dok je inhibicija ksantin oksidaze izostala. Kao najpotentniji inhibitor DNaze I pokazao se derivat nitroksolina *N*-((1-(benzo[d]tiazol-2-ilmetil)piperidin-3-il)metil)-8-hidroksi-5-nitrohinolin-7-carboksamid (**64**) ($IC_{50} = 23,33 \pm 3,36 \mu$ M) i blisko je praćen derivatima 8-hidroksihinolina *N*-((1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)piperidin-3-il)metil)-*N*-(2-(dimetilamino)etil)-8-hidroksihinolin-2-karboksamidom (**50**) ($IC_{50} = 25,61 \pm 4,80 \mu$ M) i *N*-((1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)piperidin-3-il)metil)-*N*-(2-(dimetilamino)etil)-8-hidroksihinolin-7-karboksamidom (**49**) ($IC_{50} = 30,58 \pm 7,39 \mu$ M). Najmanje efikasan inhibitor DNaze I bilo je jedinjenje **60** sa IC_{50} vrednošću od $77,74 \pm 15,96 \mu$ M. Referentni inhibitor kristal violet ispoljio je 5-15 puta niži inhibitorni potencijal prema DNazi I u odnosu na svih 16 identifikovanih inhibitora DNaze I. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze je izostala među derivatima triptofana (**70 i 71**), *N*-alkilpiperidin karbamata (**72 i 73**) i srodnih struktura (**74-77**) (Tabela 12) [Gajić i saradnici, 2022].

Sposobnost inhibicije DNaze I derivatima **49, 50 i 64** prevazilazi sve do sada poznate inhibitore [Kolarević i saradnici, 2014; Ilić i saradnici, 2018; Mavrova i saradnici, 2018; Kolarević i saradnici, 2018; Kolarevic i saradnici, 2019a; Kolarević i saradnici, 2019b, Bondžić i saradnici, 2019; Smelcerovic i saradnici, 2020; Marković i saradnici, 2023, Ruseva i saradnici, 2023a; Ruseva i saradnici, 2023b] što ih čini najpotentnijim poznatim inhibitorima DNaze I u formi malih sintetskih molekula.

Tabela 10. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima naftalena i naftola **41-48** [Gajić i saradnici, 2022].

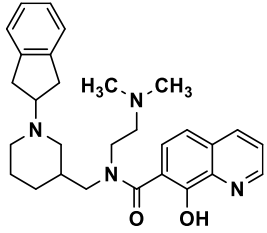
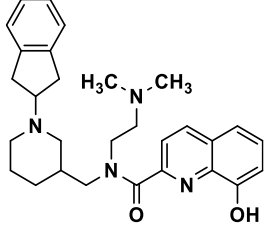
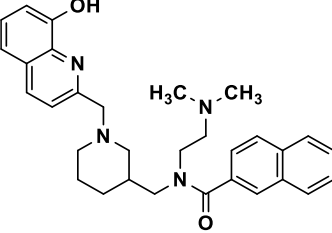
Jedinjenje	Struktura	DNaza IC ₅₀ ± SD (μM)	XO IC ₅₀ ± SD (μM)
41		> 100	> 150
42		> 100	> 150
43		> 100	> 150
44		> 100	> 150
45		> 100	> 150
46		> 100	> 150

47		> 100	> 150
48		> 100	> 150

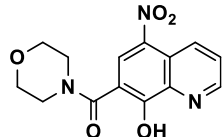
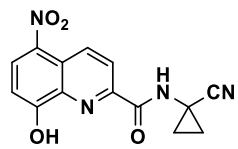
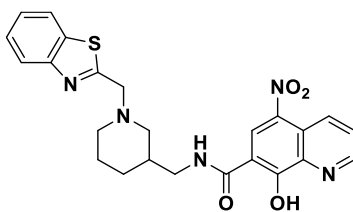
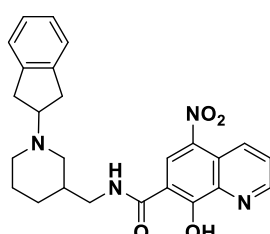
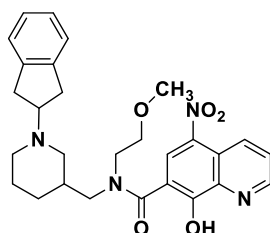
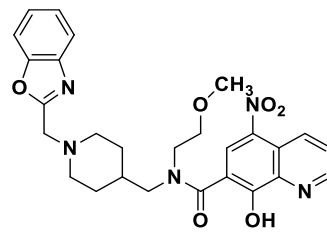
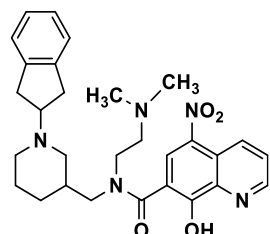
Pozitivna kontrola za DNazu I – kristal violet, $IC_{50} = 364,64 \pm 13,64 \mu M$

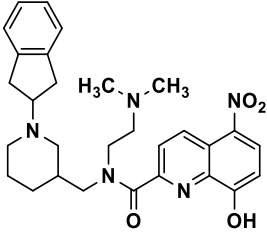
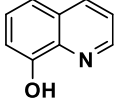
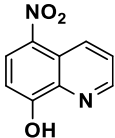
Pozitivna kontrola za XO – alopurinol, $IC_{50} = 1,24 \pm 0,18 \mu M$

Tabela 11. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima 8-hidroksihinolina i nitroksolina 49-69 [Gajić i saradnici, 2022].

Jedinjenje	Struktura	DNaza $IC_{50} \pm SD$ (μM)	XO $IC_{50} \pm SD$ (μM)
49		$30,58 \pm 7,39$	> 150
50		$25,61 \pm 4,80$	> 150
51		$31,34 \pm 5,80$	> 150

52		> 100	> 150
53		42,98 ± 9,26	> 150
54		50,83 ± 10,51	> 150
55		> 100	> 150
56		39,93 ± 6,75	> 150
57		73,75 ± 10,35	> 150
58		66,66 ± 8,26	> 150
59		52,43 ± 8,43	> 150
60		77,74 ± 15,96	> 150
61		33,83 ± 6,19	> 150

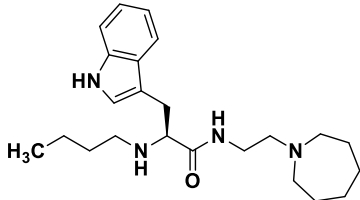
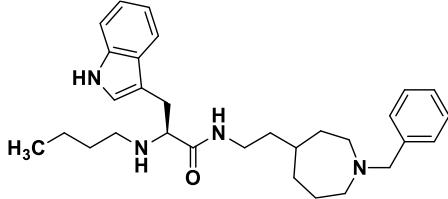
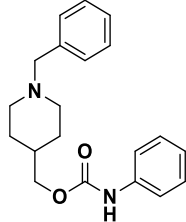
62		$43,03 \pm 4,67$	> 150
63		$61,59 \pm 7,27$	> 150
64		$23,33 \pm 3,36$	> 150
65		$67,40 \pm 9,36$	> 150
66		> 100	> 150
67		$34,54 \pm 2,76$	> 150
68		> 100	> 150

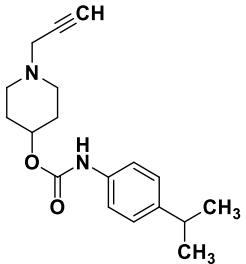
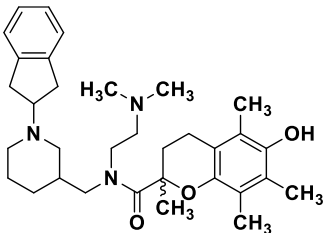
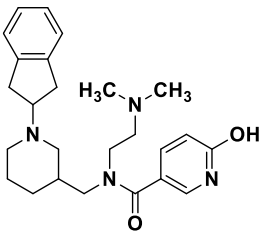
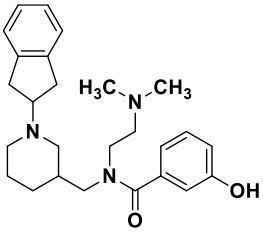
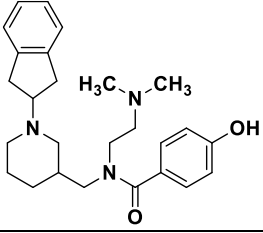
69		> 100	> 150
8-hidroksihinolin		> 100	-
Nitroksolin		> 100	-

Pozitivna kontrola za DNazu I – kristal violet, $IC_{50} = 364,64 \pm 13,64 \mu M$

Pozitivna kontrola za XO – alopurinol, $IC_{50} = 1,24 \pm 0,18 \mu M$

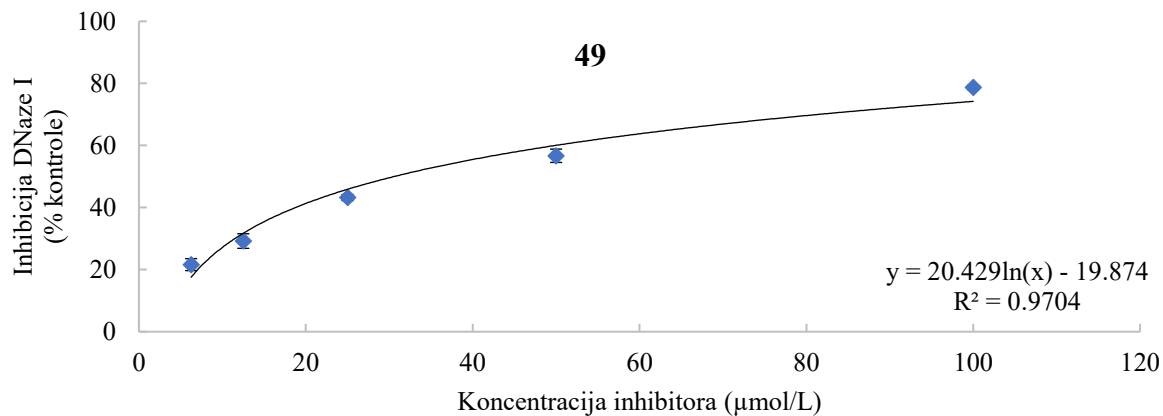
Tabela 12. Inhibicija DNaze I i ksantin oksidaze derivatima triptofana (**70** i **71**), *N*-alkilpiperidin karbamata (**72** i **73**) i srodnim strukturama (**74-77**) [Gajić i saradnici, 2022].

Jedinjenje	Struktura	DNaza $IC_{50} \pm SD$ (μM)	XO $IC_{50} \pm SD$ (μM)
70		> 100	> 150
71		> 100	> 150
72		> 100	> 150

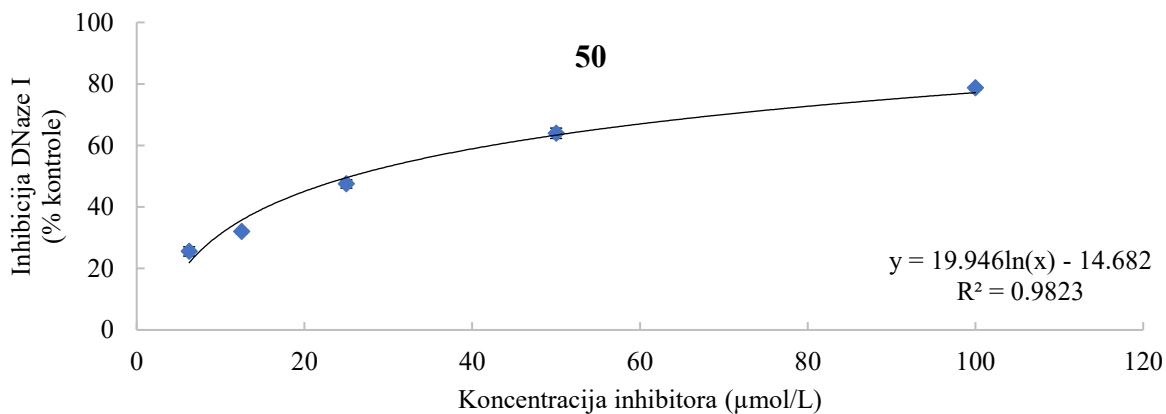
73		> 100	> 150
74		> 100	> 150
75		> 100	> 150
76		> 100	> 150
77		> 100	> 150

Pozitivna kontrola za DNazu I – kristal violet, $IC_{50} = 364,64 \pm 13,64 \mu M$

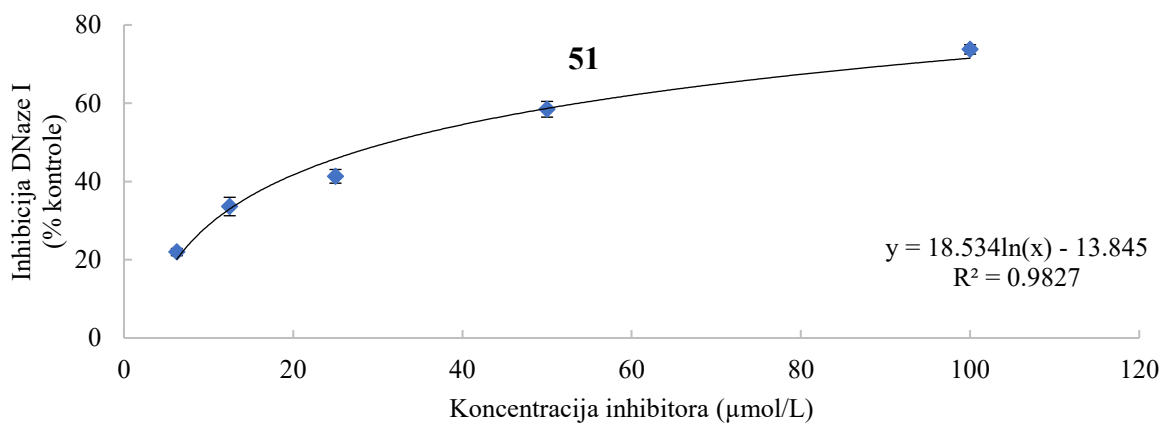
Pozitivna kontrola za XO – alopurinol, $IC_{50} = 1,24 \pm 0,18 \mu M$



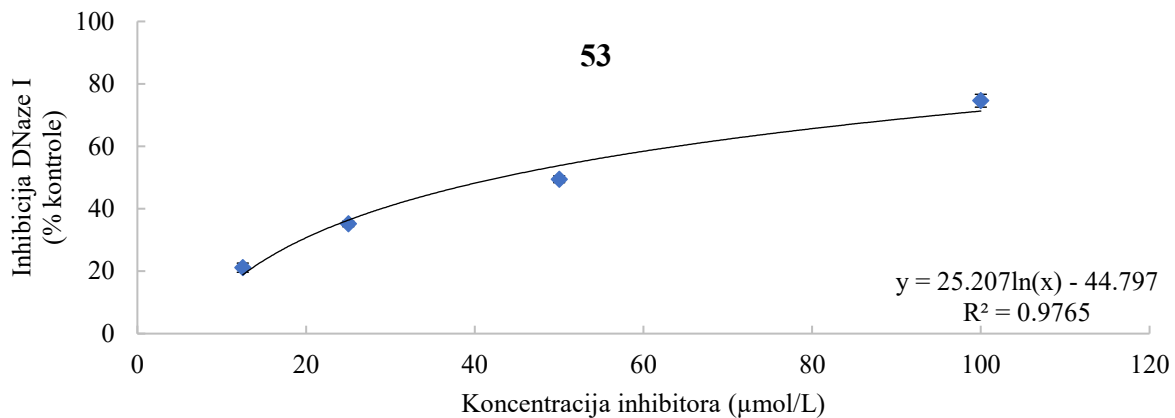
Slika 60. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 49.



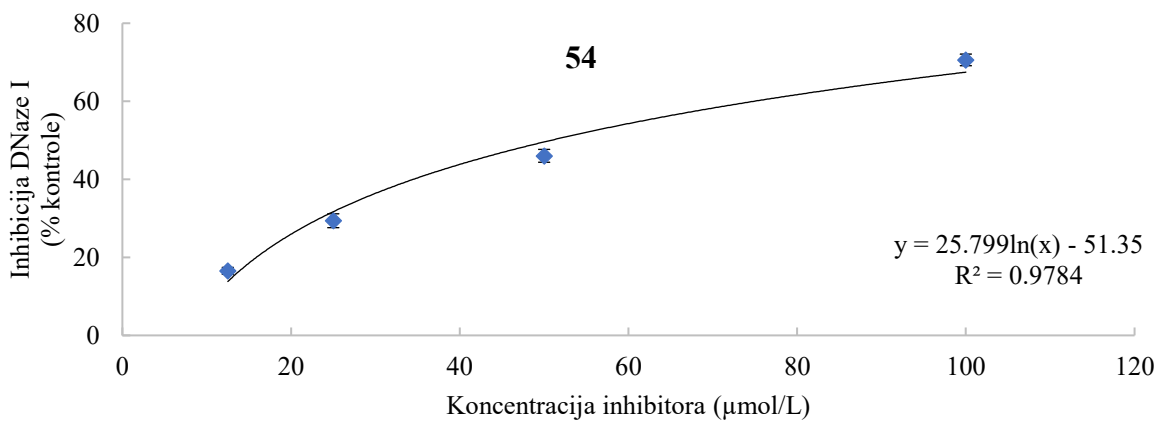
Slika 61. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 50.



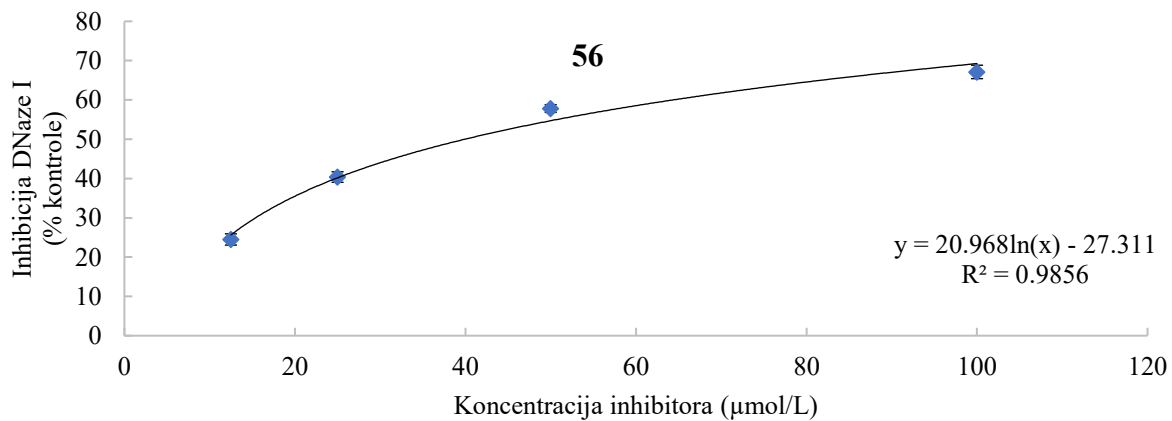
Slika 62. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 51.



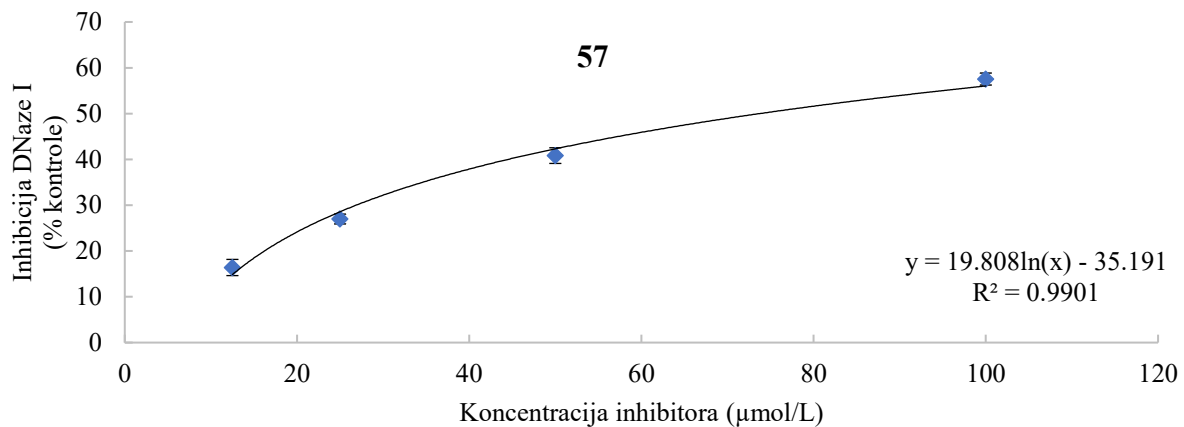
Slika 63. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 53.



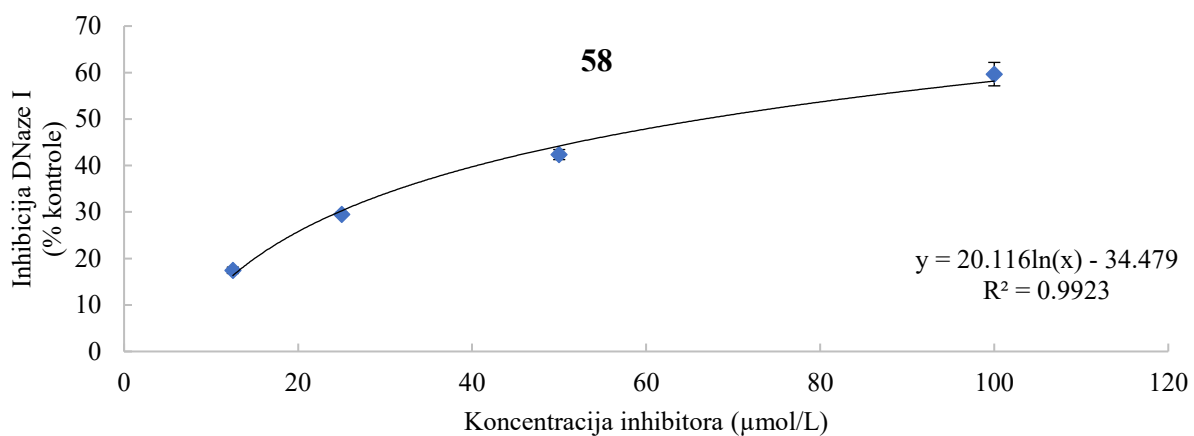
Slika 64. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 54.



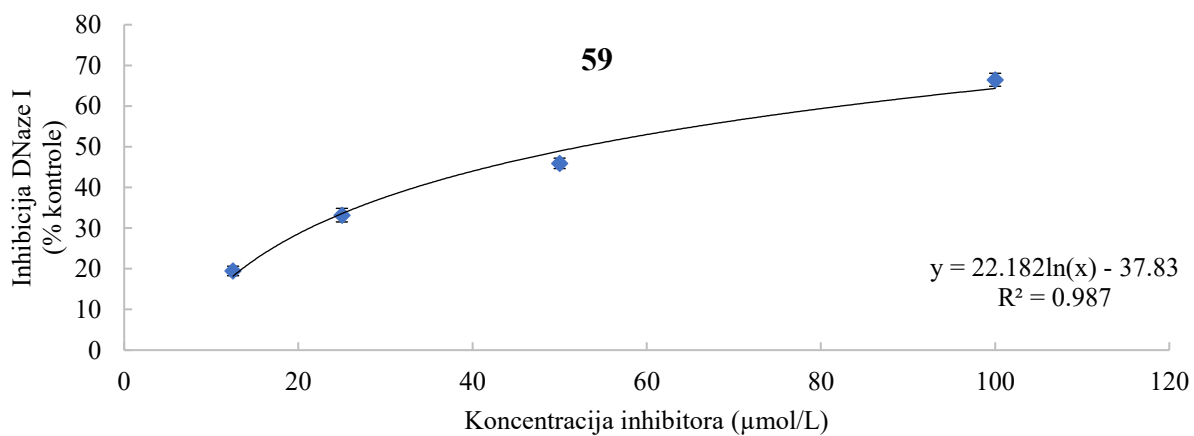
Slika 65. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 56.



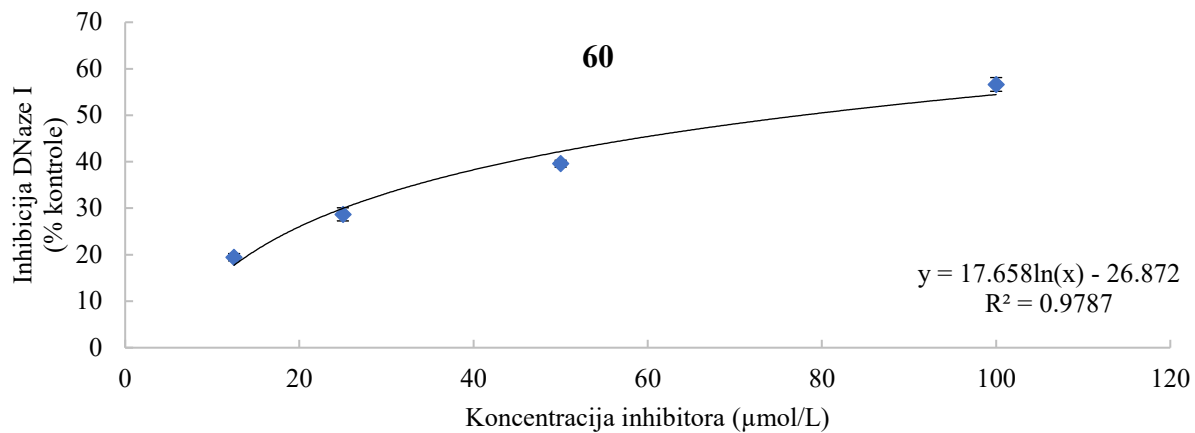
Slika 66. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 57.



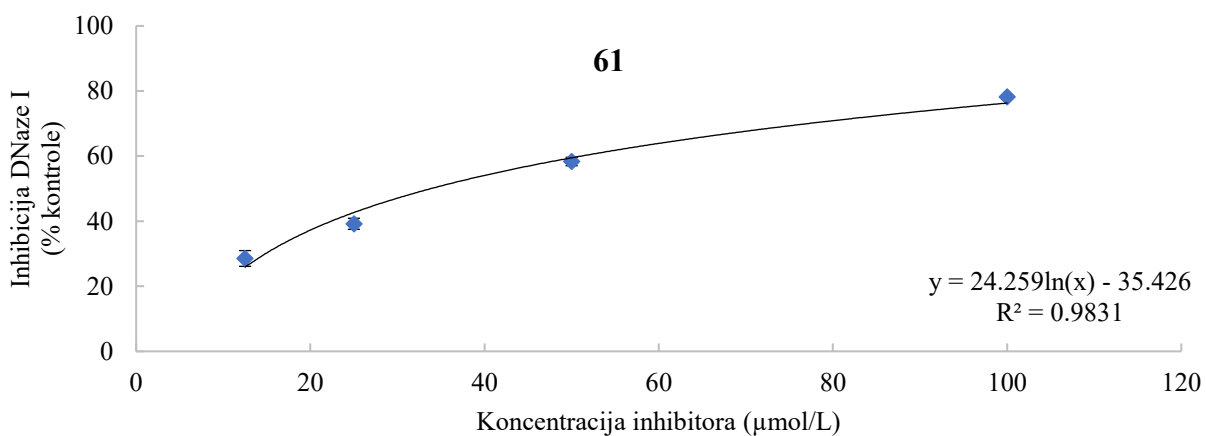
Slika 67. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 58.



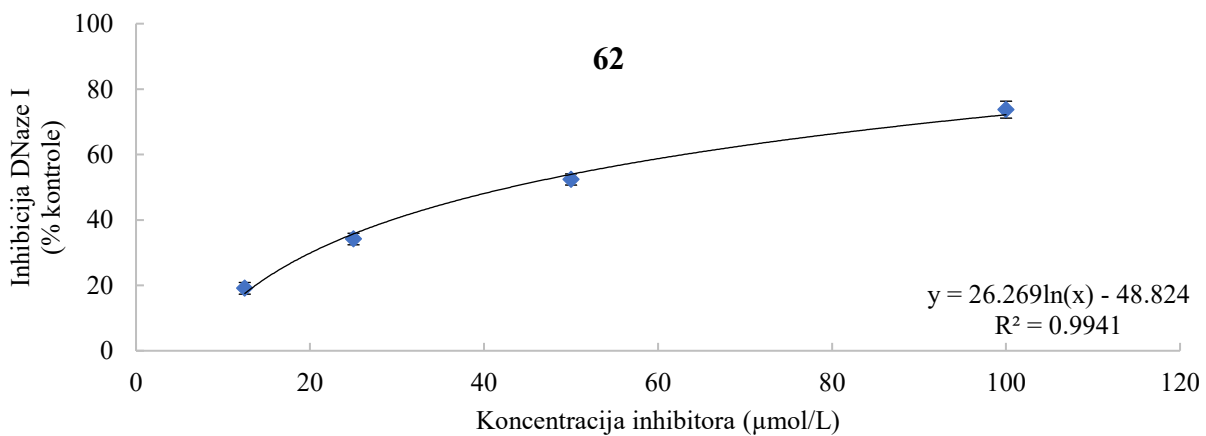
Slika 68. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 59.



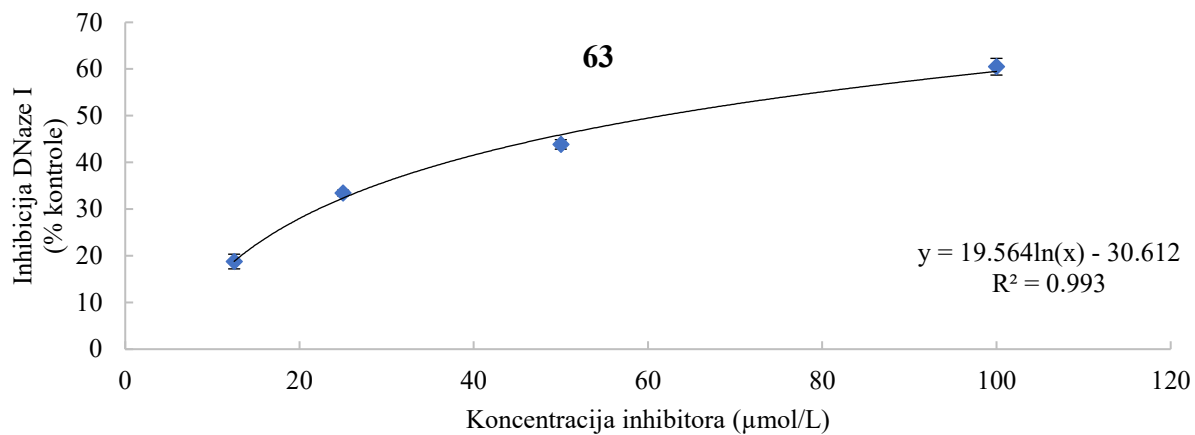
Slika 69. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **60**.



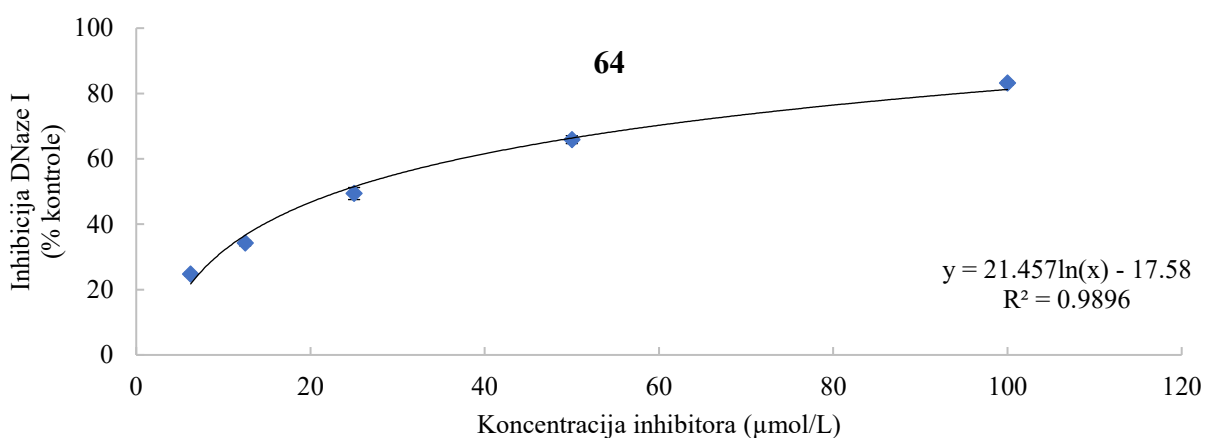
Slika 70. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **61**.



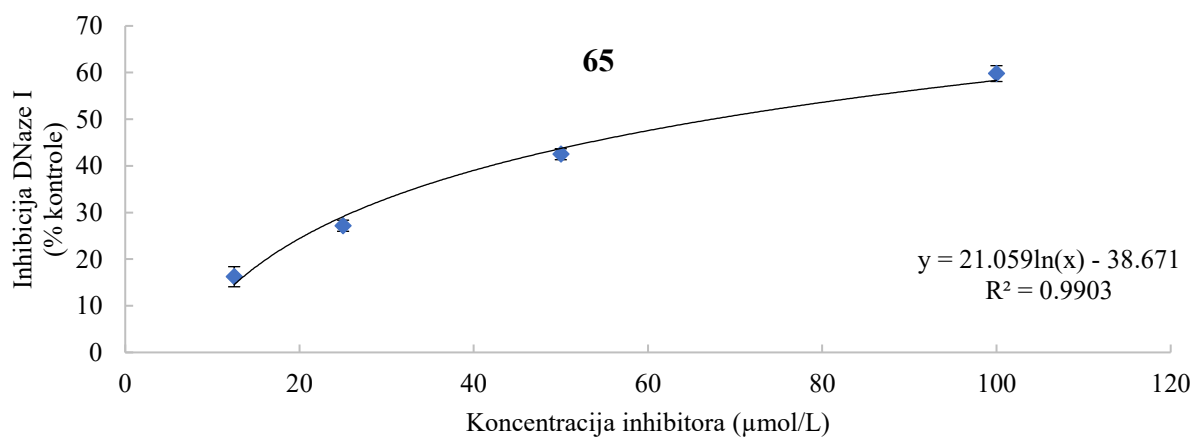
Slika 71. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **62**.



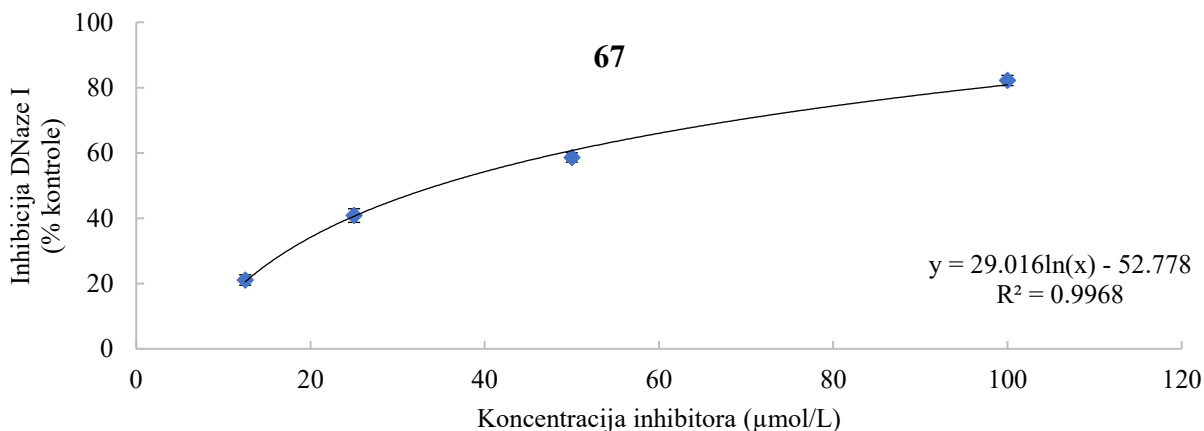
Slika 72. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 63.



Slika 73. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 64.

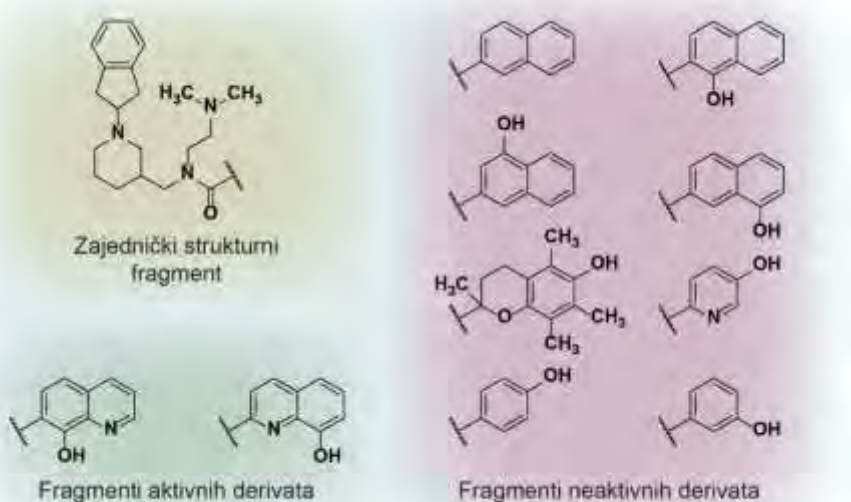


Slika 74. Inhibicija DNaze I jedinjenjem 65.



Slika 75. Inhibicija DNaze I jedinjenjem **67**.

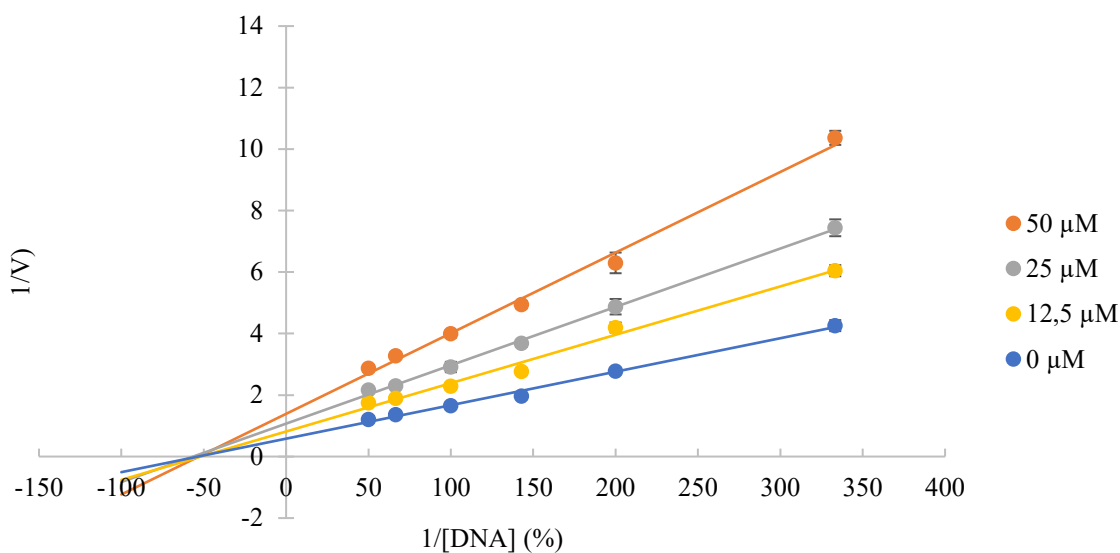
Analiza struktura ispitanih derivata (Tabele 10-12) jasno ukazuje da su 8-hidroksihinolin i nitroksolin (8-hidroksi-5-nitrohinolin) ključni strukturni fragmenti aktivnih jedinjenja. Derivati 8-hidroksihinolina **49** i **50** inhibirali su DNazu I, dok su njihovi strukturni analozi koji sadrže naftalen (**45**) i naftol (**46-48**) ostali neaktivni (Slika 76). Poređenjem parova **47** i **49**, odnosno **48** i **50**, koji poseduju hidroksilnu grupu u istoj poziciji bicikličnih aromatičnih sistema uviđa se značaj heterocikličnog hinolinskog jezgra. Dodatno, inhibicija DNaze I je izostala i među derivatima **74-77** koji predstavljaju strukturne analoge aktivnih jedinjenja **49** i **50**, ali umesto fragmenta 8-hidroksihinolina sadrže fragment hromana, piridina ili fenola (Slika 76) [Gajić i saradnici, 2022].



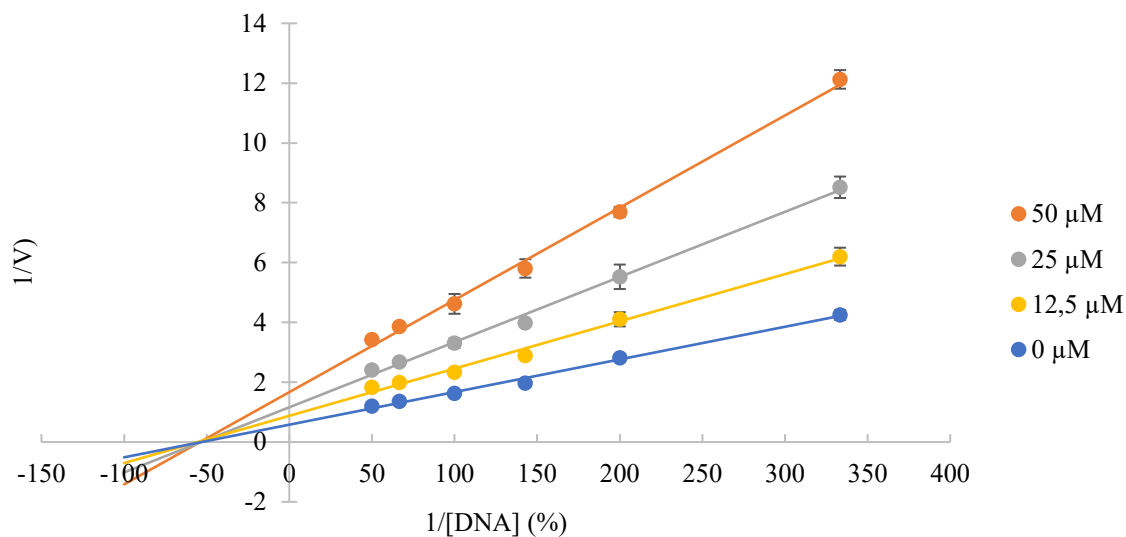
Slika 76. Aktivni derivati 8-hidroksihinolina i njihovi neaktivni analozi.

Nesupstituisani 8-hidroksihinolin i nitroksolin testirani su zajedno sa ostalim jedinjenjima (Tabela 11) u cilju provere hipoteze da fragment 8-hidroksihinolina jeste neophodan ali ne i dovoljan za inhibiciju DNaze I. Izostanak inhibicije pri koncentraciji od 100 μM ukazao je da strukturne karakteristike izuzev posedovanja 8-hidroksihinolinskog jezgra doprinose inhibiciji enzima. Daljom analizom strukturnih karakteristika ispitivanih derivata uočeno je da *N,N*-dimetilaminoetil supstituent amidne funkcionalne grupe dovodi do inhibicije DNaze I ukoliko je udružen sa 8-hidroksihinolinom (**49** i **50**), ali ne i ukoliko je udružen sa nitroksolinom (**68** i **69**). Slično, derivat **66** sa metoksietil supstituentom nije pokazao aktivnost, dok je njegov analog **25**, bez drugog supstituenta amidne funkcionalne grupe, inhibirao enzim. Primećeno je i da su derivati **53**, **54**, **56-62** sa malim supstituentom u poziciji 7 nitroksolinskog jezgra ispoljavali inhibitorni potencijal, sa izuzetkom jedinjenja **55**, koje je ostalo neaktivno [Gajić i saradnici, 2022].

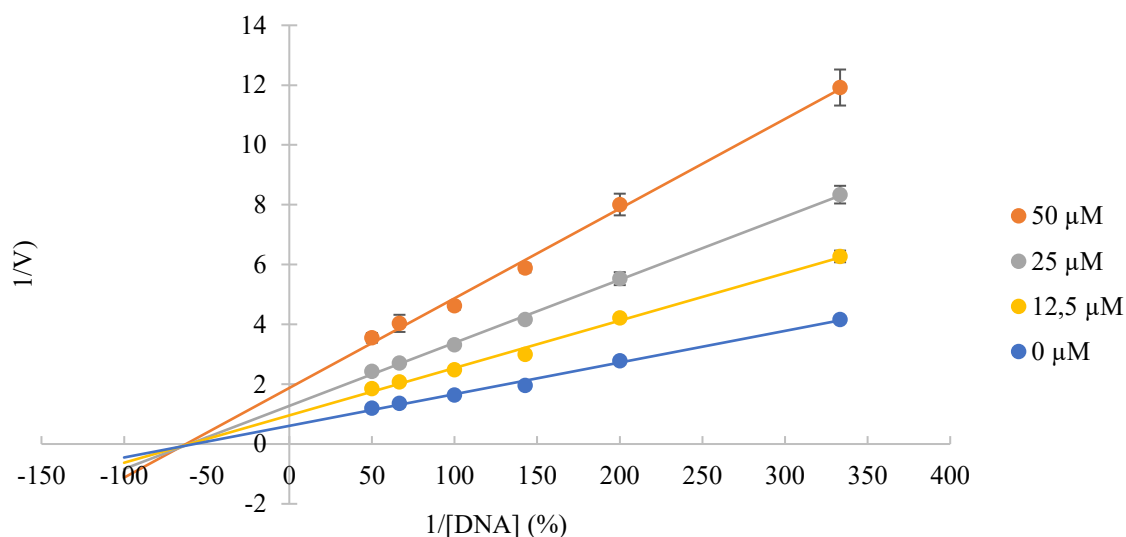
Na osnovu dobijenih rezultata inhibicije DNaze I, najpotentniji derivati **49**, **50** i **64** podvrgnuti su daljem ispitivanju kinetike inhibicije enzima. *Lineweaver-Burk*-ovi dijagrami (Slike 77-79) ukazuju na nekompetitivni tip inhibicije DNaze I.



Slika 77. *Lineweaver-Burk*-ov dijagram inhibicije DNaze I jedinjenjem **49** [Gajić i saradnici, 2022].



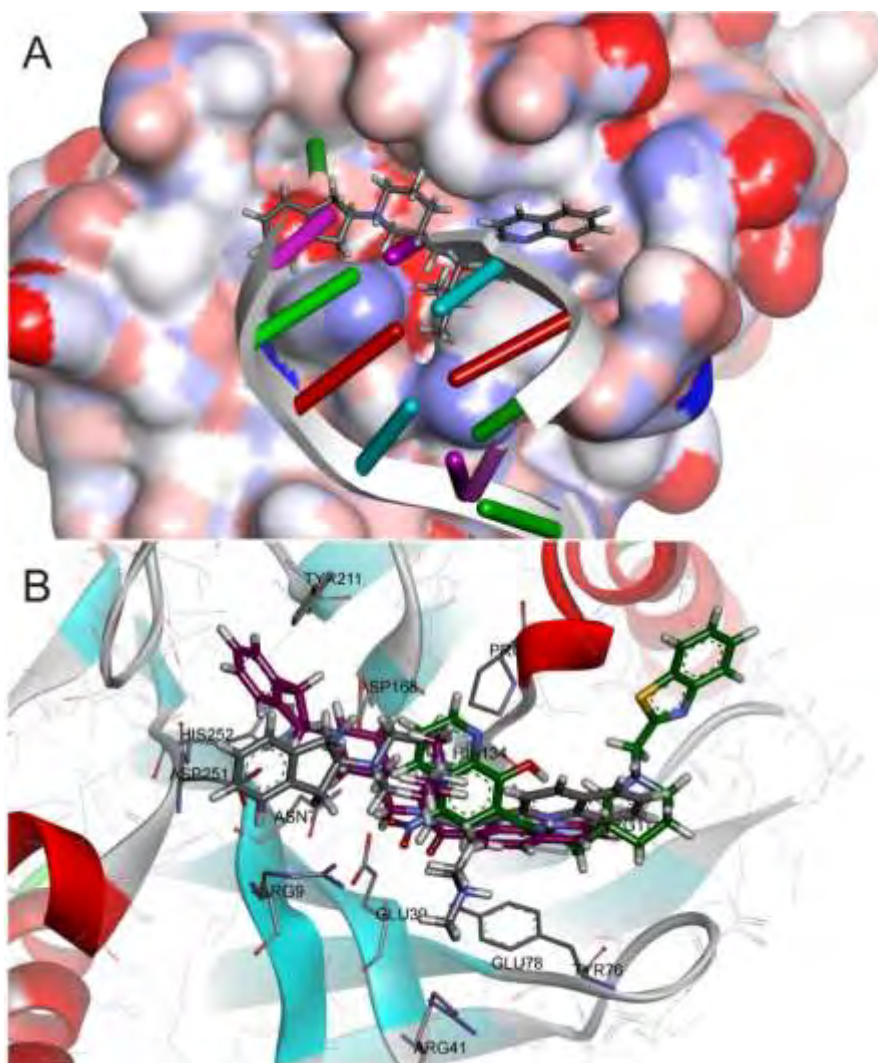
Slika 78. *Lineweaver-Burk*-ov dijagram inhibicije DNaze I jedinjenjem **50** [Gajić i saradnici, 2022].



Slika 79. *Lineweaver-Burk*-ov dijagram inhibicije DNaze I jedinjenjem **64** [Gajić i saradnici, 2022].

Molekularnim *docking*-om predviđeno je vezivanje selektovanih jedinjenja **49**, **50** i **64** na način kojim se ostvaruje delimično preklapanje sa DNK-vezujućim mestom (Slika 80). Preklapanje je omogućeno uklanjanjem DNK molekula iz kristalografske strukture DNaze I pre izvođenja simulacije molekularnog *docking*-a. Iako je vezivanje za aktivno mesto enzima odlika

kompetitivnih inhibitora, dobijeni rezultati razmatranih derivata 8-hidroksihinolina ukazuju da to nije slučaj. Nakon superponiranja jedinjenja u odgovarajućim konformacijama vezivanja sa uklonjenim oligonukleotidom iz kristalografske strukture (PDB kod: 2DNJ), uočava se preklapanje samo dela polinukleotidnog lanca DNK sa vezanim inhibitorima, dok kontakt ostatka DNK sa enzimom nije narušen. Predviđeni način vezivanja derivata 8-hidroksihinolina **49**, **50** i **64** za DNazu I u skladu je sa eksperimentalno dobijenim rezultatima o nekompetitivnom tipu inhibicije [Gajić i saradnici, 2022].



Slika 80. Rezultat molekularnog *docking*-a jedinjenja **49**, **50** i **64** za DNazu I (PDB kod: 2DNJ): A) Preklapanje najbolje rangirane orijentacije inhibitora **50** unutar vezujućeg mesta DNaze I sa DNK molekulom; B) Uvećani prikaz interakcija jedinjenja **49** (ljubičasto), **50** (sivo) i **64** (zeleno) sa aminokiselinским ostacima unutar vezujućeg mesta DNaze I [Gajić i saradnici, 2022].

4.5. Ispitivanje inhibicije 5-lipoksigenaze i određivanje afiniteta vezivanja odabranih jedinjenja za dopaminske D₂ i D₃ i histaminske H₃ i H₄ receptore

Imajući u vidu značaj BChE i CatB enzima za razvoj potencijalnih lekova usmerenih protiv Alchajmerove bolesti [Bautista-Aguilera i saradnici, 2017; Knez i saradnici, 2018; Košak i saradnici, 2018; Sosič i saradnici, 2018] i prekomernu ekspresiju DNaze I kao pretpostavljeni uzrok povećane učestalosti apoptoze u Alchajmerovoj bolesti [Schatzmann-Turhani i saradnici, 1999], ispitivanje selektovanih derivata 8-hidroksihinolina **49**, **50** i **64** prošireno je na enzim 5-lipoksigenazu i dopaminske D₂ i D₃ i histaminske H₃ i H₄ receptore koji su validni terapijski targeti u cilju modifikacije toka ili simptomatske terapije Alchajmerove bolesti [Cummings i saradnici, 2019]. Rezultati meta analize ukazuju na povezanost nivoa dopamina i broja dopaminskih receptora sa patofiziologijom Alchajmerove bolesti [Pan i saradnici, 2019]. Agonisti dopaminskih D₂/D₃ receptora, poput rotigotina, dovode do obnavljanja kortikalne plastičnosti [Koch i saradnici, 2014], dok antagonisti D₂/D₃ receptora, poput amisulprida, pronalaze primenu u tretmanu psihoza i agitacije pacijenata sa Alchajmerovom bolešću [Reeves i saradnici, 2017; Reeves i saradnici, 2018]. Nalik tome, antagonistički efekat na histaminskim H₃ receptorima predstavlja značajnu terapijsku strategiju, a H₃ receptor značajnu metu multi-target usmerenih liganada [Khanfar i saradnici, 2016; Sadek i saradnici, 2016; Bautista-Aguilera i saradnici, 2017; Bajda i saradnici, 2020; Łażewska i saradnici, 2021] usled svojih regulatornih efekata na oslobađanje acetilholina i drugih neurotransmitera. Iako je tačna uloga histaminskog H₄ receptora u kognitivnim procesima i dalje predmet diskusije [Provensi i saradnici, 2020], nedavni podaci ukazuju na neuroprotektivne efekte klobenpirita, agonista H₃ i parcijalnog agonista H₄ receptora, na oštećenja nervnog sistema uzrokovanim amiloidom-β [Stark, 2013; Patnaik i saradnici, 2018]. Nivoi enzima 5-LO i njenih nishodnih metabolita leukotriena ne samo što su povećani kod starijih pacijenata sa Alchajmerovom bolešću, već se dovode u vezu sa povećanom produkcijom amiloida-β [Firuzi i saradnici, 2008; Joshi i saradnici, 2015].

Selektovani inhibitori DNaze I, **49**, **50** i **64**, testirani su na pomenutim receptorima i enzimu. Rezultati ispitivanja ukazuju na izostanak afiniteta testiranih jedinjenja prema dopaminskim D₂, D₃ i histaminskim H₃ i H₄ receptorima, izuzev jedinjenja **50**, koje je pokazalo nizak afinitet sa K_i vrednošću od 13,7 μM prema humanom H₃ receptoru. Nijedno od ispitivanih jedinjenja nije pokazalo sposobnost inhibicije 5-lipoksigenaze [Gajić i saradnici, 2022].

4.6. Razmatranje ispitivanih 8-hidroksihinolina kao potencijalnih multifunkcionalnih liganada protiv Alchajmerove bolesti

Sposobnost inhibicije DNaze I derivatima 8-hidroksihinolina i nitroksolina je u skladu sa njihovim već potvrđenom multifunkcionalnom prirodom. Naime, jedinjenja **49**, **50** i **51** su selektivni inhibitori humane BChE, sa IC_{50} vrednostima od $13,8 \pm 0,6$ nM, $11,1 \pm 0,6$ nM i $41,8 \pm 1,4$ nM, koja takođe poseduju svojstva uklanjanja slobodnih radikala [Knez i saradnici, 2018]. Inhibicija BChE u terapiji Alchajmerove bolesti ima za cilj smanjenu razgradnju acetilholina, čija je snižena koncentracija u osnovi poremećene holinergetičke signalizacije i pratećih poremećaja kognitivnih funkcija [Liu i saradnici, 2019]. Derivati 8-hidroksihinolina **49** i **50** ispoljavaju sposobnost helatizacije Cu^{2+} jona i smanjuju intracelularnu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsti. Njihov protektivni efekat od toksičnih oštećenja uzrokovanim amiloidom- β je zabeležen na SH-SY5Y ćelijskoj liniji. Farmakokinetičkim ispitivanjem je utvrđeno da jedinjenja **49** i **50** nisu supstrati efluks transportera, dok je PAMPA-BBB eksperiment ukazao na njihovu sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru [Knez i saradnici, 2018]. Spektar potencijalno korisnih efekata derivata **50** u terapiji Alchajmerove bolesti može biti proširen njegovom sposobnošću vezivanja za histaminski H_3 receptor ($K_i = 13,7 \mu M$) [Gaić i saradnici, 2022], čija aktivnost reguliše oslobađanje acetilholina i drugih neurotransmitera [Bautista-Aguilera i saradnici, 2017]. Dodatno, najpotentniji inhibitor DNaze I među ispitivan supstancama, jedinjenje **64**, poseduje osobinu inhibicije enzimske aktivnosti katepsina B ($K_i = 12 \mu M \pm 1 \mu M$) [Sosić i saradnici, 2018]. Sposobnost dualne inhibicije DNaze I i CatB zabeležena je i kod derivata nitroksolina **54**, **56**, **57-59**, **62-63** [Mirković i saradnici, 2011; Sosić i saradnici, 2013; Sosić i saradnici, 2018], dok je jedinjenje **55** pored DNaze I i Cat B inhibiralo i humanu BChE [Knez i saradnici, 2018]. Katepsin B je lizosomalna cistein proteaza [Mirković i saradnici, 2011], koja obavlja ulogu β -sekretaze u obrađivanju amilod prekursorskog proteina, produkujući amiloid- β [Hook i saradnici, 2014; Lowry i Klegeris, 2018]. Sumirano, derivati 8-hidroksihinolina **49**, **50** i **51** pokazuju IC_{50} vrednosti ispod $35 \mu M$ prema DNazu I i ispod 50 nM prema hBChE, dok su derivati nitroksolina **55** i **64** inhibirali DNazu I i egzopeptidaznu aktivnost CatB sa IC_{50} vrednostima ispod 60 i ispod $20 \mu M$.

Među ispitivanim jedinjenjima posebno se izdvaja derivat 8-hidroksihinolina **50** po svojim osobinom multi-target usmerenog liganda sa potencijalnom primenom u terapiji Alchajmerove bolesti. Njegova sposobnost inhibicije BChE u nanomolarnom i DNaze I i H_3 receptora u mikromolarnom opsegu upotpunjeni su osobinama uklanjanja slobodnih radikala, helatizacije

metalnih jona, inhibicije intraćelijske ROS produkcije i agregacije amiloida- β uz povoljne farmakokinetičke osobine. Imajući u vidu sposobnost jedinjenja **50** da vrši modulaciju aktivnosti nekoliko dokazanih terapijskih targeta Alchajmerove bolesti, dodatno proširivanje spektra njegovog delovanja na DNazu I i histaminski H₃ receptor potencijalno može rezultirati aditivnim ili čak sinergističkim efektima protiv Alchajmerove bolesti [Gajic i saradnici, 2022].

5. ZAKLJUČAK

Doktorskom disertacijom „Inhibicija dezoksiribonukleaze I i ksantin oksidaze heterocikličnim jedinjenjima *in vitro*“ je sprovedeno ispitivanje ukupno 77 jedinjenja u testovima inhibicije aktivnosti enzima dezoksiribonukleaze I i ksantin oksidaze u poređenju sa referentnim inhibitorima kristal violetom i alopurinolom. Na osnovu rezultata sprovedenog ispitivanja su izvedeni sledeći zaključci:

- Od 14 ispitanih derivata 2-alkiliden i 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina sposobnost inhibicije DNaze I sa IC_{50} vrednostima nižim od 200 μM zabeležena je kod jedinjenja **1** ($IC_{50} = 162,63 \pm 16,56 \mu\text{M}$) i **6** ($IC_{50} = 67,94 \pm 5,99 \mu\text{M}$). U ispitivanoj seriji jedinjenje **6** je jedino inhibiralo aktivnost XO ($IC_{50} = 97,98 \pm 13,47 \mu\text{M}$), što ga čini jedinim do sada poznatim dualnim inhibitorom DNaze I i XO.
- Među 24 derivata 1-supstituisanih i 1,2-disupstituisanih-1,2,3,4-tetrahidroizohinolina četiri jedinjenja (**16**, **29**, **32** i **36**) je inhibiralo DNazu I sa IC_{50} vrednostima nižim od 200 μM , pri čemu je jedinjenje **16** bilo najaktivnije ($IC_{50} = 134,35 \pm 11,38 \mu\text{M}$). Sposobnost inhibicije XO sa IC_{50} vrednošću nižom od 150 μM je zabeležena jedino kod jedinjenja **30** ($IC_{50} = 135,72 \pm 2,71 \mu\text{M}$).
- Šesnaest (**49-51**, **53**, **54**, **56-65**, **67**) od ukupno 21 ispitivanog derivata 8-hidroksihinolina i nitroksolina inhibiralo je DNazu I sa IC_{50} vrednostima ispod 80 μM , dok su njihovi analozi izvedeni iz naftalena i naftola ostali neaktivni. Inhibitorni potencijali aktivnih jedinjenja su 5-15 puta viši u odnosu na referentni inhibitor kristal violet ($IC_{50} = 364,64 \pm 13,64 \mu\text{M}$). Kao najpotentniji inhibitor DNaze I pokazao se derivat nitroksolina *N*-((1-(benzo[d]tiazol-2-ilmetil)piperidin-3-il)metil)-8-hidroksi-5-nitrohinolin-7-carboksamid (**64**) ($IC_{50} = 23,33 \pm 3,36 \mu\text{M}$) i blisko je praćen derivatima 8-hidroksihinolina *N*-((1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)piperidin-3-il)metil)-*N*-(2-(dimetilamino)etil)-8-hidroksihinolin-2-karboksamidom (**50**) ($IC_{50} = 25,61 \pm 4,80 \mu\text{M}$) i *N*-((1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)piperidin-3-il)metil)-*N*-(2-(dimetilamino)etil)-8-hidroksihinolin-7-karboksamidom (**49**) ($IC_{50} = 30,58 \pm 7,39 \mu\text{M}$). Sposobnost inhibicije XO sa IC_{50} vrednošću nižom od 150 μM je izostala.

- Među najpotentnijim inhibitorima DNaze I (**49**, **50** i **64**) jedino jedinjenje **50** poseduje nizak afinitet vezivanja za histaminski H₃ receptor ($K_i = 13,7 \mu\text{M}$). Inhibicija 5-LO enzima i vezivanje ovih inhibitora za dopaminske D₂, D₃ i histaminski H₄ receptor nisu zabeleženi.
- Multifunkcionalna priroda ispitivanih derivata 8-hidroksihinolina i nitroksolina u vidu dualne inhibicije DNaze I i BChE (**49**, **50** i **51**), odnosno DNaze I i Cat B (**54**, **56**, **57-59**, **62-64**), ili čak sva tri enzima (**55**), u skladu je sa modernim pristupom u terapiji multifaktorijalnih neurodegenerativnih bolesti koji prednost daje lekovima sa dejstvom na veći broj targeta ili patoloških mehanizama.
- Na osnovu *Lineweaver-Burk*-ovih dijagrama je utvrđeno da jedini dualni inhibitor DNaze I i ksantin oksidaze, jedinjenje **6**, i tri najpotentnija inhibitora DNaze I, jedinjenja **49**, **50** i **64**, deluju kao nekompetitivni inhibitori DNaze I.
- Studijom molekularnog *docking*-a se predviđa da ispitivani inhibitori DNaze I najčešće stupaju u interakcije sa aminokiselinama odgovornim za hidrolizu fosfodiestarskih veza (I klasa) i helatizaciju jona dvovalentnih metala (II klasa), dok inhibitori XO ostvaruju veze sa katalitičkim i nekatalitičkim aminokiselinama. Simulacijom molekularne dinamike predviđena je stabilnost kompleksa ispitivanih jedinjenja i odgovarajućeg enzima.

Opšti zaključak ove doktorske disertacije je da 24 od ukupno 77 ispitanih heterocikličnih jedinjenja inhibira DNazu I. Derivati 8-hidroksihinolina i nitroksolina, jedinjenja **49**, **50** i **64**, predstavljaju ne samo najpotentnije inhibitore DNaze I obuhvaćene ovom disertacijom, već su ujedno i najpotentniji do sada pronađeni inhibitori DNaze I u formi malih sintetskih organskih molekula. Derivat 2,5-dialkiliden-4-oksotiazolidina, jedinjenje **6**, jedini je do sada identifikovani dualni inhibitor DNaze I i ksantin oksidaze. Izdvojena jedinjenja mogu poslužiti kao uzor za dizajn još efikasnijih inhibitora DNaze I ili dualnih inhibitora DNaze I i XO.

6. LITERATURA

ADMETlab, <http://www.swissadme.ch> (pristupljeno novembra 2020).

Agrawal N, Arya M, Kushwah P. Therapeutic voyage of synthetic and natural xanthine oxidase inhibitors. *Chem Biol Drug Des* 2023; 102: 1293-1307.

Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Noda K, Nishino T, Nishino T. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem* 1990; 265: 14170-14175.

Apostolov EO, Soultanova I, Savenka A, Bagandov OO, Yin X, Stewart AG, Walker RB, Basnakian AG. Deoxyribonuclease I is Essential for DNA Fragmentation Induced by Gamma Radiation in Mice. *Radiat Res* 2009; 172: 481-492.

Arakawa K, Kawai Y, Kumamoto T, Morikawa N, Yoshida M, Tada H, Kawaguchi R, Tanaguchi K, Miyamori I, Kominato Y, Kishi K. Serum deoxyribonuclease I activity can be used as a sensitive marker for detection of transient myocardial ischaemia induced by percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2005; 26: 2375-2380.

Bajda M, Łazewska D, Godyń N, Zareba P, Kuder K, Hagenow S, Łatka K, Stawarska E, Stark H, Kieć-Kononowicz K, Malawska B. Search for new multi-target compounds against Alzheimer's disease among histamine H₃ receptor ligands. *Eur J Med Chem* 2020; 185: 111785.

Baranovski AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human Deoxyribonucleases. *Biochem (Mosc)* 2004; 69: 725-742.

- Basnakian AG, Singh AM, Shah SV. Identification and expression of deoxyribonuclease (DNase) I alternative transcripts in the rat. *Gene* 2002; 289: 87-96.
- Basnakian AG, Apostolov EO, Yin X, Napirei M, Mannherz HG, Shah SV. Cisplatin Nephrotoxicity is Mediated by Deoxyribonuclease I. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 697-702.
- Bautista-Aguilera OM, Hagenow S, Palomino-Antolin A, Farré-Alins V, Ismaili L, Joffrin PL, Jimeno ML, Soukup O, Janočkov J, Kalinowsky L, Proschak E, Iriepa I, Moraleda I, Schwed JS, Martínez AR, López-Muñoz F, Chioua M, Egea J, Ramsay RR, Marco-contelles J, Stark H. Multitarget-Directed Ligands Combining Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibition with Histamine H₃R Antagonism for Neurodegenerative Diseases. *Angew Chem Int Ed* 2017; 56: 12765-12769.
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Enzymes: Basic Concepts and Kinetics*, in: *Biochemistry*. 9th ed. New York (NY): W. H. Freeman; 2019; 770-888.
- Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004; 555: 589-606.
- Bondžić BP, Džambaski Z, Kolarević A, Đorđević A, Anderluh M, Šmelcerović A. Synthesis and DNase I inhibitory properties of new benzocyclobutane-2,5-diones. *Future Med Chem* 2019; 11: 2415-2426.
- Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9: 195-217.
- Brus B, Košak U, Turk S, Pišlar A, Coquelle N, Kos J, Stojan J, Colletier JP, Gobec S. Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. *J Med Chem* 2014; 57: 8167-8179.

- Burmaoglu S, Ozcan S, Balcioglu S, Gencel M, Noma SAA, Essiz S, Ates B, Algul O. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of bischalcone derivatives as xanthine oxidase inhibitors and anticancer agents. *Bioorg Chem* 2019; 91: 103149.
- Cao B, Fang Y, Wu T, Liang F, Cheng Y, Salah M, Pan S, Xu X. Insights from multispectral and molecular docking investigation on the xanthine oxidase inhibition by 1,4-dicaffeoylquinic acid. *J Mol Sci* 2020; 1219: 128475.
- Chantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine Oxidoreductase-Catalyzed Reduction of Nitrite to Nitric Oxide: Insights Regarding Where, When and How. *Nitric Oxide* 2013; 34: 19-26.
- Chen C, Lü JM, Yao Q. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Med Sci Monit* 2016; 22: 2501-2512.
- Chen S, Zhang T, Wang J, Wang F, Niu H, Wu C, Wang S. Synthesis and evaluation of 1-hydroxy/methoxy-4-methyl-2-phenyl-1*H*-imidazole-5-carboxylic acid derivatives as non-purine xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2015; 103: 343-353.
- Cheng YC, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 3099-3108.
- Chhabra D, Nosworthy NJ, dos Remedios CG. The *N*-terminal fragment of gelsolin inhibits the interaction of DNase I with isolated actin, but not with the cofilin-actin complex. *Proteomics* 2007; 5: 3131-3136.
- Circu ML, Aw YT. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 749-762.
- Copeland RA, editor. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2013.

Corrêa MF, Reiner D, Fernandes GAB, Varela MT, Aranha CMSQ, Stark H, Fernandes JPS. Profiling of LINS01 compounds at human dopamine D₂ and D₃ receptors. *J Chem Sci* 2020; 132: 5.

Cummings J. Disease modification and neuroprotection in neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener* 2017; 6: 25.

Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimers Dis* 2019; 67: 779-794.

Desmond 2018, Desmond Molecular Dynamics System, version 2018.4, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2018.

Diana A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017; 7: 42717.

Dong J, Wang NN, Yao ZJ, Zhang L, Cheng Y, Ouyang D, Lu AP, Cao DS. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *J Cheminform* 2018; 10: 29.

Džambaski Z, Marković R, Kleinpeter E, Baranac-Stojanović M. 2-Alkylidene-4-oxothiazolidine S-oxides: synthesis and stereochemistry. *Tetrahedron* 2013; 69: 6436-6447.

Džambaski Z, Bondžić BP. Dehydrogenative C(sp³)-H bond functionalization of tetrahydroisoquinolines mediated by organic oxidants under mild conditions. *Org Biomol Chem* 2019; 17: 6420-6425.

Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10723-10728.

- Eulitz D, Mannherz HG. Inhibition of deoxyribonuclease I by actin is to protect cells from premature cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 1511-1521.
- Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258: 479-517.
- Fahmi T, Branch LD, Nima ZA, Jang DS, Savenka AV, Biris AS, Basnakian AG. Mechanism of graphene-induced cytotoxicity: Role of endonucleases. *J Appl Toxicol* 2017; 37: 1325-1332.
- Fahmi T, Wang X, Zhdanov DD, Islam I, Apostolov EO, Savenka AS, Basnakian AG. DNase I induces other endonucleases in kidney tubular epithelial cells by its DNA-degrading activity. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 8665.
- FDA 2019. FDA adds Boxed Warning for increased risk of death with gout medicine Uloric (febuxostat). Pristupljeno 25.01.2024.; Dostupno: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-adds-boxed-warning-increased-risk-death-gout-medicine-uloric-febuxostat>
- Firuzi O, Zhuo J, Chinnici CM, Wisniewski T, Praticò D. 5-Lipoxygenase gene disruption reduces amyloid- β pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2008; 22: 1169-1178.
- Frank A, Kiss DJ, Keserű GM, Stark H. Binding kinetics of cariprazine and aripiprazole at the dopamine D₃ receptor. *Sci Rep* 2018; 8: 12509.
- Gajić M, Džambaski Z, Ilić BS, Kocić G, Bondžić BP, Šmelcerović A. Synthesis and analysis of 4-oxothiazolidines as potential dual inhibitors of deoxyribonuclease I and xanthine oxidase. *Chem-Biol Interact* 2021a; 345: 109536.

- Gajić M, Ilić BS, Bondžić BP, Džambaski Z, Kojić VV, Jakimov DS, Kocić G, Šmelcerović A. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Derivatives as a Novel Deoxyribonuclease I Inhibitors. *Chem Biodivers* 2021b; 18: e2100261.
- Gajić M, Ilić BS, Bondžić BP, Džambaski Z, Filipović A, Kocić G, Šmelcerović A. Xanthine oxidase inhibitory properties of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives. *Acta Med Median* 2021c; 69: 48-55.
- Guérault M, Picot D, Abi-Ghanem J, Hartmann B, Baaden M. How Cations Can Assist DNase I in DNA Binding and Hydrolysis. *PLoS Comput Biol*, 2010; 6: e1001000.
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 774-797.
- Hellstein-Westing Y. Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. *Histochemistry* 1993; 100: 215-222.
- Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
- Hille R, Nishino T. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 1995; 9: 995-1003.
- Hit Dexter 2.0, <https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de/hitdexter> (pristupljeno januara 2021).
- Hook G, Yu J, Toneff T, Kindy M, Hook V. Brain Pyroglutamate Amyloid- β Produced by Cathepsin B and is Reduced by the Cystein Protease Inhibitor E64d, Representing a Potential Alzheimer's Disease Therapeutic. *J Alzheimers Dis* 2014; 41: 129-149.
- Hosoya T, Sasaki T, Hashimoto H, Sakamoto R, Ohashi T. Clinical efficacy and safety of topiroxostat in Japanese male hyperuricemic patients with or without gout: an exploratory, phase 2a, multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Pharm Ther* 2016; 41: 298-305.

- Huo Y, Dan X, Babbar M, Wie Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurobiol* 2019; 15: 565-581.
- Ichida K, Amaya Y, Okamoto K, Nishino T. Mutations Associated with Functional Disorder of Xanthine Oxidoreductase and Hereditary Xanthinuria in Humans. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 15476.
- Ilić BS, Kolarević A, Kocić G, Šmelcerović A. Ascorbic acid as DNase I inhibitor in prevention of male infertility. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 498: 1073-1077.
- Ilić BS, Gajić M, Bondžić BP, Džambaski Z, Kocić G, Šmelcerović A. Deoxyribonuclease I inhibitory properties, molecular docking and molecular dynamics simulations of 1-(Pyrrolidin-2-yl)propan-2-one derivatives. *Chem Biodivers* 2021; 18: e2000996.
- Jones SJ, Worrall AF, Connolly BA. Site-directed Mutagenesis of the Catalytic Residues of Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease I. *J Mol Biol* 1996; 264: 1154-1163.
- Joshi YB, Praticò D. The 5-lipoxygenase pathway: oxidative and inflammatory contributions to the Alzheimer's disease phenotype. *Front Cell Neurosci* 2015; 8: 43.
- Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K, Kumamoto T, Morikawa N, Masamura K, Tada H, Ito S, Hoshizaki H, Oshima S, Taniguchi K, Terasawa H, Miyamori I, Kishi K, Yasuda T. Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 2398-2400.
- Kelley EE. A new paradigm for XOR-catalyzed reactive species generation in the endothelium. *Pharmacol Rep* 2015; 67: 669-674.
- Khanfar MA, Affini A, Lutesenko K, Nikolic K, Butini S, Stark H. Multiple Targeting Approaches on Histamine H₃ Receptor Antagonists. *Front Neurosci* 2016; 10: 201.

- Kıbrız İE, Saçmacı M, Yıldırım İ, Abbas Ali Noma S, Taşkın Tok T, Ateş B. Xanthine oxidase inhibitory activity of new pyrrole carboxamide derivatives: *In vitro* and *in silico* studies. *Arch Pharm* 2018; 351: 1800165.
- Kim JS, Lee JH, Jeong WW, Choi DH, Cha HJ, Kim DH, Kwon JK, Park SE, Park JH, Cho HR, Lee SH, Park SK, Lee BJ, Min YJ, Park JW. Reactive oxygen species-dependant EndoG release mediates cisplatin-induced caspase-independent apoptosis in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 2008; 122:672-680.
- Koch G, Di Lorenzo F, Bonni V, Giacobbe V, Bozzali M, Caltagirone C, Martorana A. *Neuropsychopharmacol* 2014; 39: 2654-2661.
- Kolarević A, Ilić BS, Anastassova N, Mavrova ATs, Yancheva D, Kocić G, Šmelcerović A. Benzimidazoles as novel deoxyribonuclease I inhibitors. *J Cell Biochem* 2018; 119: 8937-8948.
- Kottke T, Sander K, Weizel L, Schneider EH, Seifert R, Stark H. Receptor-specific functional efficacies of alkyl imidazoles as dual histamine H₃/H₄ receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 2011; 654: 200-208.
- Knez D, Brus B, Coquelle N, Sosič I, Šink A, Brazzolotto X, Mravljak J, Colletier JP, Gobec S. Structure-based development of nitroxoline derivatives as potential multifunctional anti-Alzheimer agents. *Bioorg Med Chem* 2015; 23: 4442-4452.
- Knez D, Coquelle N, Pišlar A, Žakelj S, Jukič M, Sova M, Mravljak J, Nachon F, Brazzolotto X, Kos J, Colletier JP, Gobec S. Multi-target-directed ligands for treating Alzheimer's disease: Butyrylcholinesterase inhibitors displaying antioxidant and neuroprotective activities. *Eur J Med Chem* 2018; 156: 598-617.

- Knez D, Sosič I, Pišlar A, Mitrović A, Jukič M, Kos J, Gobec S. Biological Evaluation of 8-Hydroxyquinolines as Multi-Target Directed Ligands for Treating Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2019; 16: 801-814.
- Kolarević A, Ilić BS, Anastassova N, Mavrova AT, Yancheva D, Kocić G, Šmelcerović A. Benzimidazoles as novel deoxyribonuclease I inhibitors. *J Cell Biochem* 2018; 119: 8937-8947.
- Kolarević A, Ilić BS, Kocić G, Džambaski Z, Šmelcerović A, Bondžić BP. Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 4-thiazolidinone derivatives. *J Cell Biochem* 2019a; 120: 264-274.
- Kolarević A, Pavlović A, Djordjević A, Lazarević J, Savić S, Kocić G, Anderluh M, Smelcerović A. Rutin as deoxyribonuclease I inhibitor. *Chem Biodivers* 2019b; 16: e1900069.
- Košak U, Brus B, Gobec S. Straightforward synthesis of orthogonally protected piperidin-3-ylmethanamine and piperidin-4-ylmethanamine derivatives. *Tetrahedron Lett* 2014; 55: 2037-2039.
- Košak U, Brus B, Knez D, Šink R, Žakelj S, Trontelj J, Pišlar A, Šlenc J, Gobec M, Živin M, Tratnjek L, Perše M, Sałat K, Podkova A, Filipek B, Nachon F, Brazzolotto X, Więckowska A, Malawska B, Stojan J, Milinarič Raščanin I, Kos J, Coquelle N, Colletier JP, Gobec S. Development of an *in-vivo* active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. *Sci Rep* 2016; 6: 39495.
- Košak U, Knez D, Coquelle N, Brus B, Pišlar A, Nachon F, Brazzolotto X, Kos J, Colletier JP, Gobec S. *N*-Propargylpiperidines with naphthalene-2-carboxamide or naphthalene-2-sulfonamide moieties: Potential multifunctional anti-Alzheimer's agents. *Bioorg Med Chem* 2017; 25: 633-645.

- Košak U, Brus B, Knez D, Žakelj S, Trontelj J, Pišlar A, Šink R, Jukič M, Živin M, Podkova A, Nachon F, Brazzolotto X, Stojan J, Kos J, Coquelle N, Sałat K, Colletier JP, Gobec S. The Magic of Crystal Structure-Based Inhibitor Optimization: Development of a Butyrylcholinesterase Inhibitor with Picomolar Affinity and in Vivo Activity. *J Med Chem* 2018; 61: 119-139.
- Košak U, Strašek N, Knez D, Jukič M, Žakelj S, Zahirović A, Pišlar A, Brazzolotto X, Nachon F, Kos J, Gobec S. N-alkylpiperidine carbamates as potential anti-Alzheimer's agents. *Eur J Med Chem* 2020; 197: 112282
- Kretschmer SBM, Woltersdorf S, Rödl CB, Vogt D, Häfner AK, Steinhilber D, Stark H, Hofmann B. Development of novel aminothiazole-comprising 5-LO inhibitors. *Future Med Chem* 2016; 8; 149-164.
- Kumar R, Joshi G, Kler H, Kalra S, Kaur M, Arya R. Towards an Understanding of Structural Insights of Xanthine and Aldehyde Oxidases: An Overview of their Inhibitors and Role in Various Diseases. *Med Res Rev* 2018; 38: 1073-1125.
- Kunitz M. Crystalline Desoxyribonuclease; Isolation and general properties; Spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol* 1950; 33: 349-362.
- Lauková L, Konečná B, Janovičová L, Vlková B, Celec P. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. *Biomolecules* 2020; 10: 1036.
- Łażewska D, Zaręb P, Godyń N, Doroz-Płonka A, Frank A, Reiner-Link D, Bajda M, Stry D, Mogilski S, Olejarz-Maciej A, Kaleta M, Stark H, Malawska B, Kieć-Kononowicz K. *Molecules* 2021; 26: 3580.

- Lee J. Tigulixostat, Phase 3 Study, Placebo Controlled in Gout Patients (EURELIA1). ClinicalTrials.gov identifier: NCT05586958. Objavljeno oktobra 2022, pristupljeno februara 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05586958>
- Lee J. Tigulixostat, Phase 3 Study, Allopurinol Controlled in Gout Patients (EURELIA2). ClinicalTrials.gov identifier: NCT05586971. Objavljeno maja 2023, pristupljeno februara 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05586971>
- Li GH, Shi Y, Chen Y, Sun M, Sader S, Maekawa Y, Arab S, Dawood F, Chen M, De Couto G, Liu Y, Fukuoka M, Yang S, Shi MD, Kirshenbaum LA, McCulloch CA, Lui P. Gelsolin regulates cardiac remodeling after myocardial infraction through DNase I-mediated apoptosis. *Circ Res* 2009; 104: 896-904.
- Li K, van Delft MF, Dewson G. Too much death can kill you: Inhibiting intrinsic apoptosis to treat disease. *EMBO J* 2021; 40: e107341.
- Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95-99.
- Li M, Yu Y; Liu J, Chen Z, Cao S. Investigation of the interaction between benzaldehyde thiosemicarbazone compounds and xanthine oxidase. *J Mol Struct* 2018; 1159: 23-32.
- Li P, Tian Y, Zhai H, Deng F, Xie M, Zhang X. Study on the activity of non-purine xanthine oxidase inhibitor by 3D-QSAR modeling and molecular docking. *J Mol Struct* 2013; 1051: 56-65.
- Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Investig J Tech Meth Pathol* 1999; 79: 967-974.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* 1998; 23: 3-25.

Liu K, Kokubo H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations: A cross-docking study. *J Chem Inf Model* 2017; 57: 2514-2522.

Liu PP, Xie Yi, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* 2019; 4: 2019.

Lopina OD. Enzyme Inhibitors and Activators, in: Senturk M, editor. *Enzyme Inhibitors and Activators*. IntechOpen, Rijeka, Croatia: 2017; 233-257.

Lowry JR, Klegeris A. Emerging roles of microglial cathepsins in neurodegenerative disease. *Brain Res Bull* 2018; 139: 144-156.

Maik N, Dhiman O, Khatkar A. Mechanistic approach towards interaction of newly synthesized Hesperidin derivatives against xanthine oxidase. *Int J Biol Macromol* 2019; 135: 864-876.

Mannherz HG, Peitsch MC, Zanotti S, Paddenberg R, Polzar B. A new function for an old enzyme: the role of DNase I in apoptosis. *Curr Top Microbiol* 1995; 198: 161-174.

Mao Q, Dai X, Xu G, Su Y, Zhang B, Liu D, Wang S. Design, synthesis and biological evaluation of 2-(4-alkoxy-3-cyano)phenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid derivatives as novel xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2019; 181: 111558.

Marković A, Živković A, Atanasova M, Doytchinova I, Hofmann B, George S, Kretschmer S, Rödl C, Steinhilber D, Stark H, Šmelcerović A. Thiazole derivatives as dual inhibitors of deoxyribonuclease I and 5-lipoxygenase: A promising scaffold for the development of neuroprotective drugs. *Chem-Biol Interact* 2023; 381: 110542.

- Marković R, Baranac M, Džambaski Z, Stojanović M, Steel PJ. High regioselectivity in the heterocyclization of β -oxonitriles to 4-oxothiazolidines: X-ray structure proof. *Tetrahedron* 2003; 59: 7803-7810.
- Marković R, Rašović A, Baranac M, Stojanović M, Steel PJ, Jovetić S. Thionation of *N*-methyl- and *N*-unsubstituted thiazolidine enaminones. *J Serb Chem Soc* 2004a; 69: 909-918.
- Marković R, Baranac M, Džambaski Z. Facile rearrangement of push-pull 5-substituted 4-oxothiazolidines induced by pyridinium hydrobromide perbromide under homogeneous reaction conditions. *J Serb Chem Soc* 2004b; 69: 239-245.
- Martínez Valle F, Balad E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 359-363.
- Mavrova AT, Dimov S, Yancheva D, Kolarević A, Ilić BS, Kocić G, Šmelcerović A. Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidines. *Bioorg Chem* 2018; 80: 693-705.
- Meden A, Knez D, Jukič M, Brazzolotto X, Gršič M, Pišlar A, Zahirović A, Kos J, Nachon F, Svete J, Gobec S, Grošelj U. Tryptophan-derived butyrylcholinesterase inhibitors as promising leads against Alzheimer's disease. *Chem Commun* 2019; 55: 3765-3768.
- Meden A, Knez D, Malikowska-Racia N, Brazzolotto X, Nachon F, Svete J, Sałat K, Grošelj U, Gobec S. Structure-activity relationship study of tryptophan-based butyrylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2020; 208: 112766.
- Mirković B, Renko M, Turk S, Sosič I, Jevnikar Z, Obermajer N, Turk D, Gobec S, Kos J. Novel Mechanism of Cathepsin B Inhibition by Antibiotic Nitroxoline and Related Compounds. *ChemMedChem* 2011; 6: 1351-1356.

MOE, Molecular Operating Environment 2019.0101, Chemical Computing Group ULC, Montreal, QC, Canada.

Morrison SS, Dawson JF. A high-throughput assay shows that DNase-I binds actin monomers and polymers with similar affinity. *Anal Biochem* 2007; 364: 159-164.

Napirei M, Basnakian AG, Apostolov EO, Mannherz HG. Deoxyribonuclease 1 Aggravates Acetaminophen-Induced Liver Necrosis in Male CD-1 Mice. *Hepatology* 2006; 43: 297-305.

Nishino T. The Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase and Role of the Enzyme in Reperfusion Injury. *J Biochem* 1994; 116: 1-6.

Nishino T, Nishino T. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem* 1997; 272: 29859-29864.

Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J* 2008; 275: 3278-3289.

OEDocking 3.0.1., OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM, USA.

Oefner C, Suck D. Crystallographic refinement and structure of DNase I at 2 Å resolution. *J Mol Biol* 1986; 192: 605-632.

Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Pai EF, Nishino T. Mechanism of Inhibition of Xanthine Oxidoreductase by Allopurinol: Crystal Structure of Reduced Bovine Milk Xanthine Oxidoreductase Bound with Oxipurinol. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 2008; 27: 888-893.

- Okamoto K, Kusano T, Nishino T. Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Curr Pharm Design* 2013; 19: 2606-2614.
- Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R, Ruccetti A. DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2001; 31: 743-751.
- Oliveri M, Daga A, Lunardi C, Navone R, Millo R, Puccetti A. DNase I behaves as transcription factor which modulates Fas expression in human cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 273-279.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu Rev Pharmacol* 2007; 47: 143-183.
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 87-114.
- Pan CQ, Ulmer JS, Herzka A, Lazarus RA. Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: Implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci* 1998; 7: 628-636.
- Pan X, Kaminga AC, Wen SW, Wu X, Acheampong K, Liu A. Dopamine and Dopamine Receptors in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci* 2019; 11: 175.
- Patnaik R, Sharma A; Skaper SD, Muresanu DF, Lafuente JV, Castellani RJ, Noyari A, Sharma HS. Histamine H3 Inverse Agonist BF 2649 or Antagonist with Partial H4 Agonist Activity Clobenpropit Reduces Amyloid Beta Peptide-Induced Brain Pathology in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2018; 55: 312-321.

Pauff JM, Zhang J, Bell CE, Hille R. Substrate orientation in xanthine oxidase: crystal structure of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine. *J Biol Chem* 2008; 283: 4818-4824.

Peitsch MC, Pozlar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 1993; 12: 371-377.

Perutz MF, Gronenborn AM, Clore GM, Fogg JH, Shih DT. The pK_a Values of Two Histidine Residues in Human Haemoglobin, the Bohr Effect, and the Dipole Moments of α -Helices. *J Mol Biol* 1985; 183: 491-498.

Petreski T, Ekart R, Hojs R, Bevc S. Hyperuricemia, the hearth, and the kidneys – to treat or not to treat? *Renal Failure* 2020; 42: 978-986.

Provensi G, Costa A, Izquierdo I, Blandina P, Passani MB. Brain histamine modulates recognition memory: possible implications in major cognitive disorders. *Brit J Pharmacol* 2020; 177: 539-556.

Rask-Andersen M, Sällman Almén M, Schiöth HB. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Disc* 2011; 10: 579-590.

Radi R, Rubbo H, Bush K, Freeman BA. Xanthine Oxidase Binding to Glycosaminoglycans: Kinetics and Superoxide Dismutase Interactions of Immobilized Xanthine Oxidase-Heparin Complexes. *Arch Biochem Biophys* 1997; 339: 125-135.

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 2977-2992.

Reeves S, McLachlan E, Bertrand J, D’Antonio F, Brownings S, Nair A, Greaves S, Smith A, Taylor D, Dunn J, Marsden P, Kessler R, Howard R. Therapeutic window of dopamine D2/3 receptor occupancy to treat psychosis in Alzheimer’s disease. *Brain* 2017; 140: 1117-1127.

Reeves S, Eggleston K, Cort E, McLachlan E, Brownings S, Nair A, Greaves S, Smith A, Dunn J, Marsden P, Kessel R, Taylor D, Bertrand J, Howard R. Therapeutic D2/3 receptor occupancies and response with low amisulpride blood concentrations in very late-onset schizophrenia-like psychosis (VLOSLP). *Int J Geriatr Psych* 2018; 33: 396-404.

Rufer AC. Drug discovery for enzymes. *Drug Discov Today* 2021; 26: 875-886.

Ruseva N, Sbirikova-Dimitrova H, Atanasova M, Marković A, Šmelcerović Ž, Šmelcerović A, Bakalova A, Cherneva E. Synthesis and DNase I Inhibitory Properties of New Squaramides. *Molecules* 2023a; 28: 538.

Ruseva N, Atanasova M, Sbirikova-Dimitrova H, Marković A, Šmelcerović Ž, Šmelcerović A, Cherneva E, Bakalova A. Chloro-substituted pyridine squaramates as new DNase I inhibitors: Synthesis, structural characterization, *in vitro* evaluation and molecular docking studies. *Chem-Biol Interact* 2023b; 386: 110772.

Sadek B, Saad A, Sadeq A, Jalal F, Stark H. Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behav Brain Res* 2016; 312: 415-430.

Samejima K, Earnshaw WC. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2005; 6: 677-688.

Sander T, Freyss J, von Korff M, Rufener C. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J Chem Inf Model* 2015; 55: 460-473.

Schäfer P, Scholtz SR, Gimadutdinow O, Cymerman IA, Bujnicki JM, Ruiz-Carrillo A, Pingoud A, Meiss G. Structural and Functional Characterization of Mitochondrial EndoG, a Sugar Non-specific Nuclease which Plays an Important Role During Apoptosis. *J Mol Biol* 2004; 338: 217-228,

Schatzmann-Turhani D, Labudova O, Yeghiazaryan K, Rink H, Hauser E, Cairns N, Lubec G. Overexpression of DNase I in brain of patients with Down Syndrome. *Journal of Neural Transmission Supplement* 1999; 57: 353-361.

Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 91898-9192.

Shalom R, Rimborth S, Rozenman D, Markel A. Allopurinol-Induced Recurrent DRESS Syndrome: Pathophysiology and Treatment. *Renal Failure* 2008; 30: 327-329.

Shi A, Wang D, Wang H, Wu Y, Tian H, Guan Q, Bao K, Zhang W. Synthesis and bioevaluation of 2-phenyl-5-methyl-2*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid/ carbohydrazide derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *RCS Adv* 2016; 6: 114879.

Shi A, Zhang L, Wang H, Wang S, Yang M, Guan Q, Bao K, Zhang W. Design, synthesis and bioevaluation of 2-mercapto-6-phenylpyrimidine-4-carboxylic acid derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2018; 155: 590-595.

Shi C, Zhou Z, Chi X, Xiu S, Yi X, Jiang Z, Chen R, Zhang L, Liu Z. Recent advances in gout drugs. *Eur J Med Chem* 2023; 245: 114890.

Singh A, Singh K, Sharma A, Kaur K, Chadha R, Bedi PMS. Past, present and future of xanthine oxidase inhibitors: design strategies, structural and pharmacological insights, patents and clinical trials. *RCS Med Chem* 2023; 14: 2155.

Sinha R, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 2013; 87: 1157-1180.

Smelcerovic Z, Veljkovic A, Kocic G, Yancheva D, Petronijevic Z, Anderluh M, Smelcerovic A. Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Chem-Biol Interact* 2015; 229: 73-81.

- Smelcerovic A, Zivkovic A, Ilic BS, Kolarevic A, Hofmann B, Steinhilber D, Stark H. 4-(4-Chlorophenyl)thiazol-2-amines as pioneers of potential neurodegenerative therapeutics with anti-inflammatory properties based on dual DNase I and 5-LO inhibition. *Bioorg Chem* 2020; 95: 103528
- Song JK, Choi SP, Kim TH, Jung CK, Lee JY, Jung SH, Kim GT. Design and synthesis of novel 2-(indol-5-yl)thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25: 1254-1258.
- Song JK, Jang JW, Kim TH, Park H, Park WS, Jung SH, Kim GT. Structure-based design and biological evaluation of novel 2-(indol-2-yl) thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2016; 26: 950-954.
- Sosič I, Mirković B, Arenz K, Štefane B, Kos J, Gobec S. Development of New Cathepsin B Inhibitors: Combining Bioisosteric Replacements and Structure-Based Design To Explore the Structure–Activity Relationships of Nitroxoline Derivatives. *J Med Chem* 2013; 56(2): 521-533.
- Sosič I, Mitrović A, Ćurić H, Knez D, Brodnik Žugelj H, Štefane B, Kos J, Gobec S. Cathepsin B inhibitors: Further exploration of the nitroxoline core. *Bioorg Med Chem Lett* 2018; 28: 1239-1247.
- Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase – conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.
- Stark H. The histamine H₄ receptor story, in Stark H, editor: *Histamine H₄ receptor: A novel drug target for immunoregulation and inflammation*, Versita - De Gruyter, London/UK, 2013.

- Stork C, Chen Y, Šícho M, Kirchmair J. Hit Dexter 2.0: Machine-learning models for the prediction of frequent hitters. *J Chem Inf Model* 2019; 59: 1030-1043.
- Suck E. DNA Recognition by DNase I. *J Mol Recognit* 1994; 7: 65-70.
- SwissADME, <http://www.swissadme.ch> (pristupljeno januara 2021).
- Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, Nakajima T, Nakashima Y, Mori S, Hoshino T, Kishi K. Mammalian Deoxyribonucleases I Are Classified into Three Types: Pancreas, Parotid, and Pancreas–Parotid (Mixed), Based on Differences in Their Tissue Concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 481-484.
- Tan A. Novel 1,2,3-triazole compounds: Synthesis, In vitro xanthine oxidase inhibitory activity, and molecular docking studies. *J Mol Struct* 2020; 1211: 128060.
- Terkeltaub R, Lee J, Min J, Shin S, Saag KG. Serum Urate–Lowering Efficacy and Safety of Tigulixostat in Gout Patients With Hyperuricemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Finding Trial. *Arthritis Rheumatol* 2023; 75: 1275-1284.
- Thiyagarajan D, Rekvig OP, Seredkina N. TNF α amplifies DNaseI expression in renal tubular cells while IL-1 β promotes nuclear DNaseI translocation in an endonuclease-inactive form” *PLoS One* 2015; 10: e0129485.
- Thiyagarajan D, Pedersen HL, Serdekina N, Horvei KD, Arranz L, Sonneveld R, Nijenhuis T, van der Vlag J, Rekvig OP. IL-1 β Promotes a new function of DNase I as a transcription factor for the Fas receptor gene. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6: 7.
- Thompson CB. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267. 1456-1462.
- Van Cruchten S, Van den Broeck W. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002, 31: 214-223.

- Vlako M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- Wan Y, Zou B, Zeng H, Zhang L, Chen M, Fu G. Inhibitory effect of verbascoside on xanthine oxidase activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016; 93: 609-614.
- Waud WR, Rajagopalan KV. Purification and properties of the NAD⁺-dependent (Type D) and O₂-dependent (Type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1976; 172: 354-364.
- White WB, Saag KG, Becker MA, Borer JS, Gorelick PB, Whelton A, Hunt B, Castillo M, Gunawardhana L. Cardiovascular Safety of Febuxostat or Allopurinol in Patients with Gout. *N Engl J Med* 2018; 378: 1200-1210.
- Xu P, Zhu XL, Huecksteadt T, Brothman AR, Hoidal JR. Assignment of human xanthine dehydrogenase gene to chromosome 2p22. *Genomics* 1994; 23: 289-291.
- Xu P, Hueckstead T, Hoidal JR. Molecular cloning and characterization of human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics* 1996; 34: 173-180.
- Xu X, Deng L, Nie L, Chen Y, Liu Y, Xie R, Li Z. Discovery of 2-phenylthiazole-4-carboxylic acid, a novel and potent scaffold as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2019; 29: 525-528.
- Yagiz G, Noma SAA, Altundas A, Al-khafaji K, Taskin-Tok T, Ates B. Synthesis, inhibition properties against xanthine oxidase and molecular docking studies of dimethyl *N*-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylate and (*N*-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole-4,5-diyl)dimethanol derivatives. *Bioorg Chem* 2021; 108: 104654.

- Yao M, Keogh A, Spratt P, dos Remedios CG, Kießling PC, Elevated DNase I Levels in Human Idiopathic Dilated Cardiomyopathy: an Indicator of Apoptosis? *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 95-101.
- Yasuda T, Awazu S, Sato W, Iida R, Tanaka T, Kishi K, Human genetically polymorphic deoxyribonuclease: Purification, characterization, and multiplicity of urine deoxyribonuclease I. *J Biochem* 1990; 108: 393-398.
- Yasuda T, Nadano D, Iida R, Takeshita H, Lane SA, Callen DF, Kishi K. Chromosomal assignment of the human deoxyribonuclease I gene, DNASE1 (DNL1), to band 16p13.3 using the polymerase chain reaction. *Cytogenet Cell Genet* 1995a; 70: 221-223.
- Yasuda T, Kishi K, Yanagawa Y, Yoshida A. Structure of the human deoxyribonuclease I (DNase I) gene: identification of the nucleotide substitution that generates its classical genetic polymorphism. *Ann Hum Genet* 1995b; 59: 1-15.
- Yin X, Apostolov EO, Shah SV, Wang X, Bogdanov KV, Buzder T, Stewart AG, Basnakian AG. Induction of Renal Endonuclease G by Cisplatin Is Reduced in DNase I-Deficient Mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2544-2553.
- Yusof F, Mehde AA, Mehdi WA, Raus RA, Ghazali H, Rahman AA, Effects of Nephrolithiasis on Serum DNase (Deoxyribonuclease I and II) Activity and E3 SUMO-Protein Ligase NSE2 (NSMCE2) in Malaysian Individuals. *Biomed Environ Sci* 2015; 28:660-665.
- Zhang B, Dai X, Bao Z, Mao Q, Duan Y, Yang Y, Wang S. Targeting the subpocket in xanthine oxidase: Design, synthesis, and biological evaluation of 2-[4-alkoxy-3-(1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl]-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid derivatives. *Eur J Med Chem* 2019; 181: 111559.

Zhang L, Wang S, Yang M, Shi A, Wang H, Guan Q, Kai B, Zhang W. Design, synthesis and bioevaluation of 3-oxo-6-aryl-2,3-dihydropyridazine-4-carbohydrazide derivatives as novel xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2019; 27: 1818-1823.

Zhang TJ, Zhang Y, Tu S, Wu YH, Zhang ZH, Meng FH. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-(3-(1*H*-tetrazol-1-yl)phenyl)isonicotinamide derivatives as novel xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2019; 183: 111717.

Zhang Z, Blake DR, Stevens CR, Winyard PG, Symons MC, Benbouberta M, Harrison R. A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor. *Free Radic Res* 1998a; 28: 151-164.

Zhang Z, Naughton D, Winyard PG; Benjamin N, Blake DR, Symons MCR. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998b; 249: 767-772.

Zhdanov DD, Fahmi T, Wang X, Apostolov EO, Sokolov NN, Javadov S, Basnakian AG. Regulation of Apoptotic Endonucleases by EndoG. *DNA Cell Biol* 2015; 34: 316-326.

Zhu B, Gong Y, Chen P, Zhang H, Zhao T, Li P. Increased DNase I activity in diabetes might be associated with injury of pancreas. *Mol Cell Biochem* 2014; 393: 23-32.

Zhu B, Zhang L, Zhang YY, Wang L, Li XG, Lui T, Fu YK, Zheng YF, Li P, Zhao ZG. DNase I aggravates islet β -cell apoptosis in type 2 diabetes. *Mol Med Rep* 2016; 13: 4577-4584.

Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Prevalence of Gout and Hyperuricemia in the US General Population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008. *Arthrit Reum* 2011; 63: 3136-3141.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mihajlo Gajić je rođen 08.06.1994. godine u Nišu. Osnovnu školu „Branko Miljković“ i prirodno-matematički smer gimnazije „Bora Stanković“ u Nišu završio je kao nosilac Vukove diplome.

Integrisane akademske studije Farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu upisao je 2013. godine. Diplomirao je 2018. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Dobitnik je plakete Grada Niša za postignut uspeh tokom studiranja.

Doktorske akademske studije, odsek farmaceutске nauke, na Medicinskom fakultetu u Nišu upisao je 2018. godine. Planom i programom predviđene ispите je položio sa prosečnom ocenom 10,00.

U istraživačko zvanje istraživač pripravnik za naučnu oblast farmaceutске nauke – farmaceutska hemija izabran je 2019. godine. U periodu od 2019. do 2021. bio je angažovan kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI 172044) i na Internom projektu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (INT-MFN-4).

Kao stipendista Nemačke službe za akademsku razmenu (DAAD) od 2021. radi na doktorskoj disertaciji iz oblasti medicinske hemije, na Institutu za farmaceutsku i medicinsku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Hajnrih Hajne Univerziteta u Dizeldorfu. Od 2022. godine je angažovan kao asistent na predmetu Instrumentalna analitika u okviru Studijskog programa farmacija na Prirodno-matematičkom fakultetu Hajnrih Hajne Univerziteta u Dizeldorfu.

BIBLIOGRAFIJA AUTORA

Mihajlo Gajić je koautor jednog rada u međunarodnom časopisu izuzetne vrednosti (kategorija M21a), autor je jednog i koautor dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorija M21), autor je dva i koautor jednog rada u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorija M22), autor je jednog rada u istaknutom nacionalnom časopisu (kategorija M52) i autor je jednog saopštenja sa međunarodnog skupa štampanog u izvodu (kategorija M34).

Zvezdicom su označeni radovi iz doktorske disertacije.

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (kategorija M21a)

Kocic G, **Gajic M**, Tomovic K, Hadzi-Djokic J, Anderluh M, Smelcerovic A. Purine adducts as a presumable missing link for aristolochic acid nephropathy-related cellular energy crisis, potential anti-fibrotic prevention and treatment. *British Journal of Pharmacology* 2021; 178: 4411-4427. (IF₂₀₂₁ = 9,473)

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorija M21)

Kocic G, Hadzi-Djokic J, Cukuranovic-Kokoris J, **Gajic M**, Veljkovic A, Cukuranovic R, Basic D, Jovanovic I, Smelcerovic A. Predictive markers for malignant urothelial transformation in Balkan endemic nephropathy: A case-control study. *Cancers* 2020; 12: 2945. (IF₂₀₂₀ = 6,639)

Smelcerovic A, Kocic G, **Gajic M**, Tomovic K, Djordjevic V, Stankovic-Djordjevic D, Anderluh M. DPP-4 inhibitors in the prevention/treatment of pulmonary fibrosis, hearth and kidney injury caused by COVID-19 – A therapeutic approach of choice in type 2 diabetic patients. *Frontiers in Pharmacology* 2020; 11: 1185. (IF₂₀₂₀ = 5,811)

***Gajić M**, Džambaski Z, Ilić BS, Kocić G, Bondžić BP, Šmelcerović A. Synthesis and analysis of 4-oxothiazolidines as potential dual inhibitors of deoxyribonuclease I and xanthine oxidase. *Chemico-Biological Interactions* 2021; 345: 109536. (IF₂₀₂₁ = 5,168)

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorija M22)

*Ilić BS, **Gajić M**, Bondžić B, Džambaski Z, Kocić G, Šmelcerovic A. Deoxyribonuclease I inhibitory properties, molecular docking and molecular dynamics simulations of 1-(pyrrolidin-2-yl)propan-2-one derivatives. *Chemistry and Biodiversity* 2021; 18: e2000996. (IF₂₀₂₁ = 2,745)

***Gajić M**, Ilić BS, Bondžić BP, Džambaski Z, Kojić VV, Jakimov DS, Kocić G, Šmelcerović A. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Derivatives as Novel Deoxyribonuclease I Inhibitors. *Chemistry & Biodiversity* 2021; 18: e2100261. (IF₂₀₂₁ = 2,745)

***Gajić M**, Knez D, Sosič I, Mravljak J, Meden A, Košak U, Leitzbach L, George S, Hofmann B, Zivkovic A, Steinhilber D, Stark H, Gobec S, Smelcerovic A, Anderluh M. Repurposing of 8-Hydroxyquinoline-Based Butyrylcholinesterase and Cathepsin B Ligands as Potent Nonpeptidic Deoxyribonuclease I Inhibitors. *ChemMedChem* 2022; 17: e202100694. (IF₂₀₂₂ = 3,4)

Rad u istaknutom nacionalnom časopisu (kategorija M52)

***Gajić M**, Ilić BS, Bondžić B, Džambaski Z, Filipović A, Kocić G, Šmelcerović A. Xanthine oxidase inhibitory properties of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives. *Acta Medicae Medianae* 2021; 60: 48-55.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (kategorija M34)

***Gajić M**, Knez D, Sosič I, Mravljak J, Meden A, Košak U, Leitzbach L, George S, Hofmann B, Zivkovic A, Steinhilber D, Stark H, Gobec S, Smelcerovic A, Anderluh M. Potent nonpeptidic multi-target directed deoxyribonuclease I inhibitors based on the 8-hydroxyquinoline motif. *Proceeding of the XXVII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Nice, France, September 2022, P524.*

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

ИНХИБИЦИЈА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЕ I И КСАНТИН ОКСИДАЗЕ ХЕТЕРОЦИКЛИЧНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА *IN VITRO*

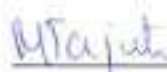
која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима,
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

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

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Михајло З. Гајић

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ПШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

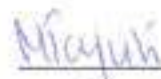
Наслов дисертације:

**ИНХИБИЦИЈА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЕ I И КСАНТИН ОКСИДАЗЕ
ХЕТЕРОЦИКЛИЧНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА *IN VITRO***

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Михајло З. Гајић

Изјава 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**ИНХИБИЦИЈА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЕ I И КСАНТИН ОКСИДАЗЕ
ХЕТЕРОЦИКЛИЧНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА *IN VITRO***


Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

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

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)

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:



Михајло З. Гајић