

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

ЈЕЛЕНА С. РУПАР

**СИНТЕЗА, ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКО
ИСПИТИВАЊЕ
ИНТЕРАКЦИЈА СА ДНК И
IN VITRO АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ
АМИНОКИСЕЛИНСКИХ ДЕРИВАТА
АКРИДИНА**

докторска дисертација

Београд, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

JELENA S. RUPAR

**SYNTHESIS, ELECTROCHEMICAL STUDY
OF INTERACTION WITH DNA AND
IN VITRO EVALUATION OF ANTICANCER
ACTIVITY OF NEW ACRIDINYL AMINO ACID
DERIVATIVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

МЕНТОРИ:

Др сц. Оливера Чудина, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Мара Алексић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др сц. Јасмина Брборић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Владимир Добричић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Александра Јаношевић Лежаић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Јелена Граховац, виши научни сарадник
Институт за онкологију и радиологију Србије

Датум одбране: _____

Захвалница

Експериментални део докторске дисертације урађен је на Катедри за фармацеутску хемију, на Фармацеутском факултету у Београду. Део експерименталног рада урађен је на Катедри за аналитичку хемију, на Фармацеутском факултету у Београду, као и на Институту за онкологију и радиологију Србије. Део експерименталног рада урађен је на Катедри за фармацеутску хемију, на Фармацеутском факултету Универзитета у Љубљани.

Посебно се захваљујем својим менторима, проф. др Оливери Чудини и проф. др Мари Алексић, на пруженом знању и безрезервној помоћи током свих фаза израде ове дисертације, као и на научној и пријатељској подршци током свих година наше сарадње и мог школовања и развоја.

Изузетну захвалност желим да упутим др Владимиру Добричићу, ванр. проф. на драгоцепој помоћи, стручним саветима, уложеном времену и труду у лабораторији.

Захваљујем се др Јелени Граховац, вишем научном сараднику Института за онкологију и радиологију Србије на великој помоћи током израде дисертације.

Захваљујем се др Јасмини Брборић, ванр. проф. на стручним саветима и сугестијама током израде дисертације.

Захваљујем се др Александри Јаношевић Лежаић, ванр. проф. на подршци, стручним саветима и пријатељској подршци.

Захваљујем се драгим колегиницама са Катеде за физичку хемију и инструменталне методе на подршци и разумевању.

Колегама са Катедре за аналитичку хемију захваљујем се на дивној сарадњи.

Захваљујем се својим родитељима који су ми омогућили да се школујем и развијам.

Хвала Вељку што је увек био мој ослонац.

Наталији и Јулији

СИНТЕЗА, ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКО ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈА СА ДНК И *IN VITRO* АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ АМИНОКИСЕЛИНСКИХ ДЕРИВАТА АКРИДИНА

РЕЗИМЕ

У овој дисертацији су описани процеси синтезе, пречишћавања и физичко-хемијске карактеризације аминокиселинских деривата акридина: (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-фенилпропаноата (1), (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1*H*-имидазол-4-ил)пропаноата (2), (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропаноата (3), (*S*)-2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропанске киселине (4), метил-8-(акридин-9-ил-амино)октаноата (5), етил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноата (6), пропил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноата (7), етил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноата (8), пропил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноата (9), етил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноата (10) и пропил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноата (11).

Испитивање антитуморске активности обухватило је испитивање цитотоксичности, клоногени есеј, испитивање утицаја синтетисаних једињења на ћелијски циклус и анализу ћелијске смрти. МТТ тестом утврђено је да једињења 6, 7, 8 и 9 имају $IC_{50} < 20 \mu M$. Ова једињења могу инхибирати хуману ДНК топоизомеразу $\text{II}\alpha$.

Испитано је електрохемијско понашање 9-хлороакридина и једињења 6, 7, 8 и 9 применом цикличне, диференцијално пулсне и волтаметрије правоугаоних таласа, на електроди од стакластог угљеника. 9-хлороакридин подлеже иреверзибилним, рН зависним и дифузионо-контролисаним процесима оксидације и редукције. Електрохемијски ДНК биосензор коришћен је са циљем испитивања интеракције 9-хлороакридина и једињења 6, 7, 8 и 9 са ДНК, применом волтаметрије правоугаоних таласа на електроди од стакластог угљеника.

9-хлороакридин и једињења 6, 7, 8 и 9 интеркалирају између база ДНК. Јачина интеракције није била иста за сва једињења, а примећен је и утицај концентрације испитиваног једињења на вредност константе везивања. Интеркалација је потврђена применом молекулског *docking*-а.

Кључне речи: аминокиселински деривати акридина, синтеза, антитуморска активност, инхибиција ДНК топоизомеразе $\text{II}\alpha$, волтаметрија, електрохемијски ДНК биосензор

Научна област: Фармација

Ужа научна област: Фармација – медицинска хемија

**SYNTHESIS, ELECTROCHEMICAL STUDY OF INTERACTION WITH DNA
AND *IN VITRO* EVALUATION OF ANTICANCER ACTIVITY OF
NEW ACRIDINYL AMINO ACID DERIVATIVES**

ABSTRACT

This dissertation describes synthesis, purification and physicochemical characterization of amino acid derivatives of acridine: (*S*)-methyl 2-(acridin-9-ylamino)-3-phenylpropanoate (1), (*S*)-methyl 2-(acridin-9-ylamino)-3-(1*H*-imidazol-4-yl)propanoate (2), (*S*)-methyl 2-(acridin-9-ylamino)-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)propanoate (3), (*S*)-2-(acridin-9-ylamino)-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)propanoic acid (4), methyl 8-(acridin-9-ylamino)octanoate (5), ethyl 4-(acridin-9-ylamino)butanoate (6), propyl 4-(acridin-9-ylamino)butanoate (7), ethyl 3-(acridin-9-ylamino)propanoate (8), propyl 3-(acridin-9-ylamino)propanoate (9), ethyl 6-(acridin-9-ylamino)hexanoate (10) and propyl 6-(acridin-9-ylamino)hexanoate (11).

In vitro anticancer activity tests included cytotoxicity, long-term survival assay, cell cycle analysis and cell death analysis. Compounds 6, 7, 8 and 9 were found to have $IC_{50} < 20 \mu M$ by MTT test. The inhibitory activity on human DNA topoisomerase II α was confirmed.

The electrochemical redox behavior of 9-chloroacridine and compounds 6, 7, 8 and 9, was investigated using cyclic, differential pulse and square wave voltammetry, on a glassy carbon electrode. The results indicated that 9-chloroacridine undergoes irreversible, pH dependent and diffusion-controlled redox processes.

An electrochemical DNA biosensor was used to investigate the interaction of 9-chloroacridine and compounds 6, 7, 8 and 9 with DNA using square wave voltammetry on a glassy carbon electrode. 9-chloroacridine and compounds 6, 7, 8 and 9 intercalate between DNA bases, whereby the strength of the interaction was not the same for all compounds, and the influence of the concentration of the tested compounds on the value of the binding constant was also observed. The intercalation was confirmed by molecular docking.

Key words: amino acid derivatives of acridine, synthesis, anticancer activity, DNA topoisomerase II α inhibition, voltammetry, electrochemical DNA biosensor

Scientific Field: Pharmacy

Narrow Scientific Field: Pharmaceutical – medicinal chemistry

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Акридини.....	2
1.1.1. Механизми дејства акридина	3
1.1.1.1. Антибактеријско дејство	3
1.1.1.2. Антивирусно дејство.....	4
1.1.1.3. Антималаријско дејство.....	5
1.1.1.4. Антитуморско дејство.....	6
1.1.1.4.1. Однос структуре и антитуморске активности акридина	7
1.2. ДНК, структура и функција.....	7
1.3. Ћелијски циклус	10
1.3.1. Дејство топоизомеразе II	12
1.3.2. Ћелијска смрт	13
1.4. Синтеза аминокиселинских деривата акридина.....	15
1.5. Волтаметријске методе	16
1.5.1. Природа процеса који се могу пратити волтаметријским техникама	17
1.5.2. Електрохемијска ћелија	20
1.5.2.1. Радна електрода	20
1.5.2.2. Електрода од стакластог угљеника.....	20
1.5.2.3. Референтна електрода	21
1.5.2.4. Помоћна електрода.....	21
1.5.3. Циклична волтаметрија	22
1.5.4. Пулсне волтаметријске технике.....	27
1.5.4.1. Диференцијално пулсна волтаметрија	27
1.5.4.2. Волтаметрија правоугаоних таласа	29
1.6. ДНК биосензори	31
1.6.1. Електрохемијско понашање пуринских и пиримидинских база, нуклеотида, нуклеозида и ДНК на електроди од стакластог угљеника.....	31
1.6.2. Електрохемијски ДНК биосензор.....	34
1.7. Рационално дизајнирање деривата – молекулски <i>docking</i>	37
2. ЦИЉ РАДА.....	38

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	40
3.1. Реагенси и растварачи.....	41
3.1.1. Синтеза и физичко-хемијска испитивања.....	41
3.1.2. Испитивање антитуморске активности.....	41
3.1.3. Електрохемијска испитивања.....	42
3.2 Опрема и програми.....	42
3.2.1. Синтеза и физичко-хемијска испитивања.....	42
3.2.2. Испитивање антитуморске активности.....	43
3.2.3. Електрохемијско испитивање.....	43
3.2.4. Молекулски <i>docking</i>	44
3.3. Синтеза и физичко-хемијска испитивања аминокиселинских деривата акридина.....	45
3.3.1. Синтеза естара аминокиселина.....	45
3.3.2. Синтеза аминокиселинских деривата акридина.....	45
3.3.3. Испитивање чистоће и физичко-хемијска карактеризација синтетисаних аминокиселинских деривата акридина.....	47
3.4. <i>In vitro</i> испитивање антитуморске активности аминокиселинских деривата акридина.....	48
3.4.1. Цитотоксичност.....	48
3.4.2. Припрема и третман хуманих леукоцита.....	49
3.4.3. Клоногени есеј.....	49
3.4.4. Анализа ћелијског циклуса.....	49
3.4.5. Анализа ћелијске смрти.....	50
3.5. Есеј електрофоретске покретљивости.....	51
3.6. Одређивање инхибиторне активности на хуману ДНК топоизомеразу Pa	52
3.7. Електрохемијско испитивање 9-хлороакридина и најактивнијих аминокиселинских деривата акридина.....	53
3.7.1. Припрема раствора.....	53
3.7.2. Припрема електроде.....	53
3.7.3. Припрема ДНК биосензора.....	54
3.7.4. Параметри коришћени за електрохемијска мерења.....	54
3.8. Извођење <i>docking</i> студија.....	55
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	56
4.1. Општи поступак за синтезу аминокиселинских деривата акридина.....	57
4.2. Физичко-хемијска карактеризација синтетисаних аминокиселинских деривата акридина.....	59

4.2.1. HPLC анализа аминокиселинских деривата акридина	76
4.2.2. <i>In silico</i> евалуација фармакокинетичких својстава и <i>druglikeness</i> процена.....	81
4.3. <i>In vitro</i> антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина	83
4.3.1. Анализа фаза ћелијског циклуса.....	86
4.3.2. Анализа ћелијске смрти	88
4.4. Тест електрофоретске покретљивости	90
4.5. Испитивање инхибиторне активности најактивнијих аминокиселинских деривата акридина на хуману ДНК-топоизомеразу $\text{P}\alpha$	91
4.6. Електрохемијско испитивање 9-хлороакридина и најактивнијих аминокиселинских деривата акридина.....	92
4.6.1. Испитивање електрохемијског понашања 9-хлороакридина применом цикличне волтаметрије	92
4.6.2. Испитивање електрохемијског понашања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина применом цикличне волтаметрије	98
4.6.3. Испитивање електрохемијског понашања 9-хлороакридина применом диференцијално пулсне волтаметрије.....	102
4.6.4. Испитивање електрохемијског понашања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина применом диференцијално пулсне волтаметрије.....	105
4.6.5. Испитивање електрохемијског понашања 9-хлороакридина применом волтаметрије правоугаоних таласа.....	106
4.6.6. Испитивање електрохемијског понашања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина применом волтаметрије правоугаоних таласа	108
4.6.7. Редокс механизам 9-хлороакридина.....	113
4.6.8. Оптимизација услова за формирање вишеслојног ДНК биосензора	116
4.6.9. Испитивање интеракције 9-хлороакридина са ДНК применом електрохемијског ДНК биосензора.....	118
4.6.10. Испитивање интеракције најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК применом електрохемијског ДНК биосензора	124
4.6.10.1. Концентрациони профил најактивнијих аминокиселинских деривата акридина добијен применом волтаметрије правоугаоних таласа и електрохемијског биосензора	128
4.6.10.2. Одређивање константи везивања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК	134
4.7. <i>Docking</i>	139
4.7.1. <i>Docking</i> интеракције 9-хлороакридина са ДНК.....	139
4.7.2. <i>Docking</i> интеракције најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК	139

5. ЗАКЉУЧАК.....	141
6. ЛИТЕРАТУРА.....	144
7. ПРИЛОЗИ	158
8. БИОГРАФИЈА	161
Изјава о ауторству	163
Изјава о истоветности штампане и електронскеверзије докторског рада	164
Изјава о коришћењу.....	165

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

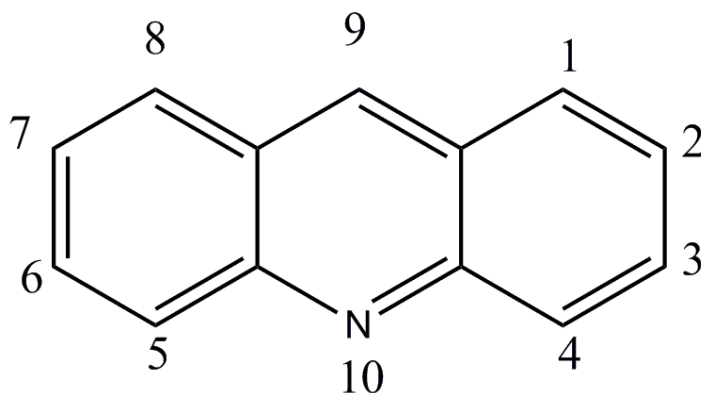
9Cl-A	9-хлороакридин
АДА	аминокиселински деривати акридина
АК	аминокиселине
АКЕ	естри аминокиселина
АТФ	аденозин трифосфат (енгл. <i>Adenosine triphosphate</i>)
CDK	циклин зависне киназе (енгл. <i>Cyclin dependent kinase</i>)
CV	циклична волтаметрија (енгл. <i>Cyclic voltammetry</i>)
dA	дезоксаденозин
dG	дезоксигуанозин
DACA	N-[2-(диметиламино)етил]-акридин-4-карбоксамид
DMSO	диметилсулфоксид
DPV	диференцијално пулсна волтаметрија (енгл. <i>Differential pulse voltammetry</i>)
ДНК	деоксирибонуклеинска киселина
FBS	фетални говеђи серум (енгл. <i>Fetal bovine serum</i>)
G	прекид (енгл. <i>Gap</i>)
GCE	електрода од стакластог угљеника (енгл. <i>Glassy carbon electrode</i>)
GPES 4.9	програм (енгл. <i>General Purpose Electrochemical System 4.9</i>)
HSV	херпес симплекс вирус (енгл. <i>Herpes simplex virus</i>)
HRMS	масена спектрометрија високе резолуције
IR	инфрацрвена спектрометрија (енгл. <i>Infra Red spectroscopy</i>)
M	митоза (енгл. <i>Mitosis</i>)
m-AMCA	4'-(9-акридиниламино)метансулфон-m-анизидид
MS	масена спектрометрија (енгл. <i>Mass spectrometry</i>)
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид
NMR	нуклеарна магнетна резонанција (енгл. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
PBS	фосфатни пуфер (енгл. <i>Phosphate buffer saline</i>)
PDB	база података кристалних протеинских структура (енгл. <i>Protein Data Bank</i>)
P-gp	П-гликопротеин
PI	пропидијум-јодид (енгл. <i>Propidium iodide</i>)
PHK	рибонуклеинска киселина
RMSD	квадратни корен средње вредности (енгл. <i>Root Mean Square Deviation</i>)
S	синтеза (енгл. <i>Synthesis</i>)
SDS	натријум-додецил сулфат (енгл. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SWV	волтаметрија правоугаоних таласа (енгл. <i>Square wave voltammetry</i>)
TLC	хроматографија на танком слоју (енгл. <i>Thin layer chromatography</i>)
QSAR	анализа квантитативних односа структуре и активности (енгл. <i>Quantitative structure-property relationship</i>)

1. УВОД

1.1. Акридини

Акридин је хемијско једињење које је првобитно изоловано из антрацена 1870. године [1], а касније и успешно синтетисано у лабораторијским условима [2]. Акридин хемијски представља дибензо[*b,e*]пиридин, тј. 10-азаантрацен [2]. Структура и нумерација акридина приказане су на **Слици 1**.

Састоји се из три коњугована прстена и планарне је структуре. Представља чврсту супстанцу, базних особина (pK_a 5,6), бледожуте боје. Може се класификовати као електрондефицитарни хетероциклус и као такав показује плаву флуоресценцију у водено-етанолним растворима [3].



Слика 1. Акридин, структура и нумерација

Деривати акридина представљају молекуле који у својој структури садрже акридинско језгро и пронашли су примену у различитим научним областима, а од изузетне је важности њихова примена у медицини. Са открићем медицинске примене крисанилина (5-(4-аминофенил)-2-акридинамина), споредног производа у процесу добијања фуксина, 1888. године, отпочело је и спровођење студија које су се бавиле потенцијалном клиничком применом акридина [4].

У току Првог светског рата, акрифлавин и профлавин примену су имали у локалној терапији бактеријских инфекција рана. Касније, 1930. године, откривен је квинакрин, синтетски антимаљаријски лек који је коришћен у Другом светском рату.

Након Другог светског рата потиснули су их пеницилини, да би нешто касније, услед појаве резистенције бактерија на пеницилине, акридини поново били коришћени за лечење инфекција узрокованих бактеријама [5].

Антивирусну активност акридина показали су деривати акридина са супституентима – аминокиселинских деривата акридина [6].

Примећена је ефикасност деривата акридина и као антитуморских агенаса. Амсакрин (4'-(9-акридиниламино)метансулфон-*m*-анизидид или *m*-АМСА) важан је представник деривата акридина који је показао *in vitro* и *in vivo* антитуморску активност [7].

Касније је доказано да амсакрин своје дејство испољава и као инхибитор топоизомеразе II [8].

Биолошка активност акридина приписује се планарној структури полиароматичног језгра молекула захваљујући којој може да интеркалира између база ДНК и утиче на ћелијске

функције. Такође, акридини могу да интерагују са различитим циљним местима дејства, зависно од супституената, те је доказан утицај акридина на ензиме топоизомеразу I, топоизомеразу II, теломеразу и циклин зависне киназе [9-13].

Фотодинамска терапија тумора, још једна је област у којој би акридини могли наћи примену [14]. Фотодинамска терапија подразумева примену фотосензитизатора, који након излагања светлости омогућава формирање реактивног кисеоника који има цитотоксичне ефекте [15].

Својство акридина да интеркалира између база ДНК може се искористити за детекцију туморских ћелија [16] у којима је репликација ДНК интензивнији процес у односу на здраве ћелије. У те сврхе вршено је радиоактивно обележавање 9-аминоакридина радионуклидом лутецијумом-177 и примењен је за испитивања на *Raji* ћелијској линији и ћелијским линијама фибросаркома мишева [16].

Захваљујући фотосензитивним својствима, деривати акридина могу се користити и као ефикасни молекули за фотодинамичку инактивацију соја *Candida albicans* [17].

1.1.1. Механизми дејства акридина

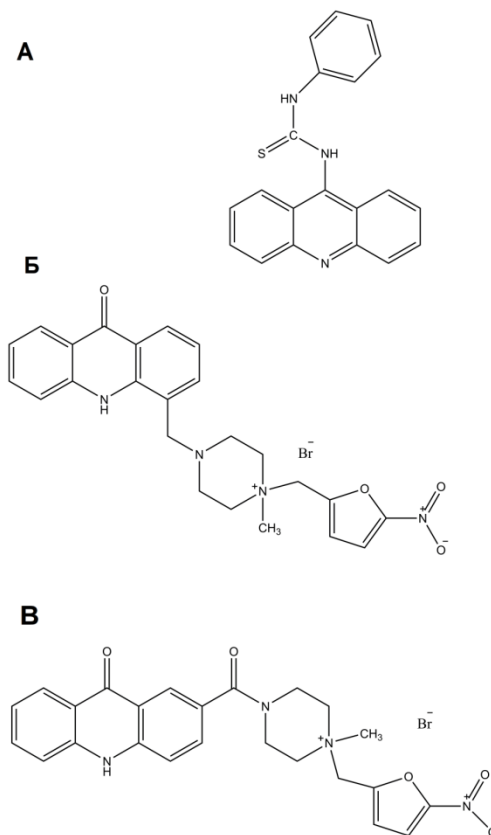
1.1.1.1. Антибактеријско дејство

Показано је да неколико фактора утиче на антибактеријско дејство деривата акридина. Формирање катјона, висок степен јонизације при неутралном рН, планарна молекулска структура [18,19] као и електронска коњугација између атома азота акридина и супституисане амино групе и последична јонизација, утичу на високу антибактеријску активност једињења. Такође, уочено је да су од нарочитог значаја за антибактеријско дејство супституенти присутни у положајима С3, С6 и С9 [20, 21]. Године 1973. синтетисани су деривати акридина који садрже карбамид, естре тиокарбамидне киселине или тиоуреу као супституенте у положају 9. Једињења која садрже тиоуреу (**Слика 2А**) показала су антибактеријску активност против великог броја бактерија као што су: *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* и *Diplococcus pneumonia* [22].

Lerman и сар. показали су да интеркалација лека између база ДНК доприноси антибактеријској активности. С обзиром на способност акридина да интеркалирају, почео је развој деривата акридина који би поред антибактеријске показали и антитуморску активност[23].

9-оксоакридини супституисани нитрофурантоином (**Слика 2Б, 2В**), пример су деривата са антибактеријском активношћу која је последица интеркалације ових једињења између база ДНК [19].

Структуре неких деривата акридина са антибактеријском активношћу приказане су на **Слици 2**.



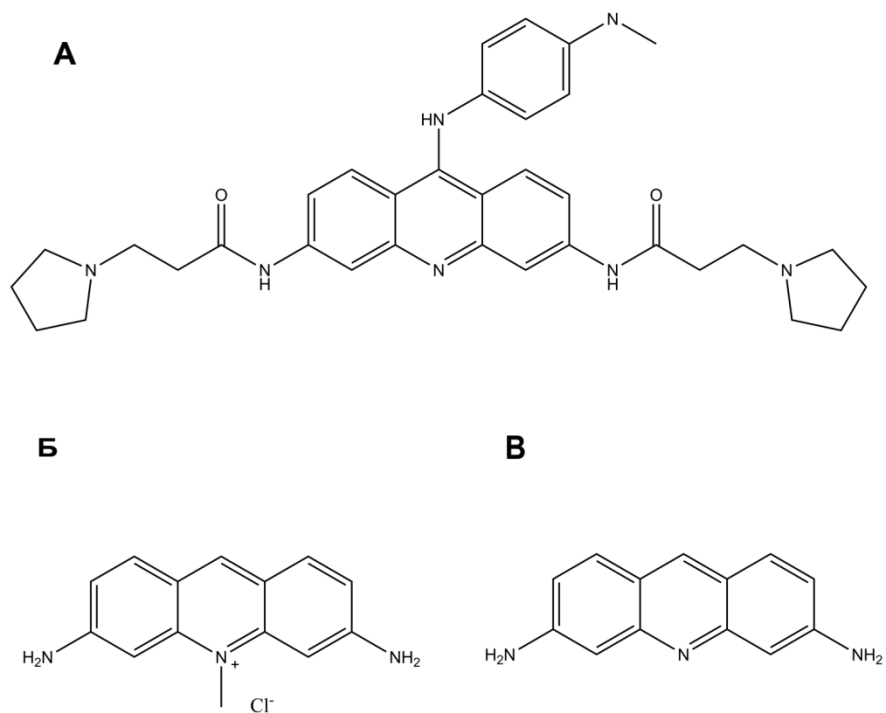
Слика 2. Деривати акридина са антибактеријском активношћу

1.1.1.2. Антивирусно дејство

Деривати акридина супституисани аминоалкохолима и аминокиселинама, показали су значајну антивирусну активност против херпес симплекс вируса (HSV, енгл. *Herpes simplex virus*) у поређењу са познатим антивирусним агенсима, камедоном и амиксином [6].

Показано је да неки деривати акридина (Слика 3) имају антивирусну активност против HSV услед способности да интеркалирају између база ДНК и последично доведу до инхибиције ензима топоизомеразе II. Ипак, и једињења која нису показала дејство на топоизомеразу II, поседовала су одређену антивирусну активност против HSV. Ово је објашњено неспецифичним везивањем акридина услед интеркалације. Супституенти са различитим стерним и електронским ефектима утичу на различиту интеракцију једињења, тако деривати акридина који садрже диетиламин у положају C2 и C3, показују значајну антивирусну активност, док присуство карбоксамидне групе или 9-амино групе може утицати на повећање антивирусне активности [24].

Како је у геному HSV-1 уочена структура Г-квадриплекса, испитан је утицај Г-квадриплекс лиганата, као што је нпр. 3,6,9 – трисупституисани дериват акридина (BRACO-19, Слика 3А) и доказано је да услед ове интеракције долази до стабилизације Г-квадриплекса и последично репликација HSV може бити заустављена [25].



Слика 3. Деривати акридина са антивирусном активношћу: А) BRACO-19; Б) акрифлавин, В) профлавин

Субтоксичне концентрације акридинских боја акрифлавина и профлавина (Слика 3Б, 3В), које су првобитно коришћене као антисептици, показале су антивирусну активност према риновирусима. Ова једињења делују као индиректни агонисти цикличне-GMP-AMP (сGAMP) синтазе и изазивају оштећење ДНК [26].

1.1.1.3. Антималаријско дејство

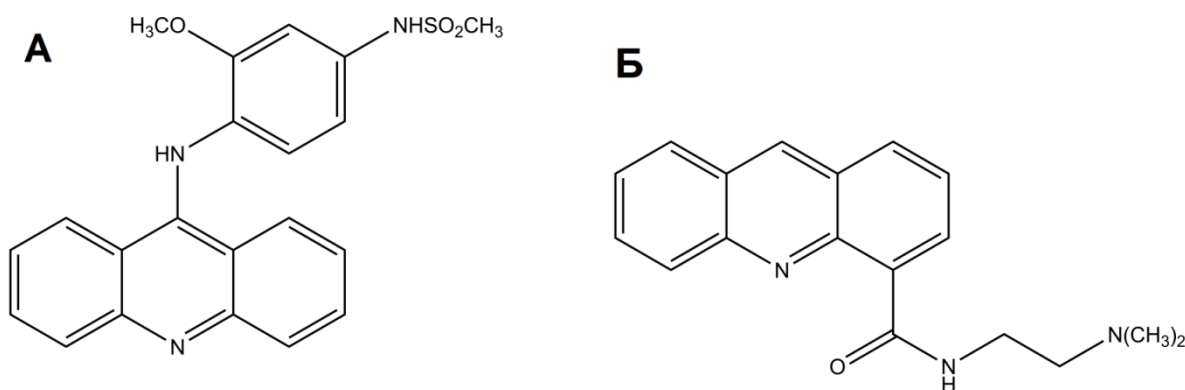
Антималаријска активност деривата акридина јавља се као последица неколико механизма деловања: циљаног деловања на хемозоин [27] инхибиције топоизомеразе II [28, 29], инхибиције метаболизма фолата [30] и инхибиције плазмепсина [31].

Испитивања *Santelli-Rouvier* и сар. показала су да је присуство акридинског језгра у једињењу један од фактора који утиче на антималаријску активност. Поред акридинског језгра, и сулфонска група у положају С9 доприноси активности против *Plasmodium falciparum* [30].

Дејство *N*-алкил амино деривата акридина испитивано је након синтезе једињења са хетероцикличним прстеном у положају С9 и за ова једињења потврђена је активност против *Plasmodium falciparum*. Једињења са хлоро- и метокси- супституентима имала су већу инхибиторну активност на формирање β-хематина, али инхибиција није била у корелацији са антималаријском активношћу [32].

1.1.1.4. Антитуморско дејство

Дериват 9-анилино акридина – амсакрин (4'-(9-акридиниламино)метансулфон-*m*-анизидид или *m*-АМСА) који је показао изузетне особине/результате синтетисан је 1974. године. Само неколико година касније постао је део клиничких испитивања након чега се успешно користио у терапији акутне лимфобластне леукемије (Слика 4А) [33, 34].



Слика 4. Хемијска структура деривата акридина са антитуморском активношћу: А) амсакрин, Б) *N*-[2-(диметиламино)етил]-акридин-4-карбоксамид (DACA)

Неколико година касније, доказано је да амсакрин своје дејство испољава и као инхибитор топоизомеразе II [35, 36]. Амсакрин је имао примену у терапији *Hodgkin* и *Non-Hodgkin* лимфома, али није показао активност против солидних тумора. Са циљем проналажења нових деривата акридина који би показали активност према солидним туморима, синтетисано је једињење *N*-[2-(диметиламино)етил]-акридин-4-карбоксамид (DACA), активно према аденокарциному плућа (Слика 4Б). Ипак, висока липофилност DACA утицала је на интеракције са липидима у јонским каналима, тј. довела је до инхибиције јонских канала и токсичности [37]. Нежељени ефекти, резистенција и лоша биорасположивост доступних антитуморских лекова, разлози су за проналажење нових деривата акридина који би показали одговарајућу цитотоксичност, а мање нежељених дејстава [38-40].

У поређењу са амсакрином, деривати *N*-супституисаних 9-аминоакридина и бис-акридина показали су добру антитуморску активност [41].

Акридини антитуморску активност испољавају најчешће тако што реагују са молекулом ДНК. Приликом формирања комплекса са ДНК могућа су два типа везивања агенса и ДНК: ковалентно и нековалентно. Када се између агенса и ДНК успоставе ковалентне везе, последица је „блокирање“ ДНК, што је иреверзибилна промена и доводи до смрти ћелије. Када се интеракција оствари нековалентним везама (интеркалација, везивање за мали или велики жљеб, електростатичке интеракције), промена је реверзибилна и агенс се сматра мање токсичним по ћелију [40, 42].

1.1.1.4.1. Однос структуре и антитуморске активности акридина

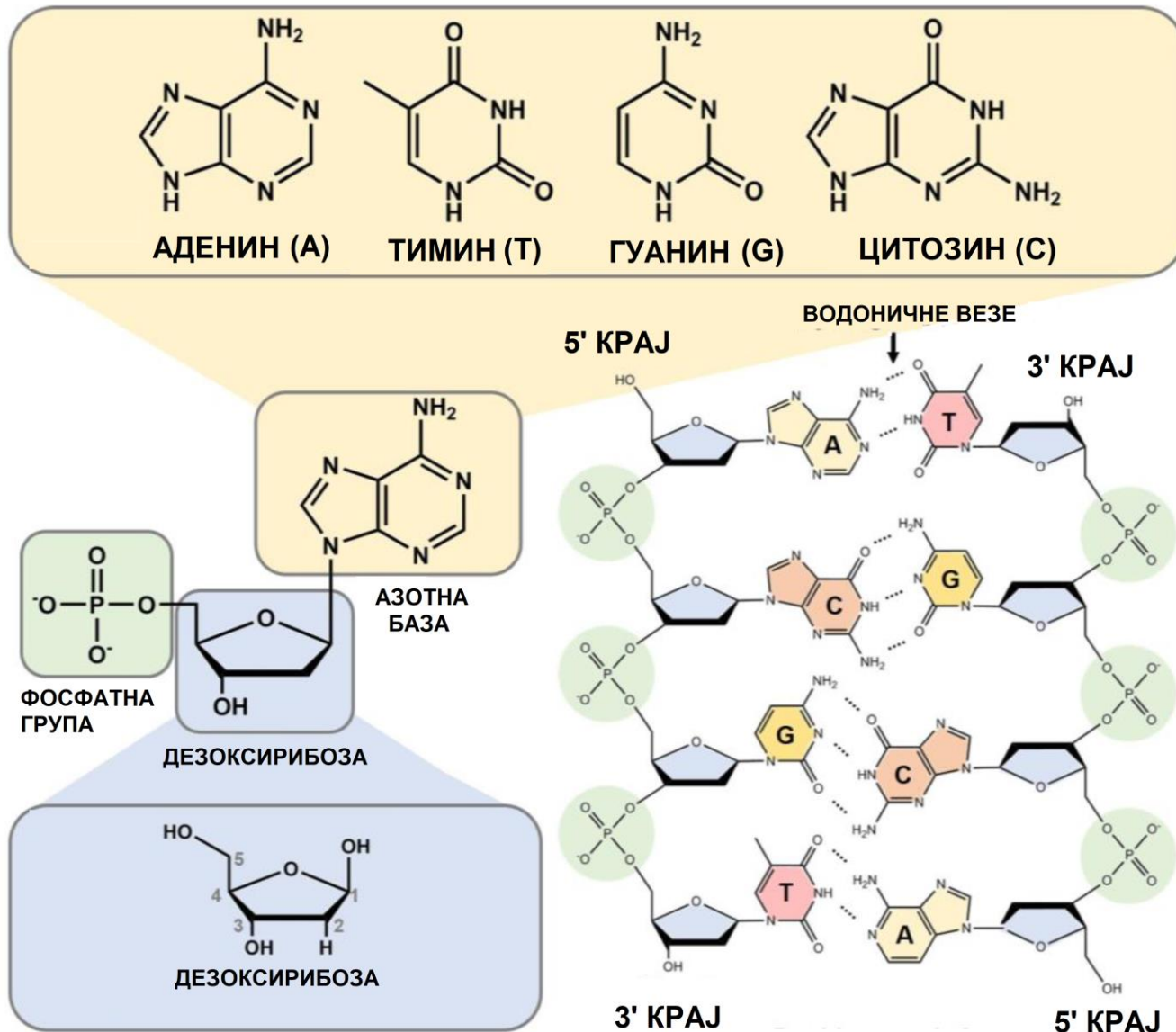
Анализа квантитативних односа структуре и активности (енгл. *Quantitative structure – activity relationship analysis*, QSAR) 9-анилино акридина са антитуморском активношћу (узимајући у обзир инхибиторну активност на туморске ћелије и везивање за ДНК) показала је да на везивање молекула акридина за ДНК утичу стерни ефекти, док хидрофобност утиче на приступ једињења активном месту [43]. Дужина бочног ланца важна је за активност деривата акридина, и то како за цитотоксичну активност акридинил-аминокиселина и њихових метил естара [40, 44], тако и за антипролиферативну активност и везивање за ДНК деривата код којих је за акридинско језгро везан фенил остатак одговарајућим линкером (бочним ланцем различите дужине) [45]. Модификацијом једињења која у структури садрже акридинско језгро постигнуто је добијање једињења која имају антитуморску активност већу од доксорубицина (антрациклинског антибиотика који је показао активност против широког спектра тумора, укључујући солидне туморе) који је коришћен као стандард [46]. Биолошка активност деривата акридина била је тема бројних истраживачких радова, од којих су најзначајнији представљени у ревијалном раду [47].

Након претраге литературе, претпостављено је да би једињења која садрже акридински прстен и супституент у положају 9, могла показати антитуморску активност. Из тог разлога, у овој дисертацији, извршена је синтеза аминокиселинских деривата акридина са различитим ароматичним и алифатичним супституентима у положају 9 акридинског прстена.

1.2. ДНК, структура и функција

Дезоксирибонуклеинска киселина (ДНК) најважнији је молекул у организму с обзиром на могућност да складишти информације за развој и правилно функционисање свих живих организама. Састоји се од два полинуклеотидна ланца, које чини низ ковалентно везаних нуклеотида.

Нуклеотид се састоји од азотне базе, шећера пентозе - дезоксирибозе и фосфатне групе, док само азотна база и шећер чине нуклеозид. Азотне базе (пуринске: аденин и гуанин и пиримидинске: тимин и цитозин) са дезоксирибозом су повезане *N*-гликозидном везом. С3' атом једног молекула дезоксирибозе је фосфодиестарском везом повезан са С5' атомом следећег молекула дезоксирибозе, тако да полинуклеотидни ланац на једном крају има молекул пентозе са слободном хидроксилном групом у положају С3 и тај крај се назива 3' крај, а на другом крају слободну хидроксилну групу у положају С5 и тај крај се назива 5' крај. Врста и редослед нуклеотида чине примарну структуру ДНК (Слика 5)[48, 49].

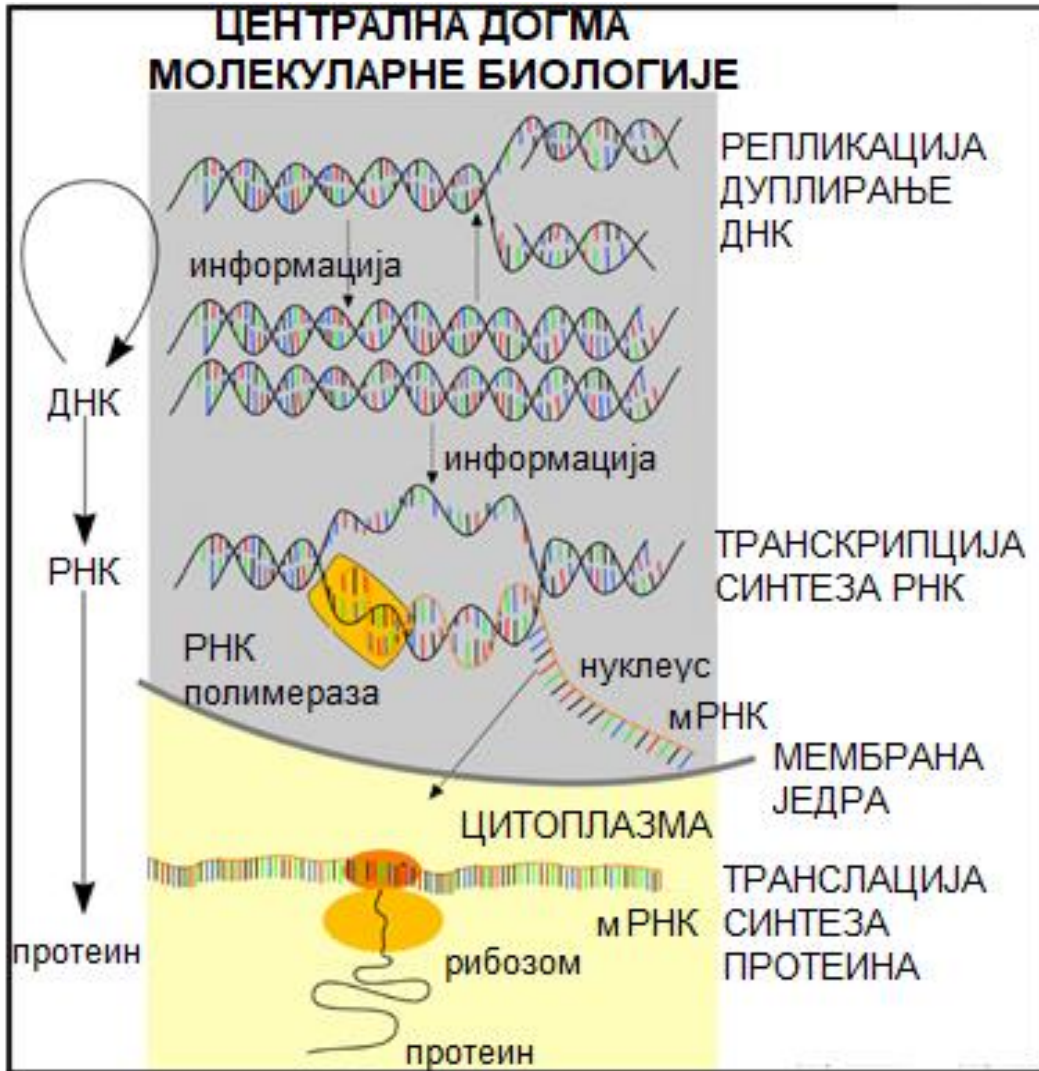


Слика 5. Структура ДНК [48]

Секундарну структуру ДНК чини спирала која се састоји од два антипаралелна (наспрам 3' краја једног налази се 5' крај другог ланца и обрнуто) полинуклеотидна ланца, што је од посебног значаја за процес репликације. У дволанчаној спирали, свака база једног ланца је водоничним везама, комплементарно, повезана са базом другог ланца, тако је аденин првог ланца двама водоничним везама повезан са тимином другог ланца, док је гуанин првог ланца са три водоничне везе повезан са цитозином другог ланца. Базе су окренуте ка унутрашњости спирале ДНК, док су фосфатне групе окренуте према спољашњости и са шећерном компонентом чине скелет ДНК [49]. Пречник спирале исти је у целом молекулу ДНК, а услед специфичног везивања база, разликују се два жљеба, велики и мали, што је значајно због специфичног везивања одређених молекула за ове жљебове.

ДНК се у живим ћелијама налази повезана (уклопљена) са протеинима и тако „спакована“ чини тзв. терцијарну структуру ДНК [49].

ДНК садржи потпуну генетичку информацију организма. У молекулу ДНК „записана“ је структура, али и функција свих протеина. Три процеса у којима учествује ДНК важна су за организм: репликација, транскрипција и транслација (Слика 6), а централна догма молекуларне биологије описује пренос информација који се одвија у овим процесима. Репликација (одвија се у једру ћелије) омогућава да се удвостручи количина ДНК и да од једног ДНК молекула настану два иста молекула. У процесу транскрипције, део молекула ДНК који садржи одређену секвенцу нуклеотида (ген) се „преписује“ у једноланчану секвенцу рибонуклеинске киселине (РНК). Овај молекул РНК напушта једро и у цитоплазми омогућава да се у процесу транслације секвенца нуклеотида преведе у секвенцу аминокиселина које граде протеине [50, 51].



Слика 6. Централна догма молекуларне биологије [50]

Имајући у виду сложену структуру ДНК као и функције које су значајне за одржавање живота ћелије, новосинтетисани деривати акридина у овој дисертацији биће испитани и са циљем утврђивања типа интеракције коју са ДНК остварују.

1.3. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус састоји се из низа процеса који се одвијају у живој ћелији, између две деобе ћелије, при чему је једна деоба укључена у циклус. Трајање ћелијског циклуса еукариотских ћелија је различито, а зависи од типа ћелија. Ћелијски циклус се састоји из интерфазе, периода у току кога се ћелија припрема за деобу, и деобе (енгл. *Mitosis*, М). Интерфаза се састоји из три фазе, G₁ фазе (енгл. *Gap*, G, прекид), S (енгл. *Synthesis*, S, синтеза) и G₂. У току G₁ фазе синтетишу се протеини, угљени хидрати и липиди потребни за раст ћелије. У S фази се количина ДНК удвостручује, тј. долази до репликације ДНК, при чему настају два молекула ДНК од којих сваки садржи један стари ланац и један новосинтетисани ланац. У G₂ фази се удвостручује број органела и синтетише се тубулин, протеин потребан за деобно вретено. У току деобе (М фазе), долази до кариокинезе, тј. поделе материјала једра и цитокинезе, тј. поделе цитоплазме [52].

Кариокинеза се састоји из: профазе, прометафазе, метафазе, анафазе и телофазе (Слика 7). У профазе постоји мембрана једра, удвојени хромозоми се кондензују. Формирају се кинетохори (протеинске структуре које имају улогу да „вежу“ хромозом за деобно вретено) у нивоу центромера (примарних сужења на сваком хромозому које спајају сестринске хроматиде). Центрозоми (органеле које садрже пар центриола, тј. цилиндричних ћелијских структура које се састоје од микротубуле) одлазе на супротне половине ћелије. У прометафази долази до кондензације хромозома и даљег удаљавања центрозома. Нестаје омотач једра и хромозоми се померају. Микротубуле везују кинетохоре. У метафази су центрозоми на различитим половима ћелије, између њих је деобно вретено које се састоји од микротубула, хромозоми су у средини ћелије и почиње подела материјала једра, тј. хромозома. У анафази се раздвајају сестре хроматиде. У телофази два сета хромозома се декондензују и формира се омотач једра.

У цитокинези долази до физичке поделе на две ћелије контрактилним прстеном (сачињеним од актинских филамената, миозин II филамената и других структурних и регулаторних протеина) везаним за ћелијску мембрану (Слика 7) [53, 54].

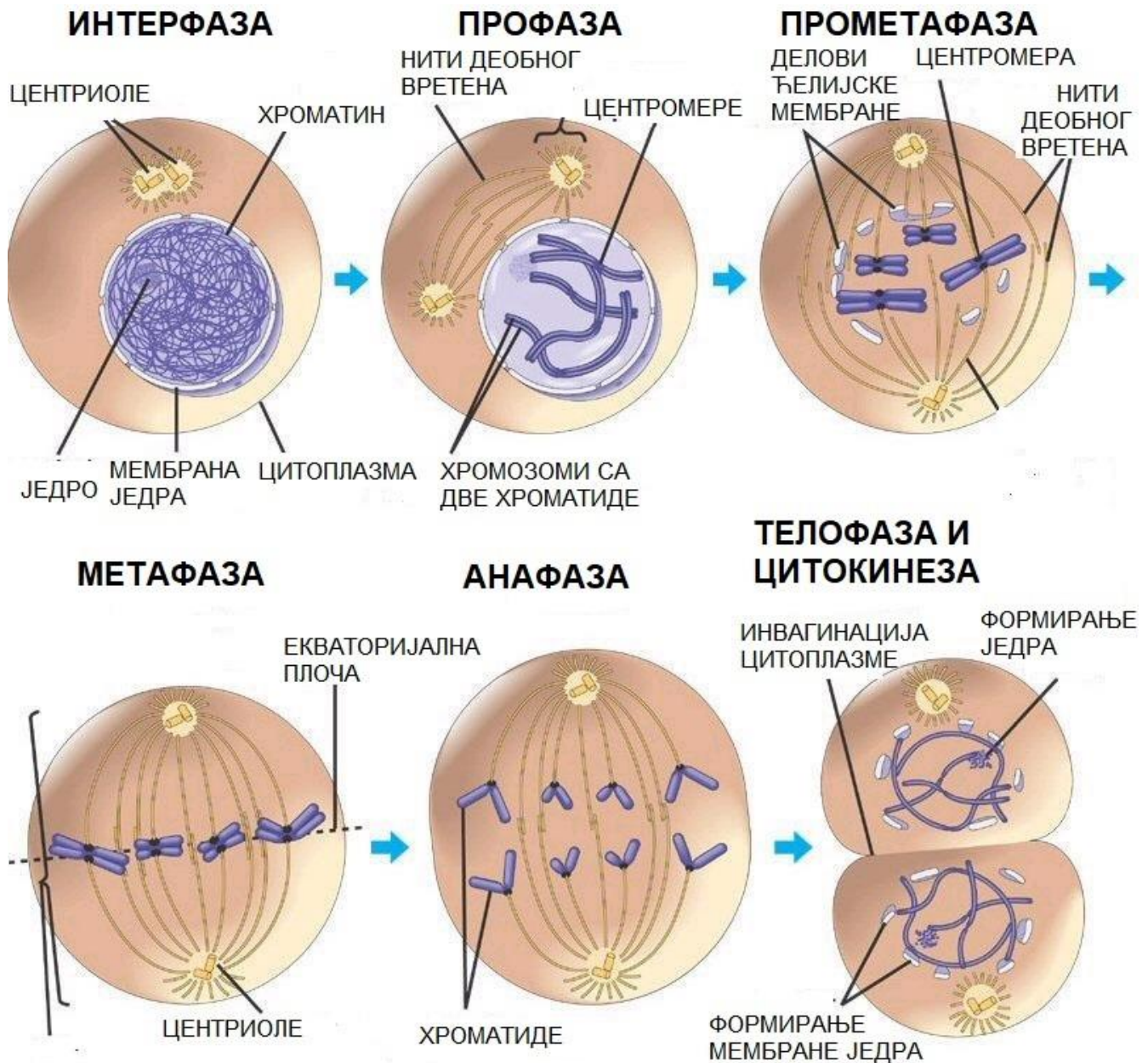
Током ћелијског циклуса повремено могу настати грешке, те су због тога ћелије развиле серију механизма који контролишу сваки корак током ћелијског циклуса и не дозвољавају ћелији да уђе у наредну фазу ако претходна фаза није успешно завршена [55, 56]. Уколико се детектује грешка, брзо се зауставља циклус док се грешка не отклони. Заустављање процеса омогућавају мониторинг механизми, тј. контролне тачке *checkpoints* или *checkpoint controls* [55-57]. Уколико *checkpoint* механизмима не функционишу правилно, последица може бити измењен кариотип, и онкогенеза.

Две главне контролне тачке оштећења ДНК постоје пре него што ћелија уђе у S фазу (контролна тачка G1-S) и након репликације ДНК (контролна тачка G2-M).

Циклин зависне киназе (CDK) су протеини важни за одвијање ћелијског циклуса јер уводе ћелију у наредне фазе ћелијског циклуса. Ови ензими фосфорилишу различите протеине у ћелији, зависно од фазе ћелијског циклуса. Док је концентрација CDK релативно стабилна током целог циклуса, ниво циклина се мења и одређује формирање CDK/циклинских комплекса. Постоје 4 класе циклина: G1/S који везују циклин зависну киназу на крају G₁ фазе и уводе ћелију у S фазу, S циклини који везују киназу у току S фазе и потребни су за иницирање репликације ДНК, М циклини који уводе ћелију у митозу и G₁ циклини који помажу ћелији пролаз кроз стартну или рестрикциону тачку у G₁ фази [53]. У контролној тачки G1/S, заустављање ћелијског циклуса зависи од активности протеина p53 [55]. Механизми контроле ћелијског циклуса у фази S су још увек неразјашњени [55, 57-61]. Контрола ћелијског циклуса у G2 фази одвија се и зависно и независно од p53 [55, 62]. Ћелијски циклус се зауставља када је

оштећена ДНК, тада p53 индукује експресију ензима за репарацију, а ако неке грешке у ДНК ипак остану, p53 активира програм апоптозе (програмиране ћелијске смрти). Овај протеин контролише и експресију протеина p21, једног од три протеина који формирају породицу Cip/Kip протеина инхибитора активности CDK-циклинских комплекса [57, 63, 64].

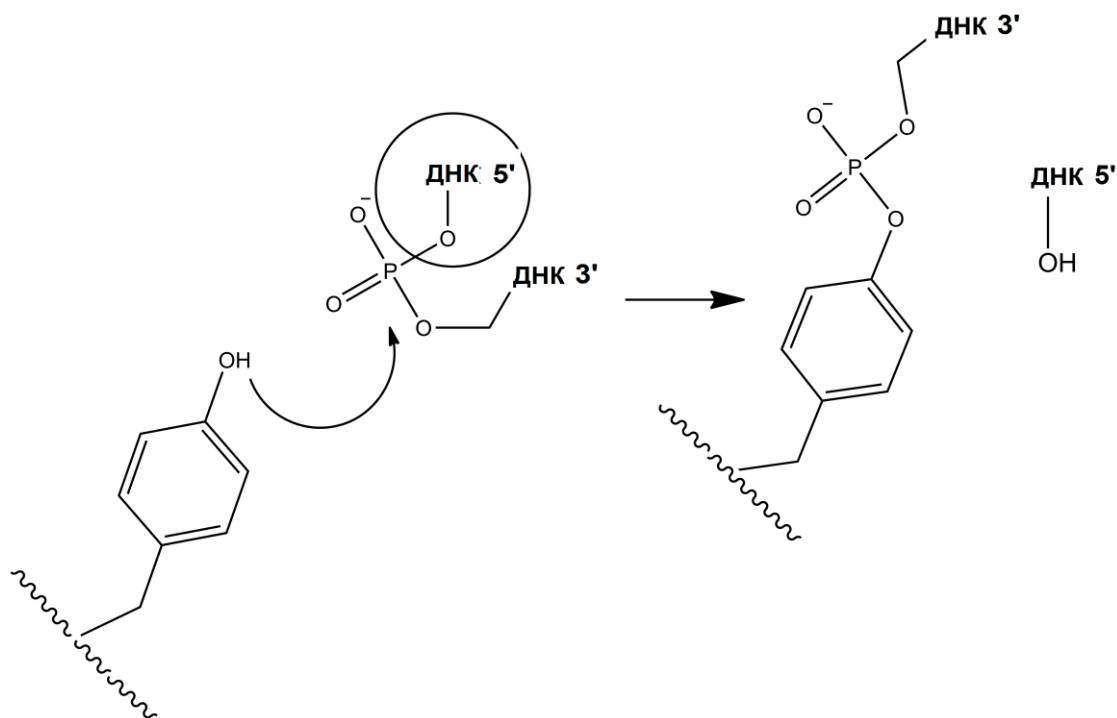
Како је познато да акридини своје дејство испољавају и као инхибитори различитих ензима, попут циклин зависних киназа и топоизомеразе, у овој дисертацији, биће у оквиру испитивања антитуморске активности новосинтетисаних деривата акридина испитан и њихов утицај на фазе ћелијског циклуса, као и на топоизомеразу Pa (ензим описан у делу 1.3.1).



Слика 7. Ћелијски циклус [54]

1.3.1. Дејство топоизомеразе II

За већину процеса за које је потребна информација садржана у ДНК, два ланца хеликса ДНК морају се раздвојити и то расплитање може бити реверзибилно (за потребе транскрипције или рекомбинације) или ирреверзибилно (за потребе репликације) [65, 66]. Како би процеси репликације, транскрипције, рекомбинације и ремоделовања хроматина могли да се правилно одвијају, неопходни су ензими топоизомеразе који могу да мењају топологију ДНК [65]. Све топоизомеразе реагују са ДНК тако што се ствара интермедијер као последица формирања фосфодиестарске везе између тирозина у ензиму и фосфатне групе ДНК (Слика 8).



Слика 8. Катализа реверзибилног прекида ДНК, трансестерификација између остатка тирозина у ензиму и фосфатне групе ДНК молекула

Зависно од тога да ли ензим „пресеца“ један, или истовремено оба ланца ДНК, разликују се топоизомераза I, односно топоизомераза II. У оквиру обе класе ових ензима, постоје одређене поткласе зависно од структуре.

За правилно функционисање топоизомеразе II неопходан је АТФ молекул. Везивање и хидролиза АТФ-а утиче на конформационе промене у ензиму и последично, на активност и промену ДНК топологије [65]. У хуманим ћелијама постоје два типа топоизомеразе II: топоизомераза II α , чија је експресија значајна у ћелијама које се деле и топоизомераза II β , чија је експресија једнака у ћелијама које се деле и у ћелијама које мирују [67].

Експресија топоизомеразе II α различита је у току ћелијског циклуса и највећа је у G₂/M контролној тачки, а најмања на крају митозе, док експресија топоизомеразе II β не зависи од фазе ћелијског циклуса [68].

Ниво експресије ензима одређује осетљивост ћелија на инхибиторе ензима.

У живим ћелијама које се деле, топоизомераза II уклања супернавоје ДНК у S фази, и катализује процесе раздвајања сестринских хроматида у току анафазе [65]. У односу на

функције наведених ензима, постоје одређена једињења која делују на ензиме. Инхибитори топоизомеразе могу да реагују са ДНК и формирају комплекс ДНК-једињење-ензим, при чему нема одмотавања супернавоја, и долази до оштећења ДНК које се описује као „тровање ДНК“ и апоптозе ћелије. Други начин деловања је инхибиција каталитичке активности ензима у анафазе и узроковање ћелијске смрти апоптозом [65, 68].

Као инхибитори топоизомеразе Pa , клинички су значајни цитотоксични лекови у које спадају доксорубицин, етопозид, актиномицин итд. [69, 70], па се ови лекови могу користити као контрола приликом испитивања дејства новосинтетисаних једињења као потенцијалних инхибитора овог ензима.

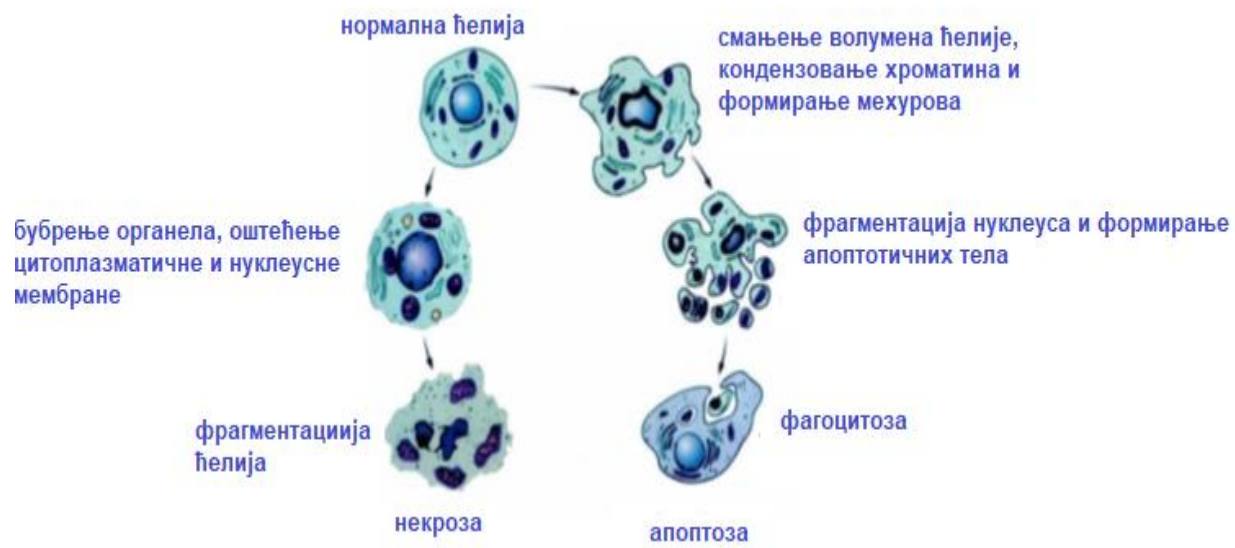
1.3.2. Ћелијска смрт

Некроза и апоптоза представљају две врсте ћелијске смрти (**Слика 9**). Који од ова два процеса ће се догодити зависи од стимулуса, генетске основе и микроокружења ћелије [71, 72]. Различити механизми ћелијске смрти нису међусобно искључиви, тако да могу деловати синергистички или могу бити међусобно супротстављени [73, 74].

Апоптоза представља „програмирану ћелијску смрт“ и пожељан, активан, уређен и генетски регулисан догађај. Разликују се морфолошке промене ране и касне фазе апоптозе. У раној апоптози долази до премештања молекула фосфатидил-серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране, кондензације хроматина и цитоплазме. У касној фази долази до дезинтеграције ћелијске мембране и пикнозе (згушњавања и фрагментације) једра, тако да на крају овог процеса настају фрагменти апоптотске ћелије који су окружени ћелијском мембраном и називају се апоптотична телашца [75, 76]. Пре ослобађања садржаја ћелија, макрофаги фагоцитују апоптотске ћелије. Како се у раној апоптози фосфатидил-серин налази са спољашње стране мембране, анексин рецептори који се налазе на површини макрофага га препознају, даље се макрофаг везује за апоптотску ћелију и активира се процес фагоцитозе. Услед оваквог механизма уклањања ћелија код апоптозе, не долази до инфламаторне реакције [77-79].

Некроза представља пасивну ћелијску смрт, која се одвија у нефизиолошким условима, приликом које долази до бубрења органела, а затим и читаве ћелије. Потом долази до дезинтеграције мембране ћелије и једра, услед чега се садржај ћелије ослобађа у околно ткиво. Овом приликом долази до привлачења инфламаторних ћелија и развоја инфламаторне реакције (**Слика 9**). Услед инфламације, долази до оштећења ткива, покретања система поправке и пролиферације, а управо ови процеси повољно утичу на онкогенезу и развој тумора и најважнија су фаза туморогенезе [77-80].

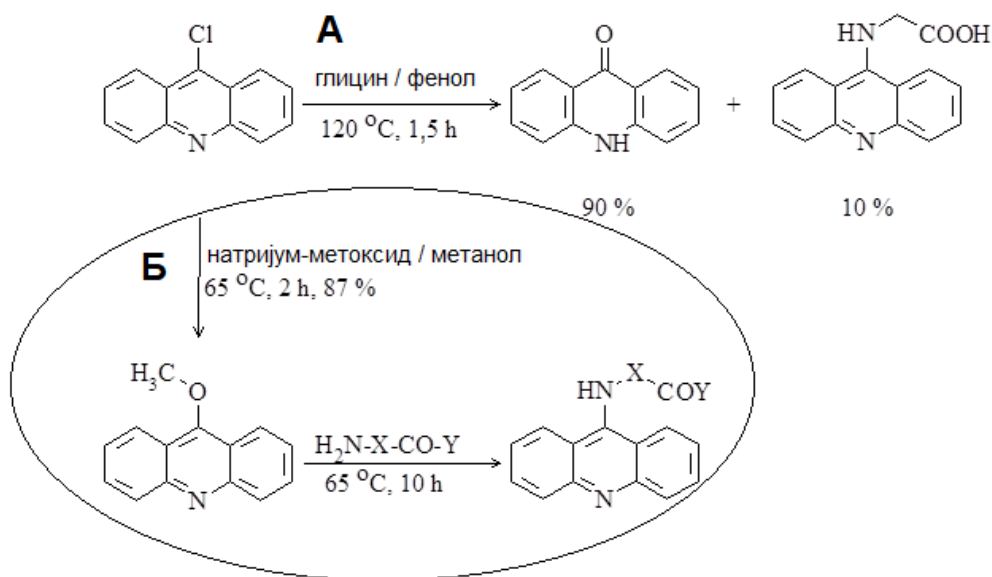
За једињења за која је показано да имају антитуморску активност, важно је испитати да ли до смрти ћелије доводе услед некрозе или апоптозе и у овој дисертацији у делу 4.3.2. биће описана анализа ћелијске смрти.



Слика 9. Морфолошке разлике између апоптозе и некрозе (слика преузета и адаптирана из референце [79] уз дозволу бр. 5597251163557 Copyright 2002, John Wiley & Sons, Inc.)

1.4. Синтеза аминокиселинских деривата акридина

Аутори *Lyakhov* и сар. испитивали су биолошку активност деривата 9-аминоакридина које су синтетисали. Приликом кондензације 9-хлороакридина са глицином у присуству фенола, споредни производ - акридон, добијен у великој количини, представљао је недостатак методе, док је производ реакције (добијен након додатка аминокиселина) био контаминиран фенолом. Осим тога и пречишћавање производа довело је до нових губитака (**Слика 10, метода А**). Каснијом модификацијом методе, применом процеса у коме аминокиселине или одговарајући естри аминокиселина реагују уз рефлукс са 9-метоксиакридином у анхидрованом метанолу, добијен је задовољавајући принос (**Слика 10, метода Б**). Аутори су навели да даље пречишћавање овако добијених производа није било потребно (чистоћа је била проверена хроматографијом на танком слоју). Применом теста на корену краставца, аутори су доказали да синтетисана једињења доводе до заустављања деобе ћелија и престанка раста ћелија. Утврђено је да постоји веза између дужине полиметиленског ланца и активности синтетисаних једињења [44].



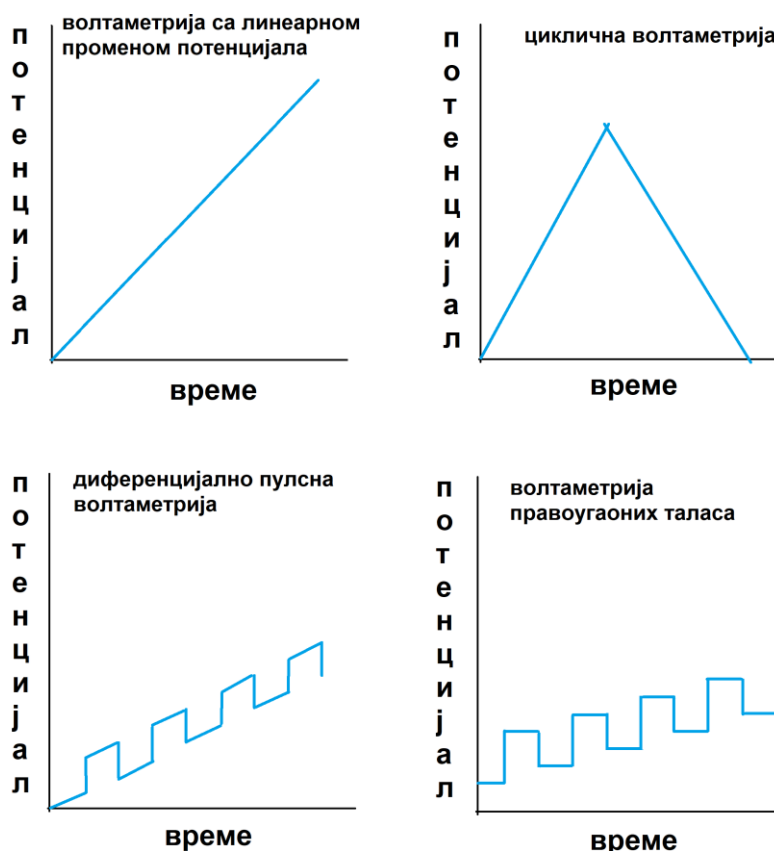
Слика 10. Синтеза аминокиселинских деривата акридина (слика преузета и адаптирана из референце [44] уз дозволу издавача)

Модификацијом описане методе (**Слика 10, метода Б**), у овој дисертацији, синтетисани су аминокиселински деривати акридина. 9-хлороакридин коришћен је као полазно једињење, док је уместо глицина и фенола, у првом кораку реакције коришћен натријум-алкоксидни раствор метанола, етанола или пропанола. У другом кораку реакције, коришћени су следећи естри аминокиселина: метил естри L-фенилаланина, L-хистидина, 1-метил-L-триптофана, 8-аминооктанске киселине; етил естри γ -аминобутерне киселине, 6-аминохексанске киселине, 3-аминопропанске киселине; пропил естри γ -аминобутерне киселине, 6-аминохексанске киселине, 3-аминопропанске киселине. Такође, коришћена је и аминокиселина 1-метил-L-триптофан.

1.5. Волтаметријске методе

Како метаболички активне ћелије представљају системе у којима се одвијају редокс процеси, примена електрохемијских техника за анализу процеса преноса електрона представља једну од важнијих фаза приликом испитивања нових једињења. ДНК живих ћелија је један од делова ћелије у коме се одвија континуални пренос електрона. Приликом интеракције једињења са ДНК применом електрохемијских техника може се одредити да ли је трансфер електрона олакшан или отежан, те донети закључак о јачини и типу интеракције. Како би се добила потпуна информација о процесу и механизму оксидације и редукције, успешно се користе волтаметријске методе (Слика 11): циклична волтаметрија (CV), диференцијално пулсна волтаметрија (DPV) и волтаметрија правоугаоних таласа (SWV) које се разликују по различитом побуђивачком сигналу и начину мерења струје [81]. Ове технике примењиване су за испитивање електрохемијског понашања деривата аминокридина као потенцијалних антитуморских агенаса [82]. Такође, коњугати триазол-акридина испитивани су електрохемијски применом наведене три технике са циљем одређивања редокс механизма [83]. Од посебног је значаја редокс понашање 9-хлороакридина, с обзиром да се може користити као прекурсор за синтезу деривата акридина са антитуморском активношћу [44].

У овој дисертацији, наведене методе CV, SWV и DPV коришћене су за испитивање редокс понашања 9-хлороакридина и најактивнијих синтетисаних аминокиселинских деривата акридина.



Слика 11. Различите методе промене потенцијала радне електроде у волтаметрији (слика преузета и адаптирана из референце [81])

1.5.1. Природа процеса који се могу пратити волтаметријским техникама

Јарослав Хејровски је 1959. године добио Нобелову награду за откриће и развој поларографије, методе код које је као радна електрода коришћена капајућа живина електрода, а на основу примењеног потенцијала мерен је интензитет струје поларографског таласа. Основни недостатак живе - њена токсичност, утицао је на развој нових волтаметријских метода, тј. метода са чврстим електродама као што су електрода са угљеничном пастом, бором допирана дијамантска електрода, електрода од стакластог угљеника и друге.

Да би електрохемијска реакција могла да се одвија, потребно је да постоји нека покретачка снага, тј. потенцијал електроде, при чему се у систему јавља струја када примењени потенцијал постане довољно негативан или позитиван да би дошло до електролизе. Електролизи подлеже електроактивна врста која је дифузијом стигла до површине електроде, а интензитет измерене струје сразмеран је концентрацији анализата. Овакви процеси одвијају се према Фарадејевом закону и називају се „фарадејски процеси“, а прате се преко трансфера електрона током редокс процеса:



где су O и R оксидовна и редукована форма редокс пара, а ne^- представља број електрона који учествују у реакцији [84].

Веза између потенцијала електроде и концентрације електроактивне врсте на површини електроде дата је Нернстовом једначином:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (1)$$

где је:

E – потенцијал електроде,

E^0 – стандардни електродни потенцијал,

n – број електрона који учествују у реакцији оксидо-редукције,

R – гасна константа ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

F – Фарадејева константа (96487 C mol^{-1}),

T – температура (K),

$\frac{a_{ox}}{a_{red}}$ – однос активности оксидованог и редукованог облика анализата.

Како је:

$$a = \gamma \cdot c \quad (2)$$

где је:

γ – коефицијент активности,

c – концентрација, када је јонска јачина у свим растворима једнака, што се постиже додатком инертног помоћног електролита у релативно високој концентрацији, Нернстов израз се може представити следећом једначином:

$$E = E'^0 + 2,303 \frac{RT}{nF} \log \frac{c_{ox}}{c_{red}} \quad (3)$$

Када кроз электроду не пролази струја, електрода је на равнотежном потенцијалу и није поларизирана, а равнотежни потенцијал представљен је Нернстовим изразом (3). Када кроз электроду пролази струја, потенцијал одступа од равнотежног и долази до поларизације. Реакција (I) увек је усмерена тако да се супротставља поларизацији, представља реакцију деполаризације, док се аналит назива деполаризатор [84, 85].

Укупна електродна реакција састоји се из преноса електроактивних врста до површине електроде, преноса електрона на граници електрода/раствор и преноса производа назад у раствор. Поред наведених процеса, код сложенијих реакција додатно се могу јавити и различити хемијски и површински процеси који претходе или прате процес преноса електрона [81], а најспорији ступањ реакције одређује брзину укупног електродног процеса [85].

Брзина реакције која се дешава на граничној површини електрода/раствор одређена је транспортом масе (транспортом врсте која се оксидује или редукује на површини електроде) и транспортом електрона. Транспорт масе представља кретање анализираних једињења у електрохемијској ћелији и одвија се на три начина: миграцијом (под дејством градијента електричног потенцијала), конвекцијом (под дејством градијента брзине) и дифузијом (под дејством градијента концентрације). Миграција се дешава услед кретања наелектрисаних честица кроз електрично поље и код већине електроаналитичких техника, ефекат миграције је минимизован употребом основног електролита чија је концентрација више од 100 пута већа од концентрације анализираних супстанци. Конвекција, тј. хидродинамички транспорт масе, дешава се услед кретања раствора, као последица мешања, или присуства ротирајуће или вибрирајуће електроде. Конвекцију је могуће само до одређене границе смањити, и то извођењем експеримента са растворима који се не мешају. До дифузионог кретања долази услед кретања молекула због постојања градијента концентрације. Како у експериментима који се прате применом електрохемијских техника између површине електроде и раствора увек постоји градијент концентрације електроактивне врсте, дифузија је појава заједничка за већину електроаналитичких експеримената. Струја која се јавља код процеса који су само дифузионо контролисани зависи од флукса (прилива) електроактивне врсте на површину електроде, што опет, зависи и од површине и од геометрије електроде [84].

Једнодимензиони флукс масе је описан првим Фиковим законом на следећи начин: ако постоји разлика густине или концентрације дате супстанце (∂C) у две тачке које се налазе на растојању ∂x , онда је флукс супстанце (J) изражен следећом једначином:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (4)$$

где је D – дифузиони коефицијент, величина која зависи од природе супстанци, температуре и вискозности раствора.

Флукс представља брзину одвијања процеса дифузије, а дефинише се као број честица које дифузијом пролазе кроз јединичну површину у јединици времена.

Промене у концентрацији, узимајући у обзир простор и време, описане су другим Фиковим законом који важи за услове нестационарне дифузије:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (5)$$

Када је струја контролисана само дифузијом, јачина дифузионе струје се може изразити преко промене концентрације аналита на растојању x од површине електроде, из првог Фиковог закона дифузије:

$$I = n \cdot F \cdot D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx} \quad (6)$$

где је:

I – интензитет струје (A),

n – број размењених електрона,

F – Фарадејева константа (96 485,3 C mol⁻¹),

D – дифузиони коефицијент (cm² s⁻¹),

A – површина електроде (cm²),

$\frac{dc}{dx}$ – промена концентрације анализата на растојању x од електроде.

Претходни израз може се трансформисати:

$$I = n \cdot F \cdot D \cdot A \cdot \frac{c_u - c_p}{dx} \quad (7)$$

где су: c_u - концентрација анализата у унутрашњости раствора и c_p - концентрација анализата на површини електроде. Када је $c_p = 0$, постиже се гранична дифузиона струја која је пропорционална само концентрацији анализата у унутрашњости раствора и добија се израз који се користи за квантитативну анализу електроактивних једињења [84, 85]:

$$I_d = n \cdot F \cdot D \cdot A \cdot \frac{c_u}{dx} \quad (8)$$

Процеси који се прате могу се одвијати реверзибилно и иреверзибилно.

Када је трансфер електрона између оксидоване и редуковане врсте спори ступањ, електродна реакција је иреверзибилна. Тада је концентрација електроактивне врсте једнака на површини електроде и у дубини раствора, а зависност потенцијала електроде и концентрације електроактивне врсте се не може описати Нернстовом једначином за реверзибилни електродни процес. Када је трансфер електрона између оксидоване и редуковане врсте врло брз, а транспорт масе једини спори ступањ, електродна реакција је реверзибилна. Уколико је и пренос масе, као и пренос електрона спори ступањ, реакција је квазиреверзибилна [86].

1.5.2. Електрохемијска ћелија

Електрохемијска мерења се врше у електрохемијској ћелији која се обично састоји од три електроде које су у контакту са раствором електролита: радна, референтна и помоћна електрода. Осим електрода и раствора, електрохемијска ћелија садржи и отвор за цевчицу за увођење инертног гаса са циљем уклањања раствореног кисеоника [87].

1.5.2.1. Радна електрода

Избор материјала од кога је израђена електрода зависи од опсега потенцијала електроде у одређеном раствору, као и од електрохемијских особина испитиваног анализата. Радна електрода треба да обезбеди висок однос сигнал-шум и репродуктивне резултате. Управо због тога, одабир радне електроде углавном зависи од два фактора: редокс понашања испитиваног анализата и позадинске струје у оквиру опсега потенцијала који је потребан за мерење. Интензитет измерене струје зависи како од дизајна ћелије, тако и од физичког облика радне електроде, док на процес преноса електрона који омогућава праћење редокс понашања електролита утиче материјал од кога је израђена електрода.

Предности чврстих електрода у односу на живину электроду су: мали електрични отпор, боље механичке карактеристике и примена у области веома позитивних потенцијала. Иако је постизање обновљивости површине чврстих електрода и даље изазов, а прецизан електрохемијски претретман и полирање су неопходни како би се добили репродуктивни резултати, ове електроде омогућавају испитивање оксидације многих органских молекула па су пронашле широку примену [84].

1.5.2.2. Електрода од стакластог угљеника

Електроде од стакластог угљеника (енгл. *glassy carbon electrode*, GCE) су веома значајане и често коришћене графитне електроде. Добијају се загревањем различитих врста полимера, најчешће полиакрилонитрила, на високим температурама (1000 – 3000 °C) под високим притиском, када влага и сви хетероатоми испаравају, а остају само угљеникови атоми. Под овим условима не долази до раскидања C-C веза, већ се мења дужина, која је већа у односу на дужину C-C веза у графиту.

Стакласти угљеник као материјал са sp^2 хибридизованим C атомима поседује способност ковалентног везивања па је због тога адсорпција честа појава на овим електродама. На ове електроде се лако адсорбују молекули или јони реактаната, као и међупродукти хемијских реакција, али и друге нечистоће присутне у раствору, тако да је припрема ових електрода предмет великог броја истраживачких радова [88]. Кинетика површинске оксидације и издвајање водоника су на GCE далеко спорији него на конвенционалним електродама (као што су електроде од злата или платине), па ове електроде имају широк опсег радних потенцијала од $-1,5\text{ V}$ па до 2 V , што зависи од рН вредности раствора и присутних електролита. Релативно су отпорне на екстремне услове рада. С обзиром да графитни материјали лако адсорбују органске материје, електрода од стакластог угљеника може бити модификована и коришћена за израду електрохемијских сензора и биосензора [89].

1.5.2.3. Референтна електрода

Потенцијал радне електроде у електроаналитичком експерименту је увек дефинисан у односу на неки стандард, тј. у односу на референтну электроду. Употреба референтне електроде има за циљ да обезбеди стабилан и репродуктиван потенцијал у односу на који се одређује потенцијал радне електроде. Референтна електрода је електрода друге врсте, чији је потенцијал константан током експеримента и независан од присуства електроактивне врсте у раствору. Најчешће коришћена референтна електрода је сребро–среброхлоридна (Ag/AgCl) електрода јер је руковање овом електродом једноставно, а опсег температура при којима се може користити је велики.

Потенцијал Ag/AgCl електроде се заснива на редокс реакцији [85]:



и зависи од активности хлоридних јона у раствору, а дат је изразом:

$$E_{Cl^-/AgCl,Ag} = E_{Cl^-/AgCl,Ag}^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-} \quad (9)$$

где је:

$E_{Cl^-/AgCl,Ag}$ – потенцијал сребро-среброхлоридне електроде,

$E_{Cl^-/AgCl,Ag}^0$ – стандардни електродни потенцијал,

a_{Cl^-} – активност хлоридних јона у раствору.

1.5.2.4. Помоћна електрода

Помоћна електрода у троелектродном систему користи се како би био омогућен алтернативни пут за проток струје, тако да кроз референтну электроду протиче струја мале јачине. У супротном, када би кроз референтну электроду протичала струја великог интензитета, потенцијал би био померен ван стандардне вредности. У троелектродном систему функција референтне електроде одвојена је од функције помоћне електроде на тај начин што струја која поларизује радну электроду протиче између радне и помоћне електроде. Потенцијал радне електроде мери се у односу на референтну электроду, у посебном електричном колу, методом компензације. Помоћна електрода може бити направљена од било ког материјала, било које геометрије, а да би се подржала струја која је генерисана на радној електроди, површина помоћне електроде мора бити најмање исте величине као и радна електрода. У практичном раду, практикује се да површина помоћне буде вишестуко већа од површине радне електроде, како би јој отпор у електричном колу био занемарљив у поређењу са отпором радне електроде [86].

1.5.3. Циклична волтаметрија

Циклична волтаметрија је електроаналитичка потенциодинамичка техника која се примењује у многим областима хемије и медицине за квалитативну анализу електрохемијских реакција. Заснива се на мерењу интензитета струје која протиче кроз електролитичку ћелију, приликом линеарне промене потенцијала радне електроде са временом. Потенцијал се линеарно мења задатом брзином до одређене максималне вредности, а након тога се мења смер линеарне промене потенцијала и добија се запис, циклични волтамограм, са одговарајућим пиковима који су одређени потенцијалом (E_p) и интензитетом струје пика (I_p) [81]. Анализом података добијених применом CV могу се добити информације о природи и реверзибилности процеса, броју размењених електрона/протона, термодинамици и кинетици редокс процеса, али и о куплованим хемијским реакцијама и адсорпционим процесима [81, 87].

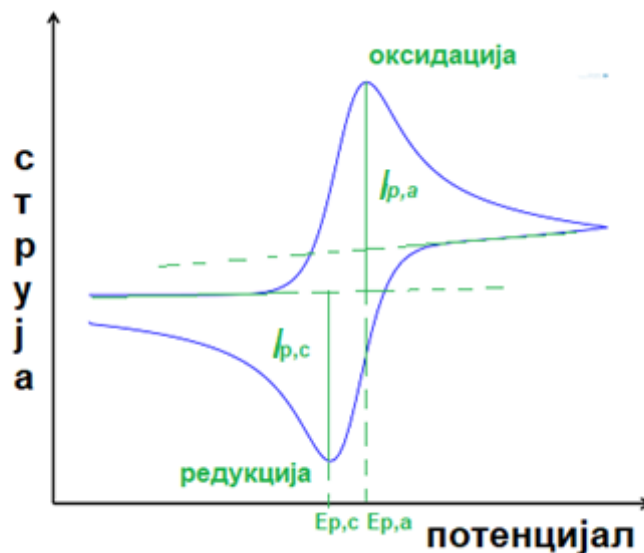
Када се потенцијал мења од позитивнијих ка негативнијим вредностима, на одређеном потенцијалу долази до редукције електроактивне врсте (реакција III).



Редукција се на цикличном волтамограму може пратити појавом катодног пика и одговарајуће катодне струје, $I_{p,c}$ (Слика 12) [90]. Када се сва количина електроактивне врсте на површини електроде редукује, катодна струја достиже максимум, $I_{p,c}$. Након достизања крајњег потенцијала, смер промене потенцијала се мења. С обзиром да се приликом снимања волтамограма раствор не меша, а време између преокрета потенцијала је кратко, производ који настаје као последица редукције је у непосредној близини површине електроде и може се оксидовати када се промени потенцијал. Као резултат повратне реакције:



настаје анодни пик, чији је интензитет струје $I_{p,a}$.



Слика 12. Типични циклични волтамограм (слика преузета и адаптирана из референци [81,90])

За реверзибилан процес, описан реакцијом I, интензитет струје на 25 °C дат је *Randles-Sevcik* једначином [84, 91, 92]:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C \quad (10)$$

где је:

I_p – интензитет струје пика (A),

n – број размењених електрона,

A – површина електроде (cm²),

D – дифузиони коефицијент (cm² s⁻¹),

v – брзина промене потенцијала (V s⁻¹),

C – концентрација почетног облика анализата у раствору који подлеже оксидацији/редукцији (mol cm⁻³).

Према овом изразу, струја пика је директно пропорционална концентрацији анализата и квадратном корену брзине поларизације. Број електрона (n) који се размени током реверзибилне електродне реакције може се одредити из разлике потенцијала анодног (E_{pa}) и катодног (E_{pc}) пика која износи око 59 mV / n .

Ова разлика се може представити једначином (11):

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad (11)$$

Код реверзибилног процеса, потенцијали пикова не зависе од брзине поларизације.

За утврђивање реверзибилности дифузионо контролисаног процеса могу се користити следеће релације [84]:

E_p је независно од v ;

I_p је пропорционално $v^{1/2}$;

I_p се линеарно мења са променом концентрације;

$$E_p - \frac{E_p}{2} = \frac{57 \text{ mV}}{v};$$

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{59 \text{ mV}}{n};$$

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1.$$

За квазиреверзибилне системе, струја је контролисана и трансфером масе и трансфером наелектрисања. Циклични волтамограми квазиреверзибилних система су промењени у односу на реверзибилне системе и више су раздвојени. Параметри квазиреверзибилних система могу бити приказани на следећи начин:

E_p је зависно од v ;

I_p је зависно од $v^{1/2}$ али зависност није линеарна;

Струја пика у директном смеру се линеарно мења са променом концентрације;

$E_{pa} - E_{pc}$ зависи од v ;

$E_p - \frac{E_p}{2}$ делимично зависи од v и има вредности између $\frac{48 \text{ mV}}{an}$ и $\frac{57 \text{ mV}}{an}$.

Код трансфера електрона у системима који су мање реверзибилни, пикови волтамограма су заобљенији и разлика у потенцијалима је већа него код реверзибилних система. У случају израженије иреверзибилности, интензитети струја анодног и катодног пика могу се знатно разликовати, могу бити још више раздвојени, па чак један од њих може да изостане (не јавља се пик у повратном циклусу).

Потпуно иреверзибилни системи су окарактерисани потпуним изостанком пика у повратном смеру и померањем потенцијала пика са променом брзине промене потенцијала. Такође, на температури 25°C , струја пика се може представити једначином [93, 94]:

$$I_p = 2,99 \times 10^5 n \cdot (\alpha n_\alpha)^{1/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C \quad (12)$$

где је:

α – коефицијент преноса,

n_α – број електрона који учествују у ступњу који одређује брзину процеса (најспорији ступањ).

Параметри иреверзибилности се могу сумирати на следећи начин:

E_p је зависно од v ;

I_p је пропорционално $v^{1/2}$;

Струја пика у директном смеру $I_{p \text{ forward}}$ се линеарно мења са променом концентрације;

Струја пика у повратном смеру, $I_{p \text{ reverse}} = 0$;

$\frac{I_{p \text{ forward}}}{I_{p \text{ reverse}}} = 0$ за све v ;

$$E_p - \frac{E_p}{2} = \frac{48 \text{ mV}}{an}.$$

Анализом једначине $E_p - \frac{E_p}{2} = \frac{48 mV}{\alpha n}$ за иреверзибилне системе, може се одредити број електрона који учествују у редокс процесу. Како α представља коефицијент преноса наелектрисања и за иреверзибилне процесе увек има вредност мању или једнаку 1 (најчешће између 0,3 и 0,7), када су за пик познате вредности E_p и $\frac{E_p}{2}$, број електрона се може израчунати.

За иреверзибилне системе, потенцијал пика анодног процеса помера се ка позитивнијим вредностима потенцијала за око $\frac{30 mV}{\alpha n}$ при повећању брзине промене потенцијала 10 пута.

Имајући у виду да се електрохемијски процес обично састоји од реакције трансфера електрона, трансфера реактанта из раствора до површине електроде (и производа са површине електроде у раствор) и могућих хемијских реакција које ове процесе прате или им претходе, важно је описати и процес адсорпције. Приликом трансфера реактанта до електроде, осим дифузије, може бити присутна и адсорпција, тј. реактант може адсорпционим силама бити везан за површину електроде. Уколико је адсорбовани реактант електроактиван, на цикличном волтамограму се може уочити адсорпциони пик, чија висина зависи од јачине адсорпције. За разлику од дифузионо контролираних процеса код којих је интензитет струје пропорционалан квадратном корену брзине промене потенцијала, код адсорпционо контролираних процеса, интензитет струје пика пропорционалан је брзини промене потенцијала и то према једначини (13) за реверзибилне процесе [84, 95]:

$$I_p = (n^2 F^2 / 4RT) v A \Gamma \quad (13)$$

где је:

I_p – интензитет струје пика (А),

n – број размењених електрона,

F – Фарадејева константа (96 485,3 C mol⁻¹),

R – универзална гасна константа (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹),

T – температура (К),

v – брзина промене потенцијала (V s⁻¹),

A – површина електроде (cm²),

Γ – количина анализата која се адсорбује (mol cm⁻²) тј. површинска запоседнутост електроде.

Код процеса код којих постоји адсорпција, може се уочити линеарна зависност логаритма интензитета струје пика од логаритма брзине промене потенцијала, при чему нагиб има вредност већу од 0,5. У случају када је адсорпција једини присутан процес нагиб ове зависности има вредност ≈ 1 [96].

Анализом промене потенцијала пика са променом рН вредности раствора, може се претпоставити да је са променом рН вредности редокс процес олакшан или отежан али и да ли поред електрона и протони учествују у редокс процесу на површини електроде. Када у електродном процесу учествују протони, приликом редукције полуталасни потенцијал помера се ка негативнијим вредностима са порастом рН. Описана зависност за иреверзибилан процес представљена је једначином:

$$E_{1/2} = E_{1/2}^0 + m \frac{RT}{\alpha n_{\alpha} F} pH \quad (14)$$

где је:

$E_{1/2}$ – полуталасни потенцијал када протони не учествују у редокс процесу,
 m – број протона који учествују у редокс процесу.

Из једначине (14) могуће је извести једначину (15), која представља однос нагиба зависности $E_{1/2} = f(pH)$:

$$\text{нагиб} = \frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta pH} = \frac{0,059}{\alpha n_{\alpha}} m \quad (15)$$

Према једначини (15), уколико је $E_{1/2} = f(pH)$ зависност линеарна, а нагиб има вредност $\approx 59 \text{ mV}$, на температури од 298 K, у редокс процесу учествује исти број електрона и протона [96-99,100].

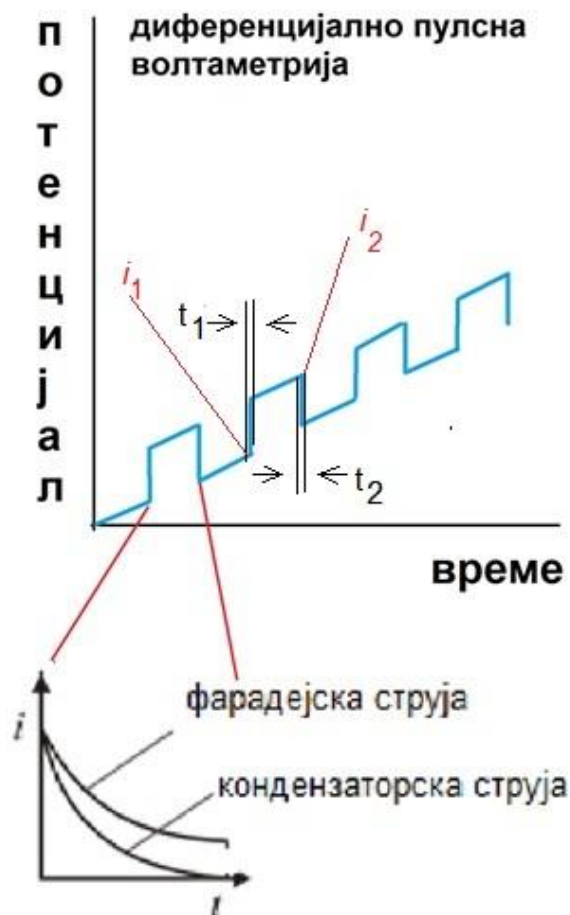
Анализом утицаја брзине промене потенцијала, тј. зависности $E_p = f(\log v)$, могуће је добити детаљнији увид у механизам редокс процеса. Теоријска вредност нагиба наведене зависности од $\approx 20 \text{ mV}$ указује на процес формирања димера, односно на присуство хемијске реакције, поред електрохемијске реакције [101].

1.5.4. Пулсне волтаметријске технике

Пулсна волтаметрија је широко примењивана техника за детекцију ниских концентрација анализата. Најчешће се користе диференцијално пулсна волтаметрија (DPV) и волтаметрија правоугаоних таласа (SWV), које се разликују по облику пулса потенцијала који се доводи електроди. Добијени сигнал представља зависност разлике струје измерене у две тачке (непосредно пре почетка и пре краја пулса потенцијала) од примењеног потенцијала [102]. Предност SWV је што се овом методом могу добити информације и о редукцији и о оксидацији анализата истовремено [81].

1.5.4.1. Диференцијално пулсна волтаметрија

Диференцијално пулсна волтаметрија је изузетно корисна техника за одређивање ниских концентрација електроактивних супстанци и често се користи за одређивање фармацеутски активних супстанци присутних у траговима у фармаколошким препаратима и узорцима биолошког материјала. DPV је метода у којој је сигнал побуђивања диференцијално пулсни. Овај сигнал приказан је на Слици 13 [103].



Слика 13. Сигнал побуђивања у диференцијално пулсној волтаметрији (слика преузета и адаптирана из референци [81, 103])

У овој методи се у одређеном времену t_1 мери струја i_1 , а затим се примењује пулс потенцијала ниске амплитуде. У времену t_2 , након примене новог пулса потенцијала, поново се мери струја, непосредно пре краја пулса, означена као i_2 . Параметар који се прати у диференцијално пулсној волтаметрији је разлика струја $i_2 - i_1$ [84].

$$\Delta I = i_2 - i_1 \quad (16)$$

Запис је у облику криве струја-потенцијал и има облик пика.

Струја пика у диференцијално пулсној волтаметрији је директно пропорционална концентрацији одговарајућег анализата, што се може видети из једначине (17) за реверзибилне процесе:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A C}{4RT} \Delta E_p \sqrt{\frac{D}{\pi t_m}} \quad (17)$$

где је:

I_p – интензитет струје пика (А),
 n – број размењених електрона,
 F – Фарадејева константа (96 485,3 C mol⁻¹),
 R – универзална гасна константа (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹),
 T – температура (К),
 A – површина електроде (cm²),
 D – дифузиони коефицијент (cm² s⁻¹),
 t_m – време трајања периода пулса потенцијала.

Полуширина пика, параметар добијен са волтамограма, може се користити за одређивање броја електрона који учествују у редокс реакцији, према једначини:

$$W_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{nF} \quad (18)$$

где је:

$W_{1/2}$ – полуширина пика (ширина пика на половини висине пика),
 n – број размењених електрона,
 F – Фарадејева константа (96 485,3 C mol⁻¹),
 R – универзална гасна константа (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹),
 T – температура (К).

Применом DPV могу се уочити разлике између реверзибилних и иреверзибилних система, тако што иреверзибилни редокс системи дају шире и ниже пикове са мањом осетљивошћу и нижом резолуцијом у односу на реверзибилне системе [84, 104], што је описано једначином (19):

$$W_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{\alpha n F} \quad (19)$$

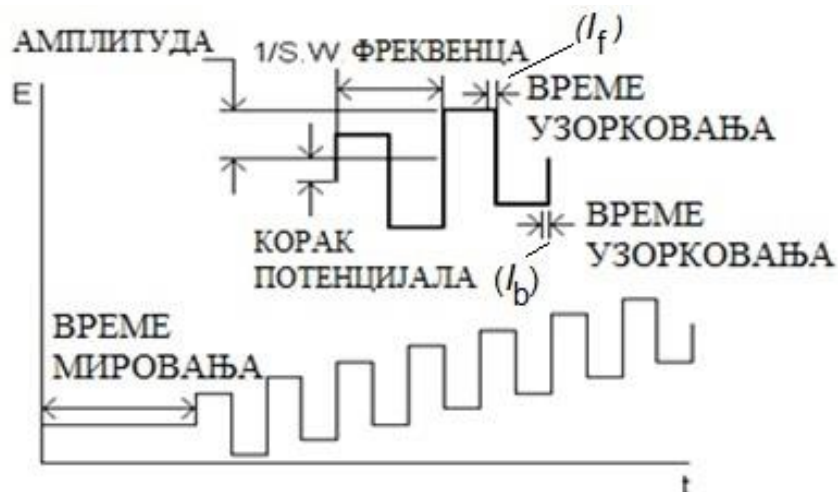
где је α – коефицијент преноса.

1.5.4.2. Волтаметрија правоугаоних таласа

Волтаметрија правоугаоних таласа је техника у којој се примењује низ пулсева потенцијала константне амплитуде који се надовезује на степеничasto растући потенцијал. Овај побуђивачки потенцијал је графички представљен на **Слици 14**.

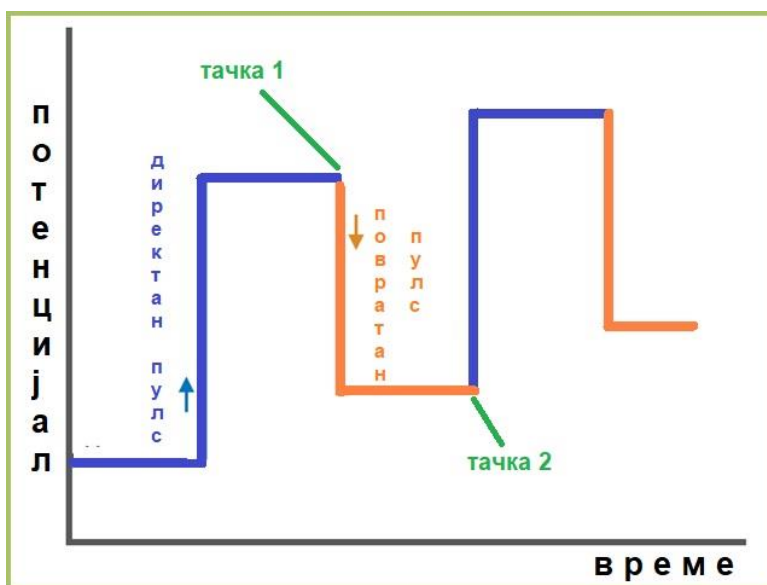
SWV је слична DPV методи, у смислу да се струја мери два пута током трајања пулса што резултује диференцијалним одговором. Директна струја I_f се мери пре него што је опадајући потенцијал примењен (у тачки 1, **Слика 15**), а реверзна (повратна) струја I_b се мери на крају повратног пулса (у тачки 2, **Слика 15**). Струје се мере током последњих неколико микросекунди сваког пулса и разлика између њих је укупна струја која се дефинише као:

$$\Delta I = I_f - I_b \quad (20)$$



Слика 14. Сигнал побуђивања у SWV (слика преузета и адаптирана из референце [84])

Резултујући волтамограм је у облику симетричног пика, а струја пика је пропорционална концентрацији електроактивне компоненте. Како добијени пик представља последицу оксидације и редукције испитиваног анализата, велика предност методе је што је из једног експеримента могуће добити информације и о процесу редукције и о процесу оксидације испитиваног анализата. Анализом пикова (интензитета струја) који представљају директну и повратну компоненту струје укупног пика (I_f и I_b) могу се донети закључци о реверзибилности процеса. Уколико су интензитети струја пикова у односу 1:1, а потенцијали приближно једнаки, процес је реверзибилан, док уколико у повратној компоненти струје нема пика, тј. $I_b = 0$, или је пик слабо изражен, процес је ирреверзибилан [84].



Слика 15. Директан и повратан пулс, SWV (слика преузета и адаптирана из референце [103])

Веома ниске границе одређивања од $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ је могуће постићи захваљујући ефикасном опадању капацитивне струје. Осетљивост је неколико пута већа него код диференцијално пулсне волтаметрије, како за реверзибилне тако и за ирреверзибилне системе.

SWV има неколико предности у електроанализи. Прво, непожељни ефекти нефарадејске струје су редуковани, тако да брзина снимања може значајно да се повећа и типична мерења у SWV трају само 1 – 5 s, док DPV мерења трају око 2 – 4 минута. Фреквенција у опсегу од 1 до 100 Hz дозвољава употребу екстремно брзе промене потенцијала. Осетљивост и брзина SWV чине је корисном методом за анализу, нарочито за одређивање једињења присутних у траговима [84].

SWV се може користити за испитивање електрохемијског понашања анализата како у раствору, тако и након адсорпције на површини електроде. Смањење сигнала који описује процес оксидације или редукције након адсорпције анализата на површини електроде, може бити представљено нормализованим интензитетом струје (једначина 21), кроз проценат промене сигнала:

$$d(I)\% = \frac{I_{p, \text{ адс}}}{I_{p, \text{ сол}}} \times 100 \quad (21)$$

где $I_{p, \text{ адс}}$ представља интензитет струје пика на волтамограму који је добијен након урањања електроде у раствор анализата, инкубације у току одређеног временског периода, и након тога трансфера у основни раствор, а $I_{p, \text{ сол}}$ представља интензитет струје пика на волтамограму који је добијен након снимања раствора анализата [93, 105, 106]. На основу добијених вредности нормализованог интензитета струје може се претпоставити да ли анализат показује афинитет за адсорпцију на површини електроде.

1.6. ДНК биосензори

1.6.1. Електрохемијско понашање пуринских и пиримидинских база, нуклеотида, нуклеозида и ДНК на електроди од стакластог угљеника

За испитивање интеракције малих молекула са ДНК најчешће се користе UV-VIS спектрофотометрија, флуориметрија, електрофореза, као и електрохемијске методе [107]. Интеракција молекула и ДНК може се волтаметријски пратити у раствору – када се у електрохемијској ћелији налазе раствор испитиваног молекула и раствор ДНК, или на површини електроде где је претходно ДНК имобилизована (евапорацијом или електростатичком адсорпцијом). Овако модификована електрода представља ДНК биосензор који се урања у раствор испитиваног молекула, након чега се прати интеракција [108].

Најшире примењивана електрохемијска техника за испитивање интеракције ДНК и различитих молекула је волтаметрија, и то диференцијално пулсна волтаметрија јер омогућава испитивање у широком опсегу концентрација и представља осетљиву методу [109, 110]. Ипак, волтаметрија правоугаоних таласа има одређене предности у односу на диференцијално пулсну волтаметрију— захтева краће време анализе, показује бољу поновљивост и мањи однос сигнал/шум [111].

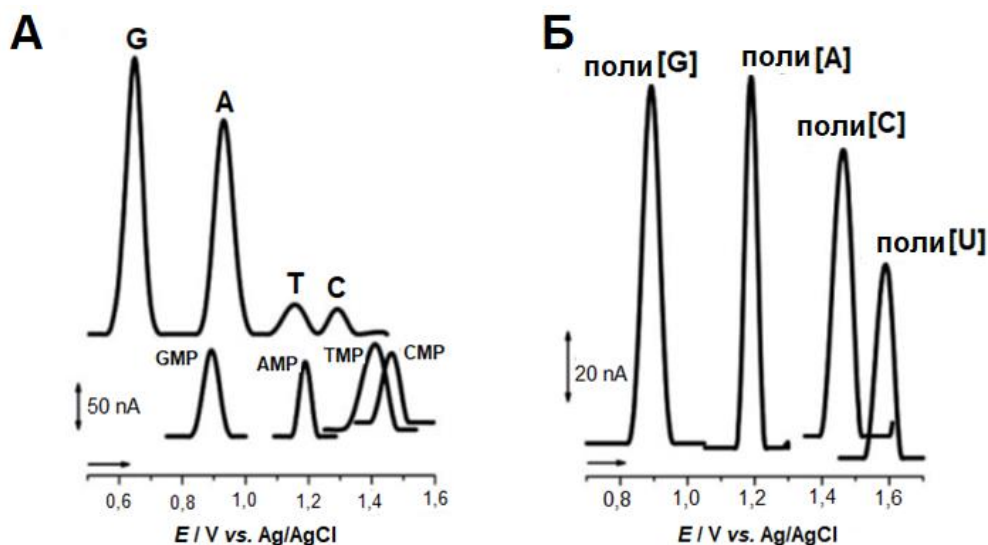
Уколико након интеракције, дође до померања потенцијала волтаметријских пикова ДНК ка негативнијим вредностима, тип интеракције је електростатичка интеракција, док уколико дође до промене потенцијала ка позитивнијим вредностима, тип интеракције је интеркалација [112]. Волтаметрија омогућава и да се прати оксидативно оштећење ДНК тако што се прати пик који се у случају оксидативног оштећења појављује при потенцијалу од 0,4 до 0,6 V негативнијем од потенцијала дезоксигуанозина или дезоксиаденозина и одговара једињењима 8-оксо гуанину односно 2,8-дихидрокси аденину [113-115].

Услед интеракције испитиваног молекула и ДНК долази до промене морфологије ДНК молекула и последично до промене интензитета сигнала. Може доћи до денатурације дела ДНК на месту интеракције што олакшава приступ електроактивних центара молекула ДНК (азотне базе) површини угљеничне електроде, те доводи до лакше размене електрона и већег интензитета сигнала. Добијени сигнал може бити искоришћен за анализу интеракције молекула са ДНК као и за одређивање типа интеракције [116, 117]. Услед интеракције, може такође доћи до формирања ригидније структуре и последично смањеног трансфера електрона до површине електроде и нижег сигнала (интензитета струје пика) [118-120].

Електрохемијско понашање азотних база ДНК испитивано је применом волтаметријских техника на различитим угљеничним електродама [121-126]. Утврђено је да се редокс процеси одвијају на пуринским и пиримидинским базама, док су шећерне компоненте и фосфатне групе електрохемијски неактивне на угљеничним електродама и у воденим растворима [121-124]. Редокс механизам слободних пуринских и пиримидинских база у воденим растворима зависи од рН вредности, при чему се оксидација пуринских база одвија на негативнијим потенцијалима у односу на пиримидинске базе [126]. Оксидација пиримидинских база се одвија на потенцијалима који су блиски потенцијалу издвајања кисеоника, па их је тешко детектовати. На **Слици 16** приказани су волтамограми пуринских и пиримидинских база кориговани на позадинске процесе (базну линију), тј. *baseline* кориговани волтамограми (у даљем тексту – кориговани волтамограми).

Аутори *Brett* и сар. [126] испитали су оксидацију свих азотних база, нуклеозида и нуклеотида при рН 7,4. Интензитети струја оксидације цитозина и урацила били су мањи у односу на сигнале за исте концентрације аденина и гуанина, што је објашњено споријом

оксидацијом пиримидинских база. Такође, нуклеозиди и нуклеотиди свих база се могу оксидовати на потенцијалима који су за око 0,2 V позитивнији од потенцијала на којима долази до оксидације одговарајућих база. Како ни шећерне компоненте, ни фосфатне групе нису електроактивне, промена положаја волтаметријских пикова нуклеозиди и нуклеотида, тј. отежан трансфер електрона, вероватно је последица гликозидне везе. Сматра се да присуство фосфатне групе значајно утиче на смањење интензитета струје пика, па је сигнал пика нуклеотида мањи од пика нуклеозиди. Такође, испитивана је оксидација хомополинуклеотида свих база и показано је да се хомополинуклеотиди оксидују на истим потенцијалима као и одговарајући нуклеотиди (Слика 16)[126, 127].

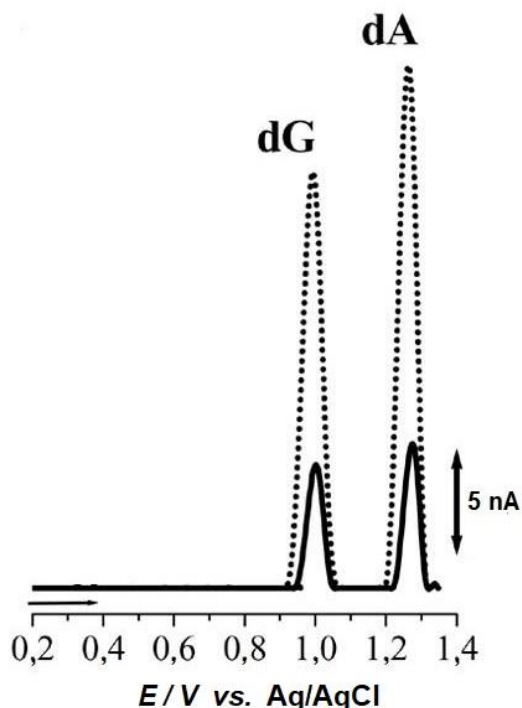


Слика 16. Кориговани диференцијално пулсни волтамограми:

А) смеше коју чине 20 μM гуанин (G), 20 μM аденин (A), 20 μM тимин (T) и 20 μM цитозин (C), 20 μM гуанозин-5-монофосфат (GMP), 20 μM аденозин-5-монофосфат (AMP), 500 μM тимидин-5-монофосфат (TMP) и 500 μM цитидин-5-монофосфат (CMP) у 0,1 М фосфатном пуферу рН 7,4 на GCE (дијаметра 1,5 mm) (слика преузета из референце [126] уз дозволу бр. 5597270442546, Copyright 2004, Elsevier) и

Б) 40 $\mu\text{g/mL}$ поли[G] и поли[A], 100 $\mu\text{g/mL}$ поли[C], и 250 $\mu\text{g/mL}$ поли[U] у 0,05 М фосфатном пуферу рН 7,4; Амплитуда пулса 50 mV, време трајања периода пулса потенцијала 70 ms, брзина снимања 5 mV/s (слика преузета из референце [127, 128] уз дозволу, Copyright 2006, American Chemical Society)

Испитивањем електрооксидације дволанчане и једноланчане ДНК, утврђено је да се применом електроде од стакластог угљеника могу на снимљеним волтамограмима уочити два јасно раздвојена пика. Ова два пика последица су оксидације дезоксигуанозина (dG) и дезоксиаденозина (dA). Флексибилна једноланчана ДНК садржи базе које су, у поређењу са ригидном дволанчаном ДНК, више изложене тако да могу остварити јаче интеракције са површином електроде, па су интензитети струја које су последица оксидације dG и dA у једноланчаној ДНК већи од одговарајућих струја у дволанчаној ДНК, тј. трансфер електрона је бржи/лакши, Слика 17 [128]. Како услед оксидације пиримидинских база настају пикови чије су струје веома ниске, ове пикове није могуће детектовати.



Слика 17. Кориговани диференцијално пулсни волтамограми дволанчане (—) и једноланчане (⋯⋯) ДНК имобилизоване на GCE; концентрација 60 $\mu\text{g/mL}$ у 0,1 М ацетатном пуферу, рН 4,5 (слика преузета из референце [128] уз дозволу бр. 1381591-1, Copyright 2010, Betham Science Publishers)

Анализом интензитета струје пикова који потичу од база ДНК могуће је испитивати интеракцију анализата са ДНК. Смањење интензитета струје пика који потиче од база ДНК вероватно је резултат интеракције анализата са резидуама база ДНК и формирања ДНК агрегата, као што је већ познато за друга једињења која интеркалирају [129].

Промене интензитета струје након интеракције могу се представити као нормализована струја пика $d(dA)(\%)$ за дезоксиаденозин, или $d(dG)(\%)$ за дезоксигуанозин применом једначине (22):

$$d(dA)\% = \frac{I_{p,dA}}{I_{p0,dA}} \times 100 \quad (22)$$

где $I_{p,dA}$ и $I_{p0,dA}$ представљају интензитет струје пика дезоксиаденозина/дезоксигуанозина после и пре интеракције са анализатом.

Појава да се природа интеракције може променити, од електростатичке интеракције до интеркалације, са повећањем јонске јачине, већ је била уочена и објављена [130, 131].

1.6.2. Електрохемијски ДНК биосензор

Према *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), електрохемијски биосензор представља самостални интегрисани уређај, способан да обезбеди специфичне квантитативне или семиквантитативне аналитичке информације користећи биолошки елемент препознавања (биохемијски рецептор) који је у директном контакту са електродом. Биолошки елемент преводи информације из биохемијског домена у хемијски или физички сигнал са високим степеном селективности за испитивани аналит, док електрода представља део сензора који служи за пренос сигнала са биолошког елемента у електрични домен [132, 133].

Висока осетљивост и прецизност, могућност повезивања са модерним технологијама микрофабрикације, преносивост, ниска цена, минимални енергетски захтеви, независност од турбидитета или оптичких особина узорка, чине електрохемијске биосензоре веома погодним за употребу [134, 135].

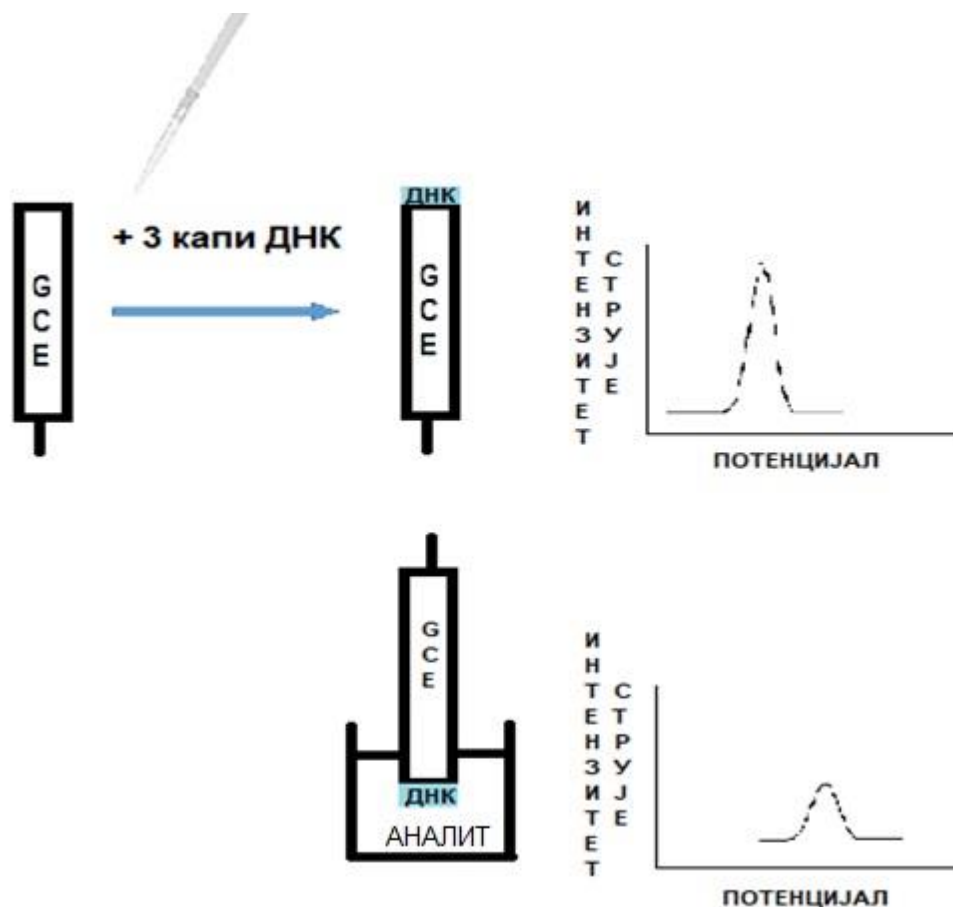
ДНК електрохемијски биосензор користи ДНК (једноланчану или дволанчану), пуринске или пиримидинске базе, нуклеозиде или нуклеотиде као биолошки елемент, док се од електрода најчешће користе угљеничне електроде. За оптималан одговор система, важно је правилно формирати биосензор и одабрати оптималне услове.

Експериментални радови показали су да је сигнал који потиче од база ДНК највећи када се експерименти изводе на рН 4,5 – 5,5, услед боље адсорпције ДНК молекула на угљеничну површину, иако се ова рН вредност разликује од физиолошке (рН 7,4) [129].

Стабилност дволанчане ДНК у рН области 4 – 8 која је потврђена у раду аутора *Nowicka* и сар. [136], оправдава овакав приступ, тј. извођење експеримената на рН 4,6 у овој дисертацији.

Постоје три различита типа ДНК биосензора, зависно од процедуре за имобилизацију ДНК на електроди: танкослојни, широкослојни и вишеслојни ДНК биосензор.

Танкослојни биосензор се формира тако што се одговарајућа електрода урони у раствор ДНК и у току претходно оптимизованог времена примени претходно оптимизовани позитивни потенцијал. Широкослојни биосензор формира се тако што се на електроду наноси раствор ДНК велике концентрације (изнад 30 mg mL^{-1}) [128, 137]. Вишеслојни ДНК биосензор (**Слика 18**) формира се тако што се на површину електроде сукцесивно наноси неколико капи (најчешће три) раствора ДНК ниже концентрације (испод $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), при чему је важно да се, пре nanoшења наредне капи, претходно нанета кап (капи) осуши/е [128, 137].



Слика 18. Формирање вишеслојног ДНК биосензора

У овој дисертацији биће коришћен вишеслојни ДНК биосензор са циљем испитивања интеракције са ДНК, применом волтаметрије превоугаоних таласа како прекурсора за синтезу аминокиселинских деривата акридина, тако и најактивнијих аминокиселинских деривата акридина.

Применом вишеслојног ДНК биосензора могуће је одредити привидну константу везивања комплекса аналит–ДНК_{адс}, који настаје приликом инкубације раствора аналита и ДНК молекула адсорбованих на површини електроде (ДНК_{адс}), уз модификацију стандардне процедуре титрације [138, 139]. Приликом извођења експеримента, концентрација ДНК на површини електроде је константна, док се повећава концентрација раствора аналита. Ова модификација стандардне процедуре титрације изведена је претпостављајући да се само један тип комплекса формира и да се процес комплексирања може представити следећом равнотежном једначином:



и одговарајућом константом равнотеже, која је представљена једначином (23):

$$K = \frac{[(\text{аналит})_n\text{–ДНК}_{\text{адс}}]}{[\text{ДНК}_{\text{адс}}][\text{аналит}]^n} \quad (23)$$

где су равнотежне концентрације појединачних компонената посматране као део укупне концентрације у реакционој смеси:

$$[\text{ДНК}_{\text{адс}}] = c(\text{ДНК}_{\text{адс}}) - [(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}]$$

и

$$[\text{аналит}] = c(\text{аналит}) - [(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}].$$

а n представља моларну количину анализата који реагују са моларном количином ДНК [140].

Према Хиловом моделу кооперативности [141], фракција анализата која је везана за адсорбовану ДНК (f) је у корелацији (приказаној једначином 23) са равнотежном константом реакције дисоцијације (K_d) и константом везивања ($K = K_d^{-1}$).

$$f = \frac{[(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}]}{[(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}]_{\text{макс}}} = \frac{[\text{аналит}]^n}{[\text{аналит}]^n + K_d^n} \quad (24)$$

где је $[(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}]_{\text{макс}}$ максимална концентрација базних парова који могу формирати комплекс, а $[(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}]$ је концентрација базних парова који формирају комплекс при одређеној концентрацији анализата. Разлика наведених концентрација базних парова представља концентрацију слободних базних парова који су доступни за везивање са анализатом и описана је једначином (25):

$$[\text{ДНК}_{\text{адс}}] = [(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}]_{\text{макс}} - [(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}] \quad (25)$$

Једначине (26) и (27) описују зависност интензитета струје волтамтеријског пика, под условима када је концентрација ДНК адсорбована на површини електроде константна и инкубирана са раствором анализата чија се концентрација мења:

$$I_{\text{КОМПЛЕКСА}} = K \cdot n \cdot [(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}] \quad (26)$$

$$I_{\text{ДНК}} = K \cdot n \cdot [(\text{аналит})_n - \text{ДНК}_{\text{адс}}]_{\text{макс}} \quad (27)$$

једначина (24) може се трансформисати у једначину (28):

$$\left(\frac{f}{1-f}\right) = K^n \cdot [\text{аналит}]^n \quad (28)$$

Решавањем једначина (24), (26), (27) и (28), може се извести једначина (29):

$$\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right] = n \log K + n \log [\text{аналит}] \quad (29)$$

где је K константа везивања, $I_{\text{ДНК}}$ представља интензитет струје пика базе адсорбоване ДНК у одсуству анализата, а $I_{\text{КОМПЛЕКСА}}$ интензитет струје пика базе адсорбоване ДНК при различитим концентрацијама анализата са којима адсорбована ДНК формира комплекс.

На основу добијених вредности за нагиб и одсечак линеарне зависности $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log[\text{аналит}]$, могуће је одредити константу формирања комплекса (константа везивања ДНК и анализита) који је адсорбован на површини електроде.

Одређена константа везивања приликом формирања комплекса адсорбоване ДНК и анализита, може се употребити за израчунавање промене Гибсове слободне енергије (ΔG), што представља меру стабилности формираног комплекса. Гибсова слободна енергија израчуната је применом следеће једначине:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (30)$$

Негативна вредност ΔG потврда је спонтаности процеса приликом одигравања реакције на површини електроде између адсорбоване ДНК и анализита, док позитивна вредност промене Гибсове слободне енергије указује на неспонтане процесе [142].

Амсакрин, као представник деривата акридина са потенцијалном антинеопластичном активношћу, испитиван је применом ДНК биосензора и детектован у узорцима хуманог серума и урина [143]. *Javar* и *cap.* су применом диференцијално пулсне волтаметрије испитивали промену интензитета струје и потенцијала пика који описује оксидацију гуанина у присуству и одсуству амсакрин. Уочили су да интензитет струје пика са порастом концентрације амсакрин опада, док се потенцијал помера ка позитивнијим вредностима. На основу наведених резултата закључили су да амсакрин интерагује са ДНК и да је тип интеракције највероватније интеркалација. Аутори *Untiveros* и *cap.* су применом електрохемијског ДНК биосензора испитивали интеракцију хибридног молекула који се састоји из акридинског прстена и тиофена са ДНК. Анализом пикова који потичу од гуанина и аденина, испитивали су и потенцијално оксидативно оштећење ДНК [144].

1.7. Рационално дизајнирање деривата – молекулски *docking*

Молекулски *docking* је компјутерска метода која се користи како би се испитала интеракција лиганда са циљним молекулом чија је тродимензионална структура претходно дефинисана, тј. позната. Интеракција лиганда са протеинима или молекулом ДНК се испитује коришћењем различитих просторних конформација лиганда и изражава се као енергија везивања, kcal mol^{-1} . За испитивање интеракције могу се користити програми *AutoDock Vina*, *Glide*, *Dock*, *AutoDock*, *AutoDock Vina*, *GOLD*, *Surflex*, *FlexX*. [145, 146]. За припрему структуре лиганда могу се користити програми за цртање структуре лиганда, попут *ChemDraw Ultra 12.0*, програми за оптимизацију структуре - *Chem3D Pro 12.0* и припрему лиганда и циљног молекула за *docking* анализе - *AutoDockTools 1.5.6*. У програму *AutoDock Vina*, структура молекула ДНК приказана је у координатној мрежи, чија се резолуција може подешавати, а након примене одговарајуће функције, може се одредити оптимална конформација испитиваног лиганда која је описана најнижом добијеном енергијом везивања. Валидација анализе врши се применом *Discovery studio 4.5* програма који омогућава израчунавање RMSD вредности (квадратни корен средње вредности, енгл. *Root Mean Square Deviation*), чија вредност, у случају валидне методе, треба да је мања од 2 Å [145, 147-149].

2. ЦИЉ РАДА

Циљеви истраживања ове докторске дисертације су:

1. Синтеза аминокиселинских деривата акридина:
 - Избор полазних аминокиселина за синтезу аминокиселинских деривата акридина на основу прегледа литературе и односа структуре и антитуморског дејства деривата акридина;
 - Оптимизација услова за извођење синтезе;
 - Пречишћавање синтетисаних деривата;
 - Карактеризација новосинтетисаних једињења применом спектроскопских метода (IR, MS/MS, ^1H NMR и ^{13}C NMR, HRMS), као и одређивањем температуре топљења.
2. Одређивање *in vitro* антитуморске активности новосинтетисаних аминокиселинских деривата акридина:
 - Одређивање цитотоксичности на ћелијским линијама K562 (хронична мијелоидна леукемија) и A549 (ћелијска линија аденокарцинома плућа) и на диплоидној ћелијској линији MRC5 (фетални плућни фибробласти) МТТ тестом; поређење са амсакрином и испитивање токсичности једињења са најмањом IC_{50} вредношћу на нестимулисаним хуманим леукоцитима;
 - Анализа ћелијског циклуса применом проточне цитометрије како би се испитао утицај синтетисаних једињења на преживљавање ћелија услед модулације фаза ћелијског циклуса;
 - Анализа ћелијске смрти применом проточне цитометрије након што су ћелијске линије изложене синтетисаним једињењима.
3. Испитивање везивања синтетисаних једињења за ДНК применом теста електрофоретске покретљивости.
4. Испитивање инхибиторне активности синтетисаних једињења на хуману ДНК-топоизомеразу Pa .
5. Електрохемијско испитивање редукције и оксидације 9-хлороакридина (једињења које ће бити коришћено као полазно једињење за синтезу аминокиселинских деривата акридина) и најактивнијих синтетисаних аминокиселинских деривата акридина применом волтаметријских метода: цикличне волтаметрије (CV), волтаметрије правоугаоних таласа (SWV) и диференцијално пулсне волтаметрије (DPV).
6. Електрохемијско испитивање везивања 9-хлороакридина и најактивнијих синтетисаних аминокиселинских деривата акридина за ДНК применом волтаметрије правоугаоних таласа.
7. Електрохемијско одређивање константе везивања 9-хлороакридина и најактивнијих синтетисаних аминокиселинских деривата актидина за ДНК.
8. Примена *docking* анализе за испитивање интеракције 9-хлороакридина и најактивнијих синтетисаних аминокиселинских деривата акридина са ДНК.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Реагенси и растварачи

3.1.1. Синтеза и физичко-хемијска испитивања

- 9-хлороакридин, 97% (Sigma Aldrich, Steinheim, Немачка)
- 1-метил-L-триптофан, 95% (Sigma Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Етил-4-аминобутират-хидрохлорид, 98% (Sigma Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Тионил-хлорид, 97% (Sigma Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Диетил етар, $\geq 99,7\%$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Метил естар L-фенилаланин-хидрохлорида, 98% (Acros Organics, Geel, Белгија)
- Етил естар β -аланин-хидрохлорида, 98% (Acros Organics, Geel, Белгија)
- Метил естар L-хистидин-дихидрохлорида, 98% (Acros Organics, Geel, Белгија)
- Хлороформ, $\geq 99\%$ (Fisher Scientific, Loughborough, Велика Британија)
- Етилацетат, $\geq 99,8\%$ (Fisher Scientific, Loughborough, Велика Британија)
- Метанол р.а. (Fisher Scientific, Loughborough, Велика Британија)
- Силикагел 60 GF₂₅₄ за танкослојну хроматографију (Merck, Darmstad, Немачка)
- Хексан, анхидровани, 95% (Merck, Darmstad, Немачка)
- Пропанол, анхидровани, 99,7% (Merck, Darmstad, Немачка)
- Апсолутни етанол (Carlo Erba, Rodano, Италија)
- Ацетонитрил HPLC чистоће (Sigma Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Ацетон р.а. (Zorka Pharma, Шабац, Србија)
- Диметилсулфоксид, $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Немачка)
- б-амино хексаноат, 98% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Немачка)
- Колона Zorbax Extend C18 150 \times 4,6 mm, дијаметар честица 5 μ m (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, САД)

3.1.2. Испитивање антитуморске активности

- dsDNA HS кит за тест, Invitrogen
- 1% агароза гел, Sigma-Aldrich
- Хумана малигна ћелијска линија: A549 – аденокарцином плућа (ATCC-CCL-185, American Type Culture Collection, Manasas, VA, САД)
- Хумана малигна ћелијска линија: K562 – мијелоидна леукемија (ATCC-CCL-243, American Type Culture Collection, Manasas, VA, САД)
- Нормални фибробласти плућа MRC – 5 (ATCC-CCL-171, American Type Culture Collection, Manasas, VA, САД)
- Хранљиви медијум: RPMI – 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- 10% серум фетуса говечета (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- Пеницилин (Galenika A.D. Београд, Србија)
- Стрептомицин (Galenika A.D. Београд, Србија)
- 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолијум-бромид (МТТ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- Амсакрин-хидрохлорид (TCI Chemicals, САД)
- 10% натријум-додецилсулфат (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- 4% формалдехид (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)

- 0,05% кристал виолет (Himedia, Mumbai, Индија)
- 10% сирћетна киселина (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- Пропидијум-јодид (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- Анексин V-FITC детекција апоптозе, кит за тест (BD Biosciences, San Jose, CA, САД)
- Рибонуклеаза А (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- Трипсин (Promega)
- GelRed гел боја за нукелинске киселине (Biotium)
- Tris/HCl пуфер (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- Протеиназа К (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, САД)
- Стрептавидином обложена плоча са 96 базенчића (Thermo Scientific Pierce)
- Хумана топоизомераза II α кит за тест (Inspiralis, Norwich, Уједињено Краљевство Велике Британије)
- Етопозид (TCl, Токуо, Јапан)

3.1.3. Електрохемијска испитивања

- Дволанчана ДНК из тимуса говечета, dsDNL, $MW_r = 10 - 15 \times 10^6$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Хлороводонична киселина (Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Калијум-хлорид (Merck, Darmstadt, Немачка)
- Глацијална сирћетна киселина (Merck, Darmstadt, Немачка)
- Натријум-ацетат (Merck, Darmstadt, Немачка)
- Натријум-дихидроген фосфат, монохидрат (Merck, Darmstadt, Немачка)
- Динатријум-хидроген фосфат (Merck, Darmstadt, Немачка)
- Амонијум-хидроксид (Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Амонијум-хлорид (Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка)
- Алуминијум оксид за припрему суспензије за полирање чврсте електроде (величина честица 0,05 μm , Metrohm Autolab, Utrecht, Холандија)
- Азот 3,5 (Messer Tehnogas, Београд, Србија)
- Стандард за калибрацију електроде, pH 7,000 \pm 0,010 (Radiometer Analytical S. A., Villeurbanne Cedex, Француска)
- Стандард за калибрацију електроде, pH 4,000 \pm 0,010 (Radiometer Analytical S. A., Villeurbanne Cedex, Француска)
- Калијум-хлорид, раствор за пуњење електроде, 3,00 М (Metrohm Autolab, Utrecht, Холандија)
- Дестилована вода
- Редестилована вода

3.2 Опрема и програми

3.2.1. Синтеза и физичко-хемијска испитивања

- Аналитичка вага Adventurer™-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, САД)
- Ротациони вакуум упаривач, ROTAVAPOR-R (Büchi, Швајцарска)
- Апарат за одређивање температуре топљења, Voetius PHMK 05 (Radebeul, Немачка)

- UV лампа, UV-Cabinet II (Camag, Швајцарска)
- Orbitrap UHPLC-HRMS (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, САД)
- NMR BRUKER AVANCE III 400 (Bruker, Biospin GmbH, Rheinstetten, Немачка)
- UHPLC-MS-MS апарат – течни хроматограф спрегнут са триплквдриполским масеним детектором (ThermoScientific, САД, Accela 1000 TSQ Quantum Access Max)
- UHPLC течни хроматограф ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, САД)
- Триплквдриполски MS-MS детектор TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, САД)
- ATR-FTIR спектрофотометар Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, САД)
- HPLC апарат Agilent 1200, мануелни инјектор, 20 μ L (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, САД)
- рН метар, Radiometer PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Данска)
- Комбинована рН електрода, модел GK2401B (Radiometer, Copenhagen, Данска)
- Аналитичка вага Scaltec SBC 31 (Scaltec Instruments GmbH, Немачка)
- Ултразвучно купатило („Iskra“ UZ 4R, Словенија)
- RP-18 F₂₅₄ алуминијумске TLC плоче, 20 × 20 cm (Merck, Darmstadt, Немачка)

3.2.2. Испитивање антитуморске активности

- Спектрофотометар Multiskan EX reader (Thermo LabSystems, Waltham, MA, САД)
- Софтвер GraphPad Prism 7
- Центрифуга Histopaque-1077 (Sigma Aldrich)
- Проточни цитометар (Calibur Becton Dickinson flow cytometer)
- Софтвер Cell Quest
- Спектрофотометар Shimadzu Biotech Bio-spec nano
- UV-VIS Thermo Scientific GENESYS
- Софтвер VISIONlite
- Флуориметар Thermo Scientific Invitrogen Qubit 4
- кит за тест, Qubit dsDNA HS
- Читач микроплочица (BioTek Synergy H4, ексцитација: 485 nm, емисија: 537 nm)
- Софтвер GraphPad Prism 6

3.2.3. Електрохемијско испитивање

- Потенциостат/галваностат μ AUTOLAB (Eco Chemie, Utrecht, Холандија)
- Metrohm 663 VA Stand, IME 663 (Interface за Metrohm електроде, Herisau, Швајцарска)
- Електрохемијска ћелија са троелектродним системом:
- Радна електрода / чврста електрода од стакластог угљеника дијаметара $d = 3$ mm (енгл. *Glassy carbon electrode, GCE*), CH Instruments, Inc., Austin, TX, САД
- Референтна електрода: сребро/сребро-хлоридна електрода (Ag/AgCl/3,00 M)
- Помоћна електрода: платинска електрода (Pt)
- Програм GPES 4.9 (енгл. General Purpose Electrochemical System 4.9)
- Програм OriginPro 8
- Програм Microsoft Office Excell 2016

3.2.4. Молекулски *docking*

- ChemDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>, 2002)
- Chem3D Pro 12.0 (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>, 2002)
- Chimera 1.10.1
- AutoDockTools 1.5.6 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, <http://autodock.scripps.edu/>)
- AutoDock Vina (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, <http://vina.scripps.edu/>)
- Discovery Studio Visualizer 4.5.0.
- Swiss-PDBViewer v4.1 (Swiss Institute of Bioinformatics, 2020, <http://spdbv.vital-it.ch/>)

3.3. Синтеза и физичко-хемијска испитивања аминокиселинских деривата акридина

3.3.1. Синтеза естара аминокиселина

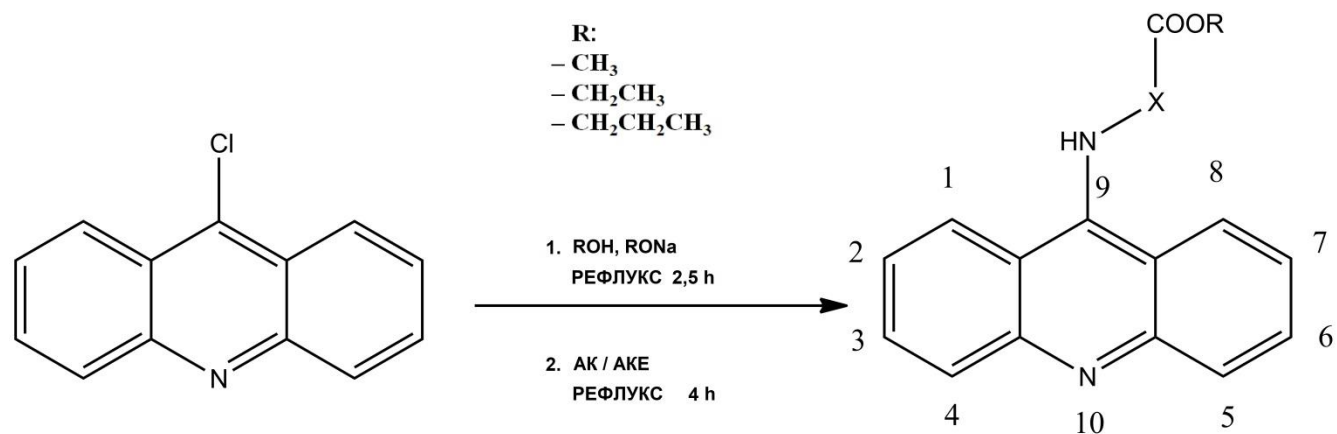
Хидрохлориди метил естра 1-метил-*L*-триптофана, метил естра 8-аминооктанске киселине, пропил естра 4-аминобутерне киселине, пропил естра β -аланина и пропил естра 6-аминохексанске киселине синтетисани су применом модификованог поступка [44] на следећи начин: у суви балон са округлим дном који је постављен на ледено купатило одмерено је 1 mL алкохола (метанола или пропанола), додато је 145 μ L тионил-хлорида и 0,65 mmol одговарајуће аминокиселине. Како се приликом одвијања реакције ослобађа велика количина топлоте, неопходно је извођење реакције у суду који је постављен на ледено купатило. Реакциона смеша се меша у току 24 h, након чега се упарава на вакуум упаривачу.

Синтетисани хидрохлориди естара аминокиселина прекристалисани су коришћењем диетилетра.

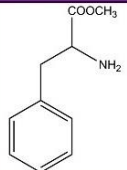
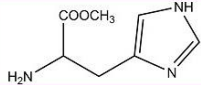
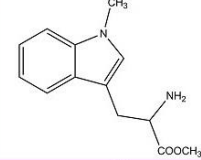
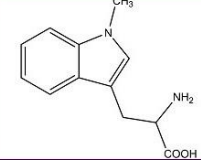


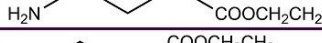


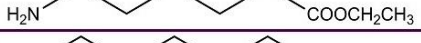

3.3.2. Синтеза аминокиселинских деривата акридина

Натријум-алкоксидни раствори припремани су тако што је растворено 150 mg натријума у 25 mL одговарајућег алкохола (метанола, етанола или пропанола) на собној температури.

У првој фази синтезе је у сув балон са округлим дном одмерен 9-хлороакридин (0,03 mmol; 1 еквивалент) који је растворен у 3 mL алкохола уз додатак 3 mL одговарајућег алкоксида. Реакциона смеша се меша уз рефлукс у току 2,5 h. У другој фази синтезе, у смешу се дода аминокиселина или естар аминокиселине (0,42 mmol; 1,4 еквивалент) и реакциона смеша се меша уз рефлукс још 4 h (Слика 19) [40]. Структуре аминокиселине (АК) и естара аминокиселина (АКЕ) коришћених за синтезу аминокиселинских деривата акридина (АДА) приказане су на Слици 20.



Слика 19. Синтеза аминокиселинских деривата акридина (АДА) [40]

Једињење	Аминокиселина / естар аминокиселине	
1		МЕТИЛ ЕСТАР L-ФЕНИЛАЛАНИНА
2		МЕТИЛ ЕСТАР L-ХИСТИДИНА
3		МЕТИЛ ЕСТАР 1-МЕТИЛ-L-ТРИПТОФАНА
4		1-МЕТИЛ-L-ТРИПТОФАН
5		МЕТИЛ ЕСТАР 8-АМИНО ОКТАНСКЕ КИСЕЛИНЕ
6		ЕТИЛ ЕСТАР γ-АМИНО БУТЕРНЕ КИСЕЛИНЕ
7		ПРОПИЛ ЕСТАР γ-АМИНО БУТЕРНЕ КИСЕЛИНЕ
8		ЕТИЛ ЕСТАР 3-АМИНО ПРОПАНСКЕ КИСЕЛИНЕ
9		ПРОПИЛ ЕСТАР 3-АМИНОПРОПАНСКЕ КИСЕЛИНЕ
10		ЕТИЛ ЕСТАР 6-АМИНОХЕКСАНСКЕ КИСЕЛИНЕ
11		ПРОПИЛ ЕСТАР 6-АМИНОХЕКСАНСКЕ КИСЕЛИНЕ

Слика 20. Аминокиселина / естри аминокиселина коришћени за синтезу АДА

Након завршене синтезе, реакциона смеша је упарена до сува на ротационом вакуум упаривачу под сниженим притиском. Суви остатак је растворен у смеси хлороформа и метанола и пречишћен хроматографијом на танком слоју са смешом елуената (етилацетат/хексан 4:0,3 (v/v); етилацетат/хексан 4:1 (v/v); хлороформ/метанол 9:1 (v/v); хлороформ/метанол 9:1,6 (v/v); хлороформ/метанол 9:2 (v/v) који обезбеђују потпуно раздвајање споредних производа од главног производа реакције.

Пречишћена једињења прекристалисана су коришћењем одговарајућег растварача (диетил етра) или смеше растварача (хлороформ/метанол 5:5 (v/v)) [40].

У делу 4.2. поред резултата физичко-хемијске карактеризације, наведени су и елуенти коришћени за свако појединачно једињење као и растварач за прекристализацију.

3.3.3. Испитивање чистоће и физичко-хемијска карактеризација синтетисаних аминокиселинских деривата акридина

HPLC анализа је коришћена како би чистоћа једињења била испитана. Анализа је изведена коришћењем инструмента Agilent 1200 system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, САД), који садржи бинарну пумпу, мануални инјектор (запремина узорка: 20 μL) и DAD детектор. Коришћена колона била је: Zorbax Extend C18 (150 mm \times 4,6 mm, величина честица 5 μm). Мобилна фаза састојала се из: метанола и воде (вредност рН била је подешена на 3,2 помоћу фосфорне киселине) у следећим односима (v/v): 25:75 (једињење 2), 40:60 (једињења 6, 8 и 9), 50:50 (једињење 7), 55:45 (једињење 10) и 60:40 (једињења 1, 3, 4, 5 и 11). Температура колоне била је 25 $^{\circ}\text{C}$ док је брзина протока била 1 mL min^{-1} . UV детекција вршена је на 220 nm, 230 nm, 254 nm, 265 nm и 280 nm.

Физичко-хемијска карактеризација синтетисаних АДА обухвата одређивање температуре топљења методом тренутног топљења, примену инфрацрвене спектрометрије (IR), нуклеарне магнетне резонантне спектрометрије (NMR ^1H , ^{13}C), масене спектрометрије (UHPLC-MS-MS) као и одређивање тачних маса (UHPLC-HRMS).

Методом тренутног топљења одређене су температуре топљења синтетисаних аминокиселинских деривата акридина, применом инструмента Voetius PHMK 05. Инфрацрвени спектри снимљени су применом ATR-FTIR Nicolet iS10 спектрофотометра и програма OMNIC 8.0 [40].

NMR спектри (^1H , ^{13}C) синтетисаних једињења растворених у CDCl_3 , DMSO или метанолу снимљени су применом инструмента NMR BRUKER AVANCE III 400 [40].

Масени спектри снимљени су применом UHPLC-MS-MS инструмента, тј. течног хроматографа ACELLA спрегнутог са триплеквадриполским масеним детектором [40].

Тачне масе одређене су применом течног хроматографа спрегнутог са масеним детектором прецизних маса Orbitrap UHPLC-HRMS [40].

3.4. *In vitro* испитивање антитуморске активности аминокиселинских деривата акридина

3.4.1. Цитотоксичност

Цитотоксичност новосинтетисаних АДА испитана је МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид) тестом на два канцерска и једној нормалној диплоидној ћелијској линији. Коришћене су К562 (хронична мијелоидна леукемија, АТСС-ССЛ-243) и А549 (карцином епителних ћелија плућа, АТСС-ССЛ-185) као и нормална диплоидна ћелијска линија МРС5 (фибробласти плућа фетуса, АТСС-ССЛ-171), а једињења са најмањом IC_{50} вредношћу тестирана су и на нестимулисаним хуманим леукоцитима [40, 150].

К562 ћелије су мултипотентне, хематопоетске малигне ћелије. Нису адхерентне у култури и припадају гранулоцитној серији.

А549 је ћелијска линија пореклом од аденокарцинома плућа. У култури формирају монослој и не задржавају структурне ни функционалне карактеристике ткива.

МРС-5 су ћелије, пореклом од нормалног ткива плућа фетуса, адхерентне у култури.

Наведене ћелијске линије чуване су у хранљивом медијуму, RPMI-1640, у који се додају 10% фетални говеђи серум (енгл. *fetal bovine serum*, FBS), пеницилин (192 U mL^{-1}) и стрептомицин ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), а гајене су у инкубатору на $37 \text{ }^\circ\text{C}$, у атмосфери ваздуха који је zasiћен воденом паром и садржи 5% CO_2 .

Ћелије су биле засејане у микротитарским плочама са 96 базенчића тако да је у сваком базенчићу било 7000 ћелија. Након 24 h ћелије су третиране различитим разблажењима амсакина или АДА, чији је опсег концентрација био од 6,25 до $100 \mu\text{M}$. Након периода инкубације ћелија и амсакина тј. испитиваних АДА од 72h, МТТ раствор (жуте боје) додат је у сваки базенчић. Након 4 h од додатка МТТ раствора, у сваки базенчић додат је 10% раствор натријум-додецил сулфата (SDS). Плоче су инкубиране током ноћи, а затим је очитана апсорбанција на таласној дужини од 570 nm на читачу Multiskan EX (Thermo Labsystems). Како само у живим метаболички активним ћелијама може доћи до редукције МТТ-а до формазана, а растварање формазана у натријум-додецил сулфату је бојена реакција (љубичаста боја), смањење редукције МТТ-а може се пратити спектрофотометријски, праћењем промене апсорбанције на 570 nm. IC_{50} вредност представља концентрацију једињења при којој долази до смањења редукције МТТ-а за 50%, тј. до смањења броја живих метаболички активних ћелија за 50%. Вредност IC_{50} одређена је са графика зависности апсорбанције од концентрације једињења [40], тј. праћењем смањења апсорбанције у присуству третираног узорка ћелија, у поређењу са контролним узорком у коме је само диметилсулфоксид (DMSO), према следећој једначини:

$$S[\%] = \left(\frac{A_u}{A_k} \right) \times 100\% \quad (31)$$

где је:

$S[\%]$ – проценат преживљавања ћелија у култури,

A_u – апсорбанција третираног узорка ћелија (узорка ћелија третираних амсакином или АДА),

A_k – апсорбанција контролног узорка ћелија.

3.4.2. Припрема и третман хуманих леукоцита

Леукоцити су издвојени из укупне хепаринизоване крви здравих добровољаца центрифугирањем (центрифуга Histopaque-1077). Леукоцити се том приликом групишу на додирној површини инструмента и плазме док се еритроцити и гранулоцити таложе на дно епрувете. Ћелије у међуфази (на граници, леукоцити) су испране три пута, а након тога избројане и ресуспендоване у медијуму RPMI-1640. Тако припремљене ћелије (150000 по базенчићу) су засејане на микроплочи са 96 базенчића. Након 2 h, ћелије су изложене дејству раствора амсакрина и АДА, различитих разблажења у опсегу концентрација од 6,25 до 100 μM . Након 24 h и 72 h, преживљавање ћелија испитано је применом МТТ теста [40].

3.4.3. Клоногени есеј

Клоногени есеј изведен је на ћелијској линији А549. У сваки базенчић плоче са 6 базенчића засејано је 1000. Ове ћелије третиране су одабраним синтетисаним једињењима (6, 7, 8 и 9) у току 48 h. Концентрације одабраних АДА одговарале су IC_{50} концентрацији одређеној помоћу МТТ теста. Ћелије су 48 h након излагања испране, а раст колонија био је омогућен у току наредних 10 дана, након чега су ћелије биле фиксиране 4% формалдехидом и обојене 0,05% кристал виолетом [151]. Кристал виолет боја се везује за ДНК и протеине у живим ћелијама, тако да се интензитет плаве боје узима као мерило количине ћелијског материјала. Након екстракције боје 10% сирћетном киселином, вршена је квантификација живих ћелија мерењем апсорбације на таласној дужини од 570 nm (Multiskan EX reader, Thermo Labsystems) [40].

3.4.4. Анализа ћелијског циклуса

Анализа ћелијског циклуса [152] изведена је применом проточне цитометрије. Ћелије (А549) су у току 24 h третиране једињењима 6, 7, 8 и 9 (IC_{50} концентрација одређена помоћу МТТ теста). Након третмана, квантитативна анализа дистрибуције фаза ћелијског циклуса извршена је применом проточне цитометрије (проточни цитометар Calibur Becton Dickinson; софтвер Cell Quest). Након инкубације и трипсинизације (трипсин 0,25%) сакупљени су узорци ћелија, испрани PBS-ом и пребачени у епрувете за цитометар. Узорци су фиксирани на леду уз вортексовање у апсолутном хладном етанолу. Након тога, испрани су PBS-ом и инкубирани 30 минута на 37 °C са 500 μL раствора PBS-а који садржи рибонуклеазу А (финално 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Узорци су бојени пропиридијум-јодидом (финално 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Пропиридијум-јодид је флуоресцентна боја која се квантитативно везује за ДНК, а интензитет флуоресценције је у корелацији са количином ДНК, која је различита зависно од фазе ћелијског циклуса [153]. У ћелијама третираним на приказани начин, на проточном цитометру снимљено је 20 000 догађаја у сваком узорку. На основу хистограма фреквенције којим је приказан садржај ДНК одређен је проценат ћелија у главним фазама ћелијског циклуса, subG1, G1, S и G2/M [40].

3.4.5. Анализа ћелијске смрти

Анализа ћелијске смрти испитана је применом Анексин V-FITC теста. Квантитативна анализа ћелијске смрти након излагања ћелија синтетисаним једињењима и амсакрину (контрола) изведена је помоћу Анексин V-FITC Apoptosis детекционог кита који садржи анексин, пропидијум-јодид (PI) раствор за бојење и анексин V везујући пуфер [154]. Анексин је Ca^{2+} зависан фосфатидилсерин-везујући протеин који има висок афинитет за фосфолипиде. Фосфатидил-серин је код вијабилних ћелија оријентисан према цитосолу, док се у фази ране апоптозе оријентише према екстрацелуларном простору, тако да је применом овог теста могуће идентификовати и рани стадијум апоптозе [155, 156]. Након везивања анексина за фосфатидил-серин и излагања узорка ласеру, долази до побуђивања и до флуоресценције приликом повратка у основно стање комплекса, при чему се емитује светлост зелене боје, што се користи за идентификацију процента ћелија у раној фази апоптозе.

Пропидијум-јодид је флуоресцентна боја, поларно, кватернарно амонијумово једињење које се везује за молекул ДНК [157], међутим нема способност да дифундује кроз очувану ћелијску мембрану вијабилних ћелија, нити кроз мембрану ћелија у раној фази апоптозе. Када се догоди процес некрозе, интегритет мембране бива нарушен, па је могуће да молекул пропидијум-јодида дифундује до ДНК. Након везивања пропидијум-јодида за ДНК и излагања узорка ласеру, долази до побуђивања и до флуоресценције приликом повратка у основно стање комплекса, при чему се емитује светлост црвене боје, што се користи за идентификацију процента некротичних ћелија.

Када се идентификују обе боје, процес који се одвија је касна апоптоза, с обзиром да тада анексин дифундује кроз ћелијску мембрану, FITC се везује за молекул ДНК и пропидијум-јодид се везује за молекул ДНК [156, 158, 159].

Након 24 и 48 h од излагања амсакрину и једињењима 6, 7, 8 и 9 (коришћене су IC_{50} концентрације одређене помоћу МТТ теста), ћелије ћелијске линије А549 третиране су трипсином, испране два пута хладним фосфатним пуфером и ресуспендоване у 200 mL везујућег пуфера (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2). Узорак који је чинило 2×10^5 ћелија је након тога обојен анексином V и пропидијум-јодидом. Након 15 минута инкубације на собној температури, заштићено од светлости, ћелије су анализиране применом проточног цитометра (FACS Calibur Becton Dickinson) и софтвера Cell Quest и утврђен је удео апоптотичних и некротичних ћелија [40, 154, 157].

3.5. Есеј електрофоретске покретљивости

Како би се испитао потенцијал најактивнијих једињења (6, 7, 8 и 9) за интеракцију са ДНК, коришћен је електрофоретски тест покретљивости који се заснива на различитој покретљивости комплекса који настају након интеракције ДНК са испитиваним једињењима.

Из ћелија ћелијске линије А549, изолована је геномска ДНК тако што је 500 000 ћелија трипсинизовано и центрифугирано на 1500 rpm у току 10 минута. Након тога, талог је ресуспендован у 300 μL пуфера за лизирање са 10% SDS и 20 mg mL⁻¹ протеиназе К. Након 1h инкубације на 56 °C, лизати су помешани са 100 μL 6 M NaCl и кратко измешани применом вортекса. Раствори су затим центрифугирани у току 3 минута на 14 000 rpm и супернатант који садржи ДНК је пренет у нову епрувету. Преципитација ДНК извршена је применом апсолутног етанола, затим је ДНК два пута испрана 70% етанолом и осушена на ваздуху. Добијена ДНК је ресуспендована у дестилованој води и концентрација је одређена спектрофотометријски (*Shimadzu Biotech* спектрофотометар).

Одмерених 0,5 μg ДНК изоловане из А549, инкубирано је на собној температури са 100 μM раствором сваког од испитиваних једињења у 5 mM Tris/HCl/50 mM NaCl пуферу. Након инкубације са испитиваним једињењима и амсакрином, узорци ДНК нанети су на 0,8% агарозни гел и електрофоретско раздвајање изведено је у току 4 h при напону од 30 V. За визуелизацију је коришћена *GelRed* (*Biotium*) боја у току 10 минута на собној температури.

Код једињења која остварују интеракцију са ДНК довели су до заостајања померања ДНК у агарозном гелу у односу на контролу [40].

3.6. Одређивање инхибиторне активности на хуману ДНК топоизомеразу II α

Тест испитивања инхибиторне активности на хуману ДНК топоизомеразу II α [160] изведен је на плочи са 96 базенчића обложених стрептавидином (Thermo Scientific Pierce). Плоче су помоћу пуфера (20 mM Tris-HCl, 0,01% w/v BSA, 0,05% v/v Tween 20, 137 mM NaCl, pH 7,6) рехидратисане и након тога је олигонуклеотид за који је везан биотин имобилизован у сваком базенчићу. Након испирања невезаног олигонуклеотида, изведен је ензимски тест. Реакциона смеша од 30 μ L, која се састојала од пуфера (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 125 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,1 μ g mL⁻¹ албумина, 1 mM АТР, pH 7,5), 1,5 U (1 U је количина хумане топоизомеразе II потребне да релаксира 0,5 μ g супернавоја плазида у стандардној реакцији) хумане ДНК топоизомеразе II α , 0,75 μ g плазида рNO1 и 3 μ L раствора инхибитора који садржи 10% DMSO и 0,008% Tween 20, била је инкубирана у току 30 минута на температури од 37 °C. Након тога, у реакциону смешу додат је TF пуфер (50 mM NaOAc, 50 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 5,0) како би ензимска реакција била окончана. Након 30 минута инкубације на собној температури, у току којих се формира терцијарни комплекс биотин-олигонуклеотид-плазмид, испран је невезани плазмид TF пуфером и додата је боја у T10 пуферу (Diamond боја у пуферу који се састоји од 10 mM Tris-HCl и 1 mM EDTA, pH 8,0). Флуоресценција је измерена помоћу микрочитача (BioTek Synergy H4), при ексцитационој таласној дужини од 485 nm и емисионој таласној дужини од 537 nm. GraphPad Prism 6 софтвер је коришћен да се израчунају IC₅₀ вредности. Као позитивна контрола коришћен је етопозид (IC₅₀ = 71 μ M)[40].

3.7. Електрохемијско испитивање 9-хлороакридина и најактивнијих аминокиселинских деривата акридина

3.7.1. Припрема раствора

За припрему основних електролита различитих рН вредности, коришћени су раствори наведени у литератури [93, 161]. За постизање рН вредности 2,0 коришћена је смеша HCl/KCl, за рН вредности 3,5; 4,6 и 5,2 коришћен је ацетатни пуфер (смеша сирћетне киселине и натријум-ацетата), за постизање рН вредности 6,2; 7,0 и 8,1 коришћен је фосфатни пуфер (смеша динатријум-хидроген фосфата и натријум-дихидроген фосфата), док је за постизање рН вредности 9,0 коришћена смеша NH₃/NH₄Cl. Јонска јачина свих пуфера била је 0,1 М. Мерења рН изведена су помоћу инструмента PHM 220 pH meter и комбиноване електроде Radiometer GK2401B. Пуфери се чувају на температури од 4 °C [93, 133, 137, 162].

Основни раствор 9-хлороакридина (9Cl-A) концентрације $1,0 \times 10^{-3}$ М припреман је на следећи начин: на аналитичкој ваги (SCALTEC SBC 31) одмерено је 0,0107 g 9Cl-A, квантитативно је пренето у одмерни суд и растворено у 50 mL апсолутног етанола. Основни раствор 9Cl-A се чува на температури од 4 °C. Концентрација 9Cl-A која је коришћена за електрохемијска испитивања, припремљена је разблаживањем основног раствора одговарајућим пуфером [93].

Основни раствори најактивнијих АДА, 6, 7, 8 и 9, концентрације $1,0 \times 10^{-3}$ М припремани су одмеравањем одговарајућих маса најактивнијих АДА на аналитичкој ваги и растварањем у 2 mL апсолутног етанола. Основни раствори најактивнијих АДА чувани су на температури од 4 °C. Концентрације најактивнијих АДА које су коришћене за електрохемијска испитивања, припремљене су разблаживањем основног раствора одговарајућим пуфером [137].

Основни раствор дволанчане ДНК (*calf thymus double stranded DNA*) припремљен је на следећи начин: на аналитичкој ваги, одмерено је 36,9 mg ДНК, одмерена количина ДНК пренета је квантитативно у одмерни суд и растворена у 250,0 mL ацетатног пуфера (CH₃COOH/CH₃COONa), рН 4,6, јонске јачине 0,1 М. Након растварања ДНК, измерена је апсорбација раствора (брзина снимања 120 nm min⁻¹, област 200-500 nm, интервал 0,5 nm) и одређена је концентрација ДНК у раствору, која је износила 73,95 µg mL⁻¹ [93, 133, 137, 162].

3.7.2. Припрема електроде

GCE је припремана тако што је пре сваког мерења полирана у току 1 минута суспензијом Al₂O₃ (дијаметар честица 0,05 µm) на одговарајућој подлози за полирање. Након полирања електрода је очишћена помоћу ултразвучног воденог купатила, прво у дестилованој води у току 2 минута, а након тога у апсолутном етанолу у току 2 минута. Коришћено је ултразвучно купатило „Iskra“ UZ 4R (Sentjernei, Словенија). По завршетку припреме, електрода је испрана редестилованом водом, и након уклањања вишка воде папирном ватом, коришћена за електрохемијска мерења [93, 133, 137, 162].

3.7.3. Припрема ДНК биосензора

Вишеслојни ДНК биосензор [93, 133, 137, 162-164] припремљен је сукцесивним наношењем три капи раствора ДНК. Након наношења сваке капи, површина електроде сушена је у атмосфери азота на собној температури. Након наношења и сушења треће капи, електрода је испрана дејонизованом водом како би био елиминисан вишак неvezане ДНК и након тога је ДНК биосензор коришћен за електрохемијска испитивања.

У току припреме ДНК биосензора, варирано су различити параметри као што су време сушења, величина капи ДНК, концентрација ДНК и рН, како би био формиран сензор који даје стабилан и поновљив сигнал.

Након оптимизовања услова за припрему ДНК биосензора, испитивана је интеракција ДНК и 9С1-А, као и ДНК и најактивнијих АДА, при чему је за сваки експеримент припреман нови ДНК биосензор.

За испитивање ДНК биосензора, као и за испитивање интеракције једињења са ДНК, коришћена је SWV [81, 91].

3.7.4. Параметри коришћени за електрохемијска мерења

Волтаметријска испитивања изведена су применом инструмента μ Autolab analyzer (Eco Chemie, Utrecht, Холандија) и софтвера GPES 4.9. Коришћен је троелектродни систем који се састоји из: електроде од стакластог угљеника као радне електроде (GCE, $d = 3 \text{ mm}$, CH Instruments, Inc., Austin, TX, САД), сребро/сребро-хлоридне референтне електроде (Ag/AgCl, 3,00 М КС1) и платинске електроде као помоћне (Pt) [93, 133, 137, 162, 165].

Испитивање електрохемијског понашања 9С1-А и најактивнијих АДА вршено је применом три волтаметријске технике: цикличне волтаметрије (CV), диференцијално пулсне волтаметрије (DPV) и волтаметрије правоугаоних таласа (SWV) [93, 133, 137, 162, 166]. У електрохемијску ћелију у коју је одмерено 9 mL основног електролита (пuffers различитих рН вредности, од 2,0 до 9,0), увођен је инертни гас, азот, у току 10 минута. Након 10 минута, снимљен је одговарајући волтамограм основног електролита, а након тога је у електрохемијску ћелију додата одговарајућа запремина основног раствора 9С1-А или најактивнијих АДА како би се постигла испитивана концентрација $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ за 9С1-А и $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ за најактивније АДА [93, 137].

Сва испитивања изведена су на собној температури, $T 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Услови за CV испитивање 9С1-А и најактивнијих АДА [93, 137] били су:

- промена потенцијала: од 0,0 V до +1,6 V у директном смеру, а затим до -1,3 V у повратном смеру; као и од 0,0 V до -1,3 V, а затим до +1,6 V, за 9С1-А;
- промена потенцијала: од 0,0 V до +1,5 V, а затим назад до -1,5 V, као и од 0,0 V до -1,5 V а затим до +1,5 V, за најактивније АДА;
- брзина промене потенцијала: од $0,01 \text{ V s}^{-1}$ до $0,1 \text{ V s}^{-1}$;
- инкремент промене потенцијала: 0,005 V.

Услови за DPV испитивање 9С1-А и најактивнијих АДА [93, 137] били су:

- инкремент промене потенцијала: 0,005 V;
- амплитуда пулса: 0,05 V;
- време модулације пулса: 0,05 s;
- време трајања периода пулса потенцијала: 1 s.

Услови за SWV испитивање 9С1-А и најактивнијих АДА [93, 137] били су:

- фреквенција: 25 Hz;
- ефективна брзина промене потенцијала: 0,025 V s⁻¹;
- инкремент промене потенцијала: 0,001 V;
- амплитуда пулса: 0,05 V.

3.8. Извођење *docking* студија

Docking студије су изведене применом програма *AutoDock Vina* у 3D структури сегмента ДНК молекула где се остварује интеракција са амсакрином и потенцијално са испитиваним једињењима. 3D структура сегмента ДНК молекула у комплексу са хуманом топоизомеразом П β и амсакрином (4G0U) [93, 162, 167] преузета је из базе података RCSB *Protein Data Bank*, при чему топоизомераза П β није била од интереса за даља испитивања, те није узета у обзир приликом извођења *docking* студија. Нацртане структуре су оптимизоване у *Chem3D Pro 12.0* програму. Структуре циљног места и лиганда за *docking* прорачуне припремљене су применом *AutoDockTools 1.5.6 (ADT)*. Програм *AutoDock Vina* коришћен је како би за свако једињење био креиран фајл са конформацијама. Направљена је координатна мрежа димензија 10 \times 10 \times 10 тачака, са размаком између тачака од 0,375 Å и постављена је у центру масе испитиваног дела молекула ДНК. Параметар који дефинише детаљност потраге за оптималном конформацијом (*Exhaustiveness*) био је подешен на 8. Валидација *docking* студије извршена је поређењем везаног лиганда из кристалне решетке применом *docking* програма (тј. поређењем добијене конформације) са кристалном структуром, а затим израчунавањем RMSD вредности. Рачунање RMSD вредности вршено је применом рачунарског програма *Discovery Studio 4.5* (када је метода валидна, RMSD вредност је мања од 2 Å) [145]. Применом програма *Discovery Studio Visualizer 4.5.0*. извршена је визуелизација интеракција испитиваних једињења са циљним местом.

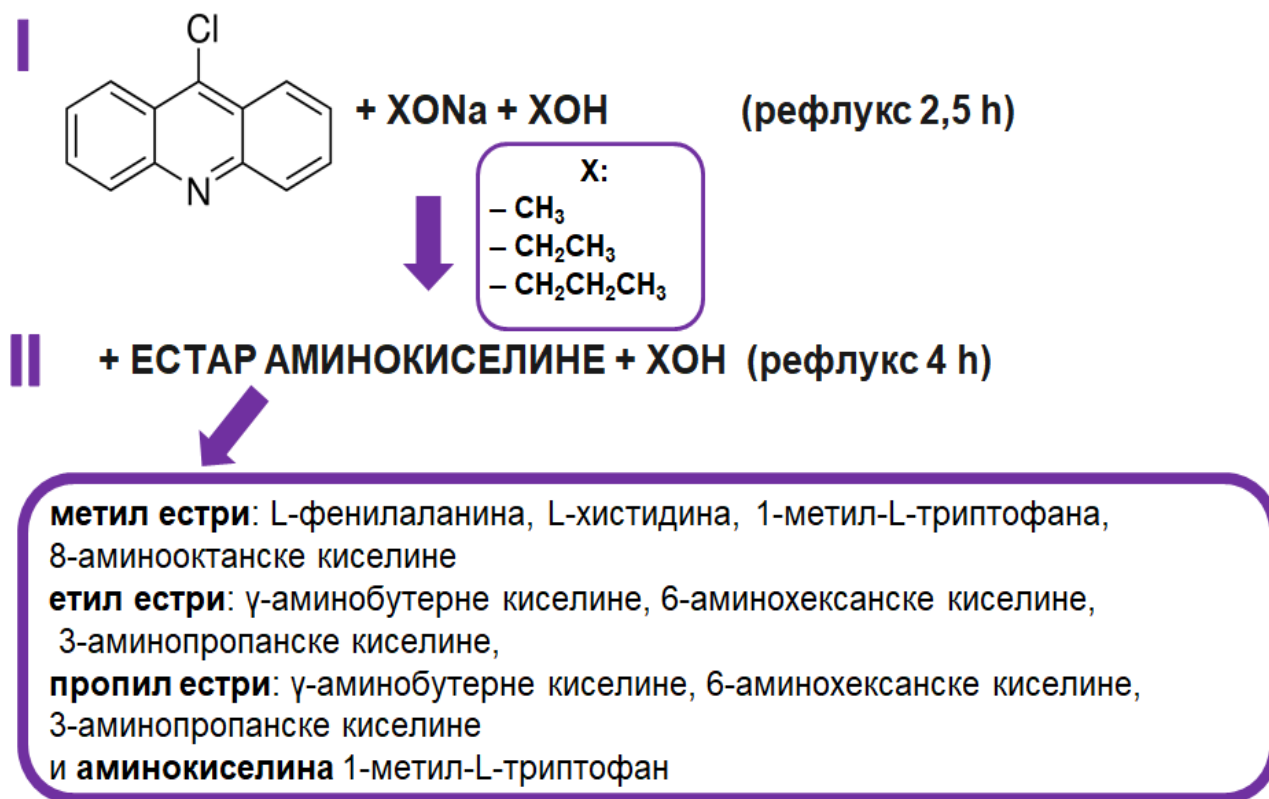
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Општи поступак за синтезу аминокиселинских деривата акридина

Аминокиселински деривати акридина (АДА) синтетисани су из 9-хлороакридина према поступку који су описали *Lyakhov* и сарадници [40, 44] уз модификације у циљу добијања одређеног естра (Слика 21).

За синтезу АДА коришћен је двостепени поступак. У првој фази 9-хлороакридин је у присуству алкохола (метанола, етанола или пропанола) реаговао са алкоксидом (метоксидом, етоксидом или пропоксидом) уз рефлукс у току 2,5 h. У реакцији нуклеофилне супституције добијен је 9-алкокси акридин, чије изоловање није било потребно, већ је у другој фази у реакциону смешу додат одговарајући естар аминокиселине или аминокиселина, уз рефлукс још 4 h.

Раствор алкоксида био је у складу са структуром естра аминокиселине, како би се избегла трансестерификација. За добијање деривата са метил естрима, коришћен је натријум-метоксид, за добијање деривата са етил естрима коришћен је натријум-етоксид, за добијање деривата са пропил естрима, коришћен је натријум-пропоксид. Овај поступак је примењен јер су производи добијени у већем приносу у односу на директну реакцију између аминокиселине и 9-хлороакридина [40].



Слика 21. Синтеза аминокиселинских деривата акридина

Синтетисана су једињења чији је бочни ланац био сличне дужине као код најпотентнијих једињења која су аутори *Lyakhov* и сар. [44] испитали, а то су једињења 6, 8 и 9. Такође, синтетисана су једињења са дужим бочним ланцем и већом липофилношћу – једињења 5, 7, 10 и 11, као и једињења која садрже метил естар ароматичних аминокиселина или ароматичну киселину у бочном ланцу – једињења 1, 2, 3 и 4 [40]. Приноси једињења приказани су у Табели 1.

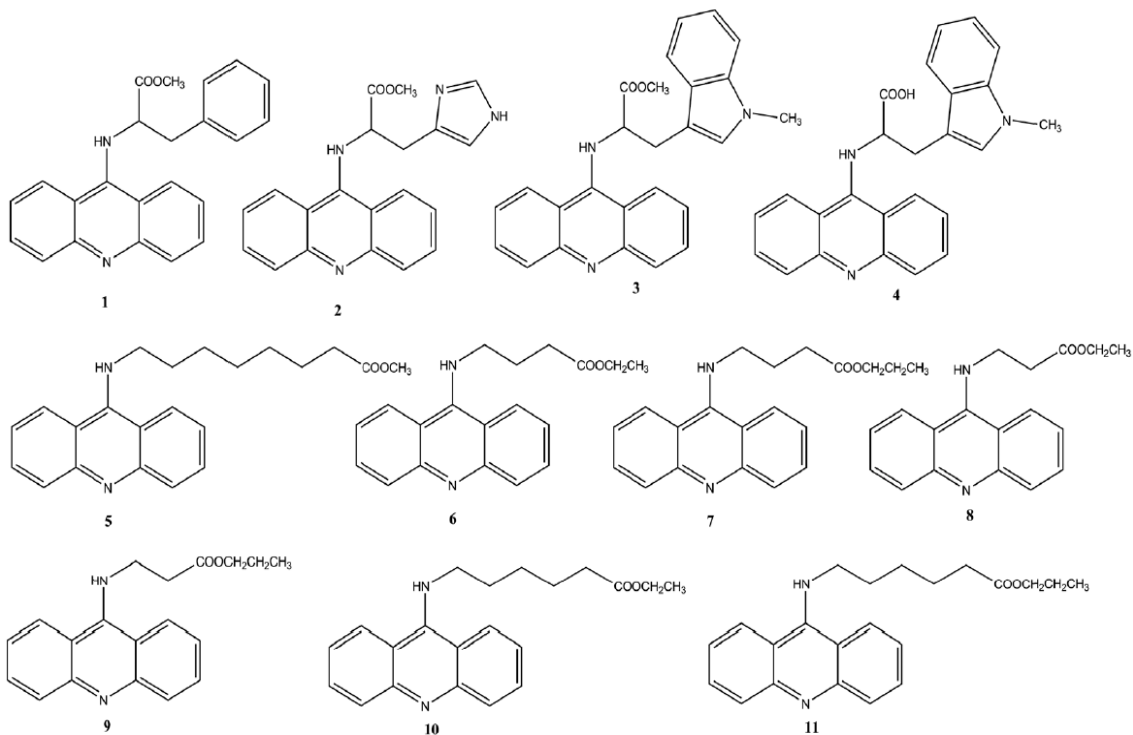
Табела 1. Приноси синтетисаних аминокиселинских деривата акридина

	Једињење	Принос (%)
1	(<i>S</i>)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-фенилпропаноат	21
2	(<i>S</i>)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1 <i>H</i> -имидазол-4-ил)пропаноат	77
3	(<i>S</i>)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)пропаноат	31
4	(<i>S</i>)-2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1 <i>H</i> -индол-3-ил)пропанска киселина	57
5	Метил-8-(акридин-9-ил-амино)октаноат	38
6	Етил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат	36
7	Пропил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат	42
8	Етил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат	29
9	Пропил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат	22
10	Етил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат	33
11	Пропил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат	32

4.2. Физичко-хемијска карактеризација синтетисаних аминокиселинских деривата акридина

Синтетисани АДА су структурно окарактерисани одређивањем температуре топљења и применом спектроскопских метода и то: инфрацрвеном спектроскопијом (IR), нуклеарном магнетном резонанцијом (^1H NMR, ^{13}C NMR), масеном спектроскопијом (MS/MS) и масеном спектрометријом високе резолуције (HRMS) [40].

Структуре синтетисаних АДА приказане су на Слици 22.



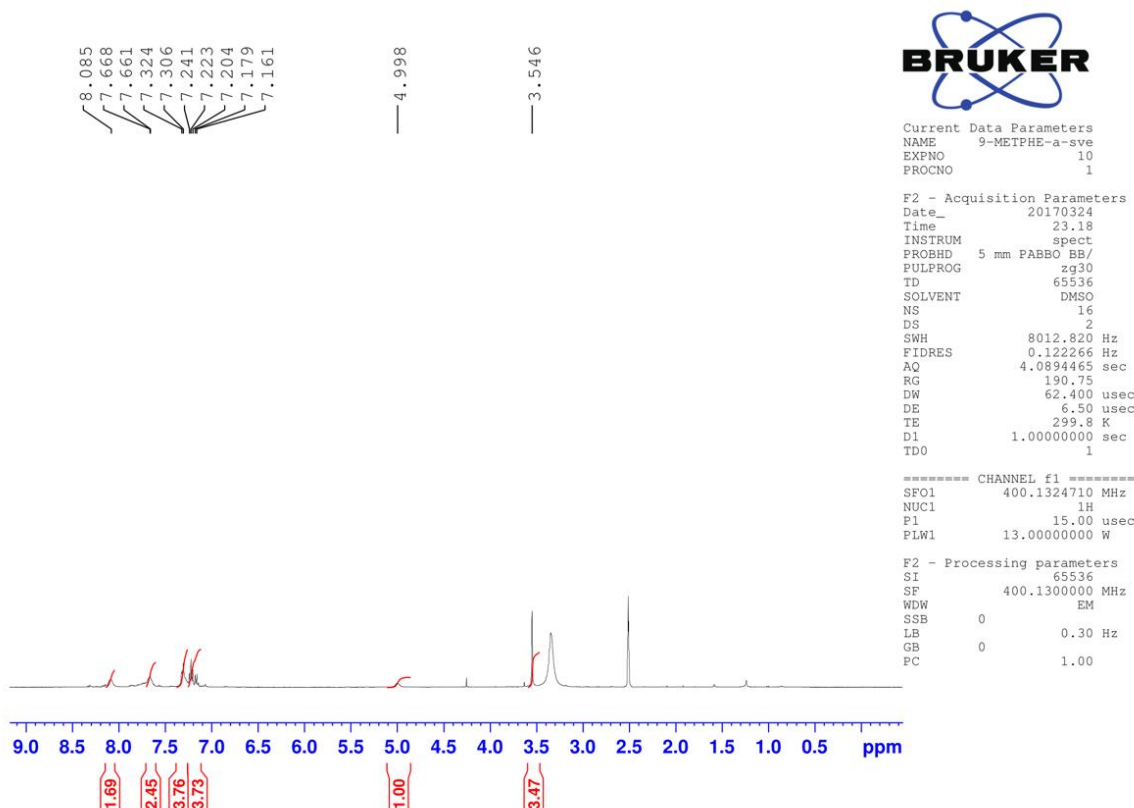
Слика 22. Структуре синтетисаних аминокиселинских деривата акридина [40]

Једињење 1, (S)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-фенилпропаноат

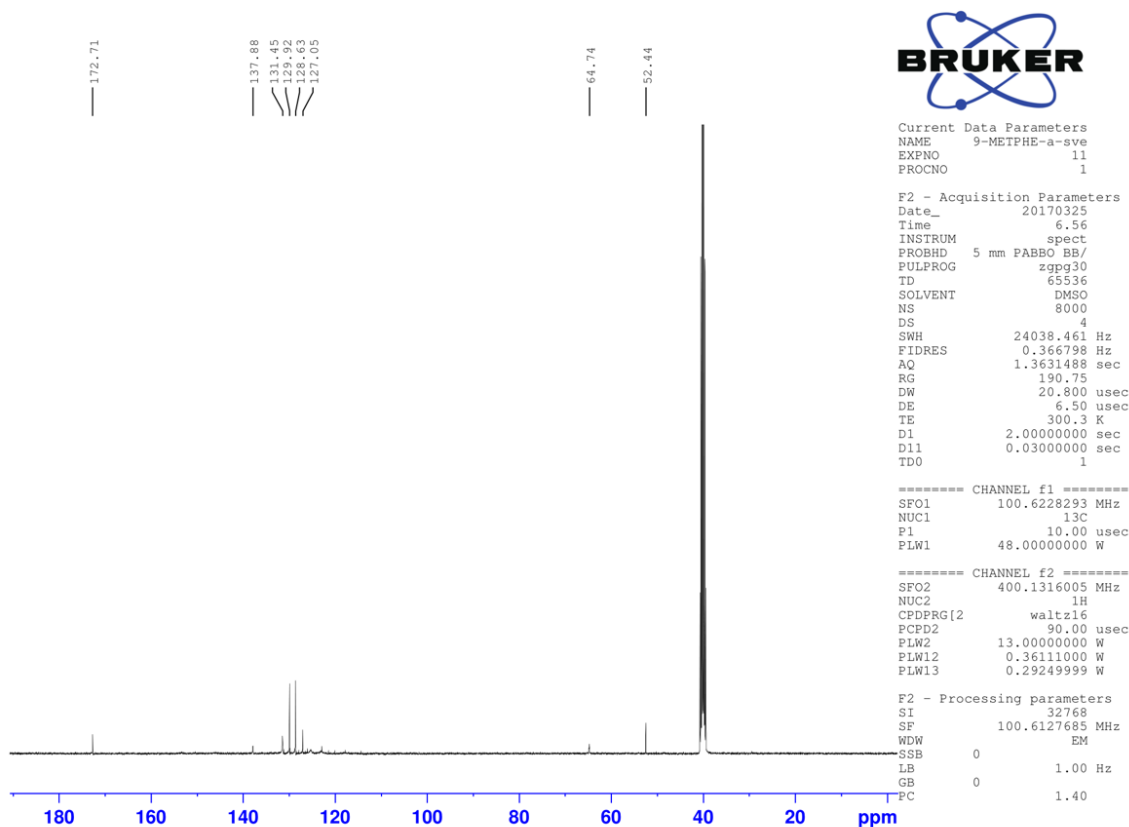
Једињење 1 је синтетисано у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-метоксид и хидрохлорид метил естра *L*-фенилаланина. Реакциона смеша је пречишћена применом препаративне хроматографије на танком слоју (TLC), са мобилном фазом етилацетат:хексан 4:0,3 (v/v) и хлороформ:метанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 21%. **Температура топљења:** 176,0-179,5 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 705,0; 789,20; 1209,67; 1470,37; 1587,16; 1739,65; 3236,92; **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm** 8,26 (d, 2H, J = 6,8 Hz, H-4 и H-5), 7,96 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-1 и H-8), 7,71 (t, 2H, J = 7,6 Hz, H-3 и H-6), 7,39 (t, 2H, J = 8 Hz, H-2 и H-7), 7,20-7,31 (m, 5H, H-4', H-5', H-6', H-7' и H-8'), 5,03 (s, 1H, H-1'), 3,64 (s, 3H, -CH₃), 3,40 (d, 2H, H-2'); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm** 172,59; 135,31; 131,44; 129,55; 128,80; 127,64; 124,47; 122,59; 77,34; 77,22; 77,02; 76,70; 70,62; 62,73; 52,63; 40,13. **m/z** = 357,4 (M⁺ + 1), 206,18; 179,19; 297,26. **MS [M + H]⁺** израчунато за C₂₃H₂₀N₂O₂ = 357,15248; одређено = 357,15297

На **Сликама 23 и 24** приказани су ¹H NMR и ¹³C NMR спектри једињења 1.



Слика 23. Једињење 1, ¹H NMR [40]



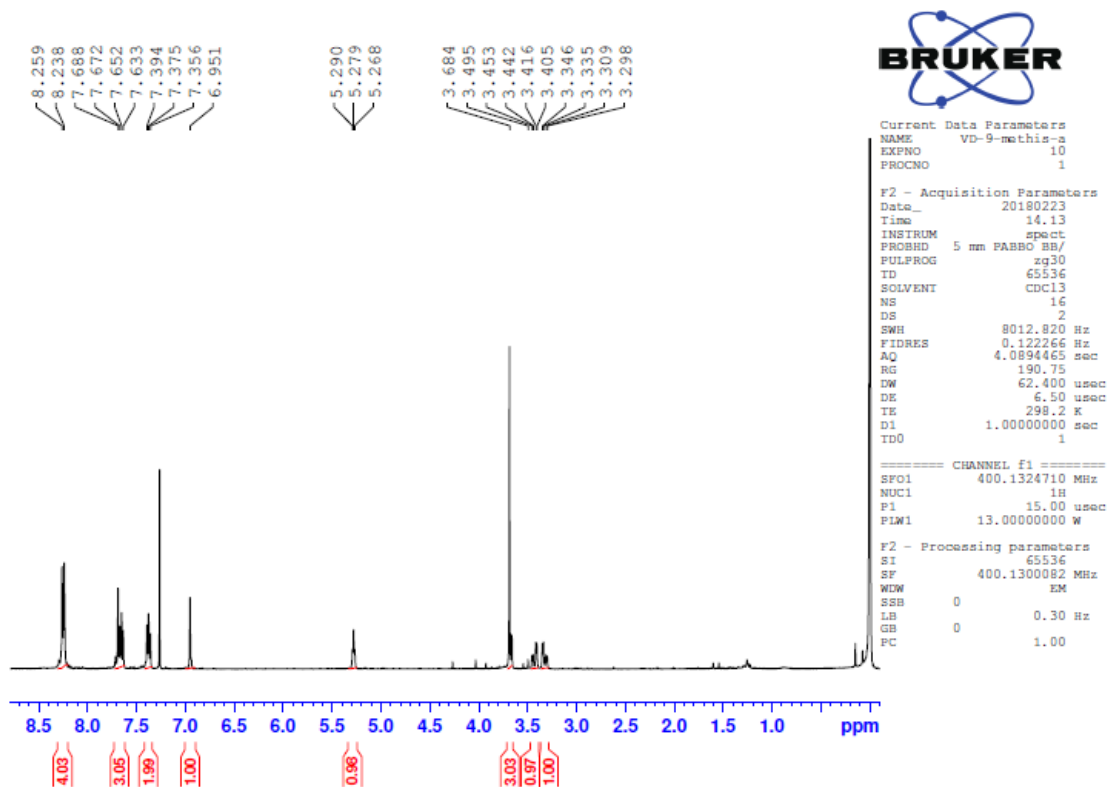
Слика 24. Једињење 1, ^{13}C NMR [40]

Једињење 2, (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1*H*-имидазол-4-ил)пропаноат

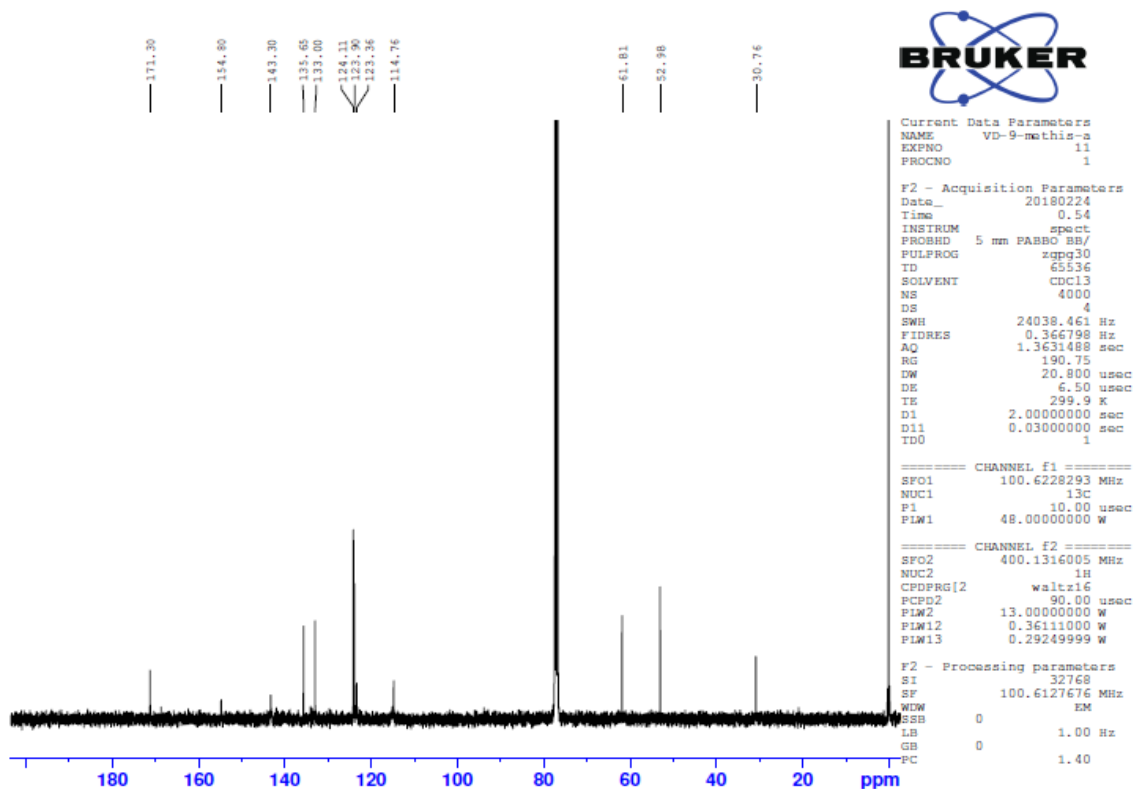
Једињење 2 је синтетисано у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-метоксид и дихидрохлорид метил естра *L*-хистидина. Реакциона смеша је пречишћена применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ:метанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 77%. **Температура топљења:** 95-97,5 °C. **IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}):** 750,67; 1168,29; 1205,05; 1473,66; 1636,99; 1738,11; 2872,03. **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm** 8,25 (d, 4H, $J = 8,4$ Hz, H-1, H-4, H-5 и H-8), 7,63-7,69 (m, 3H, H-3, H-6 и H-5'), 7,37 (t, 2H, $J=7,6$ Hz, H-2 и H-7), 6,95 (s, 1H, H-7'), 5,28 (t, 1H, $J=4.4$ Hz, H-1'), 3,68 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3,30-3,49 (m, 2H, H-2'). **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm** 171,30; 154,80; 143,30; 135,65; 133,00; 124,11; 123,90; 123,36; 114,76; 61,81; 52,98; 30,76. **m/z** = 347,1 ($\text{M}^+ + 1$), 205,98; 178,99; 234,96. **MS** [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ израчунато за $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2 = 347,14298$; одређено = 347,14966.

На Сликама 25 и 26 приказани су ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри једињења 2.



Слика 25. Једињење 2, ¹H NMR [40]



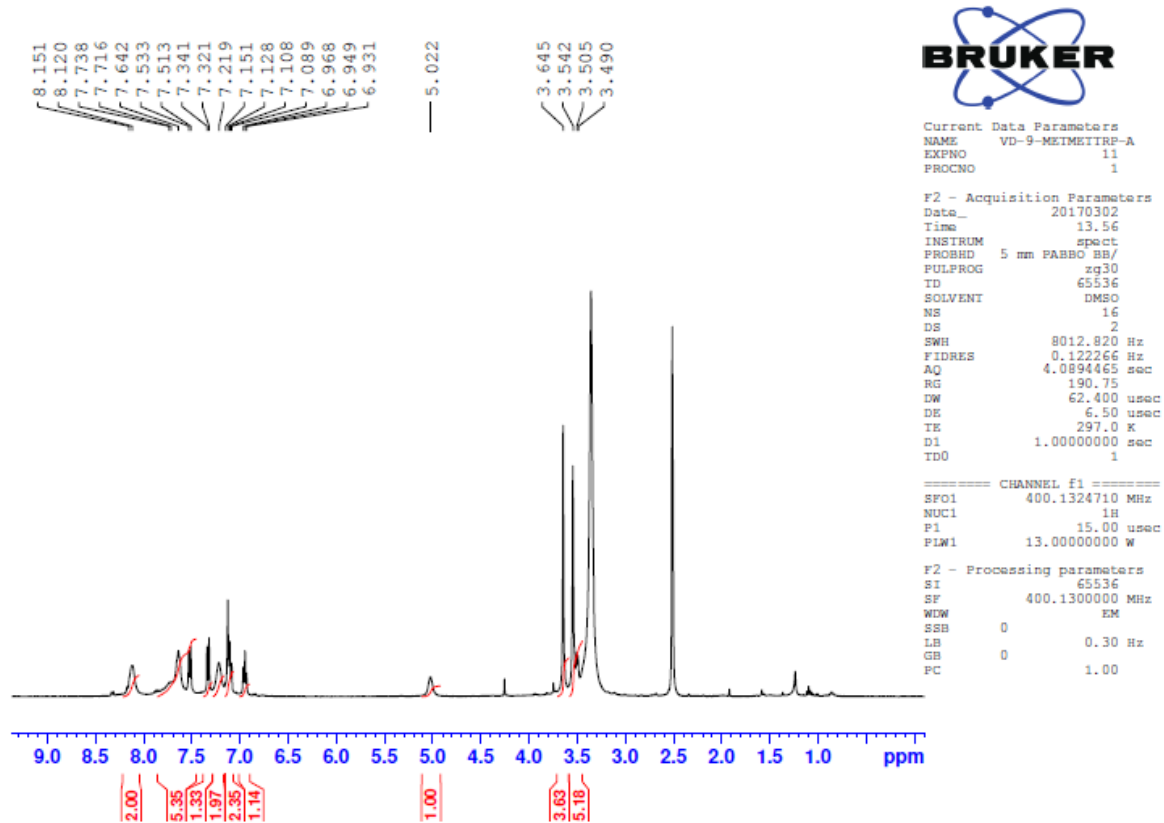
Слика 26. Једињење 2, ¹³C NMR [40]

Једињење 3, (*S*)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропаноат

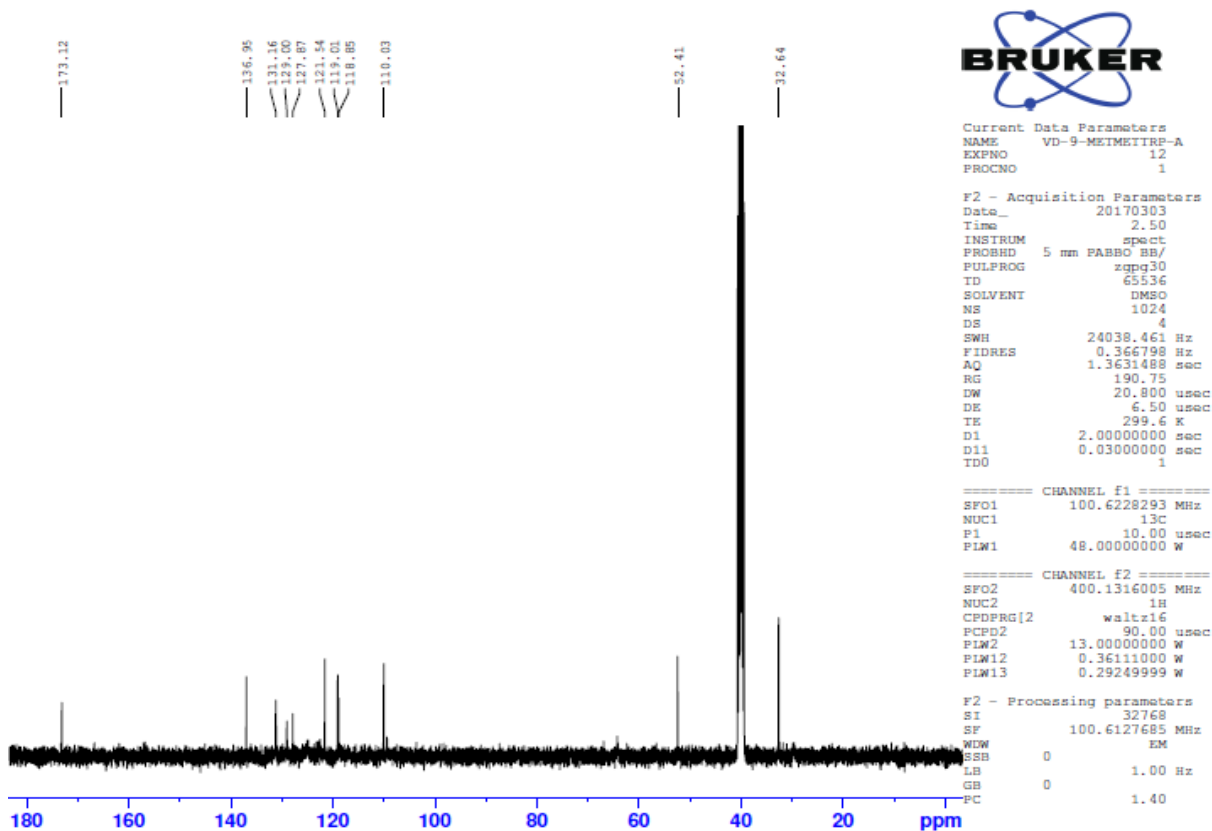
Једињење 3 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-метоксид и хидрохлорид метил естра 1-метил-*L*-триптофана. Реакциона смеша је пречишћена применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ:метанол 9:1,6 (v/v), а затим мобилном фазом етилацетат:хексан 4:1 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 31 %. **Температура топљења:** 55-58,5 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 738,83; 1205,01; 1441,65; 1470,75; 1525,13; 1557,74; 1737,67. **¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 8,12-8,15 (m, 2H, H-1 и H-8), 7,51-7,74 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 и H-7), 7,33 (d, 1H, J=8 Hz, H-10'), 7,09-7,15 (m, 3H, H-4', H-7', H-8'), 6,95 (t, 1H, J=7,6 Hz, H-9'), 5,02 (s, 1H, H-1'), 3,64 (s, 3H, -CH₃), 3,54 (s, 3H, H-12'), 3,49-3,50 (m, 2H, H-2'). **¹³C NMR (100MHz, DMSO) δ ppm** 173,12; 136,95; 131,16; 129,00; 127,87; 121,54; 119,01; 118,85; 110,03; 52,41; 32,64. **m/z** = 410,2 (M⁺ + 1), 174,06; 216,04; 144,07. **MS [M + H]⁺** израчунато за C₂₆H₂₄O₂N₃ = 410,17903; одређено = 410,18594.

На **Сликама 27 и 28** приказани су ¹H NMR и ¹³C NMR спектри једињења 3.



Слика 27. Једињење 3, ¹H NMR [40]



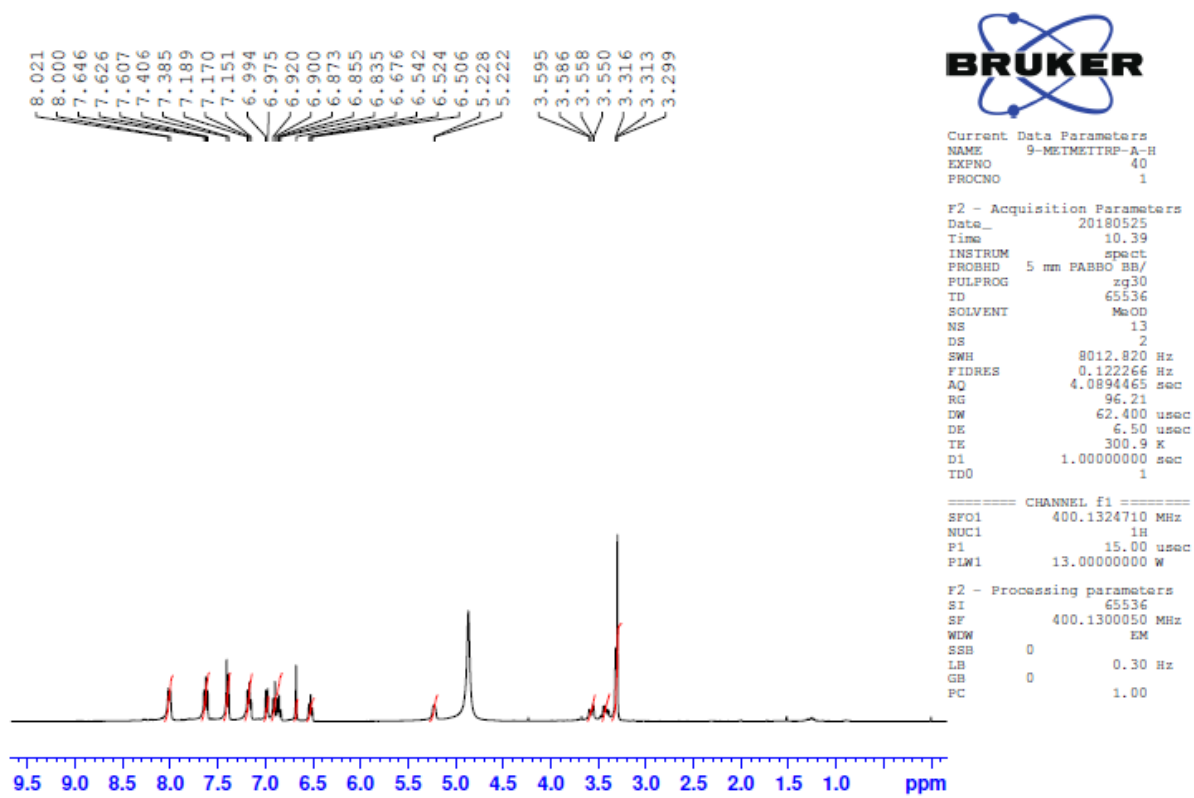
Слика 28. Једињење 3, ^{13}C NMR [40]

Једињење 4, (S)-2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пропанска киселина

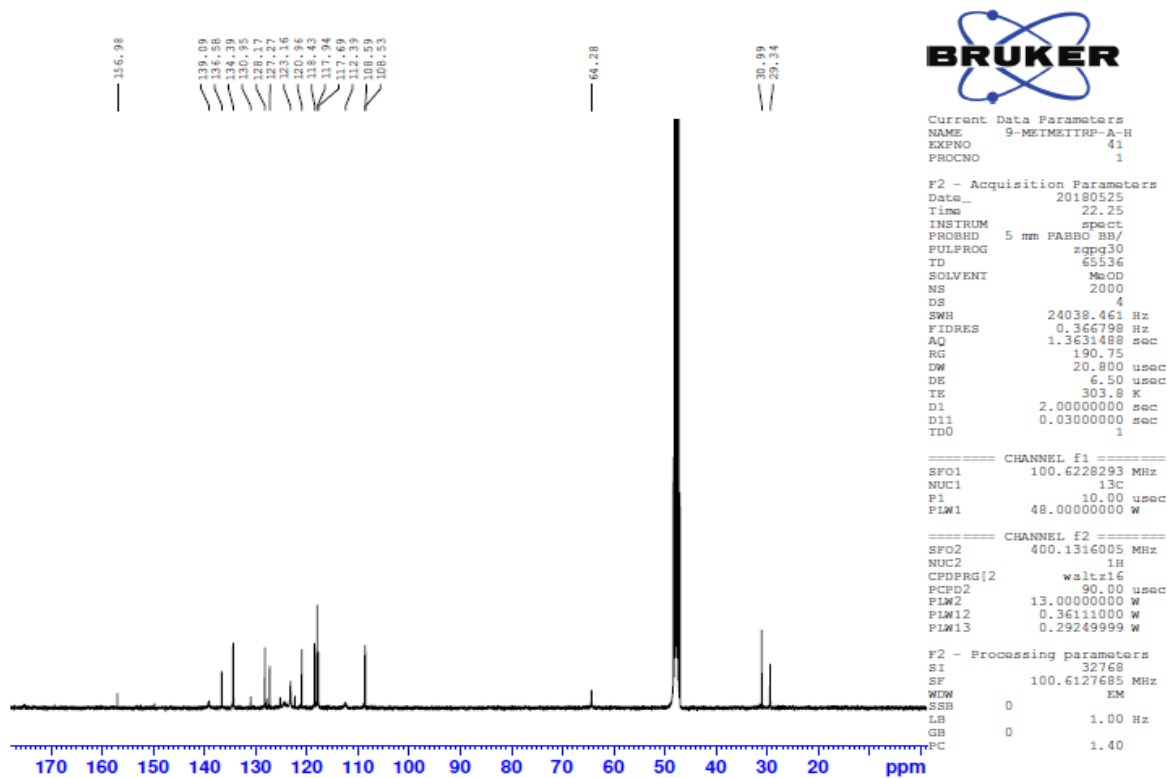
Једињење 4 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-метоксид и 1-метил-*L*-триптофан. Реакциона смеша је пречишћена применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ:метанол 9:2 (v/v). Добијен је наранџасти кристални прашак након рекристализације у растварачу који се састојао из хлороформа и метанола у односу 5:5 (v/v).

Принос: 57%. **Температура топљења:** 43-46,5 °C. **IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}):** 737,28; 1271,24; 1370,64; 1529,12; 1586,03; 1634,44; 2850,80; 2920,97. **^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm** 8,01 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-1 и H-8), 7,63 (t, 2H, $J = 8$ Hz, H-3 и H-6), 7,40 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-4 и H-5), 7,17 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-2 и H-7), 6,98 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-10'), 6,83-6,92 (m, 2H, H-7' и H-8'), 6,68 (s, 1H, H-4'), 6,52 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-9'), 5,28 (s, 1H, H-1'), 3,55-3,59 (m, 2H, H-2'), 3,30 (s, 3H, H-12'). **^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ ppm** 156,98; 139,09; 136,58; 134,39; 130,95; 128,17; 127,27; 123,16; 120,96; 118,43; 117,94; 117,69; 112,39; 108,59; 108,53; 64,28; 30,99; 29,34. **m/z** = 396,1 ($\text{M}^+ + 1$), 195,05; 144,06; 202,03. **MS** [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ израчунато за $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3$ = 396,16338; одређено = 396,17023.

На Сликама 29 и 30 приказани су ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри једињења 4.



Слика 29. Једињење 4, ^1H NMR [40]



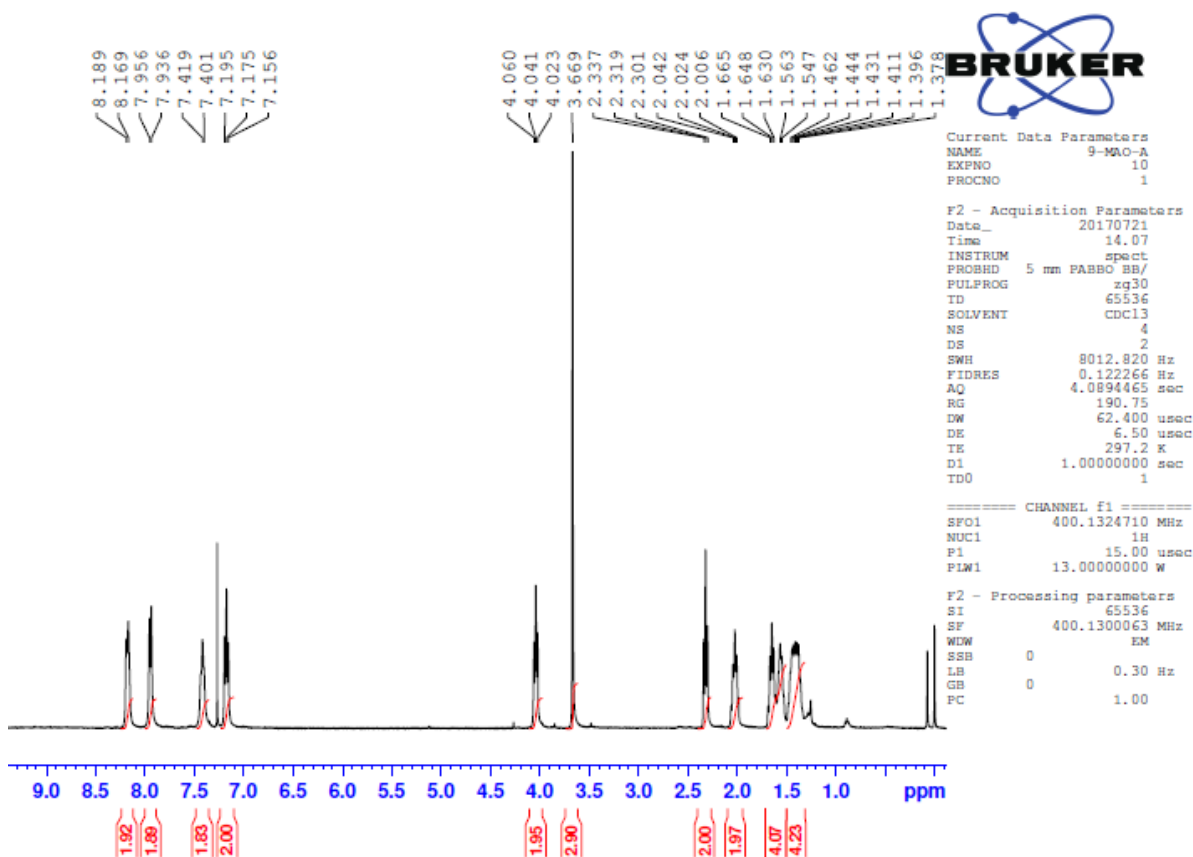
Слика 30. Једињење 4, ^{13}C NMR [40]

Једињење 5, метил-8-(акридин-9-ил-амино)октаноат

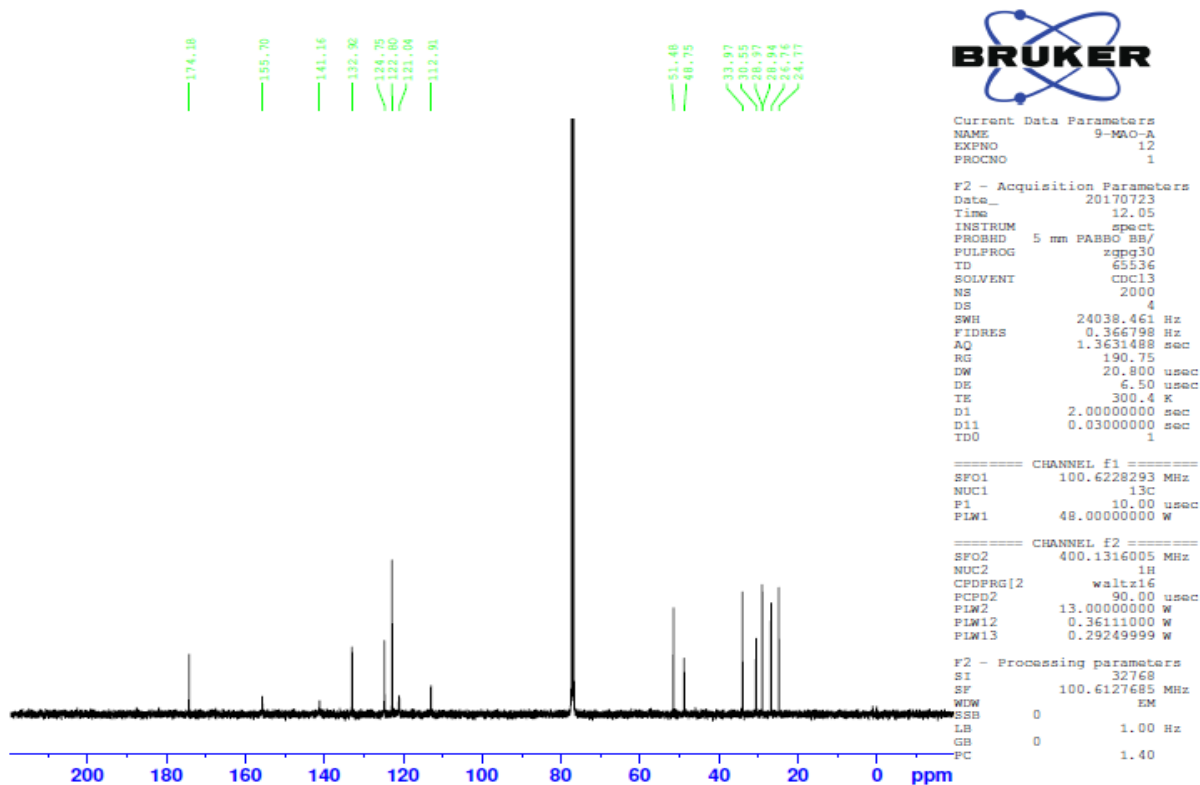
Једињење 5 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-метоксид и хидрохлорид метил естра 8-аминооктанске киселине. Реакциона смеша је пречишћена применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ:метанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 38%. **Температура топљења:** 106,3-109,0 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 662,28; 748,69; 1165,98; 1466,81; 1566,82; 1633,69; 1734,35; 2738,24. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm** 8,18 (d, 2H, J = 8 Hz, H-4 и H-5), 7,95 (d, 2H, J = 8 Hz, H-1 и H-8), 7,41 (d, 2H, J = 7,2 Hz, H-3 и H-6), 7,17 (t, 2H, J = 8 Hz, H-2 и H-7), 4,04 (t, 2H, J = 7,6 Hz, 2×H-1'), 3,67 (s, 3H, 3×H-8'), 2,39 (t, 2H, J = 7,2 Hz, 2×H-7'), 2,02 (quin, 2H, J = 7,2 Hz, 2×H-6'), 1,55-1,66 (m, 4H, 2×H-2' и 2×H-3'), 1,38-1,46 (m, 4H, 2×H-4' и 2×H-5'). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm** 174,18; 155,70; 141,16; 132,92; 124,75; 122,80; 121,04; 112,91; 51,48; 48,75; 33,97; 30,55; 28,97; 28,94; 26,76; 24,77. **m/z** = 351,2 (M⁺ + 1), 195,03; 150,99; 178,01. **MS [M + H]⁺** израчунато за C₂₂H₂₇O₂N₂ = 351,19943; одређено = 351,20621.

На Сликама 31 и 32 приказани су ¹H NMR и ¹³C NMR спектри једињења 5.



Слика 31. Једињење 5, ¹H NMR [40]



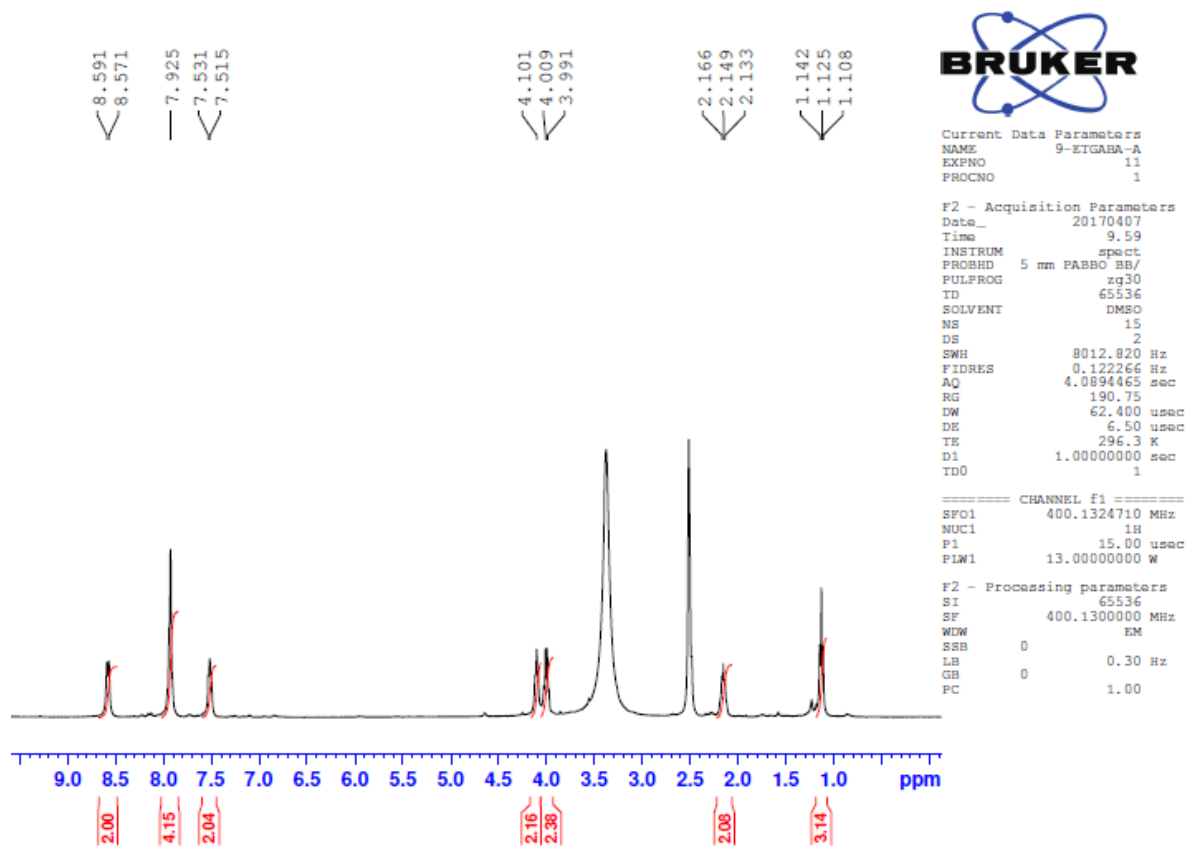
Слика 32. Једињење 5, ^{13}C NMR [40]

Једињење 6, етил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат

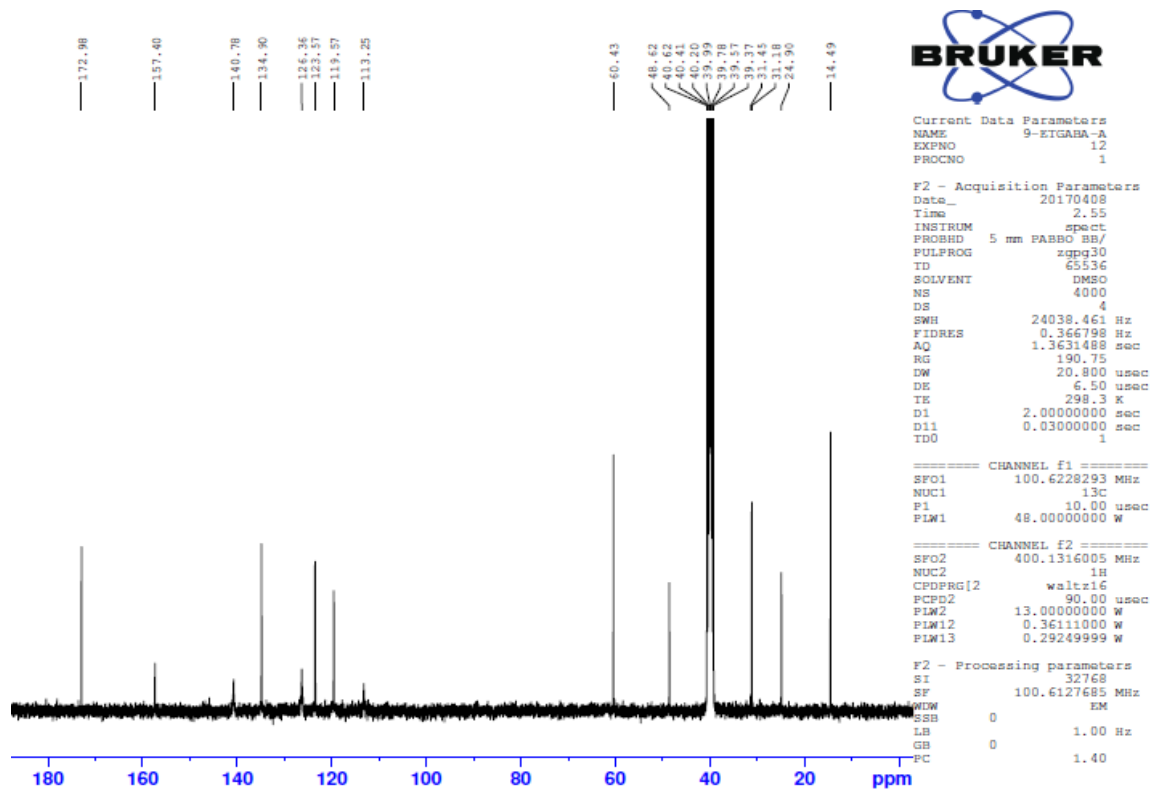
Једињење 6 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-етоксид и хидрохлорид етил естра 4-аминобутерне киселине. Реакциона смеша пречишћена је применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ:метанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 36%. **Температура топљења:** 148-150,5 °C. **IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}):** 747,07; 1171,20; 1477,01; 1569,49; 1588,35; 1635,85; 1725,72; 2779,74. **^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 8,58 (d, 2H, J = 8 Hz, H-4 и H-5), 7,92 (s, 4H, H-1, H-3, H-6 и H-8), 7,52 (d, 2H, J = 6,4, H-2 и H-7), 4,10 (2H, s, 2×H-4'), 4,00 (2H, q, J = 7,2 Hz, 2×H-1'), 2,13-2,17 (m, 2H, 2×H-2'), 1,12 (3H, t, J = 6,8, 3×H-5'). **^{13}C NMR (100MHz, DMSO), δ ppm** 172,98; 157,40; 140,78; 134,90; 126,36; 123,57; 119,57; 113,25; 60,43; 31,45; 31,18; 24,90; 14,49. **m/z** = 309,1 (M^+ + 1), 87,10; 195,02; 281,01. **MS** [M + H]⁺ израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_2$ = 309,15248; одређено = 309,15955.

На Сликама 33 и 34 приказани су ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри једињења 6.



Слика 33. Једињење 6, ^1H NMR [40]



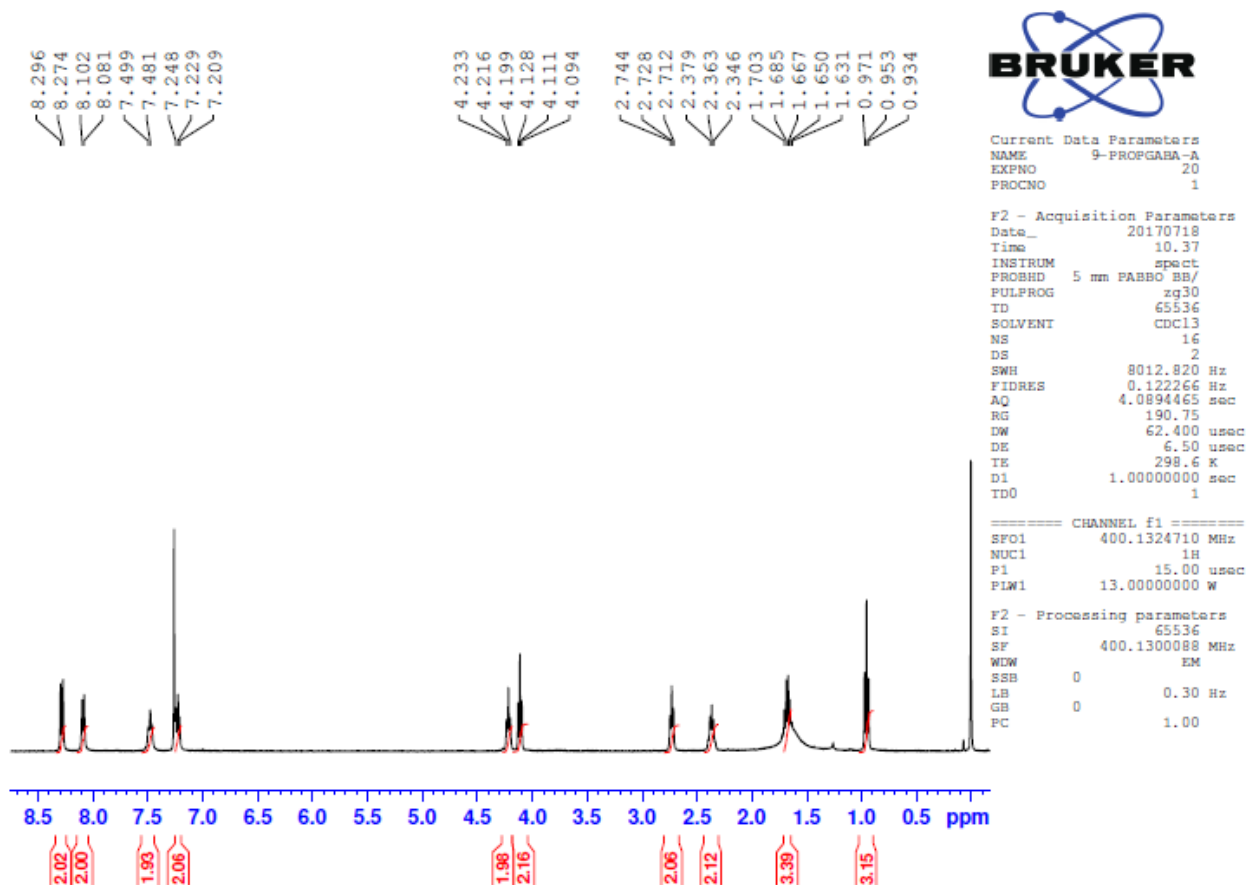
Слика 34. Једињење 6, ^{13}C NMR [40]

Једињење 7, пропилен 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноат

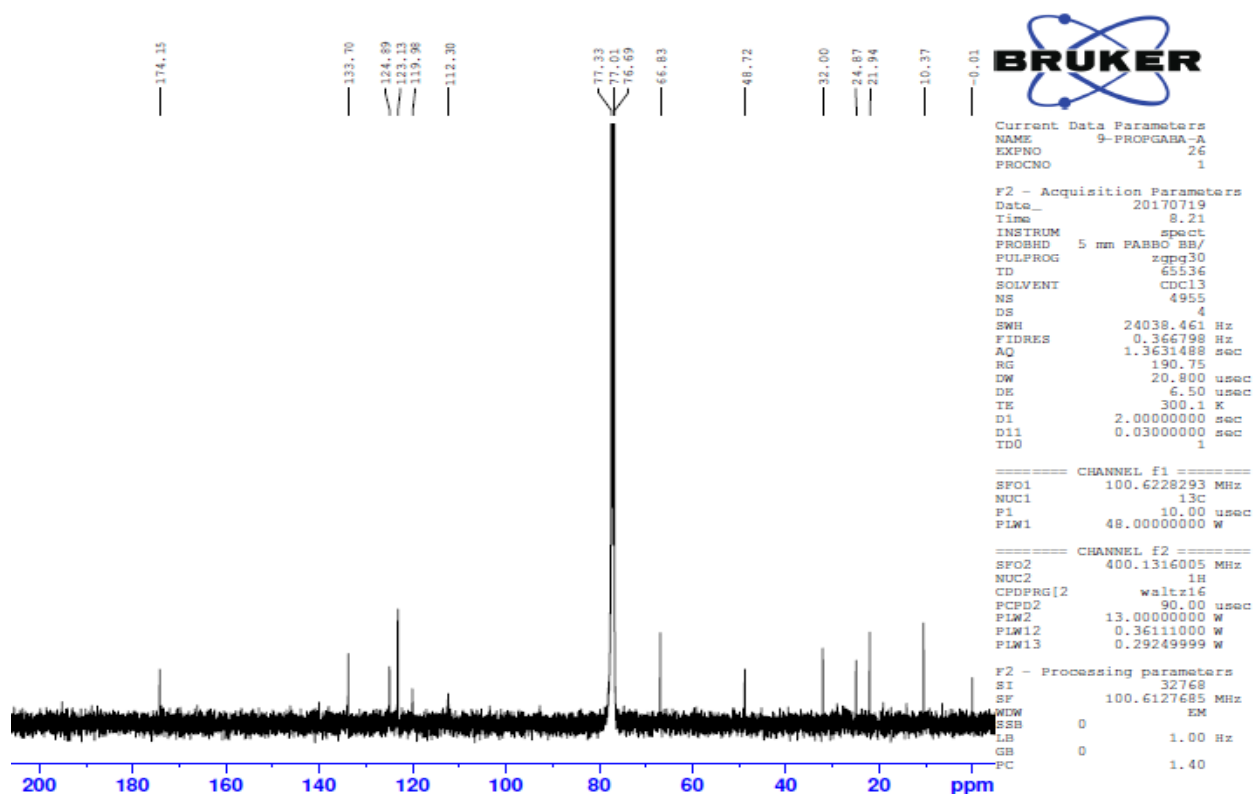
Једињење 7 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-пропоксид и хидрохлорид пропилен естра 4-аминобутерне киселине. Реакциона смеша је пречишћена применом препаративне TLC са мобилном фазом етилацетат:хексан 4:1 (v/v) а затим мобилном фазом хлороформ:метанол 9:1 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 42%. **Температура топљења:** 156,5-159,8 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 664,40; 745,42; 939,82; 1172,32; 1467,45; 1588,44; 1635,45; 1730,53; 2778,87. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm** 8,28 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-4 и H-5), 8,09 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-1 и H-8), 7,49 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-3 и H-6), 7,21-7,25 (m, 2H, H-2 и H-7), 4,22 (t, 2H, J = 6,8 Hz, 2×H-4'), 4,11 (t, 2H, J = 6,8 Hz, 2×H-1'), 2,73 (t, 2H, J = 6,4 Hz, 2×H-3'), 2,36 (quin, 2H, J = 6,4 Hz, 2×H-2'), 1,63-1,70 (m, 2H, 2×H-5'), 0,95 (t, 3H, J = 7,2 Hz, 3×H-6'). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm** 174,15; 133,70; 124,89; 123,13; 119,98; 112,30; 66,83; 48,72; 32,00; 24,87; 21,94; 10,37. **m/z** = 323,2 (M⁺ + 1), 87,11; 195,07; 281,11. **MS [M + H]⁺** израчунато за C₂₀H₂₃O₂N₂ = 323,16813; одређено = 323,17508.

На Сликама 35 и 36 приказани су ¹H NMR и ¹³C NMR спектри једињења 7.



Слика 35. Једињење 7, ¹H NMR [40]



Слика 36. Једињење 7, ^{13}C NMR [40]

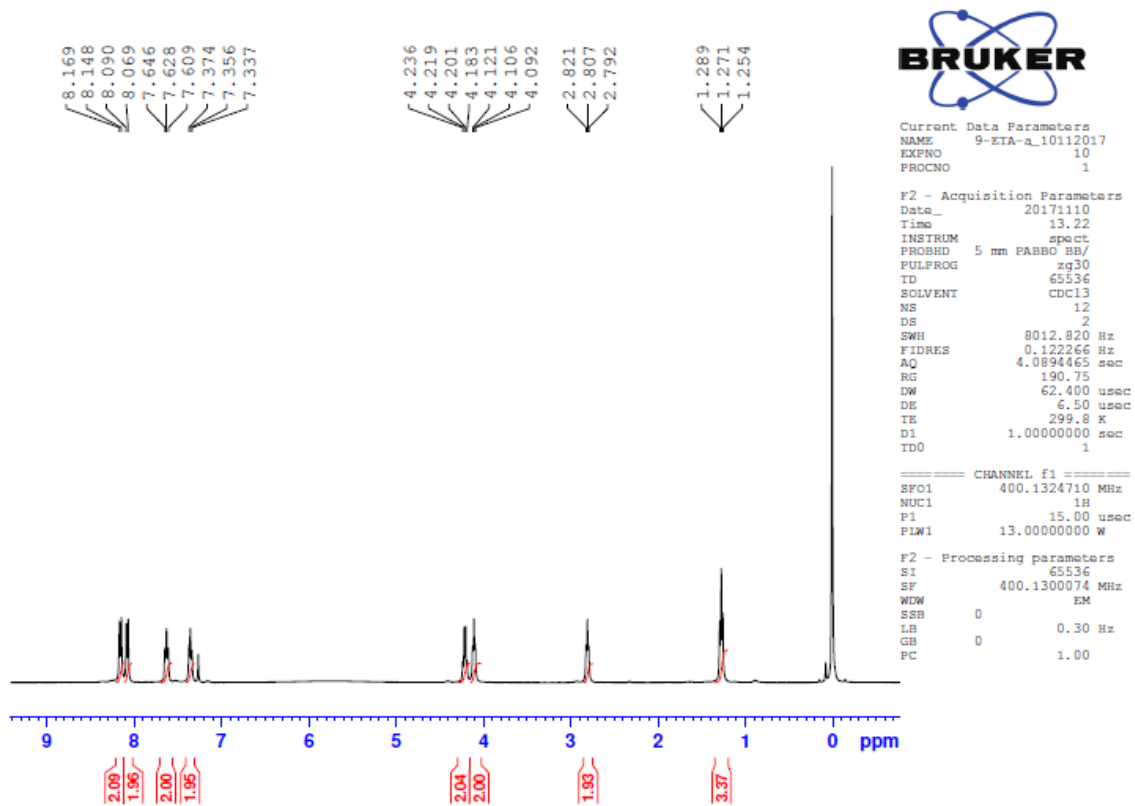
Једињење 8, етил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат

Једињење 8 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-етоксид и хидрохлорид етил естра β -аланина Реакциона смеша пречишћена је применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ:етанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прашак након рекристализације у диетилетру.

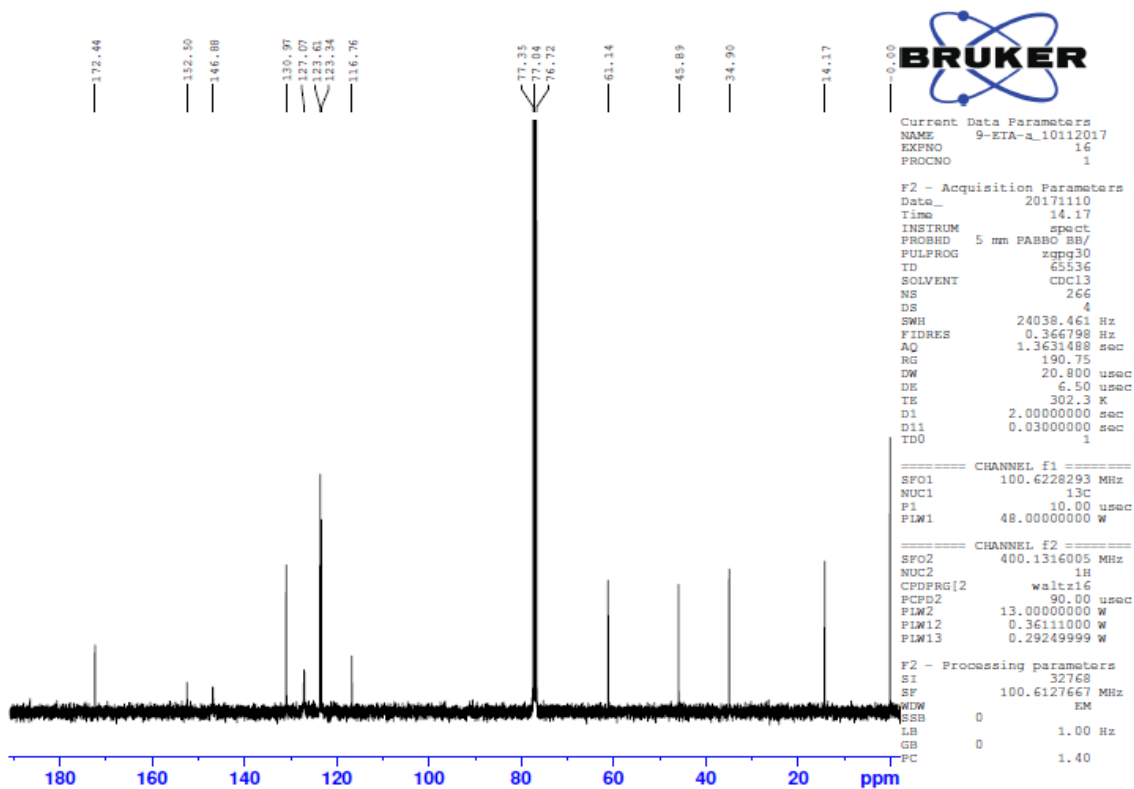
Принос: 29%. **Температура топљења:** 29,7-32,5 °C. **IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}):** 741,88; 1019,40; 1186,82; 1514,04; 1725,16; 3317,52. **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm** 8,16 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-4 и H-5), 8,08 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-1 и H-8), 7,63 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-3 и H-6), 7,36 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-2 и H-7), 4,21 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-3'), 4,11 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H-1'), 2,81 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H-2'), 1,27 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, H-4'). **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm** 172,44; 152,50; 146,88; 130,97; 127,07; 123,61; 123,34; 116,76; 61,14; 45,89; 34,90; 14,17.

m/z = 295,2 ($\text{M}^+ + 1$), 207,07; 206,06; 267,08. **MS** [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ израчунато за $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}_2 = 295,13683$; одређено = 295,14413.

На **Сликама 37 и 38** приказани су ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри једињења 8.



Слика 37. Једињење 8, ^1H NMR [40]



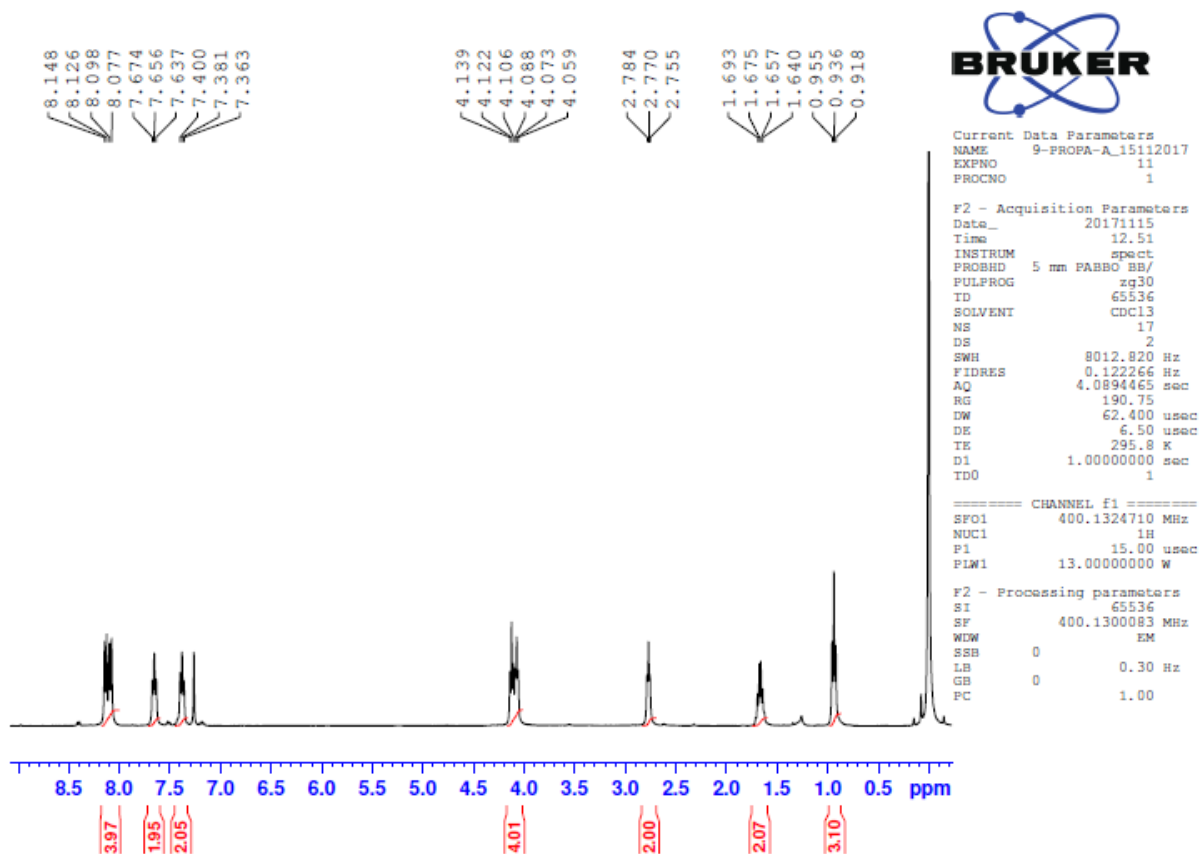
Слика 38. Једињење 8, ^{13}C NMR [40]

Једињење 9, пропил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноат

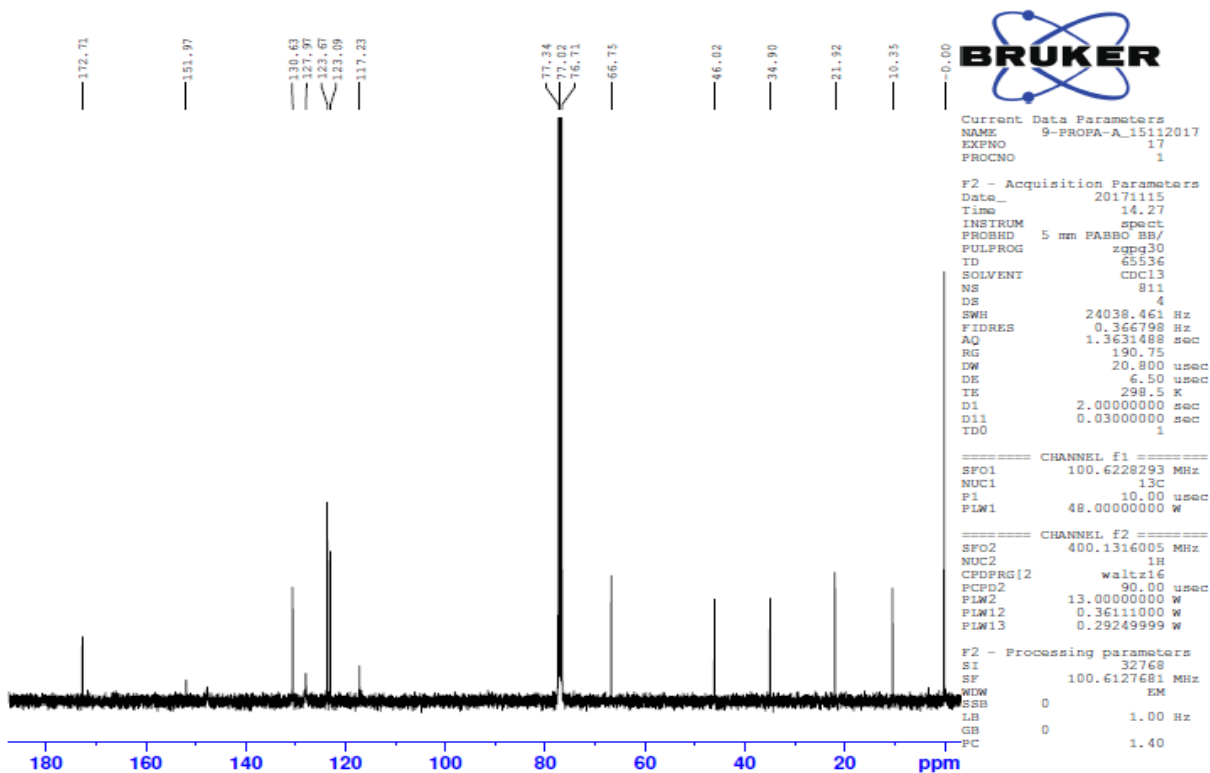
Једињење 9 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-пропоксид и хидрохлорид пропил естра β -аланина. Реакциона смеша пречишћена је применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ:пропанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прашак након рекристализације у диетилетру.

Принос: 22%. **Температура топљења:** 33-35,5 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm^{-1}):** 742,56; 753,98; 1139,08; 1183,86; 1512,75; 1562,24; 1723,97; 3311,60. **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm** 8,14 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-4 и H-5), 8,09 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-1 и H-8), 7,66 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-3 и H-6), 7,38 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-2 и H-7), 4,06-4,14 (m, 4H, 2 \times H-1' и 2 \times H-3'), 2,77 (t, 2H, J = 6 Hz, 2 \times H-2'), 1,64-1,69 (m, 2H, 2 \times H-4'), 0,94 (t, 3H, J = 7,2 Hz, 3 \times H-5'). **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm** 172,71; 151,97; 130,63; 127,97; 123,67; 123,09; 117,23; 66,75; 46,02; 34,90; 21,92; 10,35. **m/z** = 309,2 ($\text{M}^+ + 1$), 207,06; 267,08; 179,07. **MS** [M + H]⁺ израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_2$ = 309,15248; одређено = 309,15948.

На Сликама 39 и 40 приказани су ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри једињења 9.



Слика 39. Једињење 9, ^1H NMR [40]



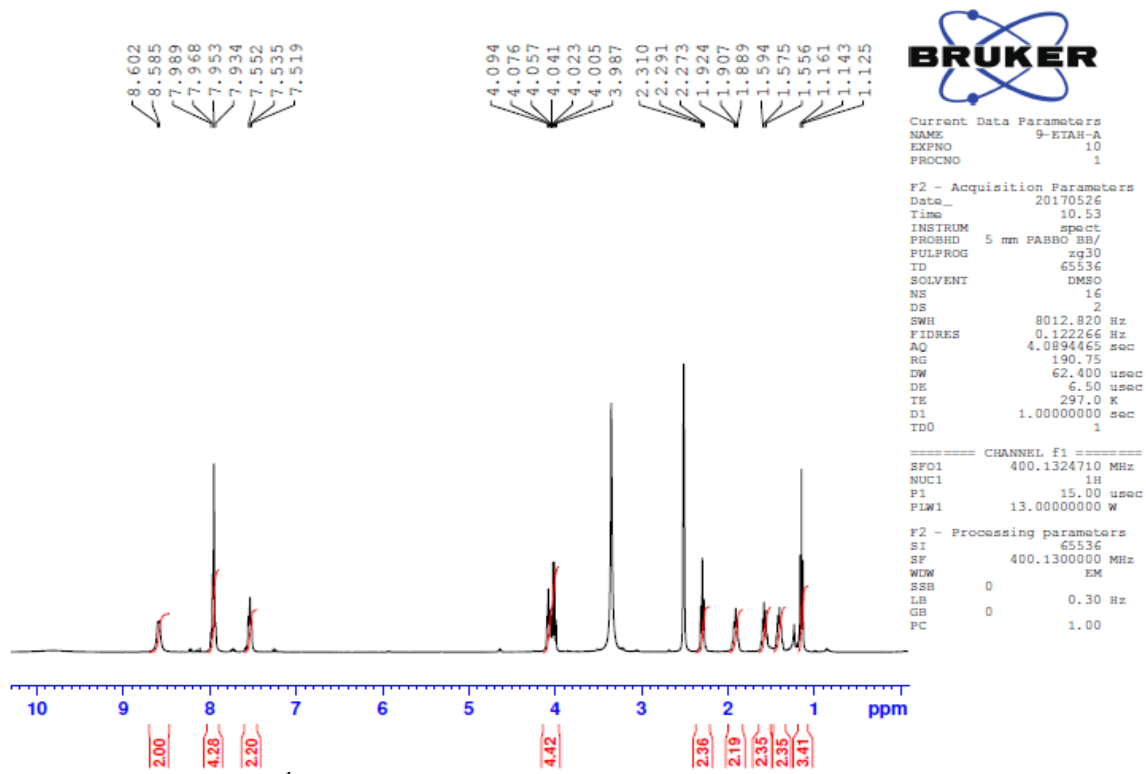
Слика 40. Једињење 9, ^{13}C NMR [40]

Једињење 10, етил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат

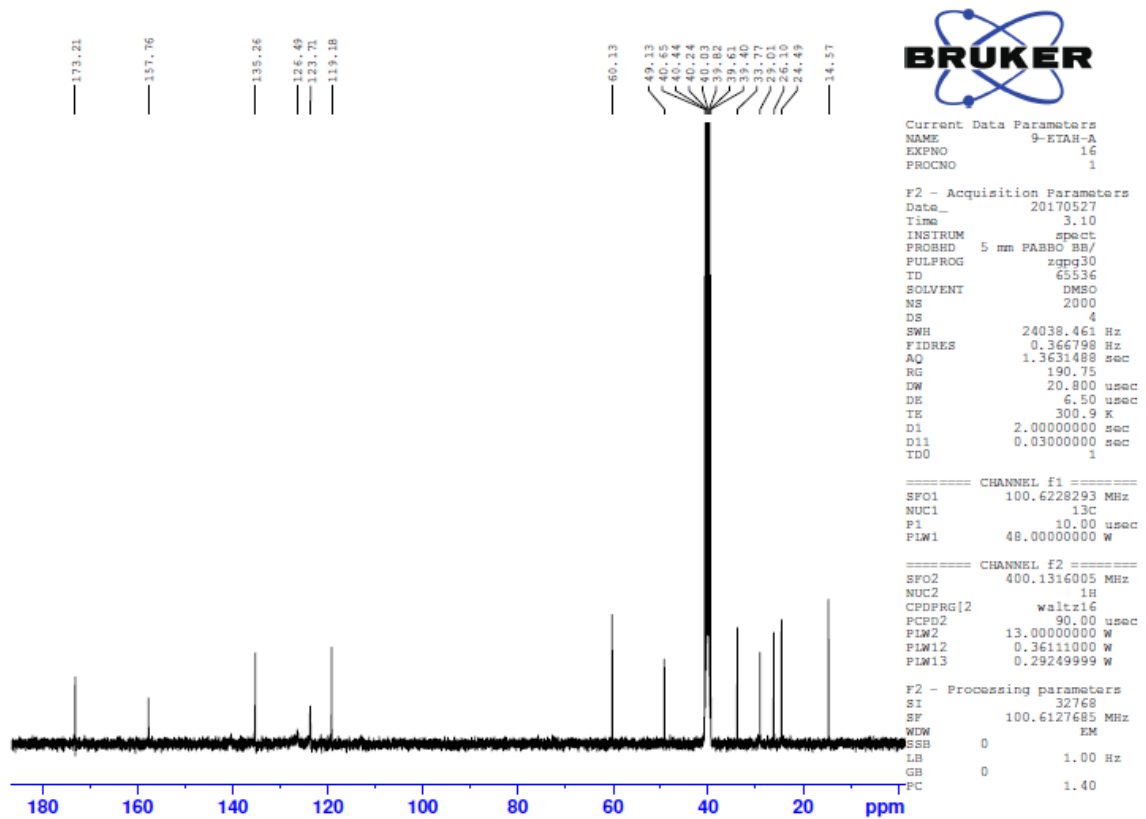
Једињење 10 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-етоксид и хидрохлорид етил естра б-аминохексанске киселине. Реакциона смеша пречишћена је применом препаративне TLC са мобилном фазом хлороформ и метанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 33%. **Температура топљења:** 169,5-172,0 °C. **IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}):** 663,28; 751,97; 836,63; 868,97; 1173,36; 1468,92; 1529,01; 1566,20; 1587,08; 1634,41; 1723,38; 2804,29. **^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm** 8,59 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-4 и H-5), 7,93-7,99 (m, 4H, H-1, H-3, H-6 и H-8), 7,53 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-2 и H-7), 3,99-4,09 (m, 4H, $2\times\text{H}-1'$ и $2\times\text{H}-6'$), 2,29 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, $2\times\text{H}-5'$), 1,89-1,92 (m, 2H, $2\times\text{H}-4'$), 1,56-1,59 (m, 2H, $2\times\text{H}-2'$), 1,30-1,45 (m, 2H, $2\times\text{H}-3'$), 1,14 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $3\times\text{H}-7'$). **^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm** 173,21; 157,76; 135,26; 126,49; 123,71; 119,18; 60,13; 49,13; 33,77; 29,01; 26,10; 24,49; 14,57. **$m/z = 337,2$ ($\text{M}^+ + 1$), 195,06; 309,16; 69,26. MS [M + H] $^+$ израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_2\text{N}_2 = 337,18378$; одређено = 337,19083.**

На Сликама 41 и 42 приказани су ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри једињења 10.



Слика 41. Једињење 10, ^1H NMR [40]



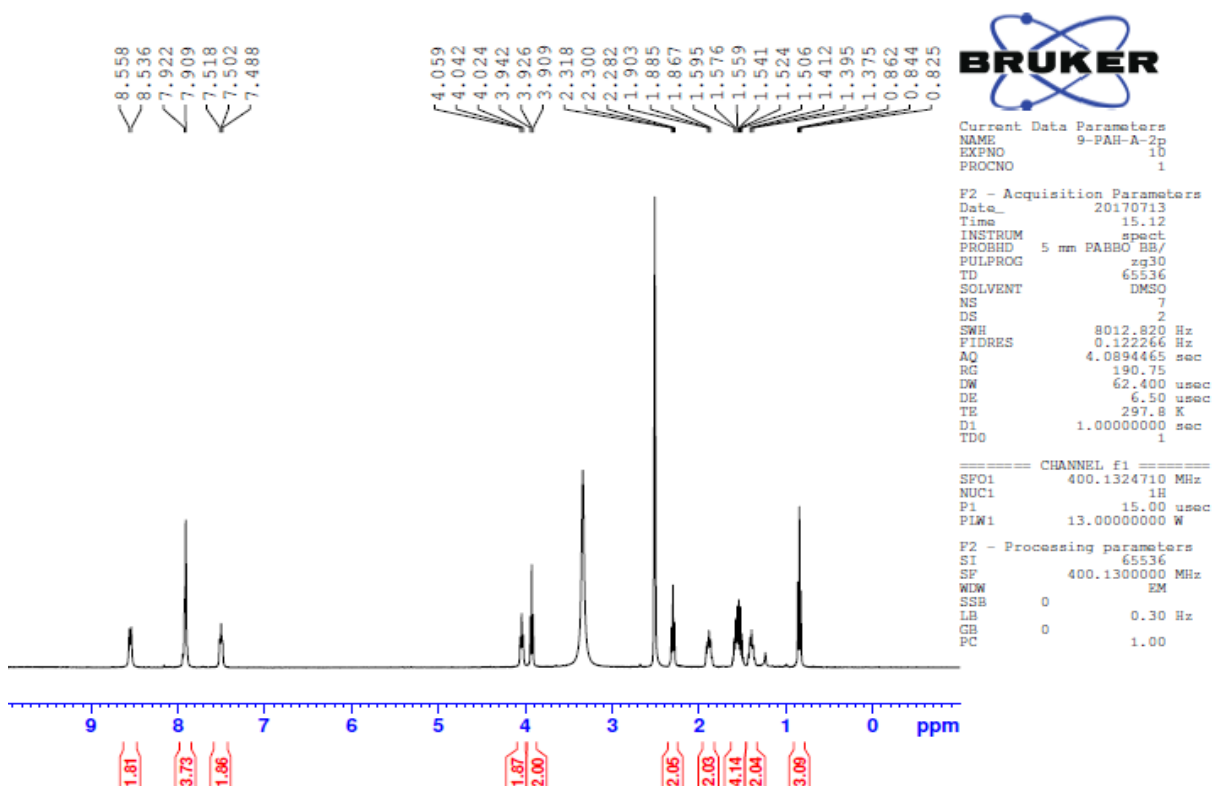
Слика 42. Једињење 10, ^{13}C NMR [40]

Једињење 11, пропил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноат

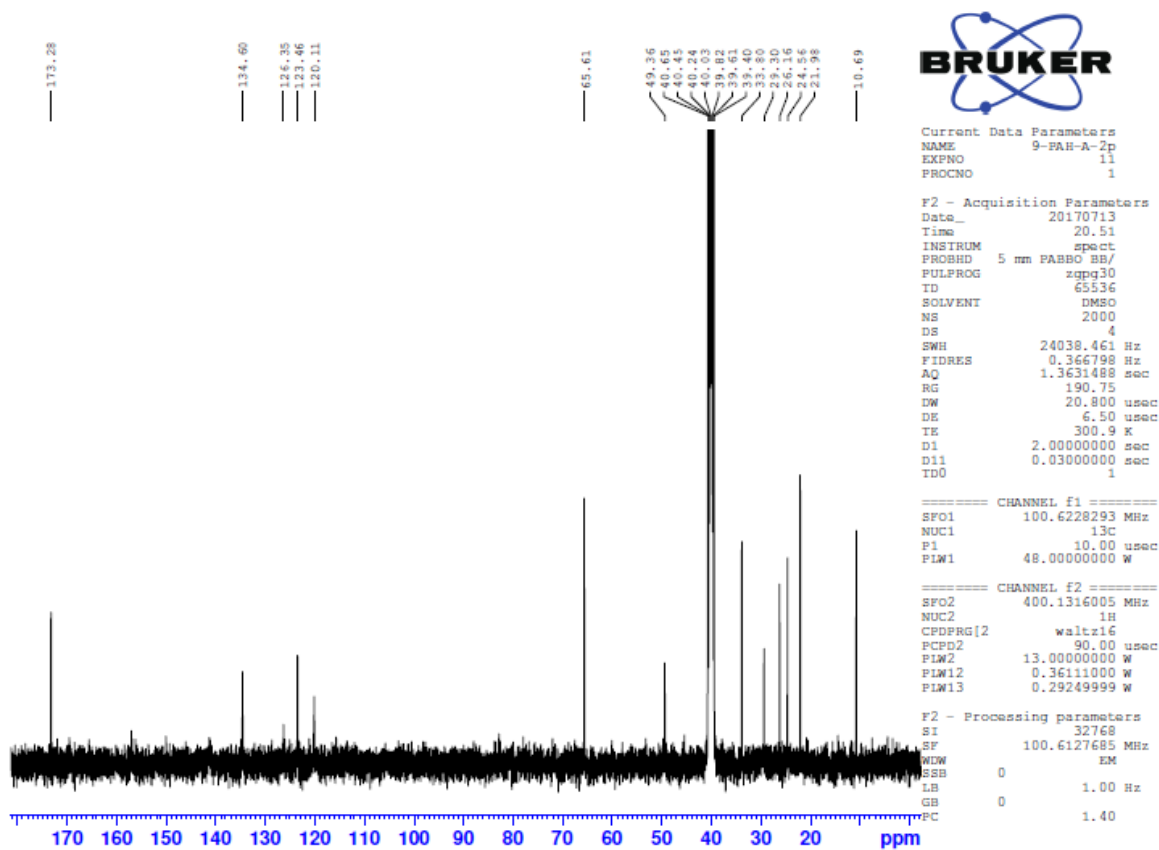
Једињење 11 синтетисано је у складу са општим поступком (описаним у делу 4.1.), а коришћени су натријум-пропоксид и хидрохлорид пропил естра 6-аминохексанске киселине. Реакциона смеша је пречишћена применом препаративне TLC са мобилном фазом етилацетат:хексан 4:1 (v/v) а затим мобилном фазом хлороформ:метанол 9:1,6 (v/v). Добијен је жути кристални прах након рекристализације у диетилетру.

Принос: 32%. **Температура топљења:** 145,7-149,3 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 662,50; 765,32; 1177,03; 1272,97; 1333,36; 1469,40; 1587,02; 1633,56; 1720,98; 2850,50. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 8,55 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H-4 и H-5), 7,91-7,92 (m, 4H, H-1, H-3, H-6 и H-8), 7,50 (t, 2H, J = 6,4 Hz, H-2 и H-7), 4,04 (t, 2H, J = 6,8 Hz, 2×H-6'), 3,93 (t, 2H, J = 6,4 Hz, 2×H-1'), 2,30 (t, 2H, J = 7,2 Hz, 2×H-5'), 1,87-1,90 (m, 2H, 2×H-4'), 1,51-1,59 (m, 4H, 2×H-2' и 2×H-7'), 1,37-1,41 (m, 2H, 2×H-3'), 0,84 (t, 3H, J = 7,2 Hz, 3×H-8'). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 173,28; 134,60; 126,35; 123,46; 120,11; 65,61; 49,36; 33,80; 29,30; 26,16; 24,56; 21,98; 10,69. **m/z** = 351,2 (M⁺ + 1), 195,00; 309,03; 69,26. **MS [M + H]⁺** израчунато за C₂₂H₂₇O₂N₂ = 351,19943; одређено = 351,20612.

На Сликама 43 и 44 приказани су ¹H NMR и ¹³C NMR спектри једињења 11.



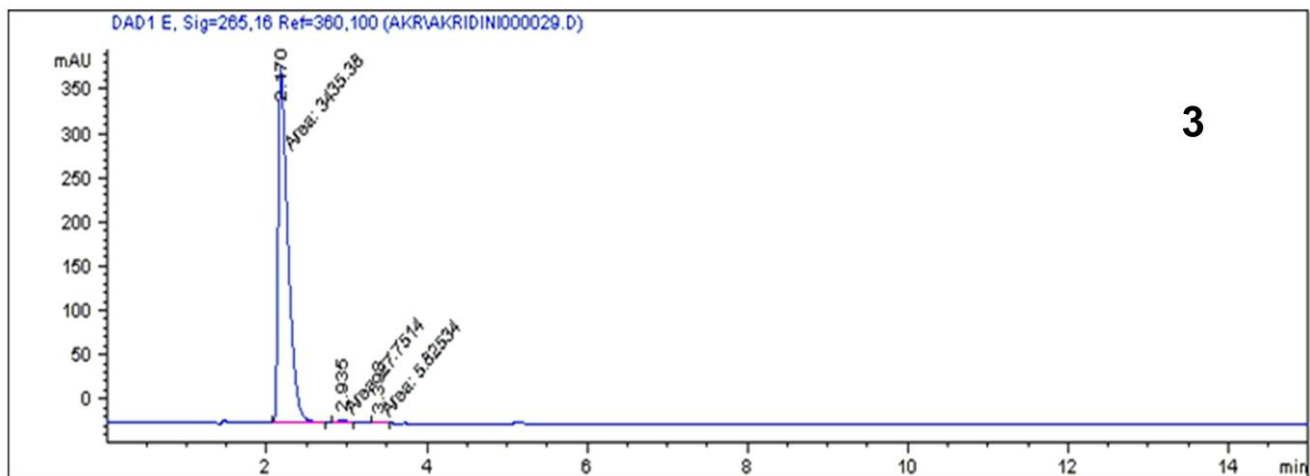
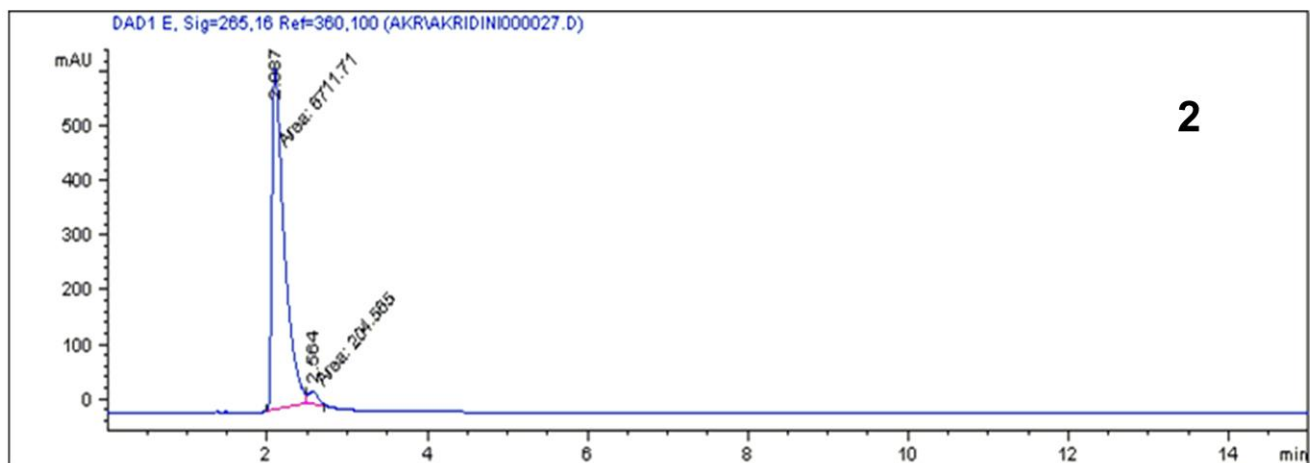
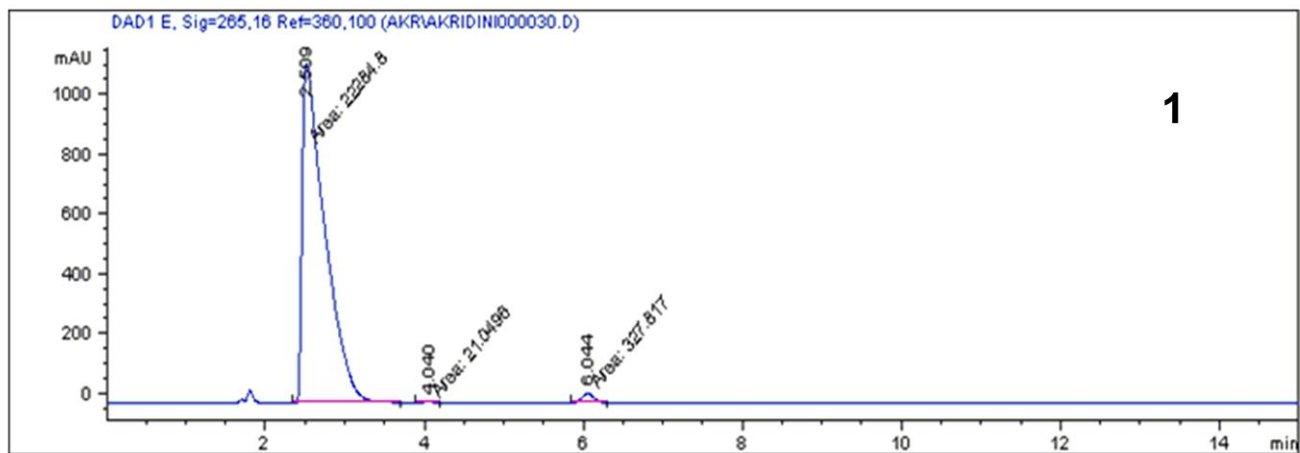
Слика 43. Једињење 11, ¹H NMR [40]



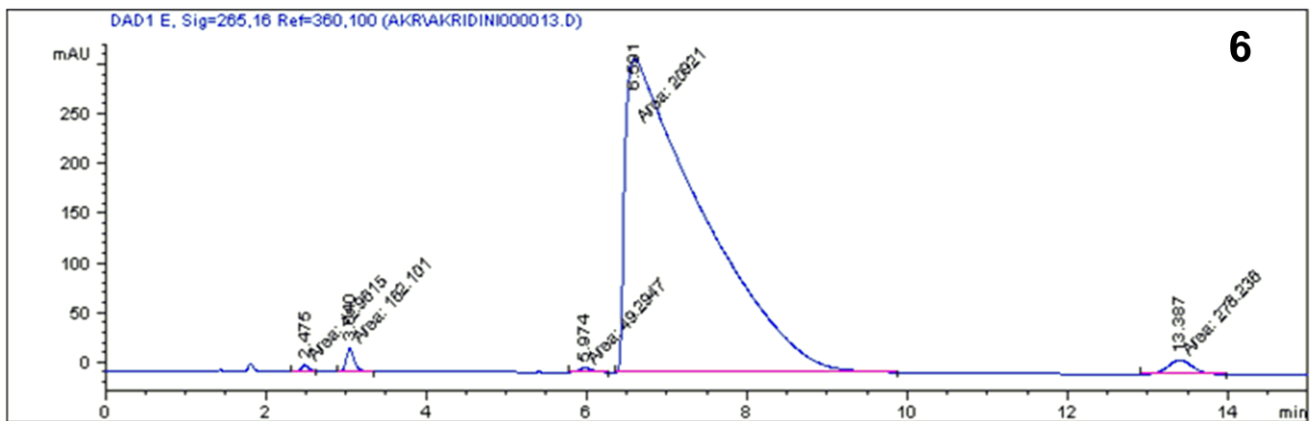
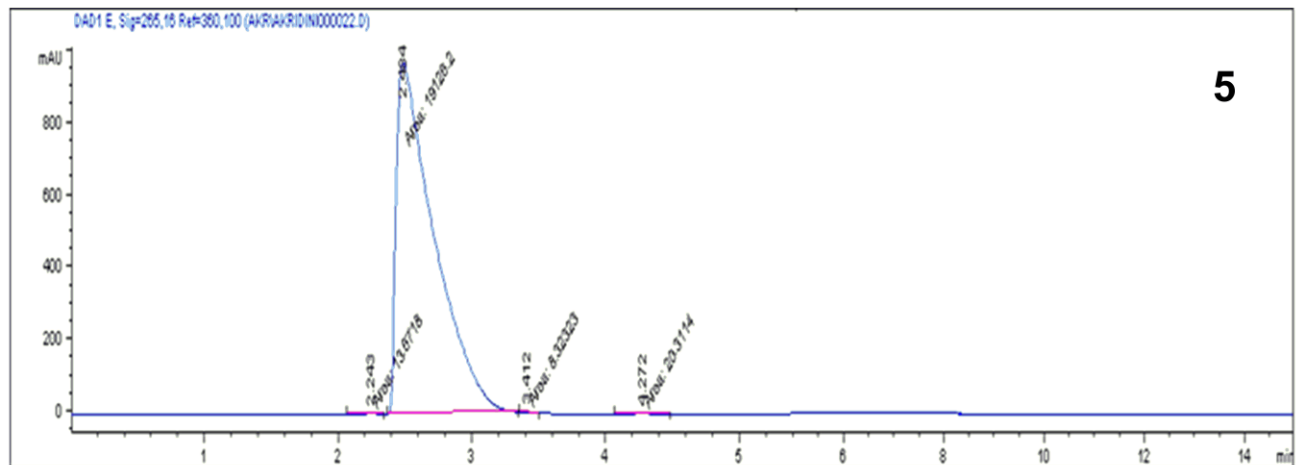
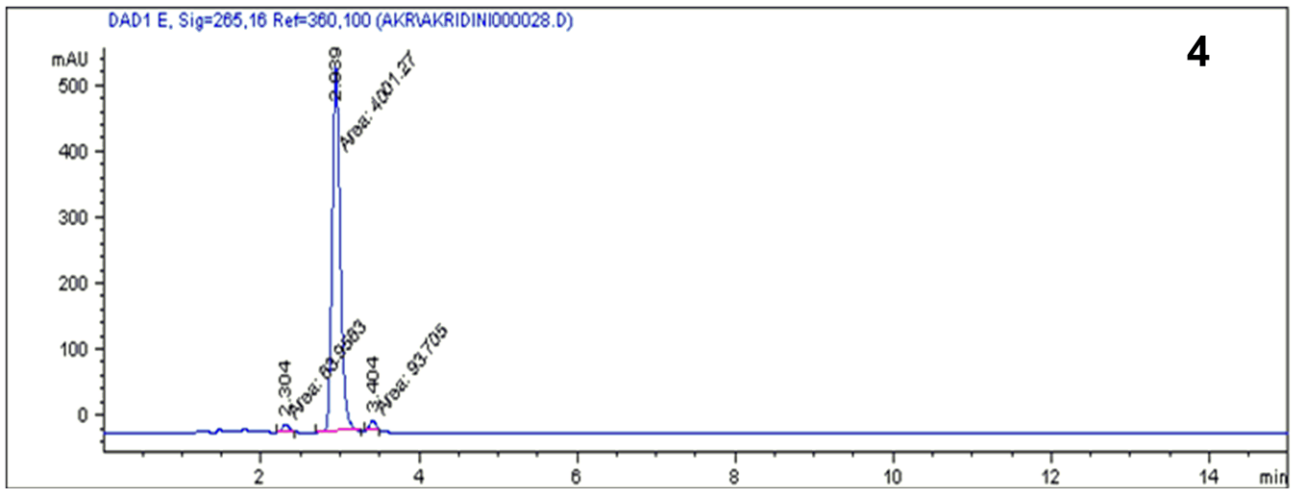
Слика 44. Једињење 11, ^{13}C NMR [40]

4.2.1. HPLC анализа аминокиселинских деривата акридина

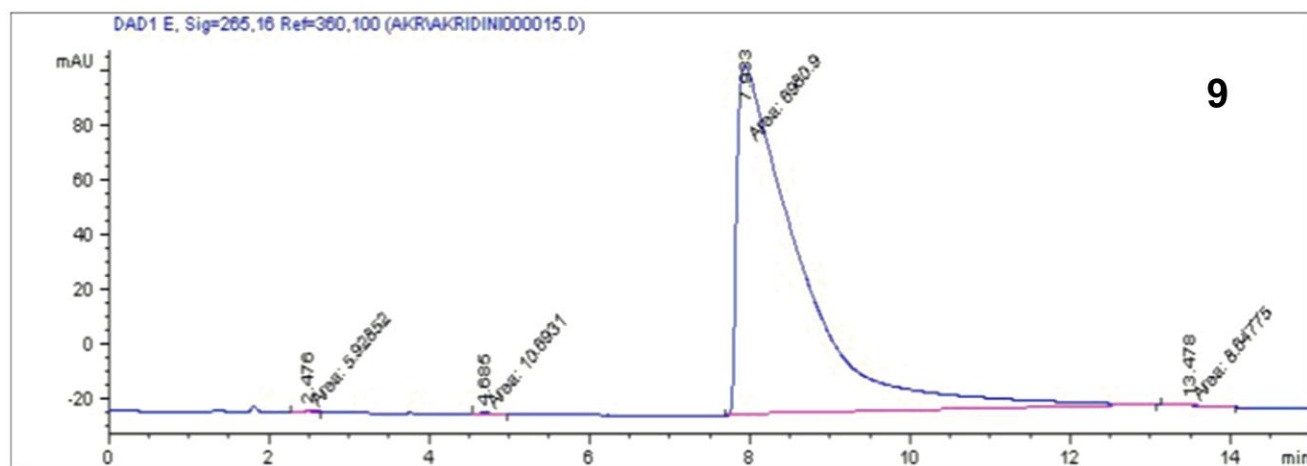
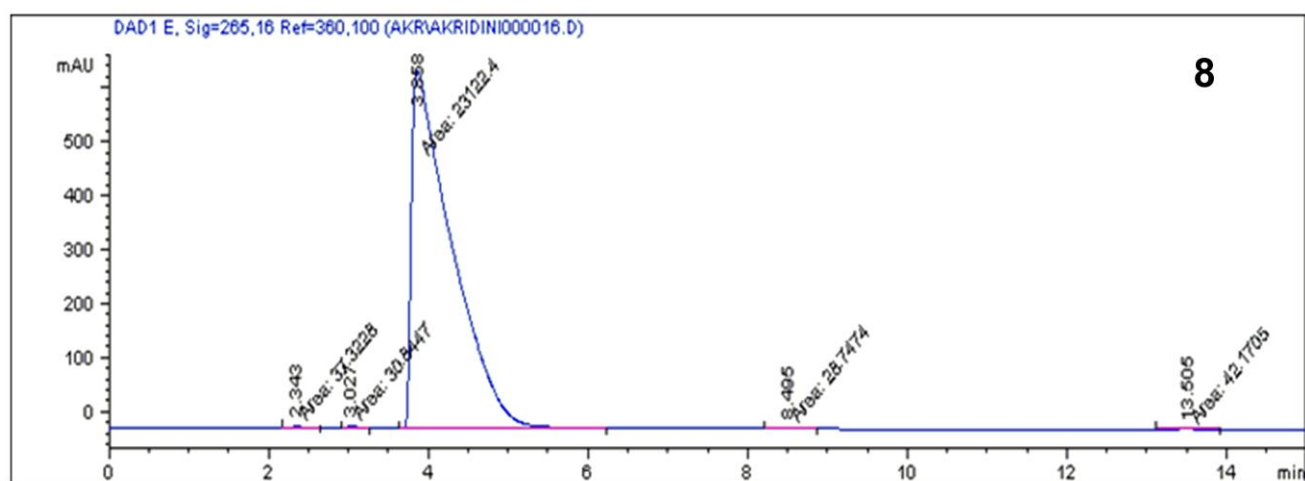
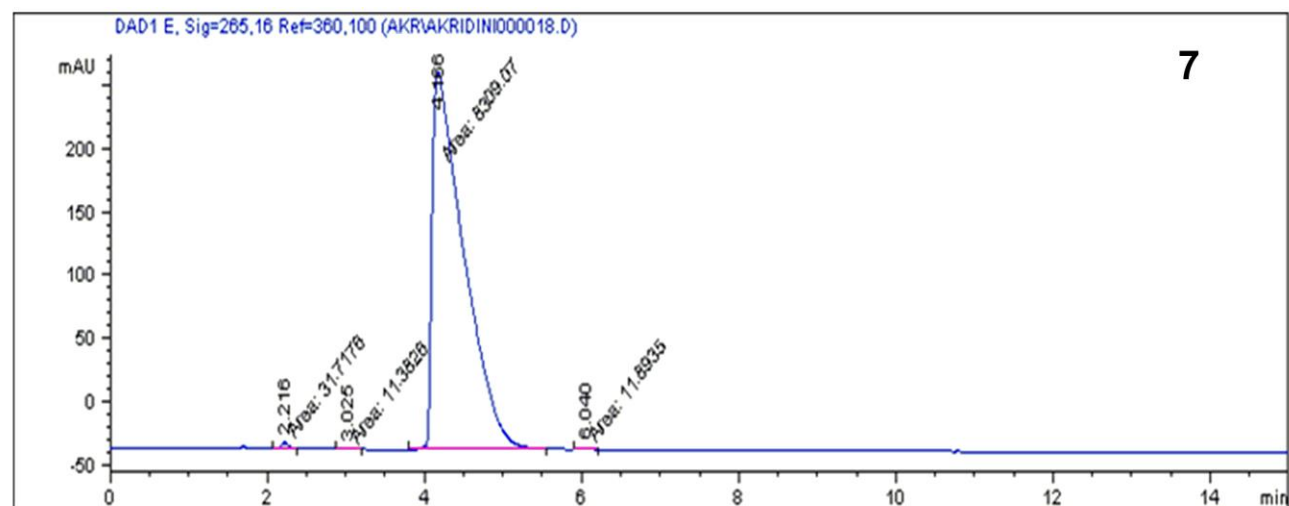
За испитивање чистоће синтетисаних једињења коришћена је HPLC метода према условима описаним у делу 3.3.3. Хроматограми узорака приказани су на **Сликама 45-48** за једињења 1-11 [40]. Чистоћа синтетисаних једињења приказана је у **Табели 2**.



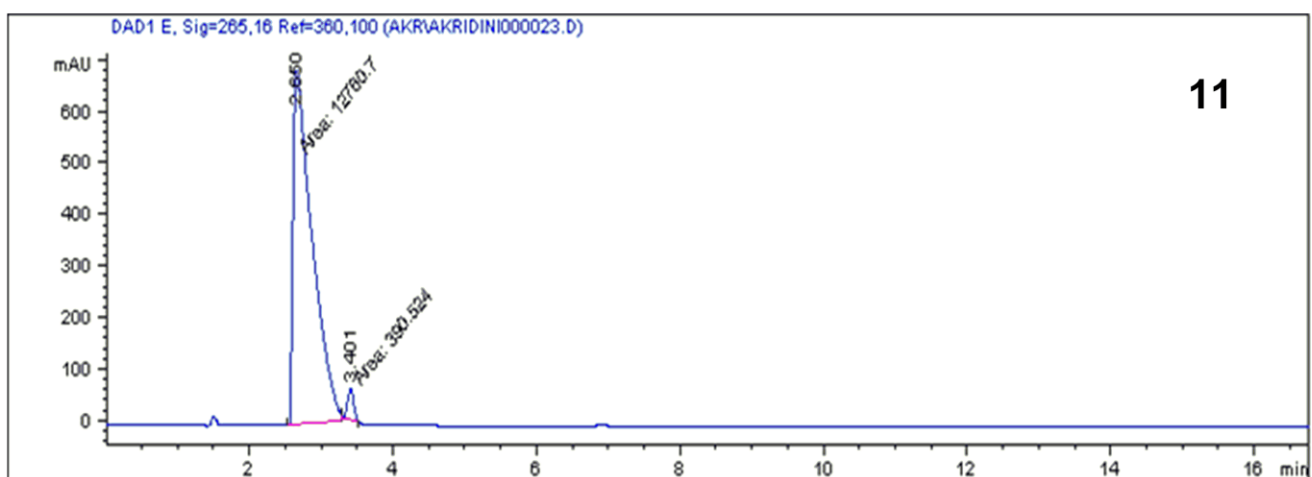
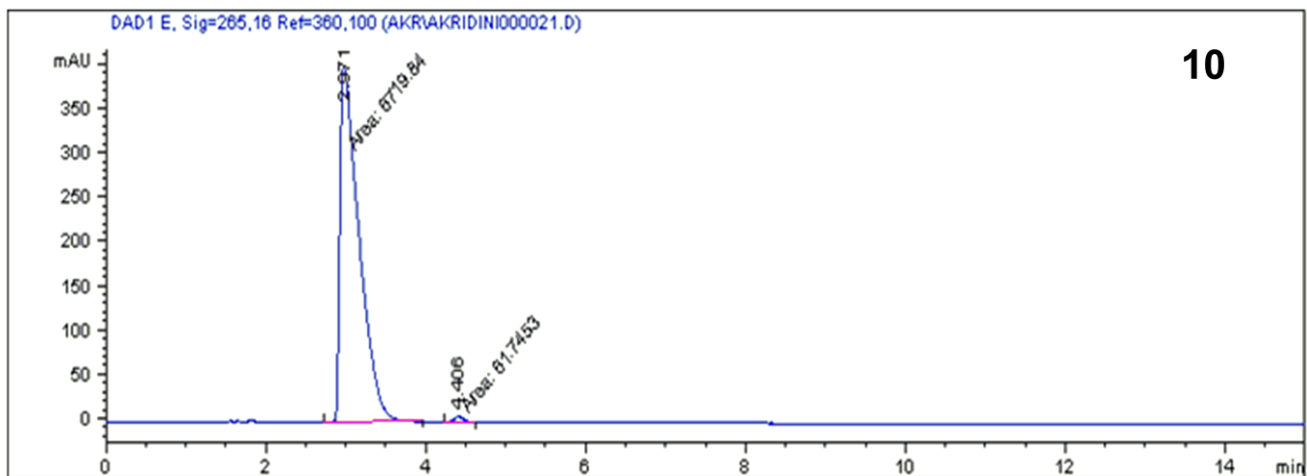
Слика 45. HPLC хроматограми – једињења 1, 2 и 3 (265 nm) [40]



Слика 46. HPLC хроматограми – једињења 4, 5 и 6 (265 nm) [40]



Слика 47. HPLC хроматограми – једињења 7, 8 и 9 (265 nm) [40]



Слика 48. HPLC хроматограми – једињења 10 и 11 (265 nm) [40]

Табела 2. Чистоћа синтетисаних аминокиселинских деривата акридина

Једињење	Чистоћа (%)
1	98,5
2	97,0
3	99,0
4	96,2
5	99,8
6	97,3
7	99,2
8	99,4
9	99,5
10	99,1
11	97,0

4.2.2. *In silico* евалуација фармакокинетичких својстава и *druglikeness* процена

SwissADME веб-сајт [168] примењен је са циљем испитивања фармакокинетичких карактеристика (апсорпција, дистрибуција, метаболизам и елиминација, АДМЕ) и *druglikeness* процену (Табела 3). За једињења 6, 7, 8, 9 и амсакрин испитана су фармакокинетичка својства као што су: гастроинтестинална апсорпција, пермеабилност кроз крвно-моздану баријеру, пермеабилност кроз кожу (коефицијент пермеабилности, LogKp), подложност транспорту П-гликопротеином (*P-gp*) и потенцијал инхибиције ензима CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4. *Druglikeness* је процењен применом следећих правила: Липински (*Lipinski's*) [169], Гозова (*Ghose's*) [170], Веберова (*Veber's*) [171], Еганова (*Egan's*) [172] и Муегеова (*Muegge's*) [173]. Скор биорасположивости такође је коришћен како би био процењен *druglikeness* [174].

За сва једињења показано је да имају високу гастроинтестиналну апсорпцију. За разлику од амсакрина, синтетисана једињења 6, 7, 8, 9 према испитивању фармакокинетичких карактеристика могу проћи крвно-моздану баријеру, нису супстрати за П-гликопротеин, што их чини добрим кандидатима за терапију метастаза на мозгу [175].

Једињења 6, 7, 8 и 9 задовољавају наведена правила, па се може очекивати њихова потенцијална биолошка активност [40].

Табела 3. *In silico* евалуација фармакокинетичких својстава и *druglikeness* процена амсакрина и једињења 6, 7, 8 и 9 [40]

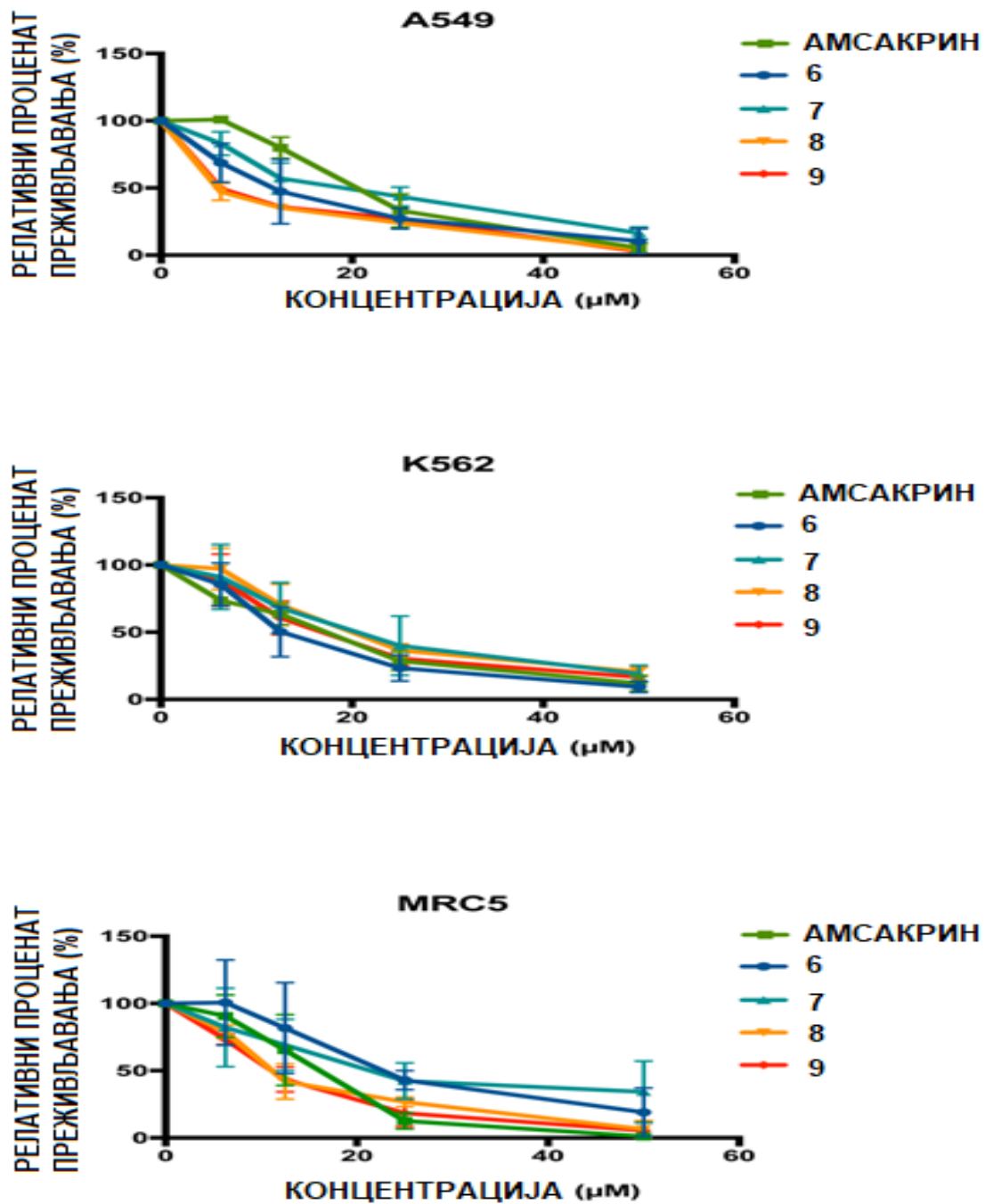
Фармакокинетичка својства и <i>druglikeness</i>	једињење				
	6	7	8	9	амсакрин
Гастроинтестинална апсорпција	висока	висока	висока	висока	висока
Пролазак кроз крвно-мождану баријеру	да	да	да	да	не
LogKp (пермеабилност кроз кожу, cm/s)	-5,30	-5,01	-5,15	-4,79	-5,85
Супстрат за П-гликопротеин	не	не	не	не	не
СУР1А2 инхибитор	да	да	да	да	да
СУР2С19 инхибитор	да	да	да	да	да
СУР2С9 инхибитор	да	да	да	да	да
СУР2D6 инхибитор	да	да	да	да	да
СУР3А4 инхибитор	да	да	да	да	да
Липински правила	да	да	да	да	да
Гозова правила	да	да	да	да	да
Веберова правила	да	да	да	да	да
Еганова правила	да	да	да	да	да
Муегеова правила	да	да	да	да	да
Скор биорасположивости	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55

4.3. *In vitro* антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина

In vitro антиканцерска активност АДА испитивана је применом МТТ теста [150]. Утицај АДА на преживљавање ћелија хумане малигне ћелијске линије K562 (хронична мијелоидна леукемија) и A549 (карцином епителних ћелија плућа/ћелијске линије аденокарцинома плућа) и на нормалне ћелије диплоидне ћелијске линије MRC5 (фетални плућни фибробласти) упоређен је са утицајем амсакрина – анилиноакридина са познатом антилеукемијском активношћу [33]. Ћелије су третиране микромоларним количинама АДА и након 72 h испитивано је преживљавање, тј. одређена је IC₅₀ вредност [150]. IC₅₀ вредност (**Табела 4**) је дефинисана као концентрација агенса која доводи до смањења редукције МТТ-а за 50% у поређењу са ћелијама које су третиране диметил сулфоксидом (DMSO), тј. као концентрација агенса која за 50% инхибира ћелијску вијабилност у односу на ћелије које су третиране DMSO раствором (контрола). Једињења 6, 7, 8 и 9 су најпотентнији инхибитори у МТТ тесту тј. најактивнији АДА са IC₅₀ вредностима испод 20 μM, што је упоредиво или ниже у односу на амсакрин. Једињења 8 и 9 била су посебно ефикасна на ћелије A549 (IC₅₀ ≈ 6μM) (**Слика 49**). Ово је од посебне важности, с обзиром да се амсакрин не може користити у терапији канцера плућа услед неодговарајуће антитуморске активности [176].

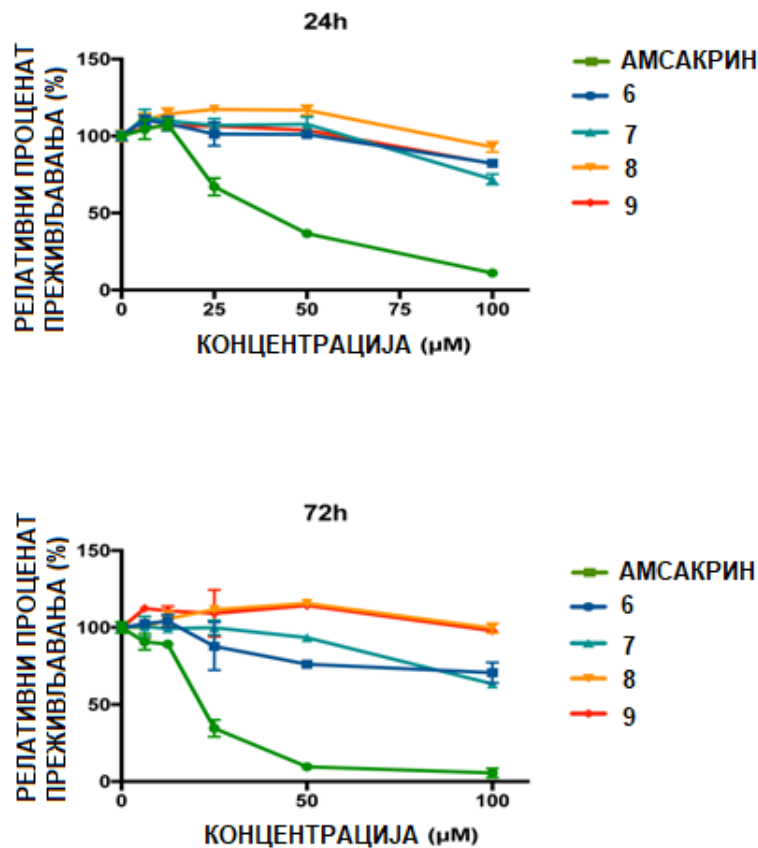
Табела 4. IC₅₀ вредности за амсакрин и једињења 1-11 [40]

	K562	A549	MRC5
Једињење	IC ₅₀ (μM)		
амсакрин	13,8 ± 8,0	22,2 ± 2,8	15,4 ± 2,6
1	40,6 ± 2,1	25,7 ± 4,9	47,6 ± 4,4
2	46,1 ± 2,0	34,3 ± 9,2	65,1 ± 11,2
3	46,6 ± 3,7	29,5 ± 1,6	56,1 ± 9,6
4	42,4 ± 1,4	34,1 ± 1,0	46,95 ± 14,3
5	62,9 ± 11,8	62,6 ± 1,1	49,8 ± 6,5
6	11,2 ± 0,4	9,5 ± 0,9	15,8 ± 3,2
7	21,8 ± 5,4	19,3 ± 4,0	16,9 ± 1,7
8	19,2 ± 2,4	6,15 ± 0,6	12,1 ± 1,6
9	16,4 ± 2,5	6,3 ± 0,2	11,6 ± 1,3
10	34,5 ± 4,8	36,3 ± 2,0	25,1 ± 3,2
11	75,0 ± 8,0	72,4 ± 1,8	58,8 ± 9,1



Слика 49. Смањење вијабилности ћелија A549, K562 и MRC5 након примене амсакрина, једињења 6, 7, 8 и 9 у току 72 h [40]

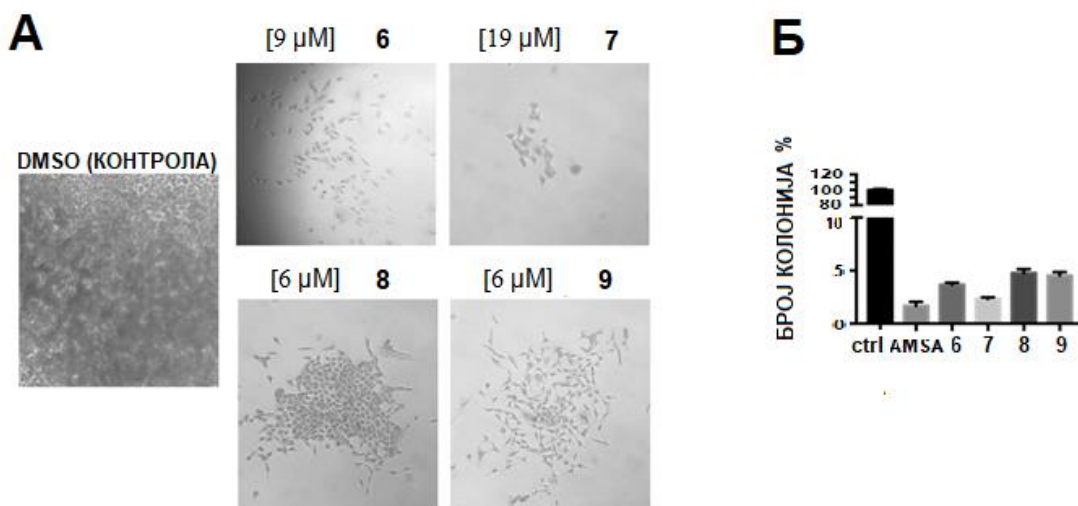
Анализа активности на MRC5, показала је да су АДА токсични и према овој ћелијској линији, али при нешто већим IC_{50} . Како примена лекова подразумева разматрање односа користи и ризика, а многи лекови се користе упркос токсичним ефектима (нпр. амсакрин који иако ефикасан против неких типова тумора, смањује број белих крвних зрнаца) [176, 177], токсичност најактивнијих АДА испитивана је на нестимулисаним хуманим леукоцитима. Леуцити припремљени из хумане крви третирани су растућим концентрацијама најактивнијих АДА, а резултати су поређени са амсакрином. Анализа активности извршена је применом МТТ теста, након 24 h и 72 h инкубације (Слика 50) [40].



Слика 50. Смањење вијабилности хуманих леукоцита након примене амсакрина и једињења 6, 7, 8 и 9 у току 24 и 72 h [40]

Како се нестимулисани леуцити не деле у ћелијској култури, смањење вијабилности у овом МТТ тесту је одраз цитотоксичности једињења. Док је амсакрин показао дозно- и временско-зависну токсичност, најактивнији АДА нису показали токсичност на испитиваним леукоцитима. Посебно, једињења 8 и 9 са повећањем концентрације нису довела до смањења процента преживљавања ћелија. Узевши у обзир IC_{50} вредности за ова два једињења, које су за ћелијску линију A549 биле најниже у односу на остале АДА и амсакрин, може се претпоставити да би ова једињења била најбољи кандидати за развој антитуморских лекова.

Цитотоксичност за најпотентнија једињења 6, 7, 8 и 9 такође је потврђена клонотестом на ћелијској линији A549. Једињења примењена у концентрацији IC_{50} (која је одређена МТТ тестом) довела су до смањења раста колонија више од 95% у поређењу са ћелијама које су третиране диметилсулфоксидом (контрола) (Слика51) [40].



Слика 51. Резултати клоногеног есеја 10 дана након излагања А549 ћелија једињењима 6, 7, 8 и 9 (А) и квантификација раста колонија из два независна експеримента (Б) [40]

Показано је да су једињења 6-10 са линеарним алифатичним бочним ланцима показала добру активност, док су једињења 5 и 11 показала слабу активност, што може довести до закључка да превише дуг бочни низ утиче неповољно на фармакокинетичка својства и, последично, неповољно утиче на антипролиферативну активност. Ови подаци у складу су и са подацима које су приказали аутори *Lyakhov* и сарадници [44] за структурно слична једињења.

4.3.1. Анализа фаза ћелијског циклуса

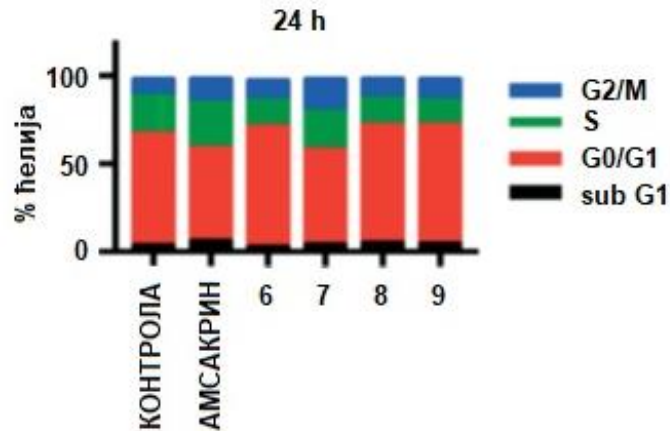
МТТ тестом утврђено је да су једињења 6, 7, 8 и 9 најактивнији аминокиселински деривати акридина, на ћелијским линијама А549 и К562. Како би детаљније био испитан механизам дејства ових једињења, један од изведених тестова био је и испитивање утицаја најактивнијих АДА на одвијање ћелијског циклуса. Контролне тачке у ћелијском циклусу представљају механизме који служе за проверу припрема ћелије за деобу [178]. Постоје у G1 фази да би се обавила контрола квалитета пре уласка у S фазу (G1/S) и у касној G2 фази (G2/M) пре отпочињање митозе. Ови механизми, уколико дође до оштећења ДНК, могу да зауставе ћелијски циклус како би дошло до поправке ДНК [179]. Утицај најактивнијих АДА на фазе ћелијског циклуса испитан је на ћелијској линији А549, с обзиром да је ова ћелијска линија била осетљивија на најактивније АДА у односу на амсакрин.

Анализа фаза ћелијског циклуса извршена је применом проточне цитометрије, коришћењем флуоресцентне боје пропиридијум-јодида у три независна експеримента. Како је садржај ДНК различит у различитим фазама ћелијског циклуса, а пропиридијум-јодид се квантитативно везује за ДНК и након озрачивања светлошћу одређене енергије флуоресцира, праћењем интензитета флуоресценције било је могуће одредити садржај ДНК [180]. Ћелије ћелијске линије А549 изложене су најактивнијим АДА (IC_{50} вредности добијене МТТ тестом) и амсакрину у току 24 h и 48 h. Након инкубације, садржај ДНК одређен је проточном цитометријом, приказан као хистограм фреквенције и одређен је проценат ћелија у главним фазама ћелијског циклуса (Слике 52 и 53) [180, 181]. Као што је и показано раније у литератури [182], амсакрин је довео до застоја у S фази (након 24 h, Слика 52) и последичне апоптозе, што

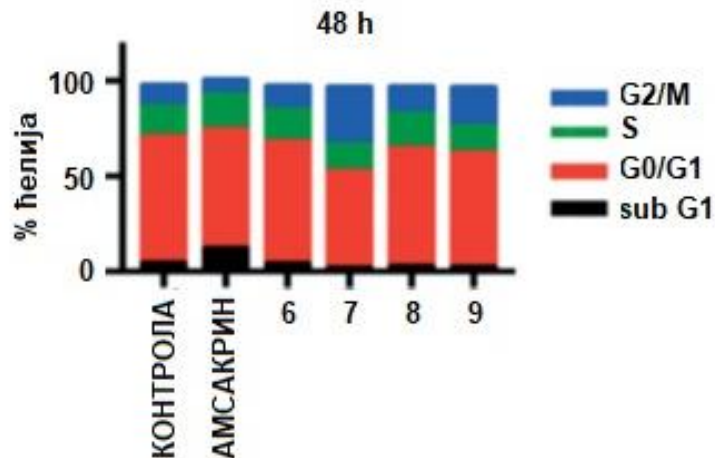
је детектовано као пораст у суб G1 фази након 48 h (касне апоптотичке ћелије са фрагментираном ДНК (Слика 53) [183].

За једињења 6 и 8 није уочен значајан утицај на ћелијски циклус, након 24 h и 48 h.

За једињење 7 се на хистограму може уочити да је већи проценат ћелија акумулираних у G2/M фази (плава боја на Сликама 52 и 53) у односу на контролу. Без третмана (контрола) 9% ћелија било је у G2/M фази након 24 h, а 11% након 48 h. Након излагања ћелија једињењу 7, 18% ћелија било је у G2/M фази након 24 h, а 29% након 48 h. Иако мање изражен, сличан тренд уочен је и приликом излагања ћелија једињењу 9: 12% ћелија било је у G2/M фази након 24 h, а 19% након 48 h [40].



Слика 52. Анализа фаза ћелијског циклуса ћелија ћелијске линије А549 које су третиране амсакрином и једињењима 6, 7, 8 и 9 у току 24 h [40]



Слика 53. Анализа фаза ћелијског циклуса ћелија ћелијске линије А549 које су третиране амсакрином и једињењима 6, 7, 8 и 9 у току 48 h [40]

На основу овог теста може се закључити да једињења 7 и 9 доводе до смањења ћелијског преживљавања вероватно услед изазивања застоја ћелијског циклуса у G2/M фази. Добијени резултати у складу су са подацима доступним у литератури, где се наводи да је G2/M заустављање уочено за акридине или друге класе једињења која делују или као отрови топоизомеразе или инхибитори топоизомеразе који могу обухватити и друге циљне молекуле и механизме [40, 184-189].

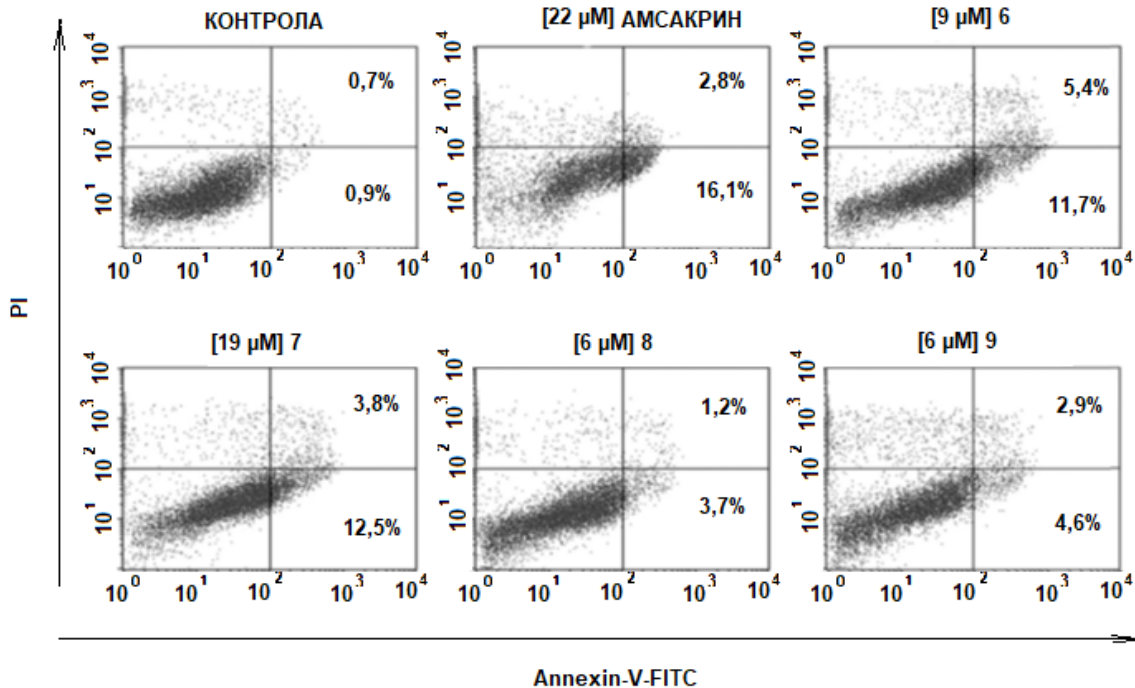
4.3.2. Анализа ћелијске смрти

Утицај најактивнијих АДА на тип ћелијске смрти испитан је применом проточне цитометрије (Слика 54, репрезентативни графици). Annexin V-FITC/пропидијум-јодид сет коришћен је за бојење ћелија А549 ћелијске линије, које су биле изложене најактивнијим АДА у току 24 h и 48 h. Концентрација најактивнијих АДА који су коришћени у овом тесту била је претходно одређена МТТ тестом, као IC_{50} вредност.

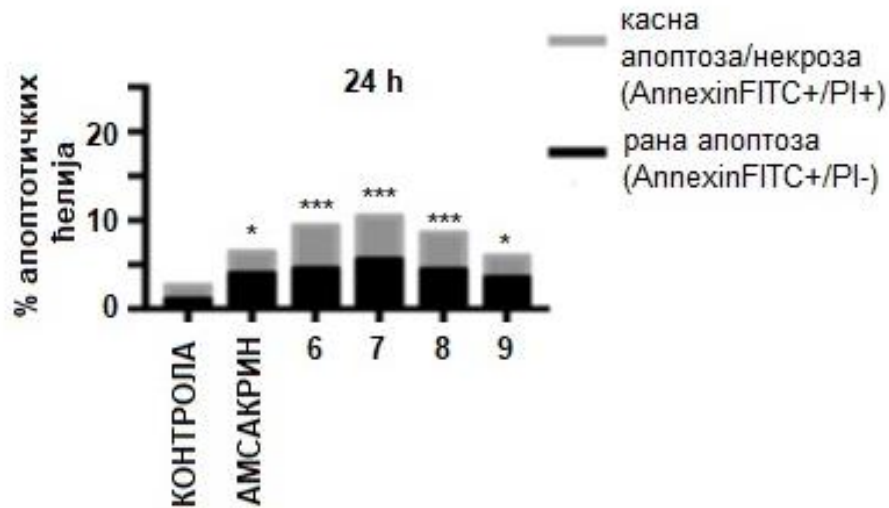
Како је апоптоза процес који је у односу на некрозу пожељан, јер не доводи до инфламаторне реакције, овим тестом могуће је проценити која једињења би могла представљати добре кандидате за антитуморске лекове, а то су једињења код којих је процес апоптозе вероватнији као узрок ћелијске смрти.

У поређењу са амсакрином, проценат ћелија код којих је дошло до апоптозе (*one-way ANOVA*) значајно је већи након излагања ћелија најактивнијим АДА, при чему је ефекат једињења 6 и 7 упоредив са амсакрином (Слика 55). Како је у тесту анализе фаза ћелијског циклуса за једињење 6 показано да не утиче на фазе ћелијског циклуса ни након 24 h (Слика 55) ни након 48 h (Слика 56), може се закључити да је најважнији узрок смањења преживљавања ћелија за ово једињење индукција апоптозе.

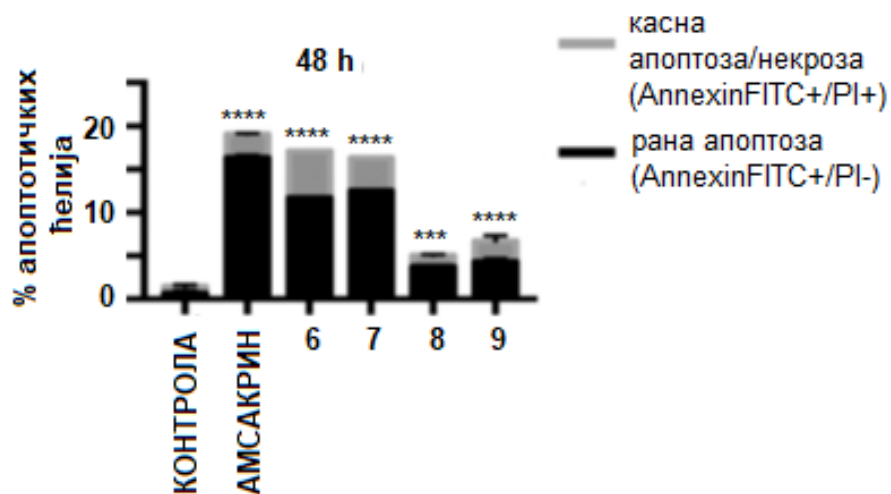
Једињења 8 и 9 такође индукују апоптозу, али у мањој мери у односу на остала једињења. Узимајући у обзир концентрације једињења, које су у односу на амсакрин скоро четири пута мање (амсакрин – 22 μ M, једињење 8 – 6 μ M, једињење 9 – 6 μ M), као и претходне резултате где је приказано да ова једињења имају најбољи профил токсичности, резултати добијени применом овог теста за једињења 8 и 9 такође су од значаја за даља испитивања и потенцијалну употребу и ових једињења као антитуморских лекова [40].



Слика 54. Анализа ћелијске смрти ћелија А549 третираних амсакрином и једињењима 6, 7, 8 и 9, репрезентативни графици након 48 h од излагања ћелија једињењима [40]



Слика 55. Анализа ћелијске смрти ћелија A549 третираних амсакрином и једињењима 6, 7, 8 и 9 након 24 h. Квантификација из три независна експеримента: *one-way ANOVA* са *Dunnnett's multiple comparison* тестом [40]

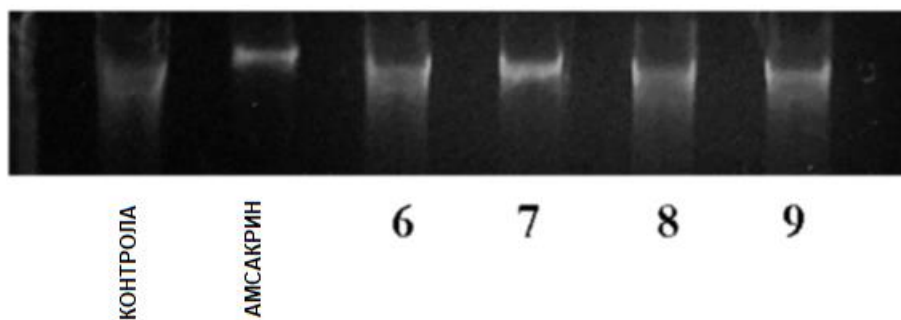


Слика 56. Анализа ћелијске смрти ћелија A549 третираних амсакрином и једињењима 6, 7, 8 и 9 након 48 h. Квантификација из три независна експеримента: *one-way ANOVA* са *Dunnnett's multiple comparison* тестом [40]

4.4. Тест електрофоретске покретљивости

Тест електрофоретске покретљивости коришћен је са циљем испитивања потенцијала најактивнијих АДА и амсакрин да директно ступе у интеракцију са дволанчаном ДНК (Слика 57). У овом тесту испитивана је целокупна геномска ДНК изоллована из А549 ћелија. Пре електрофоретског раздвајања је омогућено да ДНК у току 1 h реагује са 100 μ M најактивнијих АДА и амсакрин. Након електрофоретског раздвајања на 0,8% агароза гелу, уочено је да сва испитивана једињења доводе до промене у покретљивости ДНК, а да амсакрин и једињење 7 доводе до највеће промене покретљивости. Ови резултати указују да сва једињења интерагују са ДНК, при чему се под датим експерименталним условима, за једињење 7 и амсакрин може претпоставити да је тип интеракције са ДНК интеркалација.

Како је очекивано да сва једињења показују интеркалацију између база ДНК, тип интеракције најактивнијих АДА са ДНК испитан је касније и применом електрохемијских ДНК биосензора који представљају осетљивију методу, узимајући у обзир ове резултате као прелиминарне [40].



Слика 57. Тест електрофоретске покретљивости - интеракција амсакрин и најактивнијих АДА са ДНК [40]

4.5. Испитивање инхибиторне активности најактивнијих аминокиселинских деривата акридина на хуману ДНК-топоизомеразу $\Pi\alpha$

Испитивање инхибиторне активности на хуману ДНК-топоизомеразу $\Pi\alpha$ извршено је применом теста у коме се проценат релаксације дволанчане ДНК плазида прати флуориметријски, након бојења реакционе смеше (која се састојала из плазида, ензима и инхибитора) флуоресцентном бојом која интерагује са дволанчаном ДНК. Праћењем флуоресценције, чији је интензитет мањи што је већи проценат релаксације ДНК, одређене су IC_{50} вредности за амсакрин и најактивније АДА.

Резултати испитивања инхибиторне активности једињења 6, 7, 8, 9 и амсакрина приказани су у Табели 5. IC_{50} вредности за једињења 6, 7, 8 и 9 које износе 14, 16, 13 и 14 μM , редом, блиске су IC_{50} вредности за амсакрин (16 μM), па се може закључити да наведена једињења показују сличну инхибиторну активност на хуману ДНК топоизомеразу $\Pi\alpha$ у поређењу са амсакрином. Аутори *Chourpa* и *Manfait* су објавили студију која је разјаснила природу интеракције инхибитора топоизомеразе (амсакрина) са ДНК [189] у којој се наводи да се формира терцијарни комплекс амсакрин-ДНК-топоизомеразе Π , али и да сам амсакрин може реаговати само са топоизомеразом Π . У складу са овим резултатима, може се закључити да најактивнији АДА своје дејство могу испољити и као инхибитори хумане ДНК-топоизомеразе $\Pi\alpha$ [40].

Табела 5. IC_{50} вредности за амсакрин и једињења 6, 7, 8 и 9 [40]

Једињење	Амсакрин	6	7	8	9
IC_{50} (μM)	16 ± 8	14 ± 5	16 ± 7	13 ± 9	14 ± 5

4.6. Електрохемијско испитивање 9-хлороакридина и најактивнијих аминокиселинских деривата акридина

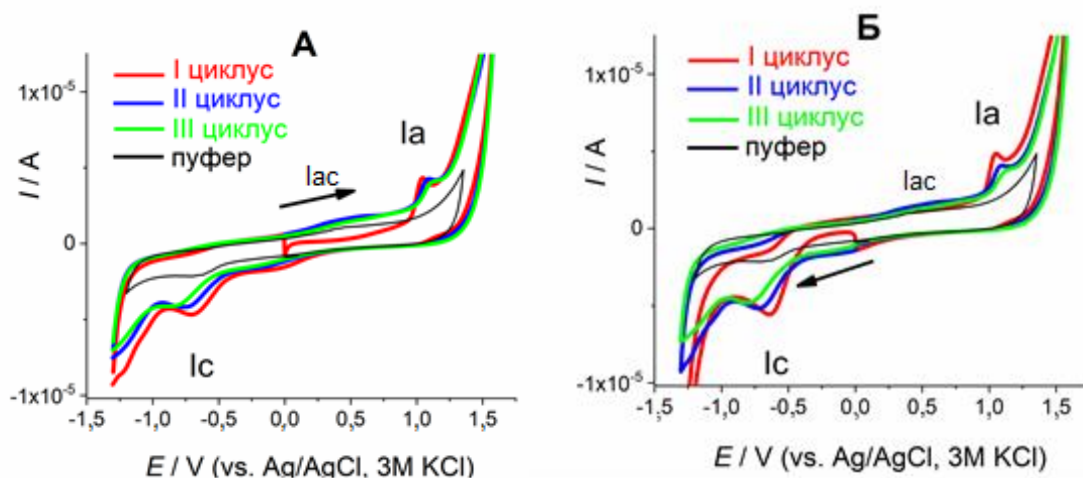
Електрохемијско испитивање 9Cl-A као полазног једињења коришћеног за синтезу аминокиселинских деривата акридина [93, 133] и најактивнијих АДА – једињења 6, 7, 8 и 9 [137] извршено је применом три технике: CV, DPV и SWV, а као радна електрода коришћена је GCE.

4.6.1. Испитивање електрохемијског понашања 9-хлороакридина применом цикличне волтаметрије

Раствор 9Cl-A, претходно изложен азоту у току 10 минута, концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M испитиван је у пуферима чија је рН вредност била од 2,0 до 9,0.

На **Слици 58** приказана су три узастопна циклуса добијена приликом снимања цикловолтамограма 9Cl-A у ацетатном пуферу, рН 3,5, као и циклични волтамограм ацетатног пуфера (рН 3,5, I 0,10 M) који је сниман под истим експерименталним условима (брзина промене потенцијала 50 mV s^{-1}). Потенцијал је мењан од 0,0 V (*vs.* Ag/AgCl, 3 M KCl) до +1,6 V и назад до -1,3 V (**Слика 58А**) као и од 0,0 V до -1,3 V и назад до +1,6 V (**Слика 58Б**)[93].

Један анодни пик (I_a) на потенцијалу $E_{p,Ia} = 1,06$ V уочен је приликом снимања од 0,0 V ка позитивнијем потенцијалу, док је након промене смера потенцијала, ка негативним вредностима, уочен катодни пик (I_c) на потенцијалу $E_{p,Ic} = -0,68$ V. Ова два пика била су присутна у сва три циклуса, независно од смера промене потенцијала. Трећи, мали анодни пик (I_{ac}), на потенцијалу око +0,5 V (*vs.* Ag/AgCl, 3 M KCl) уочен је приликом снимања другог и трећег циклуса. Осим под наведеним условима, потенцијал је мењан, тј. циклизиран, у три уже области потенцијала и то: од -1,3 V до 0 V, од 0,0 V до +1,6 V, као и од +0,5 V до +1,6 V, а разлике у волтамограмима нису уочене. Пуфер (**Слика 58**, (—)) није показивао пикове у испитиваној области потенцијала који би утицали на анализу електрохемијског понашања 9Cl-A.

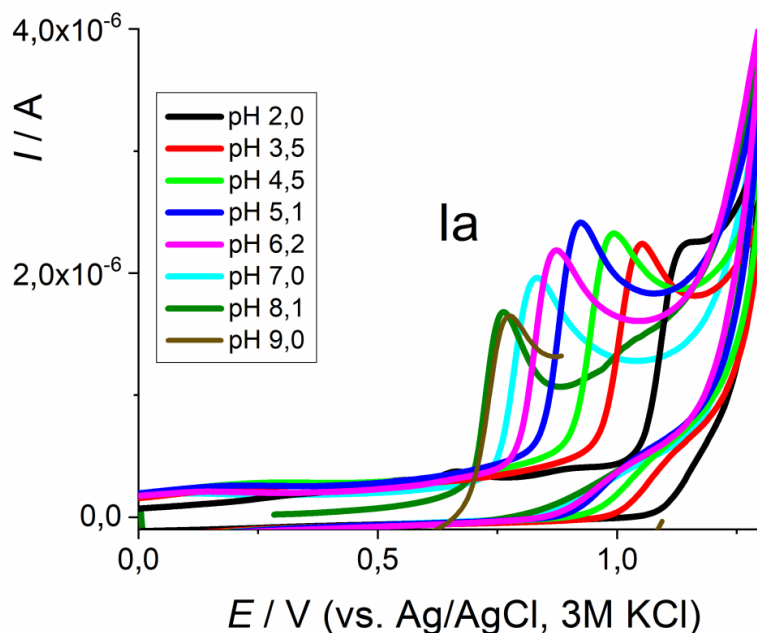


Слика 58. Циклични волтамограми $2,5 \times 10^{-4}$ M 9Cl-A у 0,10 M ацетатном пуферу, рН 3,5, снимљено при опсегу потенцијала од -1,3 V до +1,6 V, почевши од 0,0V: А) ка позитивним потенцијалима, Б) ка негативним потенцијалима; први (—), други (—) и (—) трећи циклус и (—) ацетатни пуфер; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ [93]

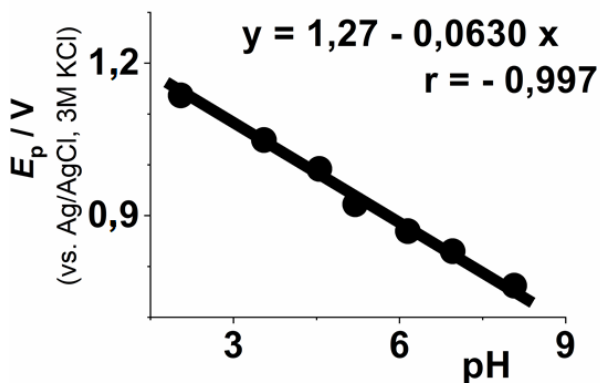
Анализом положаја и присуства пикова Ia, Ic и Iac у три узастопна циклуса снимања 9Cl-A, може се закључити да 9Cl-A подлеже независним процесима оксидације (пик Ia) и редукције (пик Ic), а да се производ редукције вероватно може оксидовати. Као резултат оксидације производа редукције, може се уочити мали пик при потенцијалу од +0,5 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl), означен као пик Iac.

Анализом цикловолтамограма, уочено је да приликом промене потенцијала од 0 V ка позитивним вредностима постоји један оксидациони пик Ia, док приликом промене потенцијала ка негативним вредностима одговарајући редукциони пик изостаје. На основу наведеног може се закључити да оксидација 9Cl-A представља иреверзибилан процес.

Утицај рН вредности на процес оксидације, тј. оксидациони пик Ia (Слика 59) такође је испитан применом CV у опсегу рН вредности од 2,0 до 9,0.



Слика 59. Циклични волтамограми $2,5 \times 10^{-4}$ M 9Cl-A, први циклус, утицај рН вредности на процес оксидације [93]



Слика 60. Зависност E_p од рН за пик који описује оксидацију (Ia); $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ [93]

Анализом промене потенцијала пика Ia са променом рН вредности основног електролита, уочено је да се са порастом рН вредности, потенцијал пика помера ка мање позитивним потенцијалима (Слика 60). Овакво понашање указује на олакшан процес оксидације у средини са вишом рН вредношћу (где је већа нуклеофилност раствора).

Зависност приказана на Слици 60 искоришћена је како би се утврдио однос броја електрона и протона који учествују у процесу оксидације. Једначина која описује зависност потенцијала пика од рН вредности је:

$$E_{p, Ia} \text{ (V)} = 1,27 \text{ (V)} - 0,063 \text{ рН (r} = -0,997\text{)}. \quad (32)$$

На основу једначине (15) из поглавља 1.5.3. нагиб од 63 mV по рН јединици сугерише да процес оксидације 9Cl-A укључује исти број електрона и протона [96, 97, 190].

Једначина $|E_p - E_{p1/2}| = 48 / (\alpha n_\alpha)$ [138, 191] где је α коефицијент преноса наелектрисања, n_α број електрона који се пренесу у одлучујућем ступњу (кораку који одређује брзину реакције), искоришћена је како би био одређен број електрона који се пренесу у одлучујућем ступњу реакције. Разлика између потенцијала и потенцијала на полувисини пика $|E_{p, Ia} - E_{p1/2, Ia}|$ је добијена експериментално и износи око 40 mV, тако да применом једначине, израчуната вредност за αn_α износи $\approx 1,2$. С обзиром да n_α представља број електрона који се пренесу у одлучујућем ступњу и има вредност целог броја, а за иреверзибилан процес α има вредност која је најчешће у опсегу од 0,3 до 0,7, може се закључити да у одлучујућем ступњу оксидације 9Cl-A учествују 2 електрона. На основу вредности нагиба једначине (32), може се закључити да се у процесу размењују и 2 протона.

Анализа интензитета струје пика Ia ($I_{p, Ia}$) са променом рН, при чему $I_{p, Ia}$ прво расте а затим при вредностима рН изнад 5 опада, указује на то да се процес електрооксидације одвија кроз два ступња, тако што прво долази до преноса електрона, што је праћено хемијском реакцијом, а затим долази до другог ступња и сукцесивног преноса још једног електрона.

При рН вредностима 4,5 и 7,0 испитан је утицај брзине промене потенцијала на потенцијал и струју пика Ia. Померање потенцијала пика ка позитивнијим вредностима са повећањем брзине снимања, потврђује претходну претпоставку засновану на анализи цикловолтамограма, да се процес оксидације одвија као иреверзибилан [96, 192].

При рН 4,5, као и при рН 7,0, интензитет струје пика 9Cl-A линеарно расте са квадратним кореном брзине промене потенцијала (Слика 61), што је представљено једначинама:

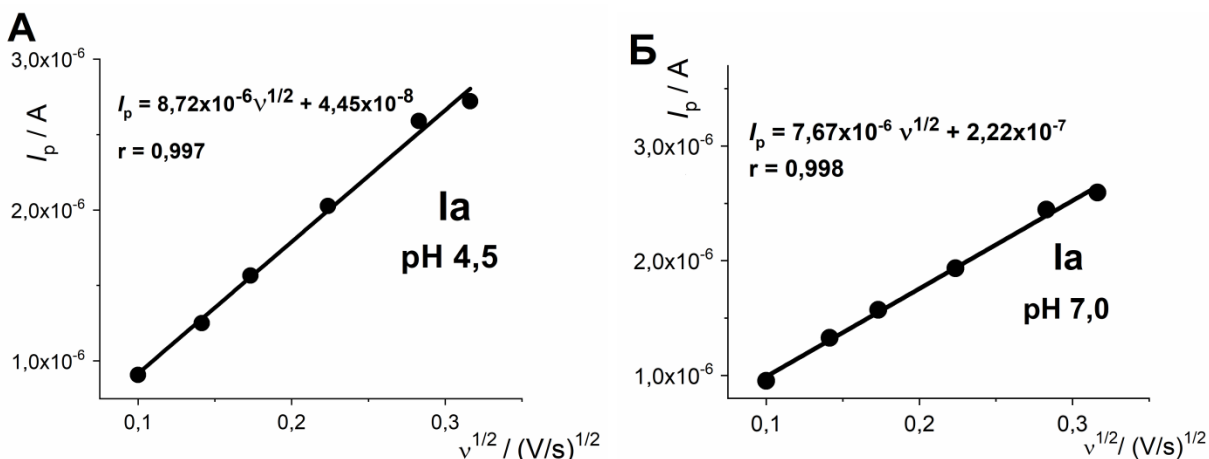
$$I_{p, Ia} \text{ (}\mu\text{A)} = 0,045 + 8,72 \text{ (}\mu\text{A}/(\text{Vs}^{-1})^{1/2})v^{1/2}; r = 0,997 \text{ за рН 4,5} \quad (33)$$

и

$$I_{p, Ia} \text{ (}\mu\text{A)} = 0,222 + 7,67 \text{ (}\mu\text{A}/(\text{Vs}^{-1})^{1/2})v^{1/2}; r = 0,998 \text{ за рН 7,0} \quad (34)$$

Овакви резултати указују да је процес оксидације дифузионо контролисан [113, 114, 166, 99, 96].

Анализом линеарне зависности $\log I_{p, Ia} = f(\log v)$, где су добијене вредности нагиба од 0,49 и 0,44 (за рН 4,5 и 7,0, редом) блиске теоријској вредности од 0,5 за дифузионо контролисан процес, потврђено је да је процес оксидације дифузионо контролисан.



Слика 61. Зависност интензитета струје пика од квадратног корена брзине промене потенцијала за $2,5 \times 10^{-4}$ М раствор 9Cl-A, пик Ia. А) pH 4,5; Б) pH 7,0 [93]

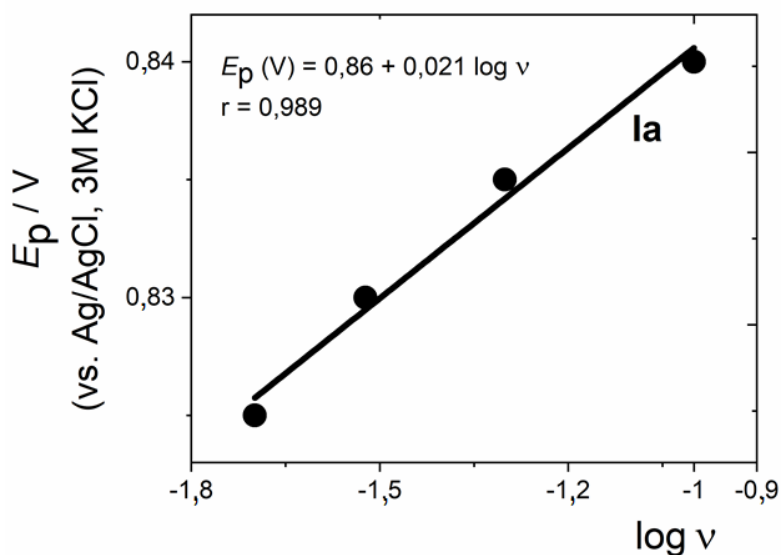
Иако је дифузија електроактивног материјала доминантно присутна, и адсорпција показује мали допринос, на шта указује вредност одсечка у једначинама које приказују зависност $I_{p,Ia} = f(v^{1/2})$. Како вредност интензитета струје оксидационог пика опада од првог до трећег циклуса (Слика 58), и ова појава може се приписати смањењу концентрације адсорбованог производа оксидације 9Cl-A на површини електроде.

Како се процес оксидације може описати као иреверзибилни, дифузионо контролисани, за одређивање коефицијента дифузије може се користити једначина (12). Наведена једначина приказује промену интензитета струје за дифузионо контролисани, иреверзибилни процес са променом квадратног корена брзине промене потенцијала, на температури $25,0$ °C уз коришћење радне електроде одређене електроактивне површине.

За одређивање електроактивне површине GCE радне електроде коришћена је електрохемијска реакција за Fe^{2+}/Fe^{3+} цијанидни редокс систем концентрације $0,1$ mM, чији је коефицијент дифузије, $D = 6,20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Применом *Randles-Sevcik* једначине (једначина 10) за реверзибилни, дифузионо контролисани процес на температури од $25,0$ °C, израчуната је вредност електрохемијски активне површине електроде, која износи $A = 0,052 \text{ cm}^2$ [142].

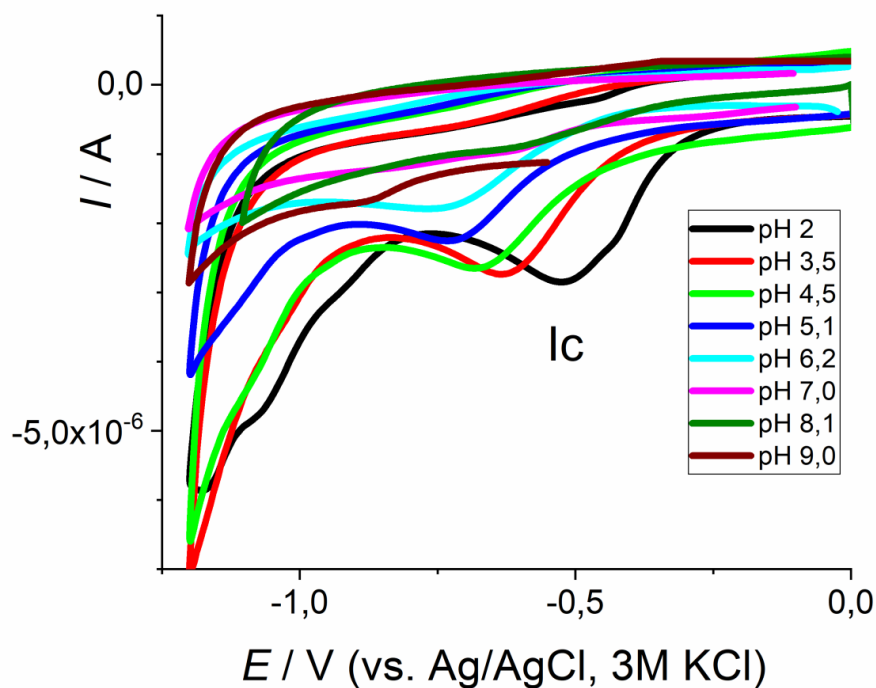
Вредност нагиба зависности $I_p = f(v^{1/2})$ (једначина 12), која износи $8,72 \mu\text{A}/(\text{V s}^{-1})^{1/2}$, при pH 4,5 искоришћена је како би био израчунат дифузиони коефицијент 9Cl-A који је у раствору био присутан у концентрацији $2,5 \times 10^{-4}$ М. Коришћењем претходно одређених вредности n и αn_α добијено је: $D_{9Cl-A} = 1,06 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. У неутралној средини, при pH 7,0 нагиб зависности $I_p = f(v^{1/2})$ има вредност $7,67 \mu\text{A}/(\text{V s}^{-1})^{1/2}$ и одговарајући коефицијент дифузије је: $D_{9Cl-A} = 8,18 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Утицај брзине промене потенцијала на положај пика Ia био је испитан како би било утврђено да ли, уз пренос електрона, постоји спрегнута хемијска реакција. Зависност $E_{p,Ia} = f(\log v)$ за процес оксидације представља линеарну зависност описану једначином: $E_{p,Ia} (\text{V}) = 0,021 (\text{V}) \log v + 0,86 (\text{V})$; $r = 0,989$ са нагибом од 21 mV (Слика 62), карактеристичним за интермедијерну хемијску реакцију као што је процес димеризације [101].



Слика 62. Зависност потенцијала пика Ia од $\log v$ за $2,5 \times 10^{-4}$ M раствор 9Cl-A [93]

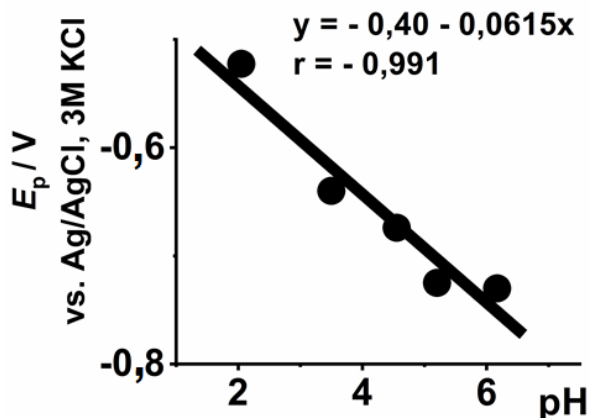
Редукција раствора 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M је испитивана применом CV у опсегу рН вредности од 2,0 до 9,0. Пик Ic био је присутан само у киселој средини и потенцијал овог пика се са порастом рН вредности померао ка негативнијим потенцијалима, уз смањење интензитета (Слика 63).



Слика 63. Циклични волтамограми раствора 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M, први циклус, утицај рН вредности на процес редукције, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ [93].

Зависност потенцијала пика I_c од рН вредности приказана је на **Слици 64** и може се описати следећом једначином:

$$E_{p,Ic} \text{ (V)} = -0,40 \text{ (V)} - 0,062 \text{ рН} \quad (35)$$



Слика 64. $E_p = f(\text{pH})$ за пик редукције 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ [93]

Израчунати нагиб зависности $E_{p,Ic} = f(\text{pH})$, од око -60 mV по рН јединици (**Слика 64**) одговара процесу редукције 9Cl-A у коме учествује исти број електрона и протона [97]. Како приликом снимања волтамограма у повратном делу циклуса није уочен одговарајући оксидациони пик, може се закључити да се и редукција 9Cl-A одвија као иреверзибилан процес (**Слика 63**).

Експериментални подаци показали су да је разлика између потенцијала пика и потенцијала на половини висине пика $|E_{p,Ic} - E_{p1/2,Ic}|$ у опсегу од 93 mV до 107 mV (зависно од рН вредности и брзине промене потенцијала), па се може претпоставити да се редукција 9Cl-A највероватније дешава уз трансфер једног електрона и једног протона. Анализа утицаја промене брзине потенцијала током снимања цикличних волтамограма при рН 4,5, показала је катодно померање пика I_c са повећањем брзине промене потенцијала, што сугерише да је процес редукције контролисан преносом масе. Ово је потврђено добијеном линеарном зависношћу интензитета струје пика од квадратног корена брзине промене потенцијала [96, 192]:

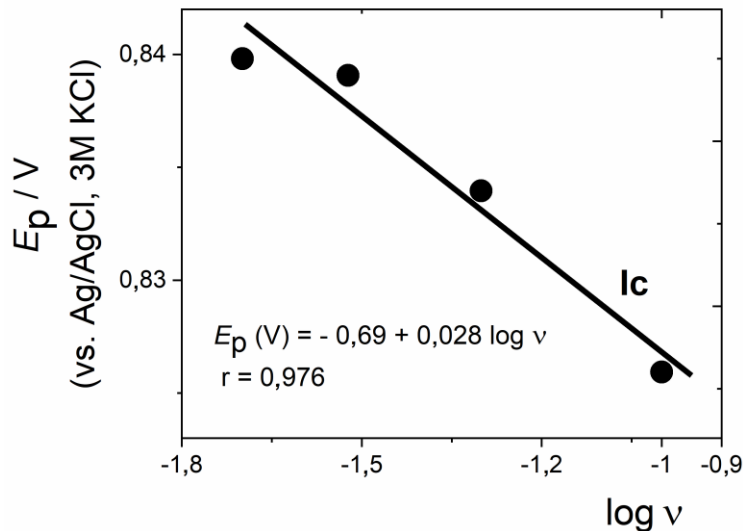
$$I_{p,Ic} \text{ (}\mu\text{A)} = -2,35 \text{ (}\mu\text{A}/(\text{V s}^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,212 \text{ (}\mu\text{A)}; (r = 0,982) \quad (36)$$

Анализа односа логаритма интензитета струје пика I_c и логаритма брзине промене потенцијала показала је да је зависност $\log I_{p,Ic} = f(\log v)$ линеарна, а нагиб чија је вредност $0,36$, указује да је процес редукције дифузионо контролисан.

Зависност $E_{p,Ic} = f(\log v)$ (**Слика 65**) може се представити једначином:

$$E_{p,Ic} \text{ (V)} = -0,69 \text{ (V)} + 0,028 \log v; r = 0,976 \quad (37)$$

Нагиб праве описане једначином (37) има вредност 28 mV , мало већу од очекиване за процес димеризације [101], што указује на то да и у случају редукције 9Cl-A, хемијска реакција прати процес трансфера електрона.



Слика 65. Зависност потенцијала пика I_c од $\log v$ за $2,5 \times 10^{-4}$ M раствор 9Cl-A [93]

Применом *Randles-Sevcik* једначине (једначина 12) за иреверзибилан, дифузионо контролисан процес, одређен је дифузиони коефицијент за 9Cl-A при рН 4,5 који износи: $D_{9Cl-A} = 7,63 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

4.6.2. Испитивање електрохемијског понашања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина применом цикличне волтаметрије

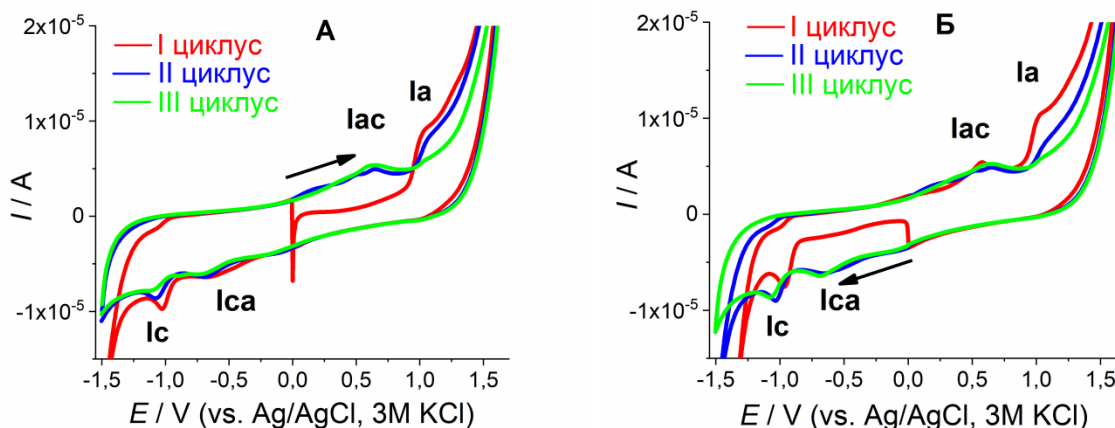
Циклична волтаметрија коришћена је за испитивање редокс понашања најактивнијих АДА на GCE. Сlike 66-69 приказују цикличне волтамограме раствора једињења 6, 7, 8 и 9 концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ M снимљене на GCE, у азотом засићеном ацетатном пуферу рН 4,6. Приликом снимања волтамограма (увек три сукцесивна циклуса) потенцијал је мењан од 0 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) до позитивног (Сlike 66A, 67A, 68A и 69A) и негативног (Сlike 66B, 67B, 68B и 69B) граничног потенцијала. У току првог циклуса, позитивни гранични потенцијал био је +1,5 V (Сlike 66A-69A) и уочен је један анодни пик (I_a) на потенцијалу $E_{p,I} \approx 1,0$ V. Након промене смера потенцијала (ка негативном граничном потенцијалу, -1,5 V), уочена су два катодна пика на потенцијалима -0,75 V (I_{ca}) и -1,0 V (I_c). У другом циклусу, оксидациони пик I_a био је нижи, док је у трећем циклусу потпуно нестало. У другом циклусу, нови оксидациони пик I_{ac} уочен је на потенцијалу око +0,6 V.

У другом експерименту, када је потенцијал мењан од 0 V до граничног негативног потенцијала (Сlike 66B-69 B) као последица редукције једињења, у првом циклусу уочен је само пик I_c , док се у наредним циклусима појавио и додатни катодни пик на мање негативном потенцијалу (I_{ca}). У реверзном делу првог циклуса уочен је оксидациони пик I_{ac} на потенцијалу 0,6 V, као и пик I_a . У току наредна два циклуса, пик I_{ac} остао је готово исти док је интензитет струје пика I_a значајно био мањи [137]. Интензитет струје пика редукције I_c опадао је са сукцесивним циклизирањем.

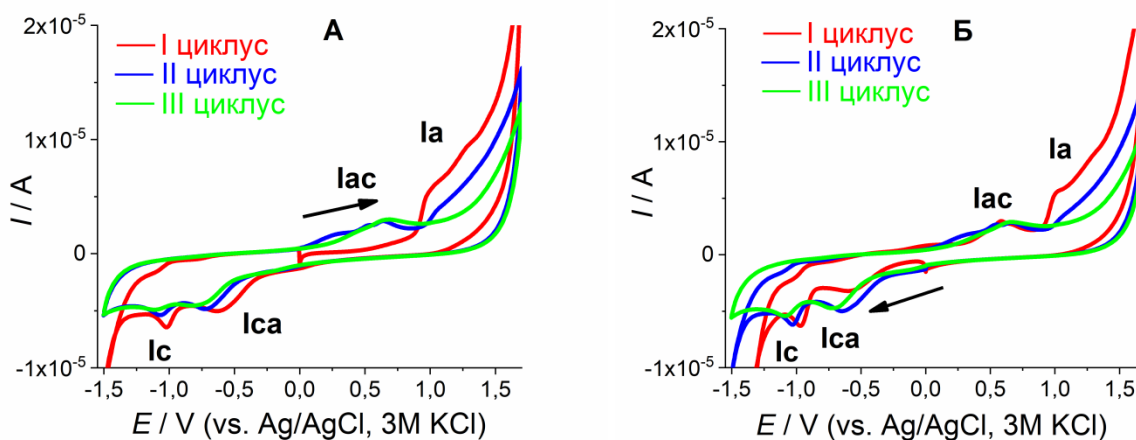
У складу са наведеним резултатима, може се закључити да најактивнији АДА показују одвојене процесе оксидације и редукције. Оксидација је, као и у случају 9Cl-A, представљена

пиком Ia, а производ редукције једињења 6,7, 8 и 9 може да се оксидује што је представљено пиком Iac на потенцијалу +0,6 V. У случају редукције, осим пика Ic (који је присутан и код 9Cl-A), јавља се и други пик редукције (Ica), на нешто позитивнијем потенцијалу који је вероватно последица редукције производа претходне оксидације. Како овај пик није примећен у волтамограмима 9Cl-A, може се претпоставити да у случају најактивнијих АДА на процес редукције вероватно утиче присуство супституената.

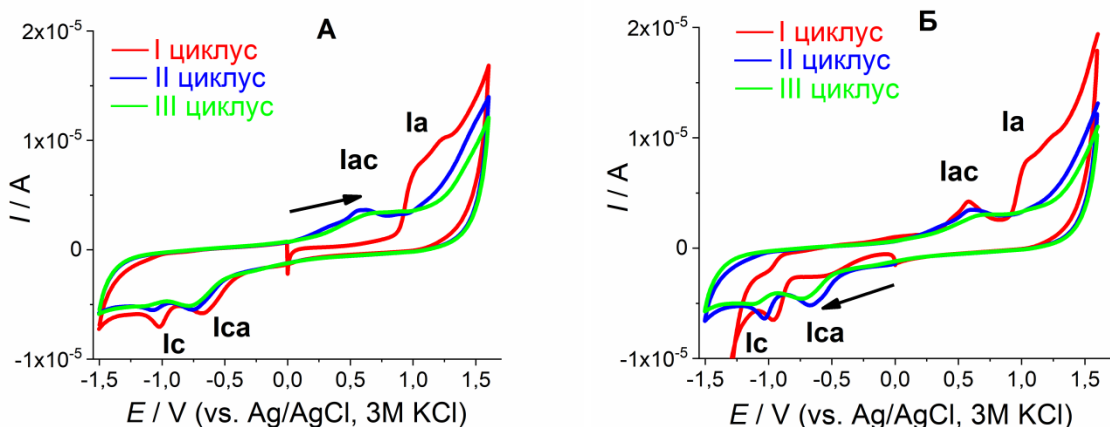
Посматрањем облика волтамограма, може се закључити да су процеси и оксидације и редукције иреверзибилни.



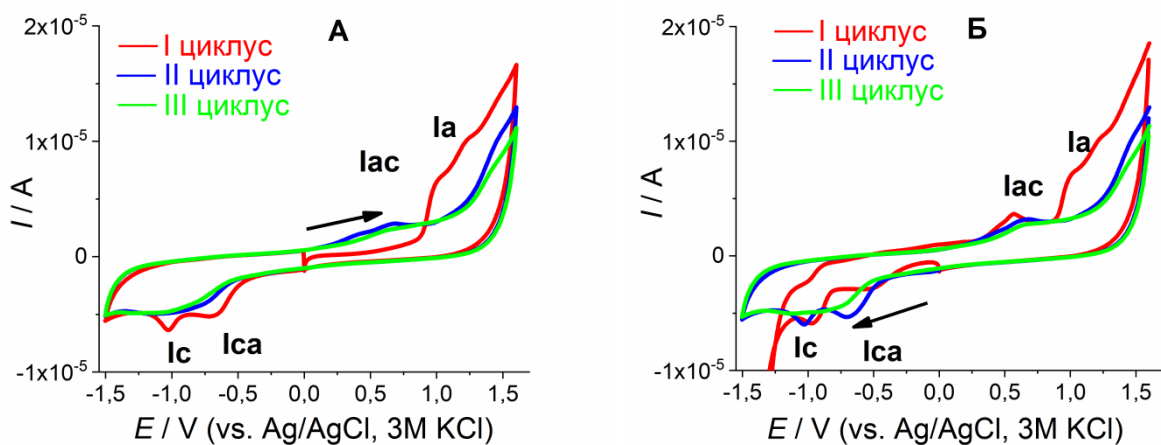
Слика 66. Циклични волтамограми раствора једињења 6, концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ M снимљени у ацетатном пуферу, рН 4,6, при опсегу потенцијала од $-1,5$ V до $+1,5$ V, почевши од 0,0V: (А) ка позитивним потенцијалима и (Б) ка негативним потенцијалима; први (—), други (—) и трећи (—) циклус, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ [137]



Слика 67. Циклични волтамограми раствора једињења 7 концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ M, снимљени у ацетатном пуферу, рН 4,6, при опсегу потенцијала од $-1,5$ V до $+1,5$ V, почевши од 0,0V: (А) ка позитивним потенцијалима и (Б) ка негативним потенцијалима; први (—), други (—) и трећи (—) циклус, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ [137]



Слика 68. Циклични волтамограми раствора једињења 8, концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М снимљени у ацетатном пуферу, рН 4,6, при опсегу потенцијала од $-1,5$ V до $+1,5$ V, почевши од $0,0$ V: (А) ка позитивним потенцијалима и (Б) ка негативним потенцијалима; први (—), други (—) и трећи (—) циклус, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ [137]



Слика 69. Циклични волтамограми раствора једињења 9 концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М снимљени у ацетатном пуферу, рН 4,6, при опсегу потенцијала од $-1,5$ V до $+1,5$ V, почевши од $0,0$ V: (А) ка позитивним потенцијалима и (Б) ка негативним потенцијалима; први (—), други (—) и трећи (—) циклус, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ [137]

Утицај рН вредности на процес оксидације и редукције једињења 6,7, 8 и 9 испитан је у опсегу рН вредности од 2,0 до 8,6. Примећено је да се са порастом рН вредности интензитет струје пикова који описују оксидацију и редукцију, Ia и Ic смањује.

Са порастом рН вредности, потенцијал пикова Ia и Ic се помера ка негативнијим вредностима, указујући на олакшан процес оксидације, а отежан процес редукције у мање киселој средини. У поређењу са 9Cl-A, пик Ia померен је ка позитивнијим потенцијалима, док је пик Ic померен ка негативнијим потенцијалима. Овакво померање пикова вероватно указује на отежане процесе оксидације и редукције најактивнијих АДА услед присуства супституената на положају 9.

За једињења 6, 7, 8 и 9 утицај брзине снимања испитан је на рН 4,5 и рН 7,0. Одговарајуће зависности за пикове Ia и Ic су приказане у **Табели 6**.

Табела 6. $I_p = f(v^{1/2})$ за једињења 6, 7, 8 и 9 при рН 4,5 и 7,0 (подаци добијени применом CV)

Једињење 6		$I_p = f(v^{1/2})$
пик Ia рН 4,5	$I_{p,Ia} (\mu A) = 16,2 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 1,09 (\mu A); r = 0,964$	
пик Ic рН 4,5	$I_{p,Ic} (\mu A) = 21,3 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 1,36(\mu A); r = 0,993$	
пик Ia рН 7,0	$I_{p,Ia} (\mu A) = 6,28(\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} + 0,08 (\mu A); r = 0,979$	
пик Ic рН 7,0	$I_{p,Ic} (\mu A) = 2,44 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,033 (\mu A); r = 0,992$	
Једињење 7		
пик Ia рН 4,5	$I_{p,Ia} (\mu A) = 7,19 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} + 0,22(\mu A); r = 0,983$	
пик Ic рН 4,5	$I_{p,Ic} (\mu A) = 12,6 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,24 (\mu A); r = 0,984$	
пик Ia рН 7,0	$I_{p,Ia} (\mu A) = 9,03 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,297 (\mu A); r = 0,992$	
пик Ic рН 7,0	$I_{p,Ic} (\mu A) = 5,44(\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,33 (\mu A); r = 0,958$	
Једињење 8		
пик Ia рН 4,5	$I_{p,Ia} (\mu A) = 14,6 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,41 (\mu A); r = 0,933$	
пик Ic рН 4,5	$I_{p,Ic} (\mu A) = 14,8 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,80 (\mu A); r = 0,966$	
пик Ia рН 7,0	$I_{p,Ia} (\mu A) = 6,21 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} + 0,14 (\mu A); r = 0,973$	
пик Ic рН 7,0	$I_{p,Ic} (\mu A) = 1,68(\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} + 0,22 (\mu A); r = 0,973$	
Једињење 9		
пик Ia рН 4,5	$I_{p,Ia} (\mu A) = 5,52 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,057 (\mu A); r = 0,947$	
пик Ic рН 4,5	$I_{p,Ic} (\mu A) = 5,68 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,49 (\mu A); r = 0,918$	
пик Ia рН 7,0	$I_{p,Ia} (\mu A) = 8,24 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,018 (\mu A); r = 0,993$	
пик Ic рН 7,0	$I_{p,Ic} (\mu A) = 3,69 (\mu A/(V s^{-1})^{1/2}) v^{1/2} - 0,045 (\mu A); r = 0,965$	

Како за оба пика код свих једињења (6, 7, 8 и 9) на рН 4,5 и 7,0 са порастом квадратног корена промене брзине интензитета струје пика линеарно расте, може се претпоставити да су процеси оксидације и редукције дифузионо контролисани [193-195].

У једначинама приказаним у **Табели 6** може се приметити да линеарне зависности не полазе из координатног почетка (што је карактеристично за процесе у потпуности контролисане дифузијом), већ је присутан одсечак чија је вредност мала. Поред тога, интензитет струје пика оксидације, као и пика редукције опада након првог циклуса. Наведени параметри указују да се поред доминантно присутне дифузије јавља и адсорпција електроактивне врсте што утиче на природу електродног процеса [137].

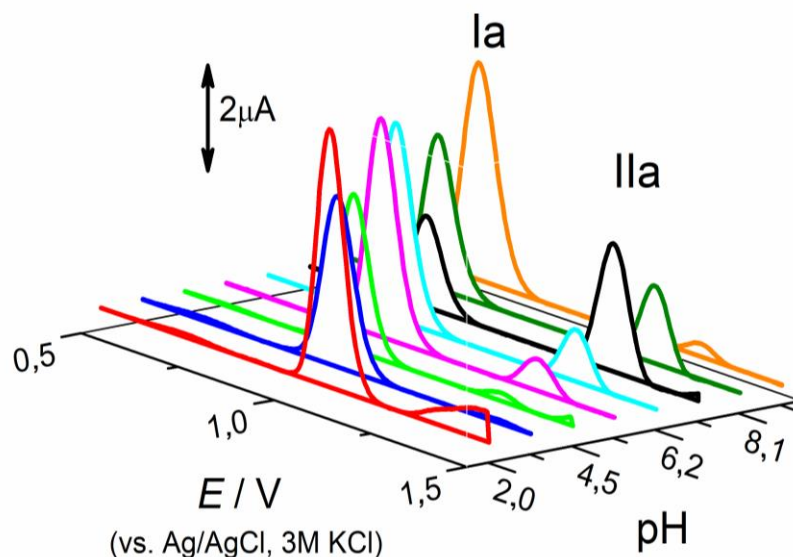
4.6.3. Испитивање електрохемијског понашања 9-хлороакридина применом диференцијално пулсне волтаметрије

Са циљем детаљног утврђивања механизма оксидације и редукције 9Cl-A, раствор концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ М испитиван је у опсегу рН вредности од 2,0 до 9,0 применом DPV (**Слика 70**).

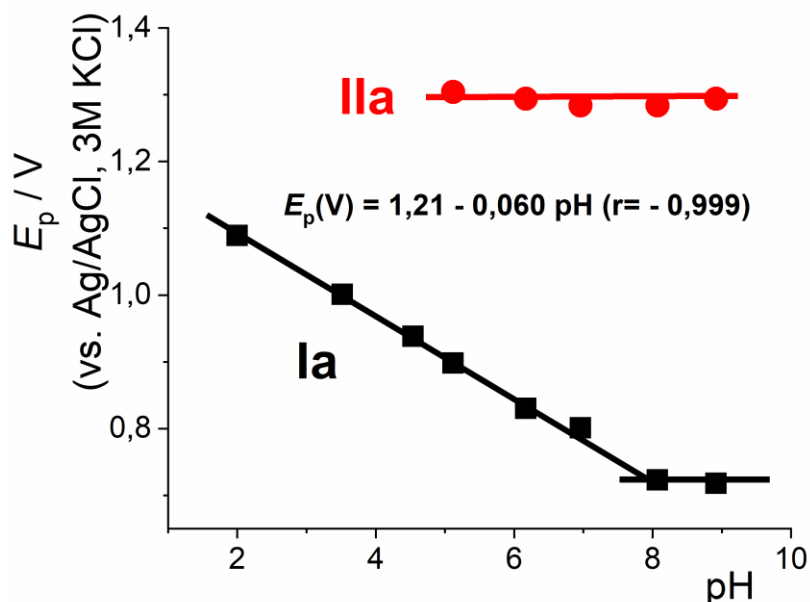
На добијеним волтамограмима уочен је оксидациони пик Ia, који по потенцијалу одговара пику Ia који је уочен на цикловолтамограмима. За разлику од CV, на DP волтамограмима, може се уочити додатни пик, IIa који је присутан при рН > 5,0, на позитивнијем потенцијалу ($E_{p,IIa} \approx 1,3$ V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl)) у односу на потенцијал пика Ia. Промена потенцијала пикова Ia и IIa са променом рН приказана је на **Слици 71**. Потенцијал пика Ia мења се линеарно са променом рН, што је описано једначином:

$$E_{p,Ia} \text{ (V)} = 1,21 \text{ (V)} - 0,060 \text{ рН}; r = -0,999 \quad (38)$$

Потенцијал пика IIa не зависи од рН.



Слика 70. 3D приказ коригованих DP волтамограма за раствор 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ М снимљен при различитим вредностима рН [93]



Слика 71. Зависност $E_p = f(\text{pH})$; ■ – пик Ia, ● – пик IIa, раствор 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M снимљен при различитим вредностима pH [93]

Оксидациони пик Ia помера се ка мање позитивним потенцијалима са порастом pH. Нагиб зависности $E_p = f(\text{pH})$ од 60 mV по pH јединици потврђује да у овом оксидационом процесу учествује исти број електрона и протона. Појава да пик IIa не зависи од pH указује на то да протони не учествују у том процесу оксидације.

Полуширина пика ($W_{1/2}$) одређена са DP волтамограма коришћена је за одређивање броја електрона који учествују у процесу оксидације, на основу једначине (19), из дела 1.5.4.1.

Са порастом pH, ширина на половини висине пика Ia ($W_{1/2}$) се мења и има вредности у опсегу од 0,083 V до 0,098 V. Према литературним подацима [96], трансферу једног електрона одговара теоријска вредност $W_{1/2} = 90$ mV, тако да ови подаци показују да се у процесу оксидације преносе један електрон и један протон.

Оксидациони пик IIa који постоји само при $5,0 < \text{pH} < 9,0$ има највећу струју пика у неутралној средини. Узимајући у обзир да је потенцијал пика независан од pH, очекује се да протони не учествују у овом процесу. Измерена вредност за $W_{1/2}$ увек је била 0,088 V (независна од pH) и готово је једнака теоријској вредности за процес у коме долази до трансфера једног електрона. Стога, оксидациони процес описан пиком IIa, дешава се уз трансфер само једног електрона [93].

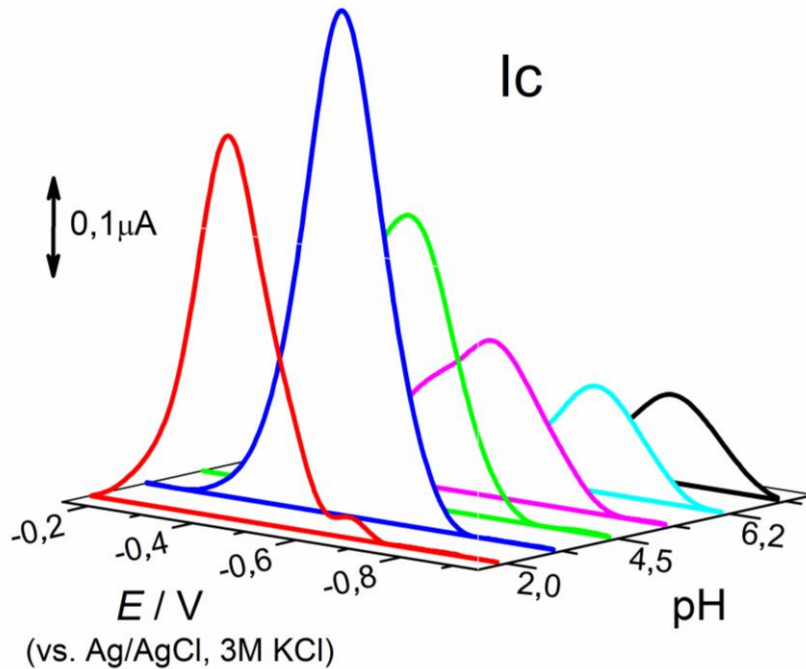
Када се упореде подаци добијени цикличном волтаметријом и диференцијално пулсном волтаметријом, може се претпоставити да се укупан процес оксидације 9Cl-A састоји из трансфера два електрона, што се може објаснити као два једно-електронска корака.

Утицај pH на процес редукције 9Cl-A ($c = 2,5 \times 10^{-4}$ M) испитан је применом DPV технике у опсегу pH од 2,0 до 8,0. При свим вредностима pH уочен је редукциони пик Ic (Слика 72). Са порастом pH вредности, интензитет струје пика био је мањи, док се потенцијал пика померао ка негативнијим вредностима. Зависност потенцијала пика од pH вредности основног електролита приказана је на Слици 73. Зависност је линеарна и може се описати једначином:

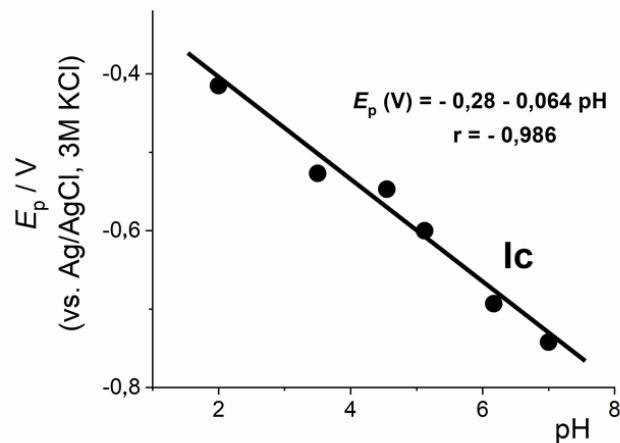
$$E_{p, Ic} \text{ (V)} = -0,28 \text{ (V)} - 0,064 \text{ pH} \quad (39)$$

Вредност нагиба од 64 mV по рН јединици подржава податке добијене применом цикличне волтаметрије за процес редукције који се одвија уз учешће истог броја електрона и протона. У складу са измереном ширином на половини висине пика која је имала вредност $W_{1/2} > 100 \text{ mV}$, може се закључити да се редукција одвија уз трансфер једног електрона и једног протона.

При $\text{pH} > 5$ DPV редукциони пик није оштар и са даљим порастом рН „цепа се“ на два пика. Присуство другог редукционог пика сугерише још један процес, тј. консекутивни трансфер електрона [93].



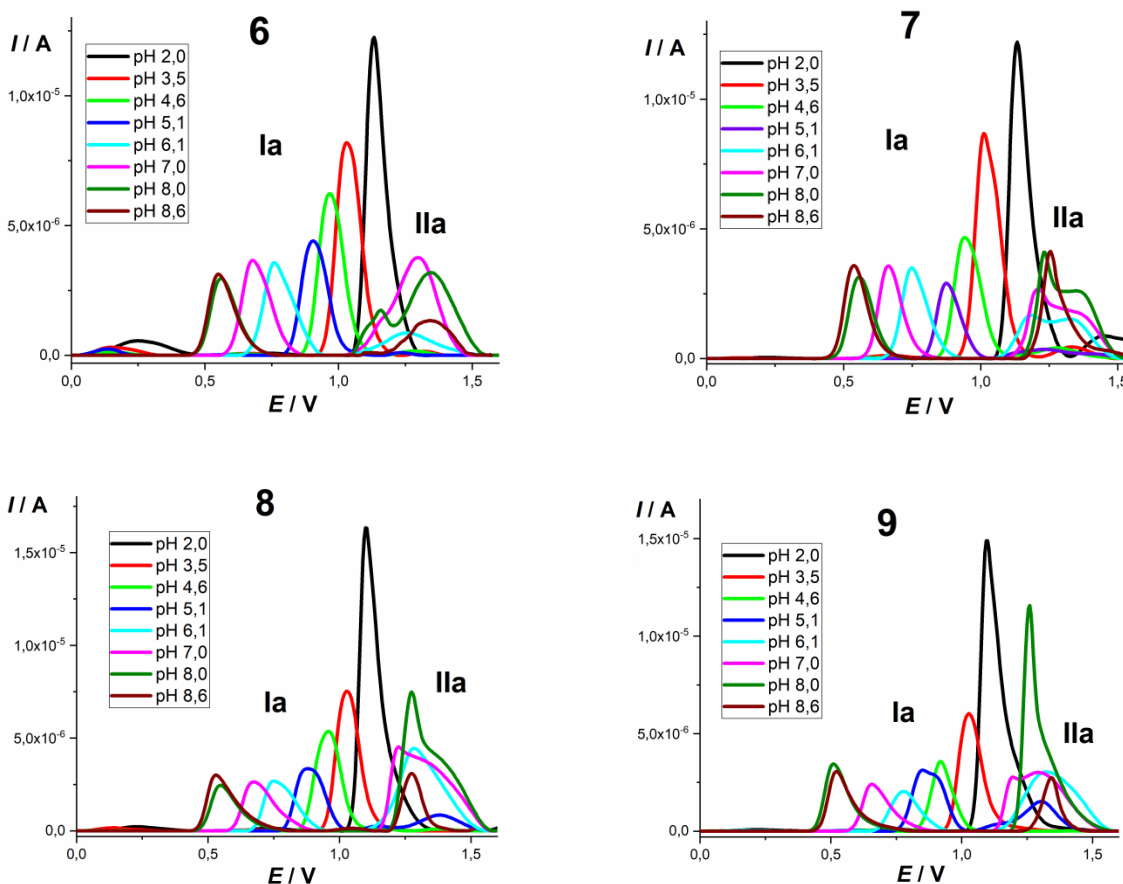
Слика 72. 3D приказ коригованих DP волтамограма за процес редукције 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ снимљених при различитим рН вредностима [93]



Слика 73. Зависност E_p од рН за процес редукције 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$, пик Ic [93]

4.6.4. Испитивање електрохемијског понашања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина применом диференцијално пулсне волтаметрије

Анализа диференцијално пулсних волтамограма, имајући у виду већу осетљивост ове технике у поређењу са цикличном волтаметријом, искоришћена је са циљем додатне анализе електрохемијског понашања најактивнијих АДА. DP волтамограми најактивнијих АДА, приликом снимања од 0 V показали су да се пик који одговара оксидацији (на потенцијалу око 1,0 V) са порастом рН помера ка негативнијим вредностима потенцијала (Слика 74). Такође, у складу са DPV резултатима добијеним за 9Cl-A, у киселој средини сва једињења показују само поменути оксидациони пик на потенцијалу око 1,0 V, док се у базној средини, поред пика који постоји и у киселој средини, може уочити и изражен други оксидациони пик на потенцијалу око 1,3 V.



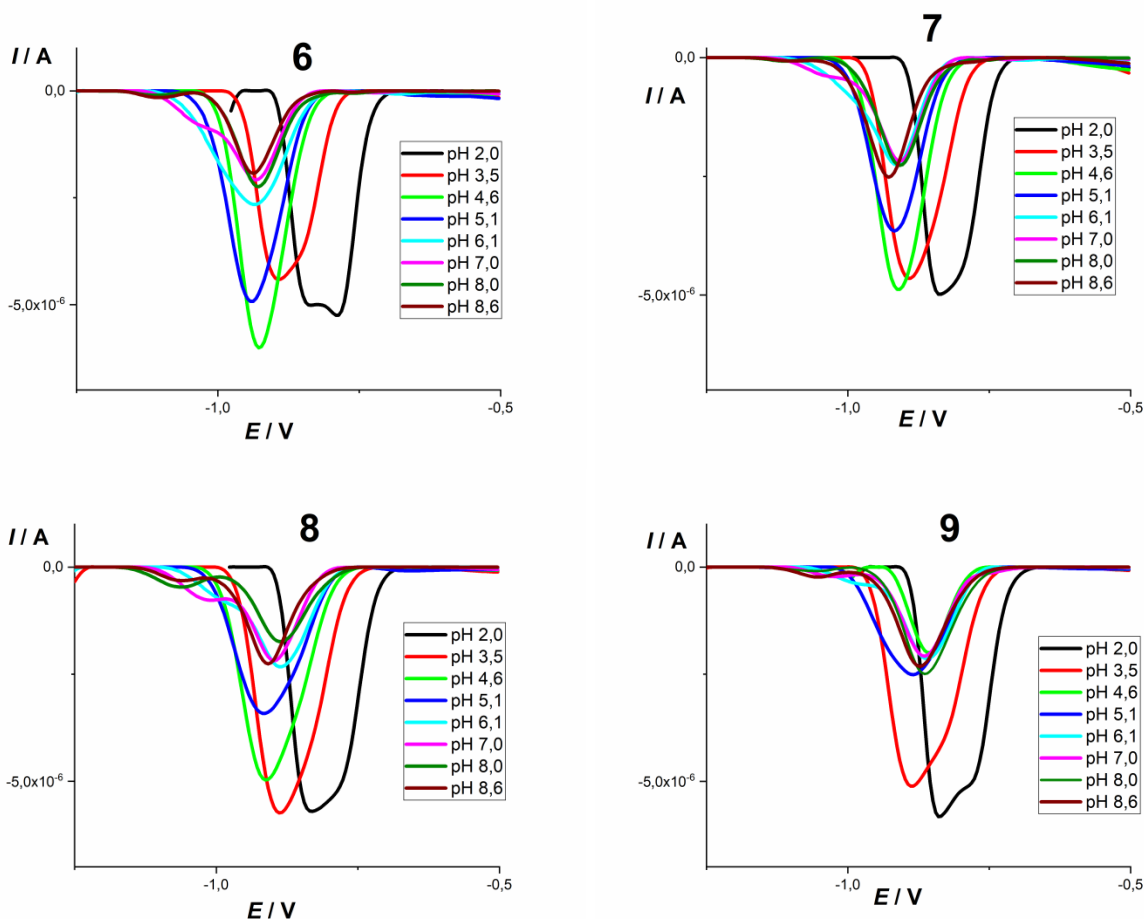
Слика 74. Кориговани DP волтамограми једињења 6, 7, 8 и 9, снимани при рН од 2,0 до 8,9, са променом потенцијала од 0 V до 1,6 V

Приликом снимања волтамограма од негативних почетних вредности потенцијала (-1,4 V) може се уочити још један, мањи и широк оксидациони пик, на потенцијалу 0,4 – 0,6 V, претходно означен као Iac. Како пик Iac није уочен у првом случају, када је почетни потенцијал био 0 V, може се претпоставити да тај пик описује оксидацију производа редукције деривата

акридина који се формира на површини GCE у току снимања на негативним потенцијалима. Ови резултати у складу су са резултатима који су добијени применом цикличне волтаметрије.

Редукциони пик I_c уочен је при свим вредностима рН (Слика 75), што је такође у складу са CV резултатима. Са порастом рН вредности, потенцијал пика померао се ка негативнијим вредностима, што указује на отежан процес редукције у средини чија је рН већа.

Уочено је да се у базној средини, главни DPV редукциони пик „дели“ на два пика, што може указивати на консекутивни трансфер електрона.



Слика 75. Кориговани DP волтамограми једињења 6, 7, 8 и 9, снимани при рН од 2,0 до 8,9, са променом потенцијала од 0 V до $-1,4$ V

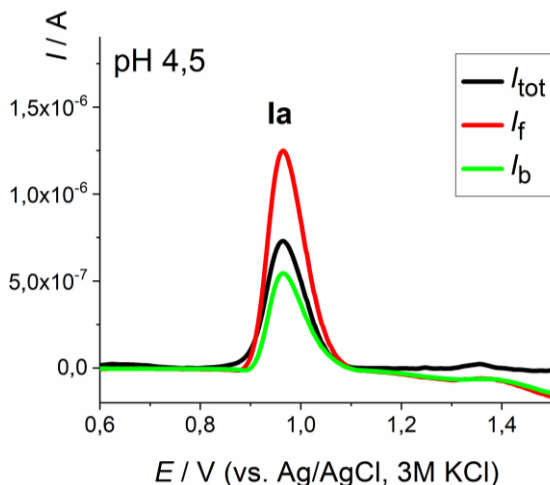
4.6.5. Испитивање електрохемијског понашања 9-хлороакридина применом волтаметрије правоугаоних таласа

Осим применом цикличне волтаметрије, реверзибилност процеса може се утврдити и анализом података добијених применом волтаметрије правоугаоних таласа, SWV [196, 197], јер се пикови који описују оксидацију и редукцију могу регистровати у истом експерименту.

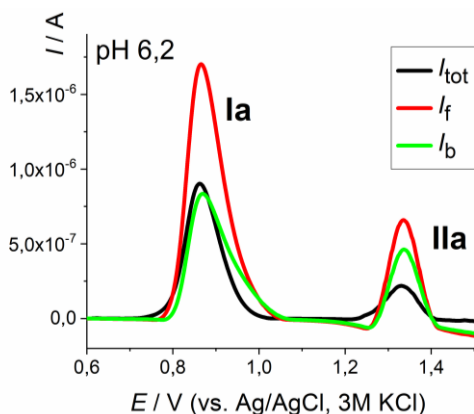
SW волтамограми раствора 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M при рН 4,5 и 6,2 приказани су на Сликама 76 и 77.

На волтамограму који представља укупну струју (I_{tot}) (Слика 76), у киселој средини, присутан је само један оксидациони пик Ia, на потенцијалу 0,97 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl), док су при рН 6,2 присутна два оксидациона пика (Слика 77), Ia и IIa на потенцијалима 0,86 V и 1,33 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl), редом.

Смер директне (I_f) и реверзне/повратне (I_b) компоненте струје (I_f – црвена линија; I_b – зелена линија) користе се за предвиђање реверзибилности процеса, па тако исти смер обе компоненте струје указује на иреверзибилну природу процеса оксидације 9Cl-A [198, 199], што је потврда података добијених применом цикличне волтаметрије.

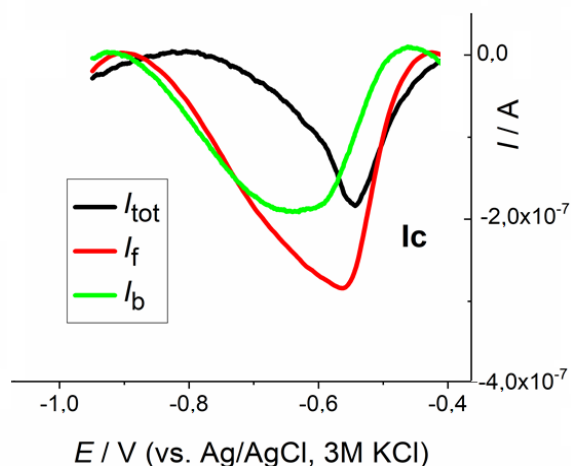


Слика 76. Коригован SW волтамограм раствора 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M снимљен при рН 4,5; (—) укупна струја (I_{tot}), (—) компонента струје снимљена уз примену директног пулса (I_f), (—) компонента струје снимљена уз примену повратног пулса (I_b); $v_{\text{eff}} = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ [93]



Слика 77. Коригован SW волтамограм раствора 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M снимљен при рН 6,2; (—) укупна струја (I_{tot}), (—) компонента струје снимљена уз примену директног пулса (I_f), (—) компонента струје снимљена уз примену повратног пулса (I_b); $v_{\text{eff}} = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ [93]

SW волтамограми раствора 9Cl-A (концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M при pH 4,5) на Сlici 78 приказују укупну струју за редукциони пик ($E_{p,lc} = -0,54$ V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl)), I_{tot} , заједно са директном (I_f) и повратном (I_b) компонентом струје. Како су директна и повратна компонента струје на волтамограму истог смера [198, 199], и процес редукције може се описати као иреверзибилан.



Слика 78. SW волтамограми редукције раствора 9Cl-A концентрације $2,5 \times 10^{-4}$ M при pH 4,5; (—) укупна струја (I_{tot}), (—) директна компонента струје (I_f), (—) повратна компонента струје (I_b); $v_{eff} = 0,025$ V s⁻¹ [93]

4.6.6. Испитивање електрохемијског понашања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина применом волтаметрије правоугаоних таласа

Са циљем добијања оптималних резултата SWV техником, за испитивање синтетисаних једињења мењани су и оптимизовани следећи параметри: амплитуда пулса, инкремент промене потенцијала и фреквенција. Приликом извођења експеримената, коришћени су следећи параметри: 5 mV за амплитуду пулса, 1 mV за инкремент потенцијала и 25 Hz за фреквенцију.

SW волтамограми раствора најактивнијих деривата акридина концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ M снимљени су у опсегу потенцијала од 0 V до 1,5 V, затим од $-1,4$ V до 1,5 V и од 0 до $-1,4$ V vs. Ag/AgCl (3M KCl) у ацетатном пуферу (pH 4,6; I 0,1 M) и у фосфатном пуферу (pH 7,0; I 0,1 M). На волтамограмима снимљеним при потенцијалима од 0 V до 1,5 V (pH 4,6) може се уочити један, главни оксидациони пик (I_a) на потенцијалу око 1,0 V, и слабо изражен пик I_{Pa} на потенцијалу око 1,3 V (Слика 79, (—)). Када је промењен почетни потенцијал (снимање волтамограма је почело од $-1,4$ V) до +1,5 V (pH 4,6), још један, мањи и веома широк оксидациони пик (I_{ac}) је уочен на потенцијалу 0,4 – 0,6 V (Слика 79, (—)). Како пик I_{ac} није уочен у првом случају, када је почетни потенцијал био 0 V, може се (као и код прекурсора за синтезу деривата тј. 9Cl-A) претпоставити да тај пик описује оксидацију производа редукције деривата акридина који се формира на површини GCE током примењеног негативног потенцијала. Ови резултати у складу су са резултатима који су добијени применом CV и DPV.

Осим за испитивање реверзибилности редокс процеса, SWV техника је у овој дисертацији коришћена и за испитивање интеракције најактивнијих АДА са ДНК због својих предности попут боље поновљивости, мањег односа сигнал/шум и брзине [111] у односу на

друге волтаметријске технике. Поред испитивања електрохемијског понашања најактивнијих АДА у раствору, испитивано је и њихово понашање након адсорпције на GCE.

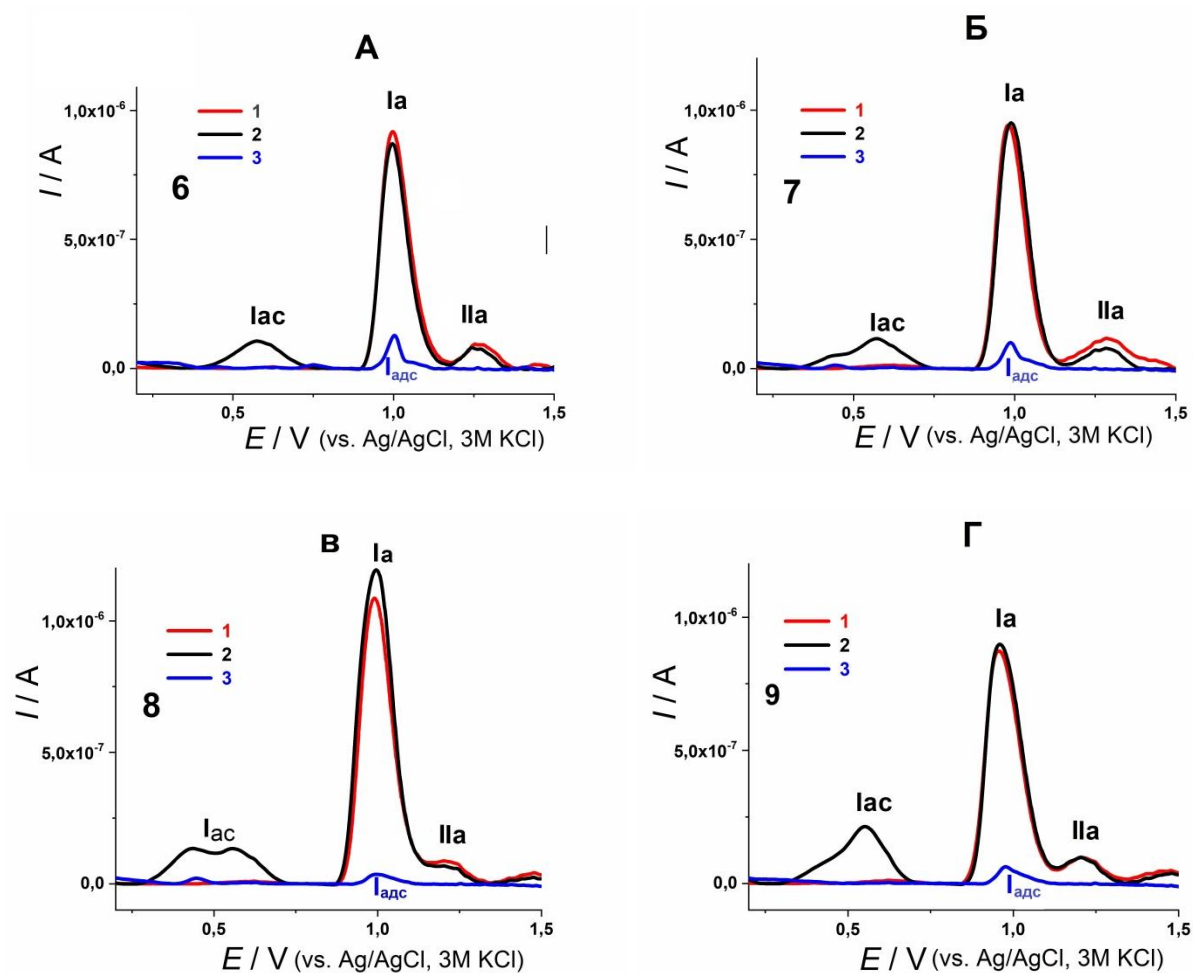
Експеримент је изведен тако што је чиста GCE била 30 минута уроњена у раствор најактивнијих АДА концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М (рН 4,6), те је дошло до адсорпције најактивнијих АДА на површини електроде. Након испирања дејонизованом водом, електрода је била пребачена у електрохемијску ћелију и снимљени су SW волтамограми за свако једињење. Волтамограми су показали мали пик ($I_{адс}$) на нешто позитивнијем потенцијалу (3 – 7 mV) (Слика 79 (—)), у поређењу са главним пиком I_a , који је уочен након снимања у раствору најактивнијих АДА. Истовремено, пикови $I_{па}$ и $I_{ас}$ нису уочени. Значајно нижи пик, указује на веома слабу адсорпцију најактивнијих АДА на површини електроде, а одсуство пика $I_{па}$ важно је за даље испитивање интеракције најактивнијих АДА са ДНК.

Смањење сигнала који описује процес оксидације након адсорпције деривата акридина на површини електроде може бити представљено нормализованим интензитетом струје (једначина 21) кроз проценат промене сигнала [93, 105, 106] . У овој дисертацији, $I_{p,адс}$ у једначини 21 представља интензитет струје пика на волтамограму који је добијен након урањања GCE у раствор најактивнијих АДА, инкубације у току 30 минута и, након тога, трансфера у основни раствор, а $I_{p,сол}$ представља интензитет струје пика на волтамограму који је добијен након снимања раствора најактивнијих АДА. Потенцијал пикова и вредности нормализованог интензитета струје пика за све најактивније АДА добијене применом једначине (21) приказани су у Табели 7 [137].

Табела 7. Потенцијал пикова и нормализовани интензитети струје пикова за најактивније АДА (добијени применом SWV) [137]

Деривати акридина	$E_{p,сол}$ (V)	$E_{p,адс}$ (V)	ΔE_p (V)	$d(I)$ (%)
6	0,999	1,003	0,004	15,6
7	0,984	0,988	0,004	10,3
8	0,993	0,996	0,003	3,25
9	0,966	0,973	0,007	6,86

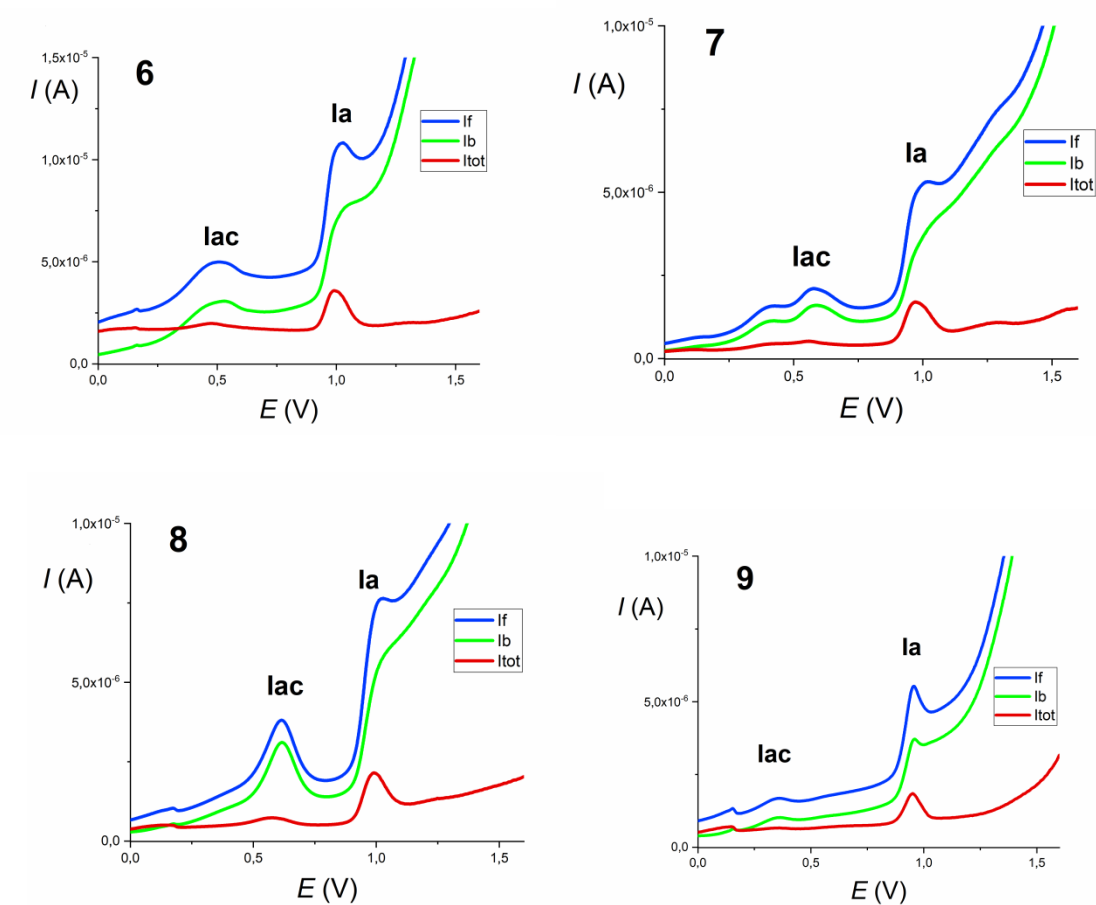
Нормализоване вредности интензитета струје биле су између 3 % (једињење 8) и 15% (једињење 6). На основу резултата, може се претпоставити да једињење 8 показује мали или никакав афинитет за адсорпцију на површини GCE, док једињења 7 и 6 показују умерену способност адсорпције.



Слика 79. Кориговани SW волтамограми деривата акридина: А) једињење 6; Б) једињење 7; В) једињење 8 и Г) једињење 9; рН 4,6.

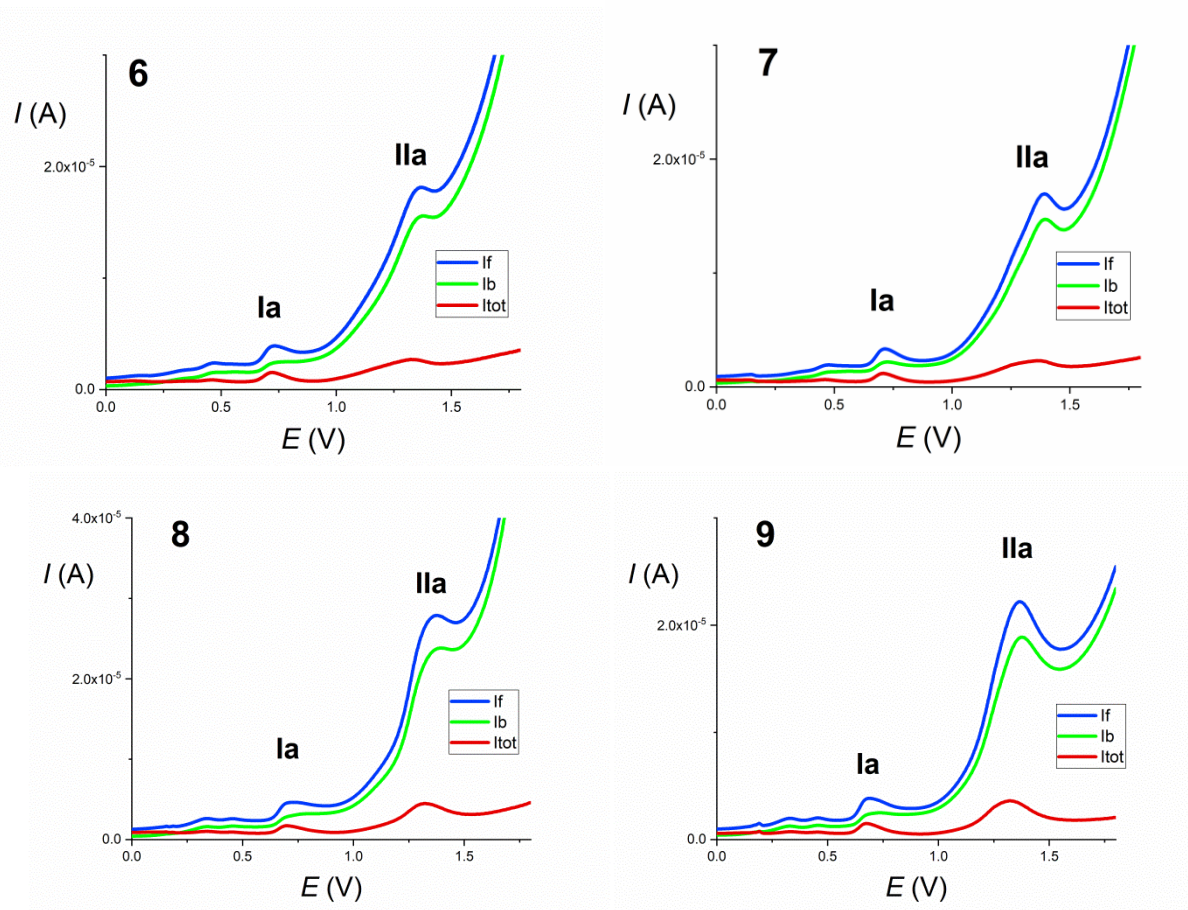
Крива 1 (—) снимљена у раствору концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М, од 0 V до +1,5 V; крива 2 (—) снимљена у раствору концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М, од -1,4 V до +1,5 V; крива 3 (—) након инкубације GCE у раствору деривата акридина концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М у току 30 минута.

Анализом директне и повратне компоненте струје волтамограма снимљених од -1,4 V до 1,5 V и од 0 V до -1,4 V уочено је да пикови волтамограма деривата акридина који описују оксидацију и редукцију представљају иреверзибилне процесе, јер су у оба случаја, обе компоненте, као и снимак укупне струје представљени у истом смеру [198, 199]. **Слика 80** приказује SW волтамограме раствора најактивнијих АДА, концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М у ацетатном пуферу (рН 4,6, I 0,1 M) снимане при промени потенцијала од -1,4 V до 1,5 V. Укупна струја (I_{tot}) заједно са директним компонентом (I_f) и повратном компонентом (I_b) представљене су пиковима који су оријентисани у истом смеру.



Слика 80. SW волтамограми добијени применом GCE за растворе једињења 6, 7, 8 и 9 ($c = 2,4 \times 10^{-4}$ M) у ацетатном пуферу (pH 4,6, 10^{-1} M); $f = 25$ Hz; $E_s = 1$ mV; амплитуда пулса 5 mV; $v_{eff} = 25$ mV s⁻¹; I_{tot} – укупна струја; I_f – директна компонента струје; I_b – повратна компонента струје

Анализе најактивнијих АДА при рН 7,0 применом SW технике показале су да се пик оксидације јавља на потенцијалу око 1,3 V (Слика 81), што је веома важно за даља испитивања с обзиром да је претрагом литературе примећено, а приликом извођења експеримената и потврђено, да базе ДНК на SW волтамограму имају пик на око 1,3 V. Наведени резултати омогућили су оптимизовање услова за испитивање интеракције најактивнијих АДА са ДНК, што је касније у делу 4.6.8. описано детаљније.



Слика 81. SW волтамограми добијени применом GCE за растворе једињења 6, 7, 8 и 9 ($c = 2,4 \times 10^{-4}$ M) у фосфатном пуферу (pH 7,0, $I 0,1$ M); $f = 25$ Hz; $E_s = 1$ mV; амплитуда пулса 5 mV; $v_{\text{eff}} = 25$ mV s $^{-1}$; I_{tot} – укупна струја, I_f – директна компонента струје, I_b – повратна компонента струје.

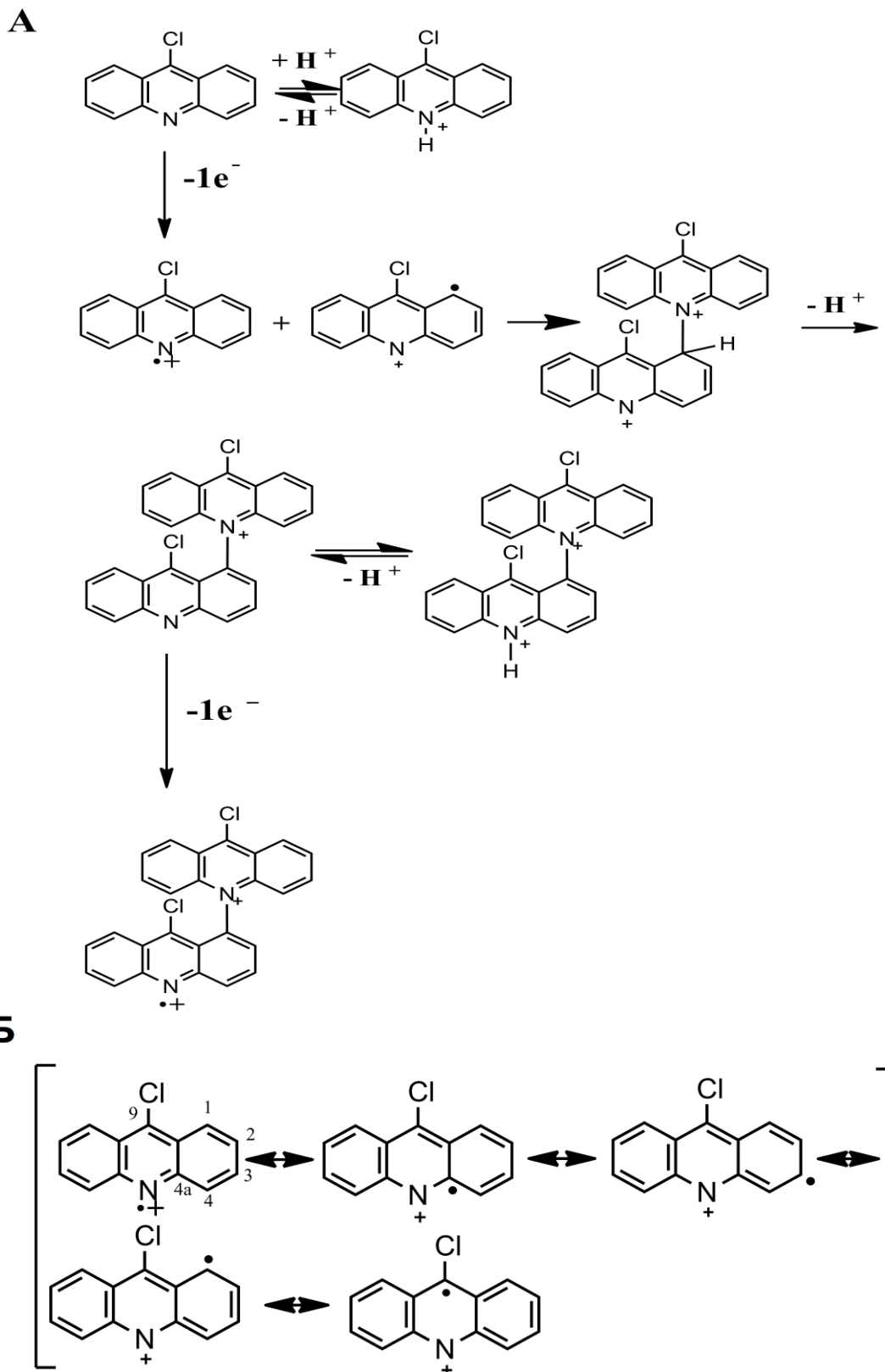
4.6.7. Редокс механизам 9-хлороакридина

Подаци добијени применом све три волтаметријске технике омогућили су тумачење механизма оксидације и редукције 9Cl-A, као прекурсора за синтезу аминокиселинских деривата акридина. Цикловолтамограми показали су да се оксидација одвија уз трансфер 2 електрона и 2 протона, док је DPV омогућио детаљнији увид у механизам, тако да је закључак да се оксидација одвија кроз два једноелектронска процеса. Зависност пика који описује оксидацију на цикловолтамограму од рН вредности сугерише да се између две реакције трансфера електрона дешава интермедијерна хемијска реакција, тј. реакција формирања димера. Електрохемијски покренута димеризација експериментално је потврђена нагибом од 21 mV зависности $E_{p,1a} = f(\log \nu)$.

У првом кораку оксидације, након иреверзибиног трансфера једног електрона, формира се мономерни радикал катјон (**Слика 82А**)[93].

Након губитка једног електрона, долази до делокализације преосталог неспареног електрона. На основу резонантне структуре може се уочити да су положаји 1 и 3 подложни нападу електрофила, док су због стерних ефеката, положаји 4а и 9 мање подложни (**Слика 82Б**). Два 9Cl-A мономера катјон радикала могу да формирају димер у процесу хемијске реакције (услед формирања C-N везе), а димер даље подлеже следећој (другој) консекутивној реакцији у којој се размењује други електрон, као што је предвиђено у складу са волтаметријским подацима. Као резултат друге реакције у којој се губи други електрон, настаје нови катјон радикал (**Слика 82**).

Може се претпоставити да непротонована форма димера, доминантна при вишим рН вредностима, лакше губи електроне у поређењу са протонованом формом, која може да подлеже даљим реакцијама и формира нови катјон радикал.



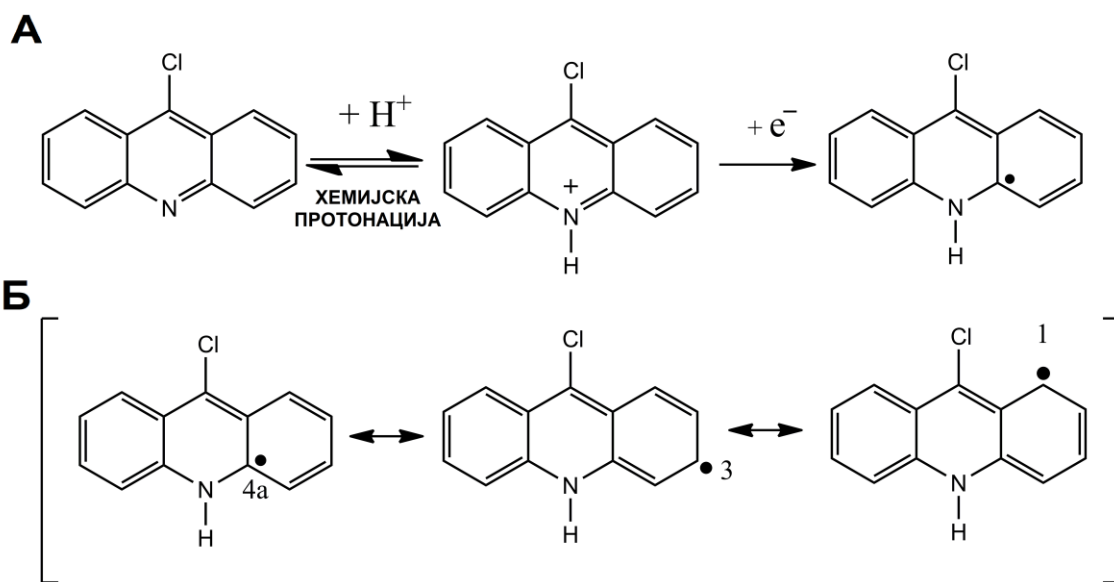
Слика 82. А) Предложени механизам оксидације 9Cl-A; Б) Резонантне структуре радикал катјона 9Cl-A [93]

Формирање мономерног радикала услед оксидације већ је објављено као део механизма оксидације за акридин оранж [200] и друге деривате акридина [201]. Предложени механизам у складу је са претходно објављеним резултатима о оксидацији сличних једињења, укључујући и акридине која се даље наставља кроз формирање мономера - радикал катјона, димера и тетрамера [202] и хексаметил акридина, где је производ оксидације успешно изолован и применом масене спектрометрије идентификован као димер акридина [201].

Редукција 9Cl-A дешава се иреверзибилно, укључујући један електрон и један протон што доводи до формирања радикала. Предложени механизам редукције представљен је на **Слици 83**.

Како настали радикал није стабилна форма, вероватан је процес димеризације како би настао стабилан производ. Имајући у виду резонантну структуру радикала 9Cl-A, различите позиције омогућавају настанак неколико различитих димера. Стерни ефекти чине да положај 4a буде мало вероватно место формирања нове везе приликом настанка димера, у поређењу са положајима 1 и 3. На основу тога, може се претпоставити да два 9Cl-A мономера – радикала формирају димер. Ово је потврђено и подацима добијеним из зависности $E_{p,ic} = f(\log v)$.

Редукција акридина првобитно је испитивана применом различитих електрода у различитим растворима [203-205]. Истраживачи су закључили да се услед редукције формира интермедијерни семихинон радикал, што је у складу са представљеним резултатима.



Слика 83. А) Предложени механизам редукције 9Cl-A; Б) Резонантне структуре радикала 9Cl-A [93]

Како молекулска структура најактивнијих АДА садржи полиароматични акридински, планарни хетероциклас са азотом, он захваљујући својим слободним, невезивним електронима на атому азота може да се понаша као електрон донор. Према литературним подацима [200, 201] може се претпоставити да се оксидација описана пиком на потенцијалу око 1,0 V дешава на азоту на положају 10. Приликом оксидације долази до губитка једног електрона, даље се формира мономер радикал катјон који како би се стабилизовао, димеризује. Редукција најактивнијих АДА дешава се иреверзибилно, при чему највероватније услед трансфера електрона долази до формирања радикала који може димеризовати уз консекутивни трансфер још једног електрона са циљем настанка стабилног производа.

Подаци добијени применом електрохемијских техника у овој дисертацији указују да присуство супституената у положају 9 утичу на отежану оксидацију и редукцију најактивнијих АДА у поређењу са 9Сl-А највероватније услед стерних ефеката, док дужина бочног ланца није значајно утицала на разлике у редокс понашању испитиваних најактивнијих АДА.

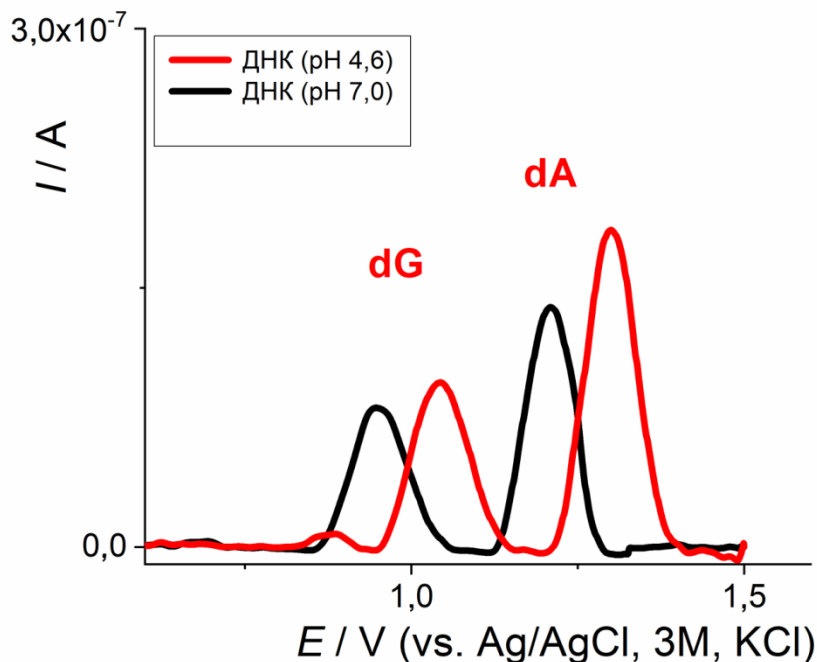
4.6.8. Оптимизација услова за формирање вишеслојног ДНК биосензора

Бројне су студије које користе DPV технику за испитивање оксидације ДНК [10, 83, 118, 126, 206]. У овој дисертацији, оксидација ДНК испитивана је применом SWV. У односу на цикличну волтаметрију, ова техника пружа јасне волтамограме који су под мањим утицајем капацитивних ефеката и осетљивији су на промене које одређују кинетику електродне реакције. Када се користи SWV, анализа траје краће, мање се троше електроактивне врсте у односу на DPV [111] и мање је проблема са “тровањем” електроде [138].

Вишеслојни ДНК биосензор формира се тако што се на припремљену электроду наносе три капи раствора ДНК одређене запремине и концентрације. Свака кап се суши у струји азота одређено време, након чега се електрода испира дејонизованом водом како би вишак неадсорбоване ДНК био уклоњен.

Са циљем добијања оптималних услова за припрему биосензора, варирани су различити параметри: рН вредност раствора у коме се врши снимање волтамограма, запремина капи ДНК, концентрација ДНК, време сушења капи, амплитуда пулса приликом снимања волтамограма, као и фреквенција.

Оксидација ДНК адсорбоване на GCE испитивана је при рН од 3,6 до 8,6 (I 0,10 М). Добијени SW волтамограми за рН 4,6 и 7,0 приказани су на **Слици 84** (рН 4,6 – црвена линија; рН 7,0 – црна линија).



Слика 84. Кориговани SW волтамограми: (—) ДНК биосензора, рН 4,6; (—) ДНК биосензора, рН 7,0

SW волтамограм ДНК вишеслојног биосензора показује два оксидациона пика на потенцијалима око 1,0 V и 1,3 V при рН 4,6 који описују оксидацију дезоксигуанозина (dG) и дезоксиаденозина (dA). Са порастом рН раствора, пикови оксидације померени су ка мање позитивним потенцијалима, а интензитет им опада.

Иако је рН 7,0 вредност блиска физиолошкој вредности рН (и из тог разлога је значајна), извођење експеримената при рН 4,6 било је погодније из два разлога. Прво, интензитети струја били су већи, у поређењу са пиковима добијеним при већој рН вредности и имали су бољи облик. Такође, пик Па, уочен на потенцијалу око 1,3 V на волтамограмима 9С1-А и најактивнијих АДА при рН 7,0, није присутан при рН 4,6, те је стога избегнуто суперпонирање пика Па 9С1-А и најактивнијих АДА са пиком ДНК базе. Ово је од нарочитог значаја за испитивање интеракције ДНК са наведеним једињењима.

У ацетатном пуферу (рН 4,6) вршено је даље испитивање услова за припрему биосензора. Време сушења капи ДНК варирано је од 5 до 60 минута, при чему је кап ДНК била запремине 5 μL , а концентрација ДНК 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Оптимално време сушења сваке појединачне капи, када је добијен највећи интензитет струје пика, било је 30 минута.

При рН 4,6 испитиван је ефекат концентрације ДНК, при чему је концентрација ДНК варирана од 25 до 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Како је сигнал био исти за све испитиване концентрације, одабрана је највећа концентрација, 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Након одређивања оптималне концентрације ДНК, испитиван је утицај запремине капи ДНК. Запремина сваке капи варирана је од 3,0 до 7,5 μL (кап већа од 7,5 μL разливала би се приликом nanoшења на површину електроде). Највећи интензитет струја пикова база ДНК добијен је коришћењем капи чија је запремина била 5 μL . Осим параметара који се односе на ДНК, варирани су и услови за снимање волтамограма: амплитуда пулса (од 0,002 до 0,050 V) и фреквенција (од 8 до 75 Hz). Добијени су оптимални резултати: амплитуда потенцијала пулса 0,005 V и фреквенција 25 Hz. У **Табели 8** приказане су оптималне вредности параметара за формирање вишеслојног ДНК биосензора [93].

Табела 8. Оптималне вредности параметара за формирање вишеслојног ДНК биосензора

Параметри	Оптималне вредности
рН	4,6
Време сушења капи (min)	30
Концентрација ДНК ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	75
Запремина капи (μL)	5
Амплитуда пулса (V)	0,005
Фреквенција (Hz)	25

Поновљивост добијених резултата испитана је тако што је при оптималним условима формирано пет биосензора, а анализирани су интензитет струје пика који потиче од оксидације базе ДНК и потенцијал пика. Израчуната стандардна девијација за интензитет струје пика од 8 nA и потенцијал пика од 2 до 3 mV представљају задовољавајуће вредности.

Резултати статистичке обраде поновљивости сигнала припремљеног биосензора приказани су у **Табели 9**.

Табела 9. Поновљивост сигнала припремљеног биосензора, представљена променом интензитета струје и потенцијала пикова база ДНК (дезоксигуанозина dG и дезоксиаденозина dA)[93]

	$E_p(dG)$ (V)	$i_p(dG)$ (μA)	$E_p(dA)$ (V)	$i_p(dA)$ (μA)
1	1,041	0,098	1,297	0,195
2	1,043	0,095	1,300	0,190
3	1,044	0,089	1,305	0,186
4	1,045	0,085	1,303	0,175
5	1,046	0,079	1,302	0, 179
$\langle E_p \rangle \pm SD$ или $\langle i_p \rangle \pm SD$	$SD = 0,001923$ (1,044 \pm 0,002)	$SD = 0,007629$ (0,089 \pm 0,008)	$SD = 0,003051$ (1,301 \pm 0,003)	$SD = 0,008093$ (0,185 \pm 0,008)
RSD (%)	0,18	8,55	0,23	4,38

На овај начин, поновљивост формирања и стабилност биосензора су потврђени у ацетатном пуферу, при рН 4,6.

4.6.9. Испитивање интеракције 9-хлороакридина са ДНК применом електрохемијског ДНК биосензора

Вишеслојни биосензор припремљен је тако да су молекули ДНК распоређени да покривају читаву површину електроде. Ово је значајно јер онемогућава неспецифичну адсорпцију једињења и одговор биосензора потиче само од једињења које је инкорпорирано у слоју ДНК, без утицаја дифузије једињења из раствора.

Након инкубације ДНК која се налази на површини електроде са једињењем у раствору, у току одређеног времена и трансфера електроде са новоформираним комплексом у пуфер, пикови који описују оксидацију једињења последица су остварене интеракције једињења са ДНК. Услед интеракције, једињење је инкорпорирано у слој адсорбованог ДНК, што му омогућава да приђе површини електроде и ту се оксидује. Након инкубације, преостали „слободни“ молекули бивају испрани помоћу дејонизоване воде у кораку који претходи урањању сензора у чист пуфер у коме се врши електрохемијско испитивање, те не могу бити детектовани.

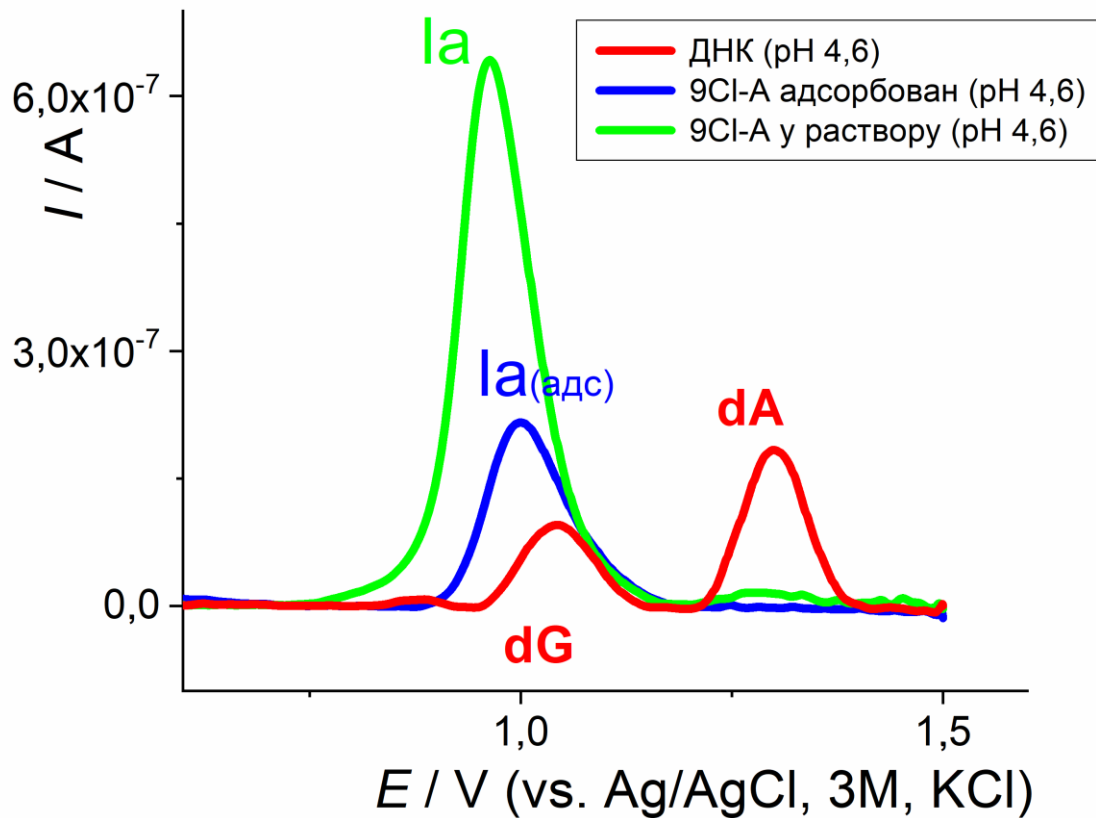
При рН 4,6, у ацетатном пуферу, SW волтамограм ДНК вишеслојног биосензора имао је два оксидациона пика који описују оксидацију дезоксигуанозина (dG) и дезоксиаденозина (dA) на потенцијалима 1,05 V и 1,30 V (**Слика 84**).

Примена електрохемијског ДНК биосензора омогућава праћење промене потенцијала и интензитета струје пикова који описују оксидацију база ДНК услед интеракције испитиваних једињења са ДНК.

Раније у литератури објављено је да неки деривати акридина могу да интерагују са ДНК, па се и за 9Cl-A може претпоставити да ће услед планарне структуре остварити интеракцију са ДНК.

Како би пре испитивања интеракције било утврђено да пикови који ће бити анализирани потичу искључиво од база ДНК или од 9Cl-A, SW волтамограм 9Cl-A био је снимљен на чистој

GCE под istim eksperimentalnim uslovima kao i kada je korišten senzor. Za tu svrhu, čista GCE bila je urožena u rastvor 9Cl-A koncentracije $1,0 \times 10^{-4}$ M u toku 5 minuta, nakon toga isprana je vodom i prebacena u elektrohemijsku ćeliју sa acetatnim puferom pH 4,6 gde je snimljen voltagram adsorbovanog 9Cl-A na površini elektrode. Na **Слици 85**, SW voltagram adsorbovanog 9Cl-A (плава линија) приказан је заједно са voltagрамом добијеним за rastvor 9Cl-A концентрације $1,0 \times 10^{-4}$ M (pH 4,6) (зелена линија). Може се уочити да оксидациони пик $I_{a(адс)}$ adsorbovanog 9Cl-A има мањи интензитет струје и померен је ка мало позитивнијим потенцијалима, што је и очекивано. Такође, уочено је да су вредности потенцијала пика који описује оксидацију дезоксигуанозина (dG) и потенцијала пика који описује оксидацију 9Cl-A ($I_{a(адс)}$) блиске и да ће вероватно приликом праћења интеракције 9Cl-A и ДНК доћи до суперпонирања ових пикова, те њихова анализа неће бити могућа. Под наведеним експерименталним uslovima, ни на једном од voltagрама није уочен други оксидациони пик 9Cl-A – Па, што указује на то да ће пик који описује оксидацију дезоксиаденозина (dA) моћи да буде анализиран са циљем праћења интеракције 9Cl-A и ДНК.



Слика 85. Кориговани SW voltagрамаи: (—) ДНК биосензора, pH 4,6; (—) 9Cl-A адсорбованог из раствора, pH 4,6; (—) раствора 9Cl-A концентрације 1×10^{-4} M, pH 4,6

Интеракција раствора 9Cl-A концентрације $1,0 \times 10^{-4}$ M у пуферу чија је pH вредност 4,6 са ДНК испитивана је након различитог времена инкубације раствора (5, 10 и 30 минута) како би било одређено оптимално време за испитивање интеракције.

Оксидациони пик 9Сl-А ($I_{a(адс)}$) и пик који потиче од дезоксигуанозина ДНК (dG) су се, као што је и очекивано, суперпонирали, па је интензитет струје пика на потенцијалу око 1,0 V већи од интензитета струја пикова када се појединачно испитују 9Сl-А и dG ДНК те не постоји могућност да се направи разлика између пика који потиче од 9Сl-А и оног који потиче од dG. Из тог разлога, за тумачење интеракције, значајне су само информације везане за пик који потиче од dA [20, 162], а запажено је да након интеракције интензитет (пика оксидације дезоксиаденозина, dA) опада.

Поређењем сигнала добијених након 5, 10 и 30 минута интеракције, уочено је да је након 30 минута најизраженије смањење интензитета струје пика dA ($\Delta I_p \approx 100 \text{ nA}$), и ово време искоришћено је као оптимално време за испитивање интеракције.

Са циљем потврде да је смањење интензитета струје пика dA последица интеракције ДНК са 9Сl-А, испитан је утицај основног електролита на сигнал који потиче од електрохемијског ДНК биосензора. Контролни ДНК биосензор инкубиран је у ацетатном пуферу чији је рН 4,6 у току 30 минута. Као што је и очекивано, нису утврђене промене на волтамограму који описује оксидацију дезоксигуанозина и дезоксиаденозина ДНК биосензора.

Смањење интензитета струје пика dA вероватно је резултат интеракције 9Сl-А са резидуама dA и формирања ДНК агрегата, као што је већ познато за друга једињења која интеркалирају [207].

Промене интензитета струје могу се представити као нормализована струја пика $d(dA)(\%)$, применом једначине (22).

Добијени резултати приказани су у **Табели 10**.

Нормализована струја пика је након 30 минута инкубације са раствором 9Сl-А концентрације $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ опала за више од 50% у поређењу са интензитетом струје пика пре интеракције.

Табела 10. 9Сl-А–ДНК интеракција представљена преко нормализоване струје SW волтаметријог пика dA за различита времена инкубације ($c_{9Сl-А} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$) [93]

$t_{\text{инкубације}} \text{ (min)}$	$d(dA) \text{ (\%)}$	$\Delta E_p \text{ (V)}$
5	89,25	0,016
10	70,61	0,016
30	48,45	0,018

Након интеракције 9Сl-А са ДНК, потенцијал пика dA померен је ка позитивнијим потенцијалима за 0,018 V (**Табела 10**), па се интеракција може окарактерисати као интеркалација [130, 131].

Циљ даљег истраживања био је да се одреди утицај концентрације раствора 9Сl-А на интеракцију, као и да се одреди најмања концентрација 9Сl-А при којој је могуће детектовати интеракцију између ДНК и 9Сl-А применом SWV.

Смањење интензитета струје пика dA коришћено је како би се испитао интензитет интеракције адсорбоване ДНК и различитих концентрација раствора 9Сl-А у опсегу од $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ до $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$. Волтамограми приказани на **Слици 86** представљају анодне одговоре који потичу од дезоксиаденозина, тј. промене сигнала dA са променом концентрације 9Сl-А након 30 минута интеракције. **Слика 87** приказује два опсега концентрација у којима је зависност интензитета струје пика dA од концентрације 9Сl-А линеарна. Нагло смањење интензитета струје пика при ниским концентрацијама 9Сl-А указује на интензивно формирање комплекса. Са порастом концентрације 9Сl-А, интензитет струје пика се стабилизује. У складу

са тим, добијене су линеарне зависности, представљене на **Слици 87**. Линеарне зависности описане су регресионим једначинама:

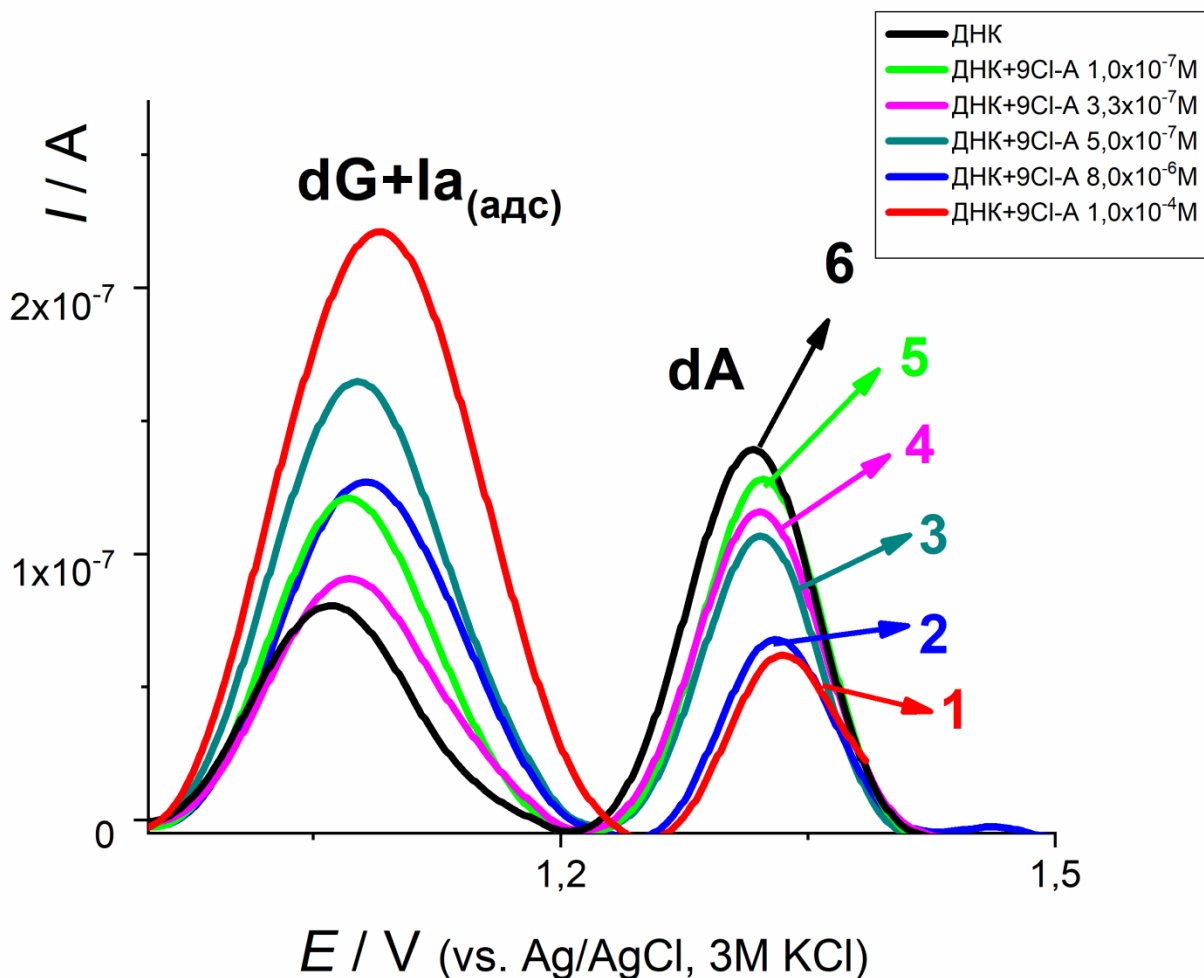
$$I_p \text{ (A)} = -0,038 c \text{ (M)} + 1,53 \times 10^{-7} \quad (r = 0,930) \quad (40)$$

за опсег концентрација 9Cl-A $1,0 \times 10^{-7} \text{ M} - 1,3 \times 10^{-6} \text{ M}$

и

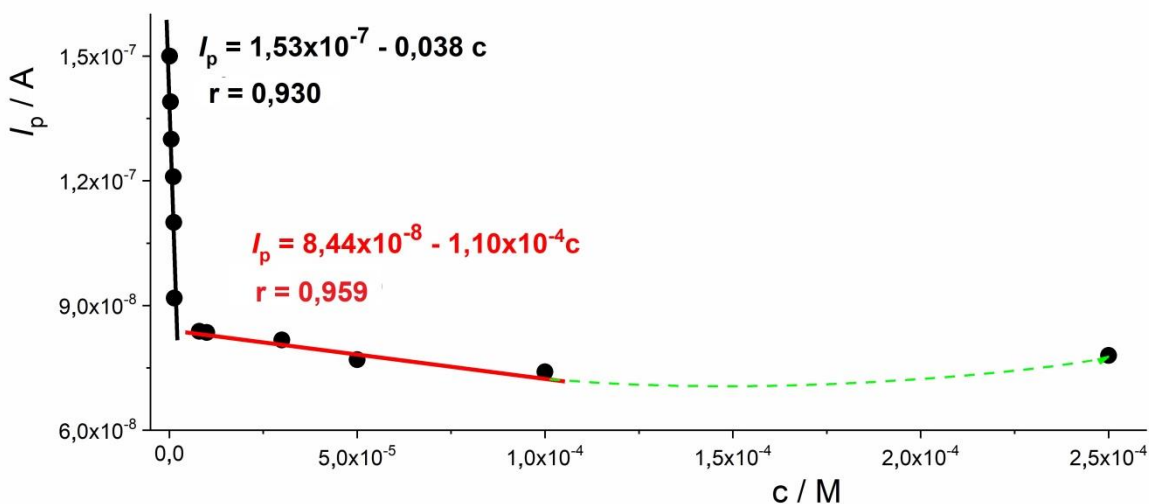
$$I_p \text{ (A)} = -1,1 \times 10^{-4} c \text{ (M)} + 8,44 \times 10^{-8} \quad (r = 0,959) \quad (41)$$

за опсег концентрација 9Cl-A $8,0 \times 10^{-6} \text{ M} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$.



Слика 86. Кориговани SW волтамограми након интеракције ДНК са различитим концентрацијама 9Cl-A : (—) $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, (—) $8 \times 10^{-6} \text{ M}$, (—) $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, (—) $3,3 \times 10^{-7} \text{ M}$, (—) $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, и (—) ДНК биосензор; pH 4,6; ($t_{\text{инкубације}} = 30 \text{ min}$)[93]

При концентрацијама 9Cl-A већим од $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, интензитет струје пика dA незнатно расте ($2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$), што може бити последица смањене способности 9Cl-A да при тим условима интерагује са ДНК [133].



Слика 87. Зависност интензитета струје пика dA (SWV) од концентрације раствора 9Cl-A у коме је вршена инкубација)[93]

Одређена је привидна константа везивања комплекса 9Cl-A–ДНК_{адс}, који настаје приликом инкубације раствора 9Cl-A и ДНК молекула адсорбованих на површини електроде (ДНК_{адс}). Концентрација ДНК на површини електроде била је константна док је у току експеримента повећавана концентрација раствора 9Cl-A. Претпостављено је да се процес комплексирања може представити равнотежном реакцијом (VI):



и одговарајућом константом равнотеже, према једначини (23):

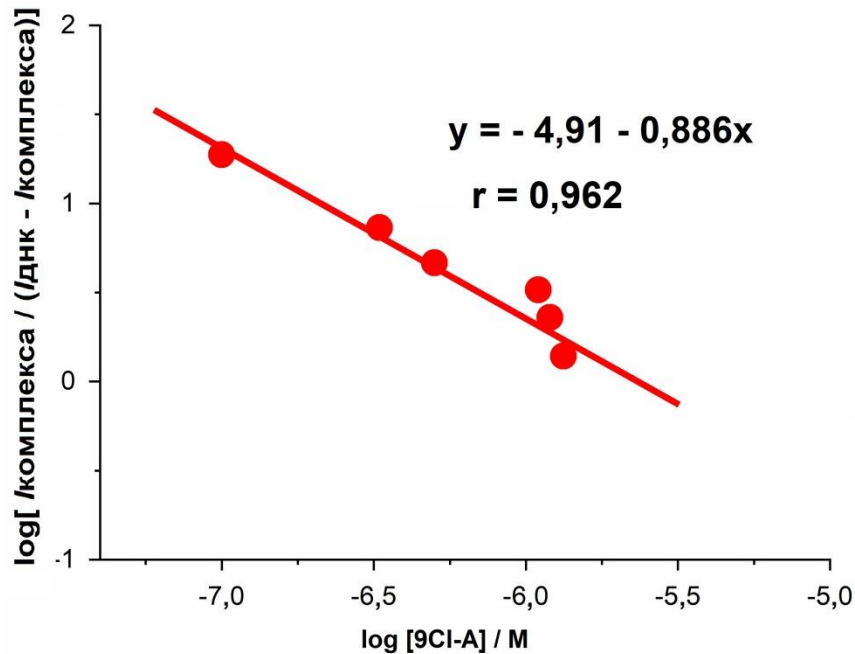
$$K = \frac{[(9\text{Cl-A})_n\text{-ДНК}_{\text{адс}}]}{[\text{ДНК}_{\text{адс}}][9\text{Cl-A}]^n} \quad (42)$$

На основу разматрања приказаног у поглављу 1.6.2., константа формирања комплекса може се повезати са интензитетима волтаметријских пикова применом једначине (43), написане према једначини (29):

$$\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right] = n \log K + n \log [9\text{Cl-A}] \quad (43)$$

где $I_{\text{ДНК}}$ представља интензитет струје пика dA адсорбоване ДНК у одсуству 9Cl-A, а $I_{\text{КОМПЛЕКСА}}$ интензитет струје пика dA при различитим концентрацијама 9Cl-A са којима адсорбована ДНК формира комплекс. На основу добијених вредности за нагиб ($n = 0,886 \approx 1$) и одсечак линеарне зависности $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log [9\text{Cl-A}]$ (Слика 88), одређена је константа формирања комплекса (константа везивања ДНК и 9Cl-A) који је адсорбован на површини електроде,

$K = 3,45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Добијена константа упоредива је са константама које одговарају једињењима која интеркалирају, а вредности су у опсегу $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$ [140, 208, 209] и добијене су применом електрохемијских или спектроскопских метода за комплексе који се формирају у раствору. Добијена вредност K , већа је од вредности константе везивања акридин-оранжа који интеркалира између база ДНК ($K_{AO} = 2,69 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), а која је добијена применом спектроскопских метода у неутралном раствору [45], што може бити објашњено олакшаном интеракцијом компонената када је ДНК адсорбована на површини електроде.



Слика 88. Зависност $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log [9\text{Cl-A}]$ [93]

Одређена константа везивања приликом формирања комплекса адсорбоване ДНК и 9Cl-A, употребљена је за израчунавање промене Гибсове слободне енергије (ΔG), што представља меру стабилности формираног комплекса. Гибсова слободна енергија израчуната је применом једначине 30.

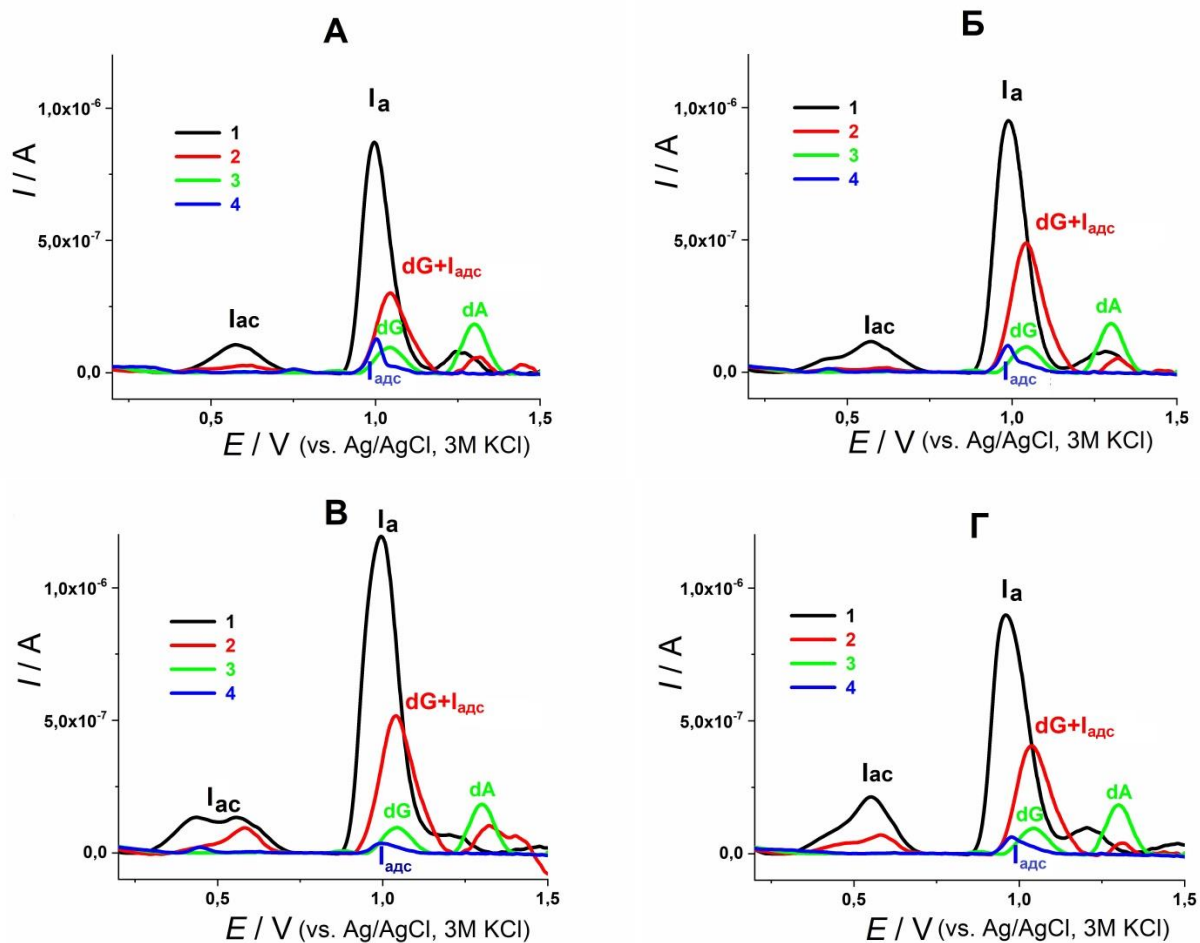
Сви експерименти изведени су на собној температури, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, а израчуната вредност промене Гибсове слободне енергије је: $\Delta G = -31,55 \text{ kJ mol}^{-1}$. Негативна вредност ΔG потврдила је спонтаност процеса приликом одигравања реакције на површини електроде између адсорбоване ДНК и 9Cl-A [142].

Најнижа концентрација 9Cl-A чију интеракцију са ДНК је било могуће детектовати применом SWV била је $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$. Ови резултати потврдили су већу осетљивост SWV као значајну предност у поређењу са другим волтаметријским техникама [93].

4.6.10. Испитивање интеракције најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК применом електрохемијског ДНК биосензора

Интеракција између најактивнијих АДА и ДНК испитивана је применом ДНК електрохемијског биосензора, који се састоји од GCE на чију је површину нането три капи ДНК ($5 \mu\text{L}$, $73,95 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Како би пре испитивања интеракције најактивнијих АДА са ДНК било утврђено да ли пикови потичу само од база ДНК, једињења, или постоји преклапање пикова, SW волтаметрија примењена је за испитивање електрохемијског понашања најактивнијих АДА и то у раствору, након адсорпције на чистој електроди и након интеракције у току 30 минута са ДНК у ацетатном пуферу (pH 4,6). Поред наведеног је снимљен и SW волтамограм биосензора инкубираног само у ацетатном пуферу (контрола) (Слика 89).



Слика 89. Кориговани SW волтамограми деривата акридина: А) једињења 6; Б) једињења 7; В) једињења 8 и Г) једињења 9.

крива 1 (—) снимљена у раствору деривата акридина концентрације $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, од $-1,4 \text{ V}$ до $+1,5 \text{ V}$; крива 2 (—) након 30 минута инкубације ДНК/GCE у раствору деривата акридина концентрације $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$; крива 3 (—) након инкубације биосензора ДНК/GCE у ацетатном пуферу pH 4,6 у току 30 минута; крива 4 (—) након инкубације GCE у раствору деривата акридина концентрације $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ у току 30 минута

Након инкубације ДНК која је адсорбована на површини електроде у раствору најактивнијих АДА или у пуферу, електрода је пребачена у ацетатни пуфер (рН 4,6; I 0,1 М) и волтамограми су снимљени при следећим условима: $f = 25 \text{ Hz}$, $E_s = 1 \text{ mV}$, амплитуда пулса 5 mV ; $v_{\text{eff}} = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Као што је већ наведено у делу 4.6.6., на SW волтамограмима најактивнијих АДА након адсорпције на чистој електроди која је била уроњена у растворе истих у току 30 минута, може се уочити само пик $I_{\text{адс}}$. Интензитет струје пика $I_{\text{адс}}$ је мали, а потенцијал је за 3 до 7 mV померен ка позитивнијим вредностима у односу на пик I_a који се може уочити на SW волтамограмима истих једињења који су снимани из раствора најактивнијих АДА (Слика 89). Под истим експерименталним условима, пик I_a није уочен.

Након интеракције најактивнијих АДА са ДНК, уместо раздвојених пикова dG и $I_{\text{адс}}$, само један пик на око 1,04 V је уочен, што је довело до повећања интензитета струје. Овај пик обележен је као $(dG+I_{\text{адс}})$, с обзиром да на интензитет струје утиче оксидација обе електроактивне врсте, дезоксигуанозина и одређеног деривата акридина који интерагује са ДНК на површини електроде. Резултати нису показали да постоји веза између повећања интензитета струје и концентрације деривата акридина у раствору. Такво понашање вероватно је последица чињенице да електроактивне врсте учествују са различитим, неједнаким утицајем на интензитет струје. Услед суперпонирања (преклапања ова два пика) подаци о пику $dG+I_{\text{адс}}$ нису коришћени за тумачење интеракције деривата акридина и ДНК.

Значајно већа висина пика $dG+I_{\text{адс}}$ након интеракције у поређењу са вредностима добијеним када је чиста електрода уроњена у раствор деривата акридина, а након тога испрана и пребачена у раствор основног електролита где је вршено снимање волтамограма ($I_{\text{адс}}$), потврђује да је остварена интеракција и да су молекули деривата акридина инкорпорирани у слој ДНК, што је омогућило лакши пренос електрона. Из наведених разлога, али и појаве да пик I_a најактивнијих АДА под примењеним експерименталним условима није уочен, квантитативна анализа пика $dG+I_{\text{адс}}$ није могућа, и за испитивање интеракције најактивнијих АДА и ДНК коришћен је само пик dA , тј. подаци о потенцијалу и интензитету струје пика dA .

Важан параметар приликом анализе интеракције је трајање инкубације. Утицај времена инкубације испитиван је за једињење 7, при концентрацији $2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$. Време инкубације било је 10, 20, 30 и 60 минута. Смањење пика dA коришћено је за анализу интеракције, а промена интензитета струје представљена је као нормализована струја пика $d(dA)(\%)$ у Табели 11, применом једначине (22).

Табела 11. Интеракција једињења 7 и ДНК, представљена преко нормализоване струје SW волтаметријог пика dA за различита времена инкубације ($c_7 = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$)[137]

$t_{\text{инкубације}} \text{ (min)}$	$d(dA)(\%)$
10	85,1
20	50,3
30	26,5
60	28,7

Након 30 минута инкубације, нормализована струја пика имала је најмању вредност и ово време је коришћено као оптимално време за испитивање интеракције једињења 7, али и осталих најактивнијих АДА са ДНК. Ови резултати у складу су и са добијеним резултатима за прекурсор, 9Cl-A.

Како је већ објашњено у делу 4.6.8., након инкубације биосензора у ацетатном пуферу, (pH 4,6; I 0,1 M) у току 30 минута (**Слика 89**, (—)), није уочена промена потенцијала ни интензитета струје пикова dA и dG. На основу ових резултата, може се претпоставити да приликом испитивања интеракције најактивнијих АДА и ДНК промене потенцијала и интензитета струје пикова који описују оксидацију dA и dG представљају последицу само интеракције најактивнијих АДА са ДНК.

Након инкубирања најактивнијих АДА (сваки раствор једињења био је концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ M) са ДНК у току 30 минута и снимања волтамограма у ацетатном пуферу (pH 4,6, I 0,1 M) примећено је значајно смањење интензитета струје пика dA што указује на интеракцију. Може се претпоставити да је АДА – ДНК интеракција праћена смањењем могућности да се остаци аденозина оксидују, вероватно услед присуства молекула најактивнијих АДА који законе остатке аденозина. Као што се може приметити на **Слици 89** (—), овакво понашање је присутно код свих једињења, при чему је најизраженије за једињења 7 и 9.

Осим што интензитет струје пика dA опада, померање ка позитивнијим потенцијалима од 11 mV до 15 mV оксидационог пика dA уочено је након инкубирања у раствору деривата акридина (**Табела 12**).

Промена положаја пика dA потврђује да је остварена интеракција између имобилизоване ДНК на површини електроде и деривата акридина, док померање ка позитивнијим потенцијалима указује да је највероватније тип остварене интеракције интеркалација [112], што је показано и за 9Cl-A.

Интеракција се може представити помоћу нормализоване вредности интензитета струје пика dA [91, 189, 190] применом једначине (22), где $I_{p,dA}$ и $I_{p0,dA}$ представљају интензитета струје пика dA после и пре интеракције са најактивнијим АДА. Нормализоване вредности интензитета струје за најактивније АДА након 30 минута интеракције, одређене применом једначине (22), приказане су у **Табели 12**. Нормализоване вредности интензитета струје налазе се између 22 % за једињење 7 и 67% за једињење 8. Тако ниске вредности за једињење 7 указују на најинтензивнију интеракцију са ДНК у поређењу са другим најактивнијим АДА [133]. Нормализоване вредности интензитета струје за једињења 9 и 6 су између 32 % и 35%, што представља задовољавајуће резултате, у поређењу са умереном активношћу за једињење 8 за које је вредност била 67% [137].

Табела 12. Промена потенцијала и нормализовани интензитет струје за пик dA, након интеракције најактивнијих АДА са ДНК (подаци добијени применом SWV)

Деривати акридина	Интеракција са ДНК	
	ΔE_p (V) ($E_{p0,dA} = 1,301$ V)	d(dA) (%)
6	0,015	35,22
7	0,014	21,75
8	0,011	66,77
9	0,015	31,61

На волтамограмима снимљеним након инкубације и интеракције (**Слика 89** (А-Г) црвене криве) могу се уочити и пикови велике ширине на потенцијалима 0,4 – 0,6 V који описују оксидацију деривата акридина који се налазе у ДНК филму формираном на површини електроде. Широки пик између 0,4 V и 0,6 V (пик Iac) снимљен након интеракције између деривата акридина и ДНК био је присутан само када је снимање вршено од негативних

потенцијала, тј. од $-1,4$ V, а био је одсутан када је снимање вршено од 0 V. Ово је потврђено и резултатима добијеним применом CV, DPV и SWV техника за испитивање најактивнијих АДА (Слике 66-69, 79). Пик I_{ас} је вероватно последица оксидације производа редукције деривата акридина који се формира на површини електроде, а у унутрашњости слоја ДНК, када је изложен негативним потенцијалима.

Ови резултати такође указују на то да пик I_{ас} не потиче од формираних 8-оксо-dG или 2,8-DНА, тј. не потиче од производа оксидативног оштећења остатака гуанина или аденина услед стварања реактивних кисеоничних врста [166, 113-115] под наведеним експерименталним условима. Ово потврђује и податак да је оксидативно оштећење праћено повећањем интензитета струје пикова dG и dA услед раздвајања двоструког хеликса дволанчане ДНК и већег излагања остатака гуанина и аденина површини електроде. У случају испитиваних деривата акридина, интензитет струје пика dA опада значајно након излагања најактивнијим синтетисаним аминокиселинским дериватима акридина.

4.6.10.1. Концентрациони профил најактивнијих аминокиселинских деривата акридина добијен применом волтаметрије правоугаоних таласа и електрохемијског биосензора

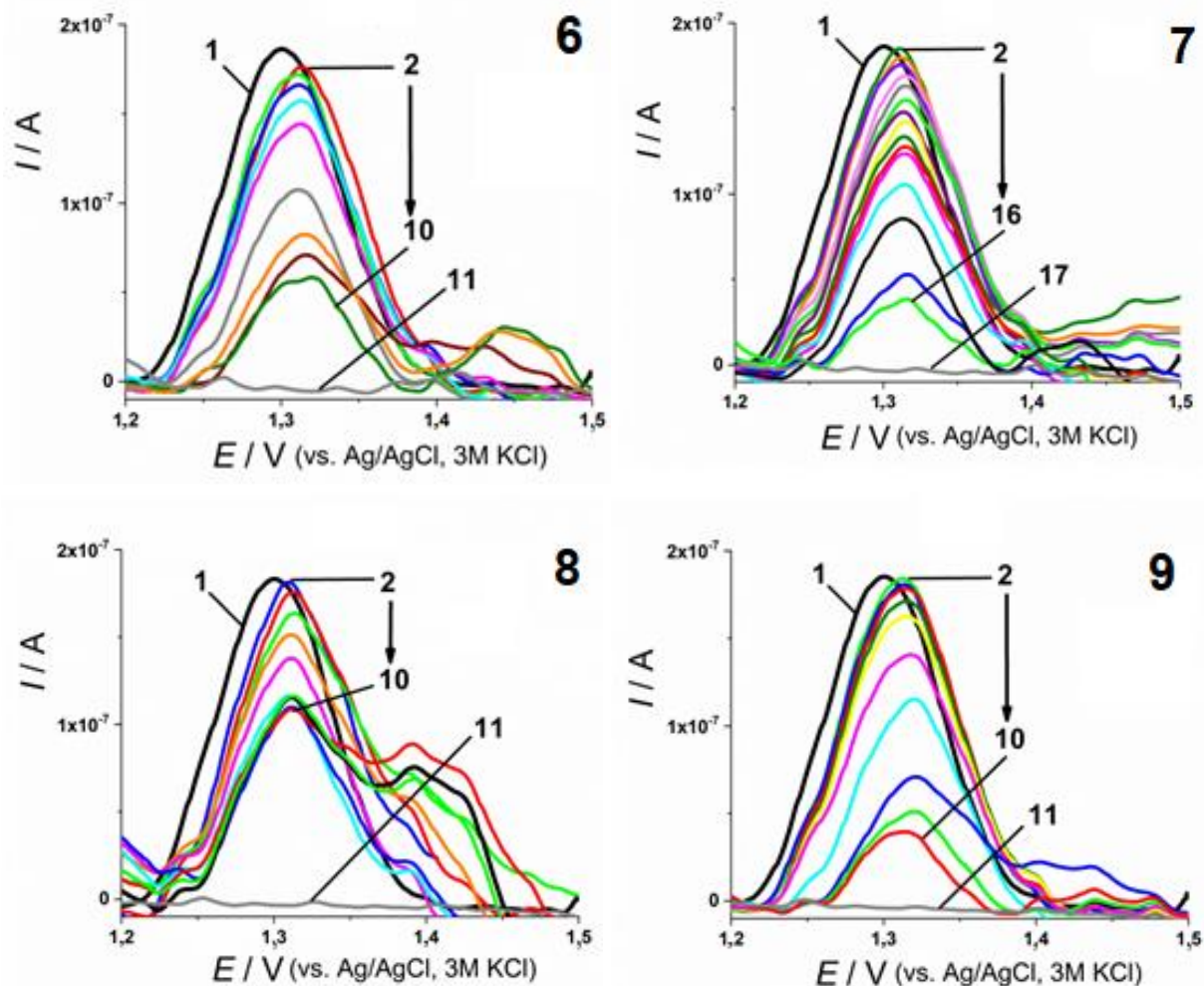
ДНК електрохемијски биосензор примењен је да се испита концентрациони профил најактивнијих АДА како би била одређена најнижа концентрација најактивнијих АДА чија се интеракција са ДНК може пратити електрохемијски под одабраним експерименталним условима (Слика 90).

Поређењем најактивнијих АДА, једињење 7 је имало највећи опсег концентрација при којима може да интерагује са ДНК [137]. Смањење интензитета струје пика dA детектовано је при концентрацији једињења 7 у опсегу од 1×10^{-7} М до $2,5 \times 10^{-4}$ М (Слика 90).

За сваку концентрацију, нови ДНК биосензор је припреман и уроњен у ацетатни пуфер (рН 4,6; I 0,1 М) са различитим концентрацијама једињења 7, у току 30 минута.

SW волтамограми снимљени су након трансфера електроде у нови основни електролит, претходно третиран азотом како би био уклоњен растворени кисеоник. Како би било потврђено да SW пик на потенцијалу + 1,3 V потиче потпуно од оксидације дезоксиаденозина (dA), извршено је контролно снимање. Контрола је изведена тако што је чиста електрода (уместо ДНК сензора) била уроњена у току 30 минута у раствор једињења 7 највеће концентрације, под истим експерименталним условима. На Слици 90, крива 17 приказан је SW волтамограм контроле; на снимку нема сигнала који потиче од једињења 7. Исто понашање примењено је и код осталих деривата акридина (Слика 90, 6, 8, 9 криве 11).

Са повећањем концентрације једињења 7 смањење интензитета струје пика dA је уочено, док је потенцијал пика померен ка позитивнијим вредностима. Интензитет струје пика dA опада нагло при ниским концентрацијама једињења 7. При концентрацији реда величине 10^{-5} М и већим, висине пикова значајно мање опадају и интензитет струје се постепено устаљује. Смањење интензитета струје пика dA са променом концентрације једињења 7 приказано је на Слици 91. Уочавају се три области. Прве две области концентрација, I (1×10^{-7} М – 9×10^{-7} М) и II (1×10^{-6} М – 5×10^{-6} М) су линеарне зависности са различитим нагибима, док је у трећој области, при концентрацијама већим од 5×10^{-6} М уочено мање смањење интензитета струје са порастом концентрације једињења 7 [137].



Слика 90. Кориговани SW волтамограми ДНК биосензора након интеракције са различитим концентрацијама најактивнијих АДА

6 1) ДНК биосензор 2) 2×10^{-7} М 3) 4×10^{-7} М 4) $1,6 \times 10^{-6}$ М 5) $5,7 \times 10^{-6}$ М 6) $8,0 \times 10^{-6}$ М
7 1) ДНК биосензор 2) 1×10^{-7} М 3) 3×10^{-7} М 4) $4,5 \times 10^{-7}$ М 5) $5,6 \times 10^{-7}$ М 6) $6,2 \times 10^{-7}$ М
8 1) ДНК биосензор 2) 1×10^{-5} М 3) $1,5 \times 10^{-5}$ М 4) $3,4 \times 10^{-5}$ М 5) $4,5 \times 10^{-5}$ М 6) $6,8 \times 10^{-5}$ М
9 1) ДНК биосензор 2) 6×10^{-7} М 3) $7,5 \times 10^{-7}$ М 4) 1×10^{-6} М 5) $1,8 \times 10^{-6}$ М 6) $3,7 \times 10^{-6}$ М
 7) $7,5 \times 10^{-6}$ М 8) $5,0 \times 10^{-5}$ М 9) $1,00 \times 10^{-4}$ М 10) $2,4 \times 10^{-4}$ М 11) SW волтамограм снимљен након 30 минута инкубације чисте GCE у раствору једињења 6 концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М.
 7) $9,2 \times 10^{-7}$ М 8) $1,9 \times 10^{-6}$ М 9) $3,1 \times 10^{-6}$ М 10) $4,4 \times 10^{-6}$ М 11) $5,3 \times 10^{-6}$ М 12) 10×10^{-6} М
 13) $2,5 \times 10^{-5}$ М 14) $6,5 \times 10^{-5}$ М 15) $1,00 \times 10^{-4}$ М 16) $2,50 \times 10^{-4}$ М 17) SW волтамограм снимљен након 30 минута инкубације чисте GCE у раствору једињења 7 концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М.
 8) 1) ДНК биосензор 2) 1×10^{-5} М 3) $1,5 \times 10^{-5}$ М 4) $3,4 \times 10^{-5}$ М 5) $4,5 \times 10^{-5}$ М 6) $6,8 \times 10^{-5}$ М
 7) $3,40 \times 10^{-4}$ М 8) $4,80 \times 10^{-4}$ М 9) $1,00 \times 10^{-4}$ М 10) $2,4 \times 10^{-4}$ М 11) SW волтамограм снимљен након 30 минута инкубације чисте GCE у раствору једињења 8 концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М.
 9) 1) ДНК биосензор 2) 6×10^{-7} М 3) $7,5 \times 10^{-7}$ М 4) 1×10^{-6} М 5) $1,8 \times 10^{-6}$ М 6) $3,7 \times 10^{-6}$ М
 7) $7,5 \times 10^{-6}$ М 8) $5,0 \times 10^{-5}$ М 9) $1,00 \times 10^{-4}$ М 10) $2,4 \times 10^{-4}$ М 11) SW волтамограм снимљен након 30 минута инкубације чисте GCE у раствору једињења 9 концентрације $2,4 \times 10^{-4}$ М [137]

Параметри регресионе једначине која описује зависност интензитета струје од концентрације представљени су у Табели 13. Граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ) за једињење 7 помоћу GC модификоване електроде са ДНК израчунати су применом једначина:

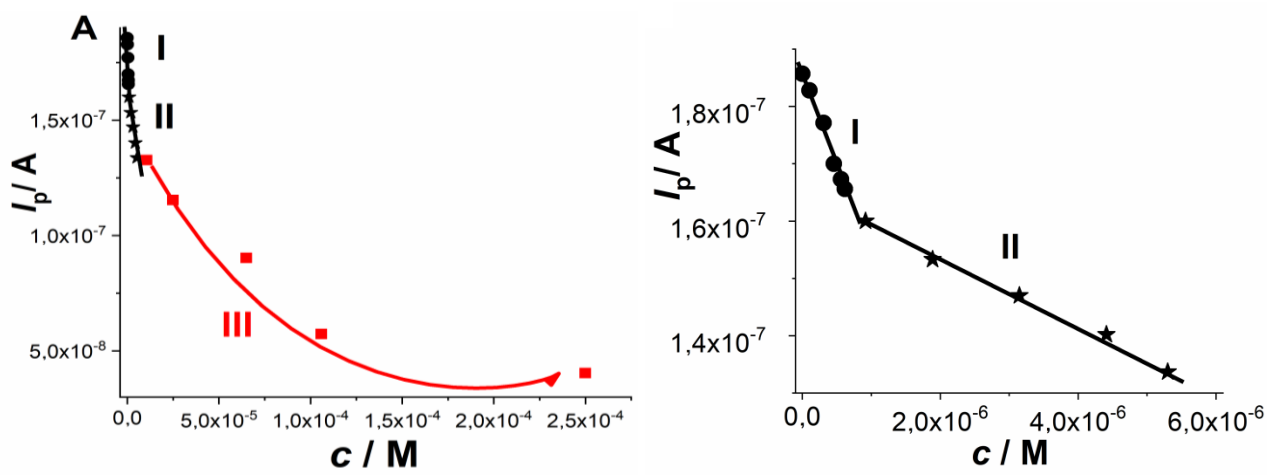
$$LOD = \frac{3S_a}{b} \quad (44)$$

и

$$LOQ = \frac{10S_a}{b} \quad (45)$$

где S_a представља стандардну девијацију одсечка, а b је нагиб регресионе једначине. Статистички подаци регресионе једначине представљени су у Табели 13.

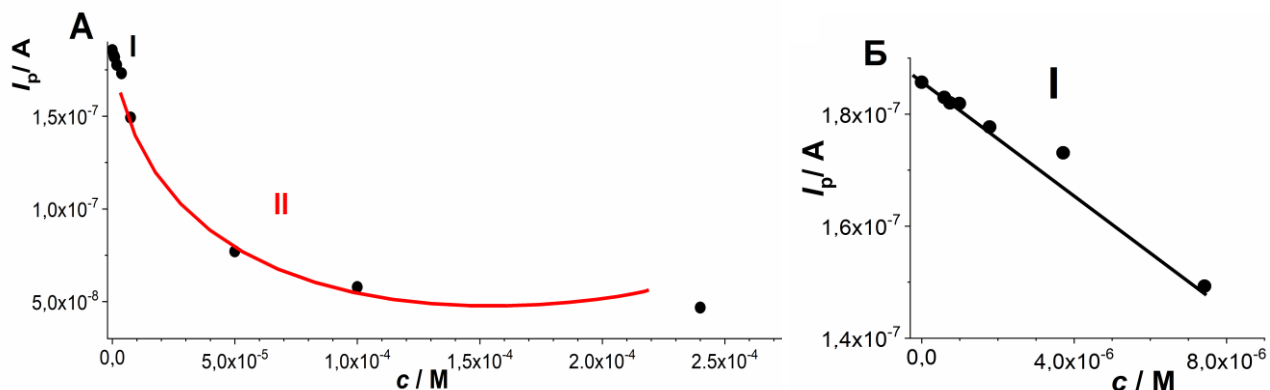
Израчунате LOD и LOQ вредности за једињење 7, за I област концентрација где постоји линеарна зависност, биле су $5,39 \times 10^{-8}$ M и $1,80 \times 10^{-7}$ M. Тако мале вредности концентрације једињења 7 при којима је могућа интеракција са ДНК потврда су могућности једињења 7 да снажно интерагује са ДНК. Два линеарна опсега концентрација са различитим нагибима указују на различит афинитет ка ДНК адсорбованој на површини електроде. Нагиб за област I је скоро шест пута већи од нагиба за област II, што утиче на вредности LOD и LOQ. У области II (1×10^{-6} M – 5×10^{-6} M), одређене су вредности границе детекције и квантификације које износе $LOD = 3,75 \times 10^{-7}$ M, и $LOQ = 1,25 \times 10^{-6}$ M [137].



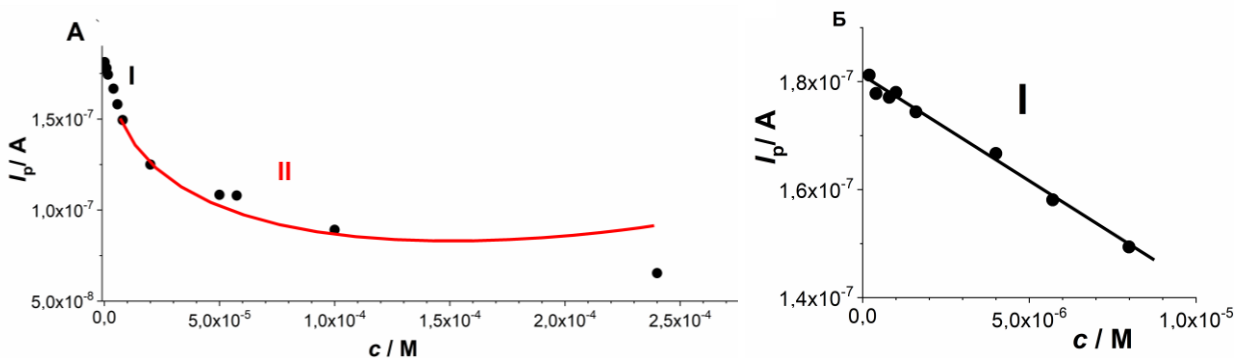
Слика 91. А) Зависност интензитета струје пика dA од концентрације раствора једињења 7 у коме је вршена инкубација. Б) Два опсега линеарне зависности интензитета струје пика од концентрације за опсег концентрација I: 1×10^{-7} M – 9×10^{-7} M; и II: 1×10^{-6} M – 5×10^{-6} M [137]

Синтетисани деривати акридина 9 и 6 показали су сличне концентрационе профиле. Брзо смањење струје пика dA било је уочено за концентрацију једињења 6 у опсегу 2×10^{-7} M – 8×10^{-6} M и праћено је мањим смањењем од концентрације 1×10^{-5} M (Слика 90, 6). У случају једињења 9 (Слика 90, 9), нешто већа концентрација овог једињења утицала је на промену интензитета струје пика dA која се може детектовати, али је и овде изједначавање интензитета струје уочено при концентрацијама већим од 1×10^{-5} M (Табела 13). Вредности

нагиба су сличне за оба једињења, око $0,004 \text{ A M}^{-1}$, а одговарајуће вредности LOD биле су $4,27 \times 10^{-7} \text{ M}$ за једињење 6 и $7,03 \times 10^{-7} \text{ M}$ за једињење 9 [137]. Концентрациони профили за ове деривате приказани су на **Сликама 92 и 93**.



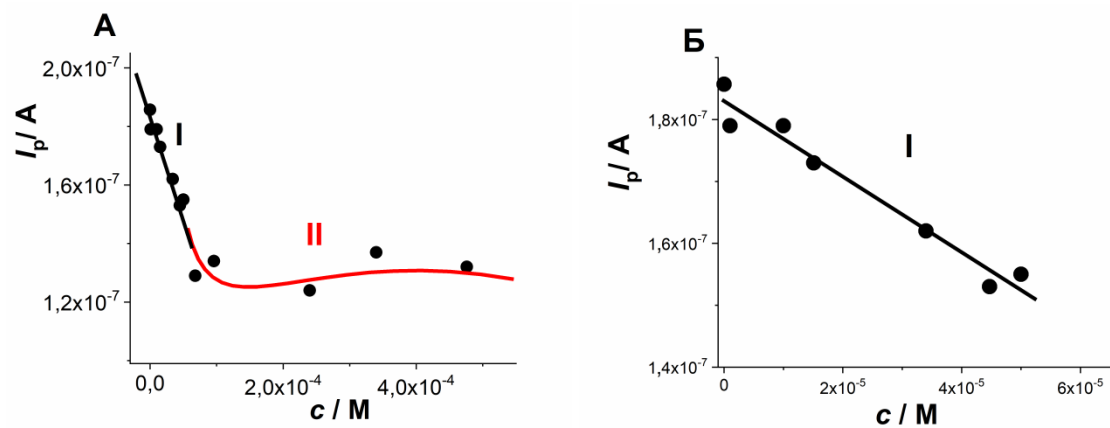
Слика 92. А) Зависност интензитета струје пика dA од концентрације раствора једињења 6 у коме је вршена инкубација.; Б) Линеарна зависност интензитета струје пика dA за опсег концентрација једињења 6: $2 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-6} \text{ M}$ [137]



Слика 93. А) Зависност интензитета струје пика dA од концентрације раствора једињења 9 у коме је вршена инкубација; Б) Линеарна зависност интензитета струје пика dA за опсег концентрација једињења 9: $6 \times 10^{-7} - 7,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ [137]

За једињење 8 експерименти су показали да је потребна значајно већа концентрација, у поређењу са осталим једињењима, како би се уочила интеракција са ДНК (**Слика 90, 8**). Линеарно смањење интензитета струје пика dA са порастом концентрације једињења 8 уочено је у опсегу концентрација $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, са око десет пута мањим нагибом него код осталих једињења. LOD и LOQ били су већи, $7,26 \times 10^{-6} \text{ M}$ и $2,42 \times 10^{-5} \text{ M}$. За концентрације веће од $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, не може се уочити линеарна зависност (**Слика 94**) [137]. Подаци из регресионе једначине приказани су у **Табели 13**.

Најбољи резултати добијени су за једињење 7, указујући на највећу способност интеркалације. LOD и LOQ вредности потврдиле су осетљивост експеримената [137].



Слика 94. А) Зависност интензитета струје пика dA од концентрације раствора једињења 8 у коме је вршена инкубација. Б) Линеарна зависност интензитета струје пика dA за опсег концентрација: $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$ М [137]

Табела 13. Статистички подаци за регресионе једначине, за квантификацију једињења 6, 7, 8 и 9 применом ДНК биосензора на GCE, SWV техником [137]

Подаци	најактивнији АДА			
	6	7	8	9
Линеарни опсег (M)	$2 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7} - 9 \times 10^{-7}$ $1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-6}$	(I) (II)	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$ $6 \times 10^{-7} - 7,5 \times 10^{-6}$
Регресиона једначина $y = I$ (A); $x = c$ (M)	$y = -0,0039x + 1,81 \times 10^{-7}$	$y = -0,033x + 1,86 \times 10^{-7}$ (I) $y = -0,0058x + 1,65 \times 10^{-7}$ (II)	$y = -0,00065x + 1,85 \times 10^{-7}$	$y = -0,0047x + 1,86 \times 10^{-7}$
Број тачака	8	6 5	(I) (II)	7
Нагиб (AM⁻¹)	-0,00392	-0,03345 -0,0058	(I) (II)	-0,000653 -0,00474
Одсечак (A)	$1,80954 \times 10^{-7}$	$1,86162 \times 10^{-7}$ $1,65013 \times 10^{-7}$	(I) (II)	$1,84681 \times 10^{-7}$ $1,86414 \times 10^{-7}$
Коефицијент корелације	-0,9959	-0,9962 -0,9981	(I) (II)	-0,9885 -0,9872
S.D. нагиба (A M⁻¹)	$1,46 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-3}$ $2,06 \times 10^{-4}$	(I) (II)	$4,99 \times 10^{-5}$ $3,42 \times 10^{-4}$
S.D. одсечка (A)	$5,58 \times 10^{-10}$	$6,01 \times 10^{-10}$ $7,25 \times 10^{-10}$	(I) (II)	$1,58 \times 10^{-9}$ $1,11 \times 10^{-9}$
SD (A)	$1,11 \times 10^{-9}$	$8,18 \times 10^{-10}$ $7,37 \times 10^{-10}$	(I) (II)	$2,25 \times 10^{-9}$ $2,18 \times 10^{-9}$
LOD (M)	$4,27 \times 10^{-7}$	$5,39 \times 10^{-8}$ $3,75 \times 10^{-7}$	(I) (II)	$7,26 \times 10^{-6}$ $7,03 \times 10^{-7}$
LOQ (M)	$1,42 \times 10^{-6}$	$1,80 \times 10^{-7}$ $1,25 \times 10^{-6}$	(I) (II)	$2,42 \times 10^{-5}$ $2,34 \times 10^{-6}$

4.6.10.2. Одређивање константи везивања најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК

Може се претпоставити да се приликом интеракције између молекула аминокиселинских деривата акридина и ДНК адсорбоване на површини електроде формира комплекс. Концентрација ДНК адсорбоване на електроди увек је у експериментима била иста, док се концентрација раствора најактивнијих АДА мењала. Како би била одређена стехиометрија и константе везивања, примењена је конвенционална равнотежна реакција у току које настаје комплекс, према реакцији (VII):



где су равнотежне концентрације појединачних компонената посматране као део укупне концентрације у реакционој смеси: $[\text{ДНК}_{\text{адс}}] = c(\text{ДНК}_{\text{адс}}) - [(\text{АДА})_n\text{-ДНК}_{\text{адс}}]$ и $[\text{АДА}] = c(\text{АДА}) - [(\text{АДА})_n\text{-ДНК}_{\text{адс}}]$.

Са циљем испитивања формираног комплекса који је адсорбован на електроди и одређивања привидне константе везивања, модификована је стандардна процедура титрације [138] и константа равнотеже (K) одређена је применом једначине (46) изведене из једначине (23), као и приликом испитивања интеракције 9С1-А са ДНК:

$$K = \frac{[(\text{АДА})_n\text{-ДНК}_{\text{адс}}]}{[\text{ДНК}_{\text{адс}}][\text{АДА}]^n} \quad (46)$$

где n представља моларни однос најактивнијих АДА који реагују са моларном количином ДНК [140].

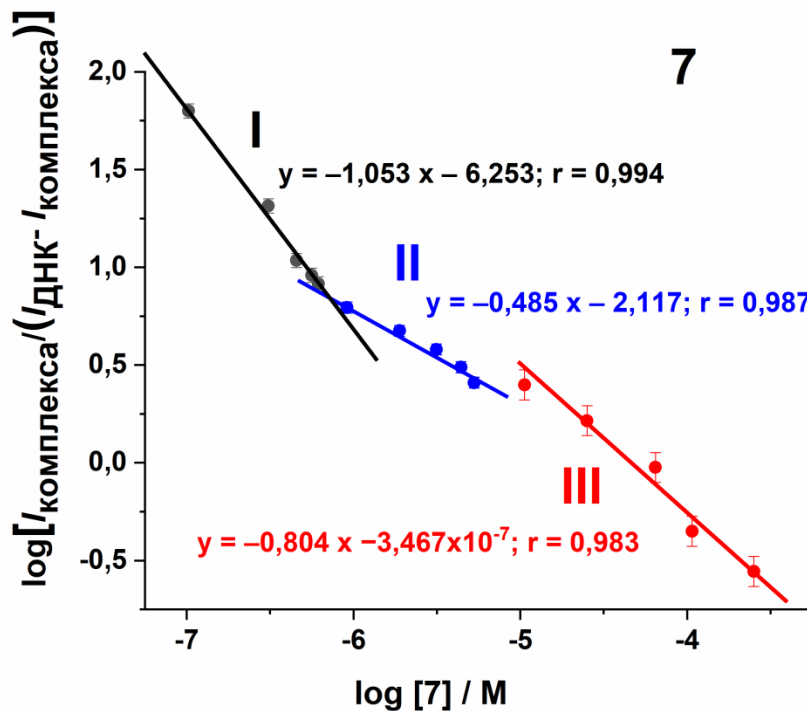
Након трансформације претходне једначине, добија се следећа једначина:

$$\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right] = n \log K + n \log [\text{АДА}] \quad (47)$$

где $I_{\text{ДНК}}$ и $I_{\text{КОМПЛЕКСА}}$ представљају интензитете струје пика dA у одсуству најактивнијих АДА и у присуству различитих концентрација најактивнијих АДА које учествују у формирању комплекса АДА-ДНК. Према једначини (47) вредности константи везивања компонената приликом формирања комплекса адсорбованог на површини електроде могу бити одређене, и то коришћењем вредности нагиба (n) и одсечка ($n \log K$) из линеарне зависности $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ vs. $\log [\text{АДА}]$. За једињење 7, које интерагује са ДНК у највећем концентрационом опсегу, могу се уочити три опсега линеарности. Може се претпоставити да се формира више од једног комплекса, узимајући у обзир различите нагибе [139].

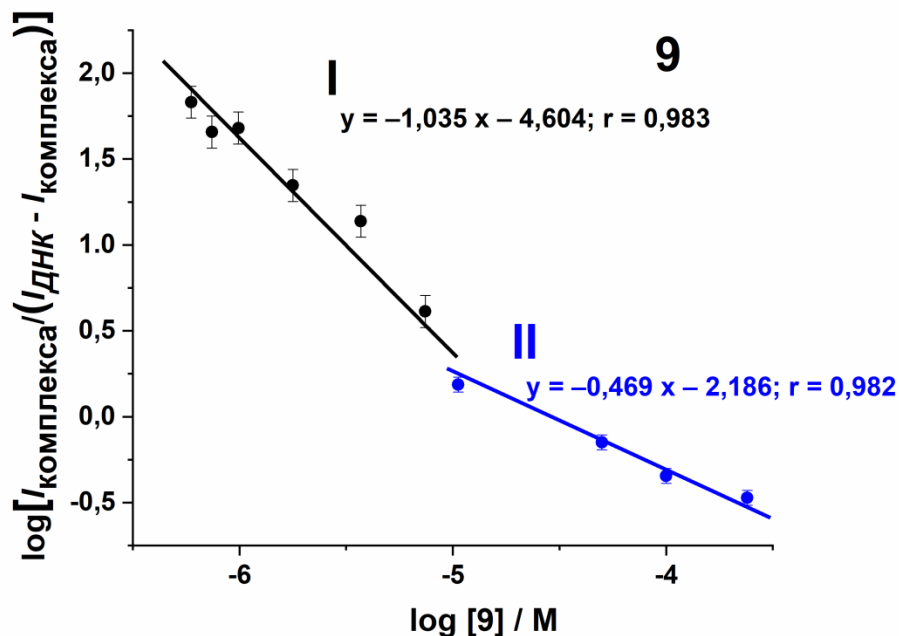
Како је приказано на **Слици 95**, линеарни опсег I, који одговара најнижим концентрацијама једињења 7 има нагиб $n = 1,053$ што указује на моларни однос 1:1. Вредност нагиба искоришћена је, заједно са одсечком, како би била израчуната константа везивања, чија вредност износи $8,68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Ова вредност блиска је вредности 10^6 M^{-1} и указује на јако везивање. Са повећањем концентрације једињења 7 у раствору у коме се врши инкубација, вредност нагиба зависности $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log [7]$ која је линеарна у опсегу II, износи

$n = 0,485$ ($n \approx 0,5$) што имплицира моларни однос 1:2 и утиче на вредност константе везивања, која за овај опсег износи $2,31 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. У III линеарном опсегу, вредност нагиба опет је била блиска јединици ($n = 0,804$), али константа везивања имала је још нижу вредност ($K = 2,05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Ови резултати систематизовани су у Табели 14 и указују да једињење 7 формира стабилне комплексе са ДНК, али се карактеристике везивања мењају са концентрацијом овог једињења. Може се претпоставити да се ниске концентрације једињења 7 лакше инкорпорирају између база ДНК под примењеним експерименталним условима. Поред тога може се претпоставити да је промена морфологије слоја ДНК изазвана интеракцијом са једињењем 7 била термодинамички вероватнија при нижим концентрацијама (што потврђује и одређена вредност промене Гибсове слободне енергије, ΔG). Смањење K , са порастом концентрације једињења 7 може бити последица промене оријентације, репулзије, „блокирања“ база ДНК или других процеса који базе чине мање доступним за интеракцију.



Слика 95. Зависност $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log [7]$ коришћена за одређивање константе везивања приликом формирања комплекса 7–ДНК. [137]

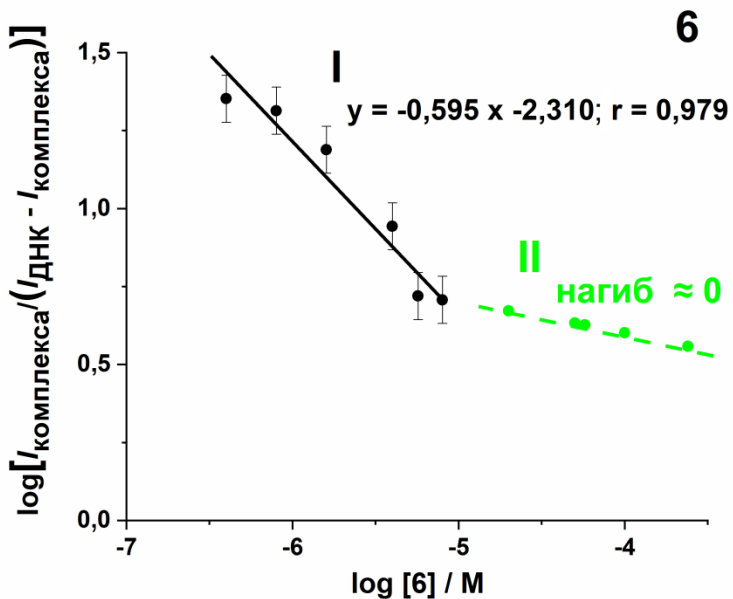
Једињење 9 показује два линеарна сегмента са нагибима, $n \approx 1$ и $n \approx 0,5$ (Слика 96), и одговарајуће константе везивања $K = 2,80 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $K = 4,57 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Одређене константе везивања имају мање вредности у поређењу са једињењем 7, што је у складу са одређеним најнижим концентрацијама чија се интеракција са ДНК може детектовати примењеном волтаметријском техником. И у овом случају, постоје два типа комплекса са различитом стехиометријом (Табела 14). На основу вредности константи везивања комплекса 9–ДНК, интеракција се може описати као интеракција средње јачине.



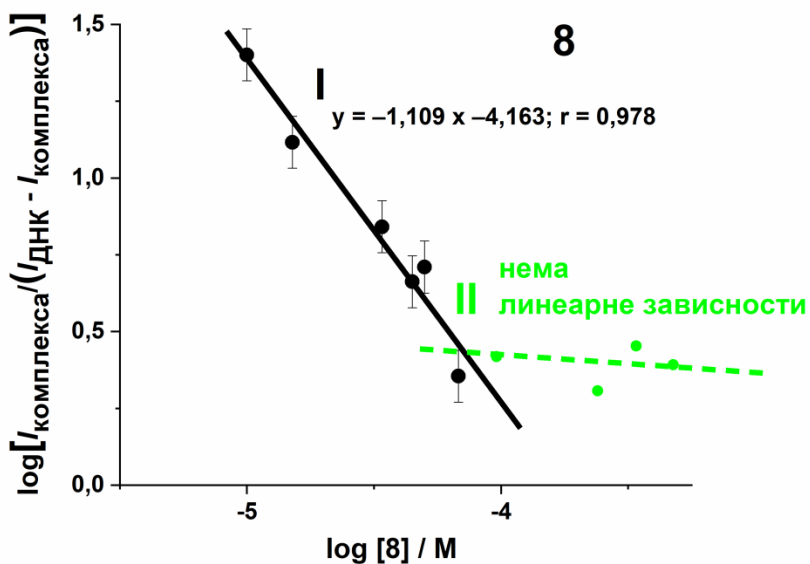
Слика 96. Зависност $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log[9]$ коришћена за одређивање константе везивања приликом формирања комплекса 9–ДНК [137]

Једињења 6 и 8 имају ниске вредности K , $7,59 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и $5,67 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Ове вредности ниже су од просечних вредности које већ постоје за једињења која интерагују са ДНК и од вредности добијених за једињење 9, и делом за једињење 7.

На основу вредности нагиба које износе 0,59 за једињење 6 и 1,11 за једињење 8 (Слика 97 и Слика 98), може се претпоставити да је стехиометрија формираних комплекса 1:2 за једињење 6 и 1:1 за једињење 8. У оба случаја, веће вредности концентрација најактивнијих АДА показале су код логаритамске зависности мале вредности нагиба, $< 0,1$. Тако ниске вредности нагиба указују на потпуну покривеност ДНК слоја молекулима најактивнијих АДА.



Слика 97. Зависност $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log [6]$ искоришћена за одређивање константе везивања 6–ДНК [137]



Слика 98. Зависност $\log \left[\frac{I_{\text{КОМПЛЕКСА}}}{I_{\text{ДНК}} - I_{\text{КОМПЛЕКСА}}} \right]$ од $\log [8]$ искоришћена за одређивање константе везивања 8–ДНК [137]

Табела 14. Вредности константи везивања најактивнијих АДА – ДНК, стехиометрија и промена Гибсове слободне енергије [137]

Дериват акридина	Опсег концентрација (М)	K (М ⁻¹)	n	Стехиометрија	ΔG kJ mol ⁻¹
6	$2 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-6}$	$7,59 \times 10^3$	0,595	1:2	-22,15
	$1 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$	/	/	/	/
7	$1 \times 10^{-7} - 9 \times 10^{-7}$	$8,68 \times 10^5$	1,053	1:1	-33,90
	$1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^4$	0,485	1:2	-24,91
	$1 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$	$2,05 \times 10^4$	0,804	1:1	-24,61
8	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^3$	1,109	1:1	-21,42
	$1 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-4}$	/	/	/	/
9	$6 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$	$2,80 \times 10^4$	1,035	1:1	-25,38
	$5 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$	$4,57 \times 10^4$	0,469	1:2	-26,60

У највећем броју објављених радова одређен је стехиометријски однос 1:1 [193, 210]. Резултати представљени у овој дисертацији недвосмислено указују да стехиометријски однос може бити различит, зависно од концентрације супстанце која интерагује са ДНК [137]. До сада није испитивана интеракција једињења са ДНК у тако широком опсегу концентрација као што је приказано у овој дисертацији, такође стехиометријски однос различит од 1:1 приликом интеракције деривата акридина са ДНК није до сада објављен.

Интеракција која се заснива на интеркалацији, окарактерисана је великим вредностима K , углавном између 10^4 и 10^6 М⁻¹, док ниже вредности K указују на слабије интеракције, као што је везивање за жљоб или електростатичке интеракције [193].

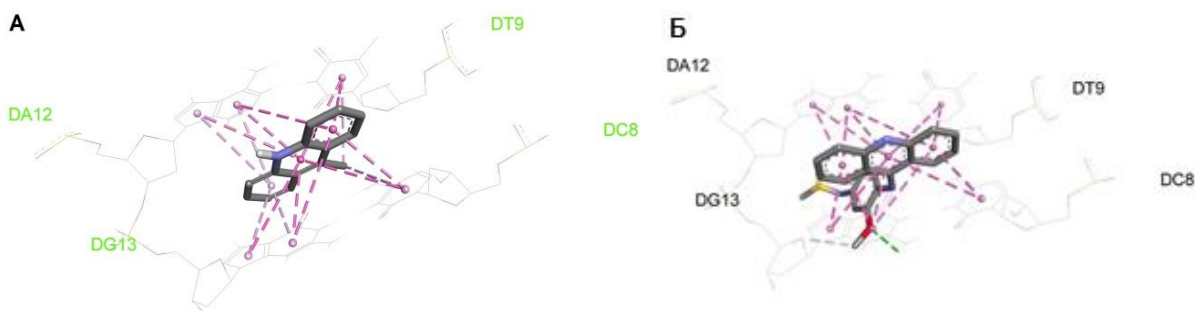
Како би било одређено да ли је интеракција између најактивнијих АДА и ДНК термодинамички спонтан процес, израчуната је промена Гибсове слободне енергије (ΔG), применом једначине 30. Резултати за сва четири једињења (експерименти вршени на собној температури, 25 °С) представљени су у **Табели 14**. Негативне вредности ΔG , за све деривате акридина, у опсегу од -21 до -34 kJ mol⁻¹, потврдиле су спонтаност процеса. Најбољи резултат, указујући на најстабилнији комплекс са ДНК, показало је једињење 7, када је присутно у ниским концентрацијама реда величине 10^{-7} М.

Према резултатима приказаним у **Табели 14**, највећу вредност константе везивања и најнижу вредност промене Гибсове слободне енергије има једињење 7 при интеракцији са ДНК, указујући на формирање најстабилнијег комплекса. Осим једињења 7, и једињење 9 формира комплексе са $K > 10^4$ М⁻¹, што се сматра јаком интеракцијом. Приказани подаци, заједно са померањем потенцијала пика на SW волтамограмима ка позитивнијим потенцијалима, указују на интеркалацију као тип интеракције. Једињења 6 и 8 слабије интерагују са ДНК, што је окарактерисано одговарајућим константама везивања, чије су вредности мање ($< 10^4$ М⁻¹), као и мање негативним вредностима Гибсове слободне енергије, ΔG . Ипак, иако мање померање, померање ка позитивнијим потенцијалима је уочено и код ових једињења, те се може претпоставити да и та једињења интеркалирају између база ДНК. Узимајући у обзир ниже вредности K , не може бити изузето ни везивање за жљоб [193], док разлике типа интеракције за различите деривате акридина могу бити последица различите концентрације једињења као и утицаја на морфологију ДНК након интеракције [166].

4.7. Docking

4.7.1. Docking интеракције 9-хлороакридина са ДНК

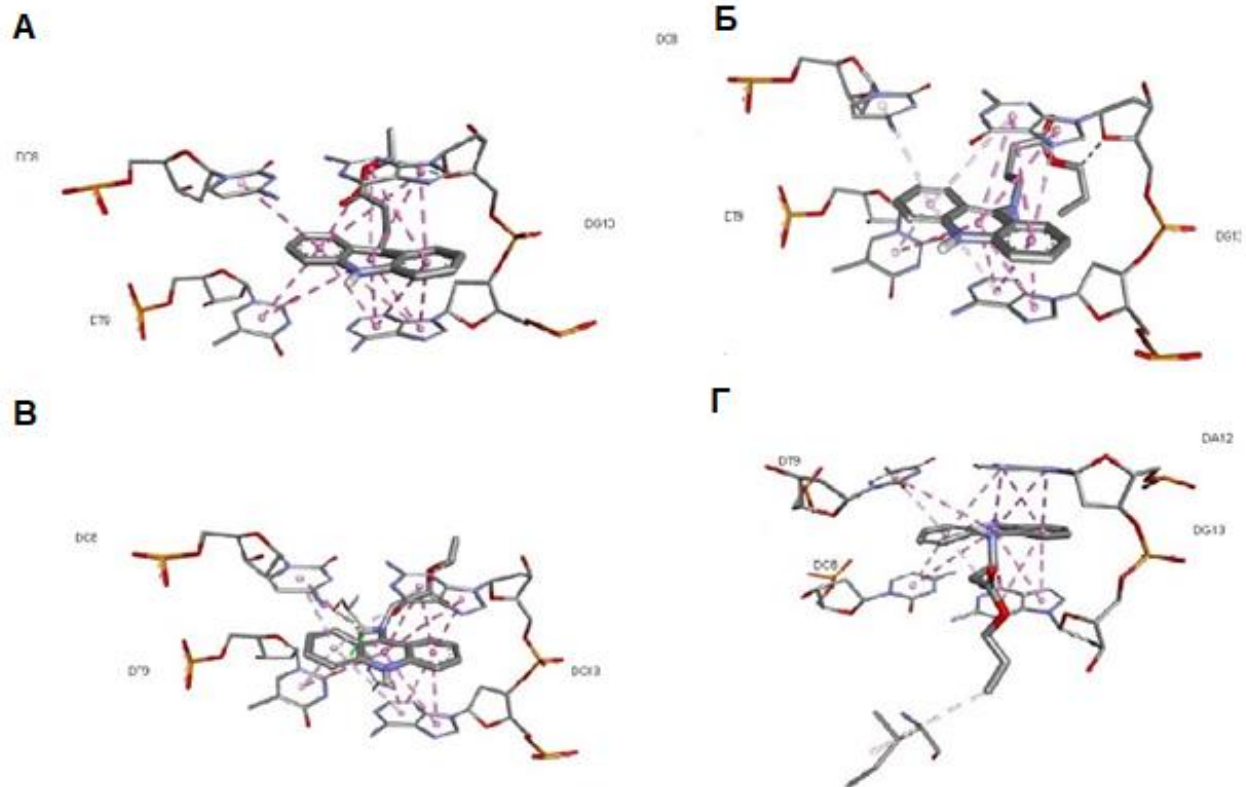
У складу са претходним испитивањима за амсакрин, потврђено је да делује као интеркалирајући агенс и као инхибитор топоизомеразе II [211]. Амсакрин садржи акридинско језгро. Због сличности механизма деловања и због структурне сличности са 9Cl-A, коришћен је ДНК/амсакрин/топоизомераза II комплекс из PDB за *docking* анализу. *Docking* анализа спроведена је са циљем да се предвиди тип интеракције између 9Cl-A и ДНК, као и између најактивнијих АДА и ДНК нуклеотида. Енергија везивања 9Cl-A ($-7,7$ kcal/mol) слична је енергији везивања амсакрин ($-7,5$ kcal/mol). Најзначајније интеракције 9Cl-A са ДНК биле су између акридинског језгра и DC8 ($\pi - \pi$ интеракције), DT9 ($\pi - \pi$ интеракције), DA12 ($\pi - \pi$ интеракције), DG13 ($\pi - \pi$ интеракције), DC8 (π -алкил), DT9 (π -алкил), DA12 (π -алкил) и DG13 (π -алкил). Ово испитивање потврдило је електрохемијски добијене резултате, да је највероватнији тип интеракције интеркалација између базних парова. Поређење интеракција 9Cl-A и амсакрин са дволанчаном ДНК приказано је на **Слици 99** [93].



Слика 99. Интеракција 9Cl-A (А) и амсакрин (Б) са дволанчаном ДНК [93]

4.7.2. Docking интеракције најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК

Осим за амсакрин, и за друге деривате акридина показано је да интеркалирају између база ДНК и делују као отрови топоизомеразе II [212]. Везивање једињења 6, 7, 8 и 9 за ДНК/топоизомераза II комплекс испитивано је *in silico*. *Docking* је изведен на Б ланцу топоизомеразе II и само на делу ДНК око места за везивање. Сва једињења имала су мало веће вредности енергије везивања (од $-8,6$ до $-8,9$ kcal mol⁻¹) у поређењу са амсакрином ($-10,1$ kcal mol⁻¹), док су према рецепторском месту били слично оријентисани. Најзначајније интеракције једињења 7 са ДНК биле су између акридинског прстена и DA12, DT9 (π - π интеракције) и DC8 (π -алкил). Акридински прстен једињења 8 остварио је интеракције са DA12 и DC8 (π - π интеракције), док је амино група формирала водоничне везе са DT9. Акридински прстен једињења 9 остварио је интеракције са DA12, DT9 и DC8 (π - π интеракције). Једињење 6 било је другачије оријентисано на рецепторском месту и акридински прстен овог једињења остварио је π - π интеракције са DA12, DC8 и DT9. Ови резултати указују да сва једињења имају потенцијал да интерагују са ДНК и да је тип интеракције највероватније интеркалација (**Слика 100**) што је у складу са *in vitro* изведеним електрохемијским испитивањима [137].



Слика 100. Везивање једињења 6 (А), 7 (Б), 8 (В) и 9 (Г) за комплекс ДНК/топоизомераза II [137]

5. ЗАКЉУЧАК

- На основу прегледа литературе и изведених експеримената оптимизовани су услови и синтетисани су, пречишћени и окарактерисани аминокиселински деривати акридина: (S)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-фенилпропаноата (једињење 1), (S)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1H-имидазол-4-ил)пропаноата (једињење 2), (S)-метил 2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1H-индол-3-ил)пропаноата (једињење 3), (S)-2-(акридин-9-ил-амино)-3-(1-метил-1H-индол-3-ил)пропанске киселине (једињење 4), метил-8-(акридин-9-ил-амино)октаноата (једињење 5), етил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноата (једињење 6), пропил 4-(акридин-9-ил-амино)бутаноата (једињење 7), етил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноата (једињење 8), пропил 3-(акридин-9-ил-амино)пропаноата (једињење 9), етил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноата (једињење 10) и пропил 6-(акридин-9-ил-амино)хексаноата (једињење 11). Наведена једињења су окарактерисана одређивањем температуре топљења и применом спектроскопских метода и то: инфрацрвеном спектроскопијом (IR), нуклеарном магнетном резонанцијом (NMR ^1H , ^{13}C), масеном спектроскопијом (MS/MS) и масеном спектрометријом високе резолуције (HRMS).
- Одређивањем цитотоксичности, у оквиру *in vitro* испитивања антитуморске активности синтетисаних аминокиселинских деривата акридина, утврђено је да су једињења 6, 7, 8 и 9, тј. једињења са линеарним алифатичним бочним ланцима, најпотентнији инхибитори у МТТ тесту са IC_{50} вредностима испод 20 μM , што је упоредиво или ниже у односу на амсакрин. Једињења 8 и 9 била су посебно ефикасна на ћелије А549 ($\text{IC}_{50} \approx 6 \mu\text{M}$). Од значаја је истаћи да испитивана једињења 6, 7, 8 и 9 нису показала токсичност на хуманим леукоцитима, за разлику од амсакрин.
- Анализом ћелијског циклуса и ћелијске смрти, применом проточне цитометрије, за најактивније синтетисане аминокиселинске деривате акридина (једињења 6, 7, 8 и 9), утврђено је да једињења 7 и 9 доводе до застоја у G2/M фази ћелијског циклуса ћелија А549, док једињења 6 и 8 индукују апоптогичку смрт ћелије независно од фазе ћелијског циклуса. Ефекат једињења 6 и 7 на индукцију ћелијске смрти апоптозом упоредив је са амсакрином.
- Испитивањем једињења 6, 7, 8 и 9, применом *in vitro* теста, утврђено је да своје дејство могу испољити као инхибитори хумане ДНК топоизомеразе IIa.
- Испитивањем везивања једињења 6, 7, 8 и 9 за ДНК применом теста електрофоретске покретљивости, показано је да сва једињења интерагују са ДНК, док је за једињење 7 и амсакарин, тип интеракције највероватније интеркалација. Како је очекивано да сва једињења интеркалирају између база ДНК, тип интеракције одређен је и електрохемијски, применом осетљивије методе, SW волтаметрије.
- Електрохемијско испитивање 9-хлороакридина као полазног једињења за синтезу аминокиселинских деривата акридина, као и испитивање редокс понашања једињења 6, 7, 8 и 9 показало је да 9-хлороакридин подлеже иреверзибилним процесима оксидације и редукције на електроди од стакластог угљеника, који су рН зависни и дифузионо-контролисани. Оксидација 9-хлороакридина почиње уз формирање мономерног радикал катјона услед иреверзибилног трансфера једног електрона, затим два мономера катјон радикала могу формирати димер, који даље подлеже другој реакцији у којој се размењује

други електрон и настаје нови катјон радикал. Редукција 9-хлороакридина одвија се уз учешће једног електрона и једног протона, што доводи до формирања радикала, а како радикал није стабилна форма, вероватан је процес димеризације.

Слично 9-хлороакридину, једињења 6, 7, 8 и 9 подлежу иреверзибилним, дифузионо контролисаним процесима оксидације и редукције на електроди од стакластог угљеника. Ови резултати потврђени су применом три волтаметријске технике: CV, DPV SWV.

- Електрохемијско испитивање интеракције 9-хлороакридина и најактивнијих аминокиселинских деривата акридина са ДНК је извршено применом ДНК биосензора и SW волтаметрије. Показано је да 9-хлороакридин интерагује са ДНК, да је тип интеракције највероватније интеркалација. Једињења 6, 7, 8 и 9, према електрохемијским резултатима показују интеракцију са ДНК, при чему је тип интеракције, као и код 9-хлороакридина, највероватније интеркалација.
- Константа везивања 9-хлороакридина за ДНК има вредност: $K = 3,45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Константа везивања једињења 7 за ДНК била је $8,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ при опсегу концентрација реда величине 10^{-7} M , док је са порастом концентрације једињења 7, вредност константи везивања била нижа. За једињење 9 израчуната вредност константе већа је од 10^4 M^{-1} , што је указивало на јаку интеракцију, док су једињења 6 и 8 показала слабију интеракцију са ДНК, а вредности константи везивања биле су мање од 10^4 M^{-1} . Резултати у овој тези недвосмислено указују да стехиометријски однос може бити различит, зависно од концентрације супстанце која интерагује са ДНК.
- Применом *docking* студија потврђени су резултати добијени применом SWV, а то је да се интеракција 9-хлороакридина и једињења 6, 7, 8 и 9 са ДНК остварује услед интеркалације наведених једињења између база ДНК. Енергија везивања 9Cl-A ($-7,7 \text{ kcal/mol}$) слична је енергији везивања амсакрина ($-7,5 \text{ kcal/mol}$). Сва једињења имала су мало веће вредности енергије везивања (од $-8,6$ до $-8,9 \text{ kcal mol}^{-1}$) у поређењу са амсакрином ($-10,1 \text{ kcal mol}^{-1}$), док су према рецепторском месту били слично оријентисани.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Graebe C, Caro H. Uber Acridin, Ber. Dtsch, Chem. Ges, 1870, 1, p 746-747
- [2] Reinhardt C, Travis AS. Heinrich Caro and the Creation of Modern Chemical Industry, 2000 Netherlands, Springer.
- [3] Acheson RM. The chemistry of heterocyclic compounds. Acridines, 1973, 2nd edition, John Wiley & Sons.
- [4] Nasim A, Brychey T. Genetic effects of acridine compounds. Mutation Research, 1979, 65, 4, p 261-288. doi: 10.1016/0165-1110(79)90005-8
- [5] Kumar R, Kaur M, Kumari M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. Acta Pharmaceutica – Drug research. 2021, 69, 1, p 3-9
- [6] Suveyzdis YI, Lyakhov SA, Litvinova LA, Rybalko SL, Dyadyun ST, Antiviral Activity of Acridinylaminoalcohols and Acridinylaminoacid Esters, Pharmaceutical Chemistry Journal, 2000, 34, 10
- [7] Baguley BC, Nash R. Antitumour activity of substituted 9-anilinoacridines -Comparison of In vivo and In vitro testing systems. European Journal of Cancer, 1981, 17, 6, p 671-679. doi: 10.1016/0014-2964(81)90271-1
- [8] Rowe TC, Chen GL, Hsiang Y-H, Liu LF. DNA damage by antitumor acridines mediated by mammalian DNA topoisomerase II. Cancer Research 1986, 46, 4, p 2021-2026.
- [9] Harrison RJ, Cuesta J, Chessari G, Read MA, Basra SK, Reszka AP, Morrell J, Gowan SM, Incles CM, Tanious, Wilson WD, Kelland LR, Neidle S, Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors, J. Med. Chem. 2003, 46, p 4463–4476, <https://doi.org/10.1021/jm0308693>.
- [10] Hutchins RA, Crenshan JM, Graves DE, Denny WA, Influence of substituent modification on DNA binding energetics of acridine-based anticancer agents. Biochemistry. 2003, 42, p 13754–13761, <https://doi.org/10.1021/bi035434w>
- [11] Dzierzbicka K, Kawzowicz A, Koc A, Kukowska-Kaszuba M, Wiad. Chem., 2009, 63, 107–139.
- [12] Roe S, Gunaratnam M, Spiteri C, Sharma P, Alharthy RD, Neidle S, Moses JE, Org. Biomol. Chem. 2015, 13, 8500–8504.
- [13] Belmont PO, Meijer L, Cohen P, Patin A, Bosson J, Goekjian PG, US Pat., 8999955, 2015
- [14] Cisáriková A, Barbieriková Z, Janovec L, Imrich J, Hunáková L, Bačová Z, Pauliková H, Bioorg. Med. Chem., 2016, 24, p 2011–2022.
- [15] Stojiljković M, Stojiljković V, Krstić N. Fotodinamska terapija u lečenju nemelanomskih karcinoma kože. Acta medica Medianae, 2007, 47, p 28-32
- [16] Ghosh S, Das T, Suman SK, Kumar C, Sarma HD, Dash A. Targeted Tumor Therapy with Radiolabeled DNA Intercalator: A Possibility? Preclinical Investigations with ¹⁷⁷Lu-Acridine, Hindawi. BioMed Research International, 2022, 9514357, p 13. <https://doi.org/10.1155/2020/951435>
- [17] Taraszkiewicz A, Grinholc M, Bielawski KP, Kawiak A, Nakonieczna J. Imidazoacridinone derivatives as efficient sensitizers in photoantimicrobial chemotherapy. Appl. Environ. Microbiol., 2013, 79, p 3692–3702. doi: 10.1128/AEM.00748-13
- [18] Lerman LS. The structure of the DNA-acridine complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1963, 49, 1, p 94-102
- [19] Kudryavtseva TN, Lamanov AY, Klimova LG, Nazarov GV. Synthesis and antimicrobial activity of acridine carboxylic acid derivatives containing a piperazine moiety. Russian Chemical Bulletin, International Edition, 2017, 66, 1, p 123-128. doi: 10.1007/s11172-017-1709-8
- [20] Albert A. The Acridines: their Preparation, Physical, Chemical, and Biological Properties and Uses (2nd ed.). 1966, London, Arnold.

- [21] Albert A, Rubbo SD, Goldacre RJ, Davey ME, Stone JD. The influence of chemical constitution on antibacterial activity. Part II: A general survey of the acridine series. *British Journal of Experimental Pathology*, 1945, 26, 3, p 160-192
- [22] Stewart JT. Synthesis and biological activity of 9-substituted acridines, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1973, 62, 8, p 1357-1358. doi: 10.1002/jps.2600620830
- [23] Lerman LS. The structure of the DNA-acridine complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1963, 49, 1, p 94-102.
- [24] Goodell JR, Madhok AA, Hiasa H, Ferguson DM. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14, 16, p 5467-5480. doi: 10.1016/j.bmc.2006.04.044
- [25] Artusi SA, Nadai M, Perrone R, Biasolo MA, Palu G, Flamand L, Calistri A, Richter SN. The Herpes Simplex Virus-1 genome contains multiple clusters of repeated G-quadruplex: Implications for the antiviral activity of a G-quadruplex ligand. *Antiviral Research*, 2015, 118, p 123-131.
- [26] Pepin G, Nejad C, Thomas BJ, Ferrand J, McArthur K, Bardin PG, Williams BRG, Gantier MP. Activation of cGAS-dependent antiviral responses by DNA intercalating agents. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45, 1, p 198-205. doi: 10.1093/nar/gkw878
- [27] Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sciences*, 2007, 80, 9, p. 813-828. doi: 10.1016/j.lfs.2006.11.008 kr
- [28] Ferguson LR, Denny WA. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutation Research*, 2007 623, 1-2, p 14-23. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.03.014
- [29] Chavalitschewinkoon P, Wilairat P, Gamage S, Denny W, Figgitt D, Ralph R. Structure-Activity Relationships and Modes of Action of 9- Anilinoacridines against Chloroquine-Resistant Plasmodium falciparum In Vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1993, 37, 3, p 403-406
- [30] Santelli-Rouvier C, Pradines B, Berthelot M, Parzy D, Barbe J. Arylsulfonyl acridinyl derivatives acting on Plasmodium falciparum. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, 39, 9, p 735-744. doi: 10.1016/j.ejmech.2004.05.007
- [31] Azim, MK, Ahmed W, Khan IA, Rao NA, Khan KM. Identification of acridinyl hydrazides as potent aspartic protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18, 9, p 3011-3015. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.02.060 kr]
- [32] Yu X -M, Ramiandasoa F, Guatzoyan L, Pradines B, Quintino E, Gadelle D, Forterre P, Cresteil T, Mahy J-P, Pethe S. Synthesis and biological evaluation of acridine derivatives as antimalarial agents. *ChemMedChem*, 2012, 7, 4, p 587-605. doi: 10.1002/cmdc.201100554).
- [33] Cain BF, Atwell GJ. The experimental antitumor properties of three congeners of three congeners of the acridylmethanesulphonanilide (AMSA) series. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1974, 10, p 539-549
- [34] Arlin ZA. Current status of amsacrine (AMSA) combination chemotherapy programs in acute leukemia. *Cancer Treat. Rep.* 1983, 67, p 967-970
- [35] Nelson EM, Tewey K, Liu LF. Mechanism of antitumor drug action: Poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, p 1361-1365
- [36] Rowe TC, Chen GL, Hsiang Y-H, Liu LF. DNA damage by antitumor acridines mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Research*, 1986, 46, 4, p 2021-2026
- [37] Baguley BC. The development of new DNA intercalating anti-cancer drugs. In *Horizons in Cancer Research*; Watanabe, H.S., Ed. Nova Publishers: New York, NY, USA, 2012; p 47-65

- [38] de Almeida SMV, Lafayette EA, da Silva LP, Amorim CA, de Oliveira TB, Ruiz AL, de Carvalho JE, de Moura RO, Beltrão EI, de Lima MC, de Carvalho Júnior LB. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16, p 13023–13042. doi: 10.3390/ijms160613023,
- [39] Sánchez I, Reches R, Caignard DH, Renard P, Pujol MD, *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, 41, p 340–352.
- [40] Rupar J, Dobričić V, Grahovac J, Radulović S, Skok Ž, Ilaš J, Aleksić M, Brborić J, Čudina O. Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 9-acridinyl amino acid derivatives, *RSC Med. Chem.*, 2020, 11, p 378
- [41] Gellerman G. 9-Aminoacridine Derivatives, their Preparation and Uses. US Patent App. 2012, 13/505,436
- [42] Zheng M-H, Bigdeli F, Gao L-X, Wu DZ, Yan X-W, Hu M-L, Morsali A. Synthesis, Characterization and DNA Binding Investigations of a New Binuclear Ag(I) Complex and Evaluation of Its Anticancer Property. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15, p 953-964. doi: <http://doi.org/10.2147/IJN.S225038>].
- [43] Gao H, Denny WA, Garg R, Hansch C. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) for 9-anilino- acridines: a comparative analysis. *Chemico-Biological Interaction*, 1998, 116, 3, p 157-180. doi: 10.1016/S0009-2797(98)00085-4
- [44] Lyakhov SA, Suveyzdis YI, Bykhovskaya, OV, Isko NM, Andronati SA, Litvinova LA. Biological active acridine derivatives. 3. Acridinylaminoacids and their esters: synthesis and cytostatic activity. *Pharmazie*, 1997, 52, 7, p 560-561
- [45] Lang X, Li L, Chen Y, Sun Q, Wu Q, Liu F, Tan C, Liu H, Gao C, Jiang Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis inducing antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21, p 4170-4177. doi:10.1016/j.bmc.2013.05.008
- [46] Abdullah AAS, Awad HM, El-Sayed IE-T, El Gokha AA. Synthesis and antiproliferative activity of new hybrids bearing neocryptolepine, acridine and α -aminophosphonate scaffolds. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2020, 17, p 1211-1221. doi: <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01849-2>
- [47] Rupar JS, Dobričić VD, Aleksić MM, Brborić JS, Čudina OA. A Review of Published Data on Acridine Derivatives with Different Biological Activities, *Kragujevac J. Sci.* 2018, 40, p 83-101
- [48] Kim H, Kwak M. Structures and applications of Nucleic Acid-Based Micelles for Cancer Therapy. 2023, 24, 2, 1592. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms24021592>
- [49] Aleksić MM, Kapetanović V. Interakcije lekova i DNK– osobine i detekcija, *Arh.farm.*, 2013, 63, p 279 – 292
- [50] Vierstraete A, Department of Biology University of Ghent K. L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent Belgium, <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/index.html>, <https://users.ugent.be/~avierstr/pdf/principles.pdf>, 17. 03. 2023.
- [51] ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES © 2001, John Wiley & Sons, Ltd., *Molecular Biology: The Central Dogma* Patricia J Pukkila, www.els.net, 17. 03. 2023.
- [52] Milenković S, Stefanović M, Cvetković B. Ćelijski ciklus – srž života, *Materia medica*, 2007, 23, 2, p 23-27
- [53] https://www.bio.bg.ac.rs/materijali_katedri/Nastanak%20celija-%20deobe_611_1382004339.pdf, 17. 03. 2023.
- [54] <https://ivanabiologija.files.wordpress.com/2014/12/mitoza.jpg>, 17. 03. 2023.
- [55] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003, 36 p; 131–149.

- [56] Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989, 246, 4930, p 629-34
- [57] Popović A. Karakterizacija i ispitivanje antitumorske aktivnosti kompleksa cinka (II) sa S-alkenil derivatima tiosalicilne kiseline, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, doktorska disertacija, 2020.
- [58] Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11(24):3471-81.
- [59] Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001;13, 225.
- [60] Painter RB. Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1986 May;49(5):771-81
- [61] Lim D.S., Kim S.T., Xu B., Maser R.S., Lin J., Petrini J.H., Kastan M.B. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 2000;404:613–617.
- [62] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997, 88, 3, p 323-31.
- [63] Carnero A, Hannon GJ. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1998, 227, p 43.
- [64] Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell CL, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell*. 1995, 6, 387
- [65] Champoux JJ, DNA topoisomerase: structure, function, and mechanism, *Annu. Rev. Biochem*. 2001. 70, p 369–413,
- [66] Wang JC, Cellular roles of DNA topoisomerases: A Molecular Perspective, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3, p 430-440
- [67] Nitiss JL, Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eucariotic cells, *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1400, p 63-81
- [68] Buzun K, Bielawska A, Bielawski K, Gornowicz A, DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35:1, p 1781-1799
- [69] Kolundžija B, Ispitivanje mehanizma antitumorskog delovanja derivata antrahinona in vitro, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, doktorska disertacija, 2014
- [70] Li, TK, Liu LF, Tumor cell death induced by topoisomerase – targeting drugs, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41, p 53-77
- [71] Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Los M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med*. 2013;17:12–29
- [72] Fan YJ, Wei XZ, The cellular decision between apoptosis and autophagy, *Chinese Journal of Cancer*, 2013, 32, 3, p 121-129
- [73] Lerner-Eisenberg A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them, *Cell Death Differ*, 2009, 16, 7, p 966-975
- [74] Kanjer K, Terapijski odgovor carcinoma dojke na citotoksične lekove analizom markera apoptoze i proliferacije ćelija, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, doktorska disertacija, 2013
- [75] Obradović A, Molekularni mehanizmi antitumorske aktivnosti novosintetisanih 3-supstituisanih 5-izopropil-5-fenilhidantiona, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, doktorska disertacija, 2020.

- [76] Hajra KM, Liu JR, Apoptosome dysfunction in human cancer, *Apoptosis*, 2004, 9, 6, p 691-704.
- [77] Rakić G. Sinteza, karakterizacija i antitumorska aktivnost trans-kompleksa Pt(II) i Pt (IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima, Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, doktorska disertacija, 2017
- [78] Thatté U, Dahanukar S. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation, *Drugs*, 1997, 54, 4, p 511-532
- [79] Van Cruchten S, Van Den Broeck W, Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis, *Anat Histol Embryol*, 2002, 31, 4, p 214-223
- [80] Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature*, 2000, 407, p 784-788
- [81] Stojković-Simatović, I., Šljukić Paunković, B. (2018). *Elektrohemija – teorijske osnove i primena*. Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju. Beograd 2018.
- [82] Chiorcea-Paquim AM, Rodrigues Pontinha AD, Oliveira-Brett AM. Quadruplex-targeting anticancer drug BRACO-19 voltammetric and AFM characterization. *Electrochimica Acta*, 2015, 174, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.05.146>
- [83] Rodrigues Pontinha AD, Sparapani S, Neidle S, Oliveira-Brett AM. Triazole–acridine conjugates: Redox mechanisms and in situ electrochemical evaluation of interaction with double-stranded DNA. *Bioelectrochemistry*, 2013, 89, 50–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.08.005>
- [84] Ozkan SA, *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis*, HNB Publishing, New York, 2012, p 350
- [85] Medenica M, Pejić N. *Instrumentalne metode*, 2018, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, ISBN 978-86-6273-034-3
- [86] Mentus S. *Elektrohemija*, Fakultet za fizičku hemiju, 2001, p 192-209
- [87] Wang J, *Analytical Electrochemistry*, 2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, p 81
- [88] Biniak, Stanislaw & Swiatkowski, A. & Pakula, Maciej & Radovic. *Chemistry and Physics of Carbon*. 2001, Marcel Dekker.
- [89] Kinoshita K. *Carbon, Electrochemical and Physicochemical Properties*, 1998, ISBN: 978-0-471-84802-8
- [90] Radulović V. *Elektrohemijsko proučavanje vareniklina i brimonidina, i razvoj elektroanalitičkih metoda za njihovo određivanje u različitim matriksima*, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, doktorska disertacija, 2017.
- [91] Brownson DAC, Banks CE, *The Handbook of graphene electrochemistry*, 2014, Springer-Verlag, London
- [92] Compton RG, Batchelor-McAuley C, Dickinson E, *Understanding Voltammetry: Problems and Solutions*, 2012, Imperial College Press, Oxford
- [93] Rupar J, Aleksić MM, Dobričić V, Brborić J, Čudina O. An electrochemical study of 9-chloroacridine redox behavior and its interaction with double-stranded DNA, *Bioelectrochemistry*, 2020, 135, 107579
- [94] Manojlović D, Mutić J, Šegan D. *Osnove elektroanalitičke hemije*. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, 2011, p 239-240
- [95] Brett MAC, Brett AMO. *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*. 1993, Oxford University Press, Oxford New York Tokyo
- [96] Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Edition, 2nd ed., Wiley & Sons, Chichester, 2001

- [97] Aleksić MM, Radulović V, Agbaba D, Kapetanović V. An extensive study of electrochemical behavior of brimonidine and its determination at glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta.* 2013, 106, p 75–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.05.053>.
- [98] Warren JJ, Tronic TA, Maver JM. The Thermochemistry of Proton-Coupled Electron Transfer Reagents and its Implications. *Chem Rev*, 2010, 110, 12, p 6961-7001
- [99] Nosheen E, Shah A, Badshah A, Rehman ZU, Hussain H, Qureshi R, Ali S, Siddiq M, Khan AM. Electrochemical oxidation of hydantoins at glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta.* 2012, 80, p 108–117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.116>
- [100] Pantić J, Aleksić M, Dobričić V, Čudina O, Brborić J, Vladimirov S. Electrochemical oxidation and interaction of 9-chloroacridine with DNA at glassy carbon electrode. *Physical Chemistry 2016, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 26-30, 2016, Belgrade, Serbia, Proceedings* 383-386
- [101] Andrieux CP, Saveant JM, Dimerization, disproportionation and e.c.e. mechanisms in the reduction of imines in acetonitrile and dimethylformamide. 1971, 33, p 453-461. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(71\)80128-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(71)80128-6)
- [102] Osteryoung JG, Osteryoung RA. Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, 1985, 57, 101-110. doi: <https://doi.org/10.1021/ac00279a004>
- [103] <https://pineresearch.com/shop/kb/software/methods-and-techniques/voltammetric-methods/differential-pulse-voltammetry-dpv/> 12.02. 2023.]
- [104] Nicholson RS, Shain I. *Theory of stationary electrode polarography*, University of Wisconsin, 1980
- [105] Mollarasouli F, Dogan-Topal B, Caglayan MG, Taskin-Tok T, Ozkan SA, Electrochemical, spectroscopic, and molecular docking studies of the interaction between the anti-retroviral drug Indinavir and dsDNA, *J. Pharm. Anal.* 2020, 10, p 473–481. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.08.004>
- [106] Carter MT, Rodriguez M, Bard AJ. Voltammetric Studies of the Interaction of Metal Chelates with DNA. 2. Tris-Chelated Complexes of Cobalt(III) and Iron(II) with 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, p 8901–8911. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja00206a020>
- [107] González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA, Ribelles P, Ramos MT, Menéndez JC. An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors, in: M.A. Komorowska, S. Olsztynska-Janus (Eds.), *Biomed. Eng. Trends, Res. Technol. InTechOpen*, 2011, London, 65–90. <https://doi.org/10.5772/13586>.
- [108] Oliveira SCB, Oliveira-Brett AM. DNA-electrochemical biosensors: AFM surface characterisation and application to detection of in situ oxidative damage to DNA. *Comb. Chem. High. T. Scr.*, 2010, 13, 628–640. doi: <https://doi.org/10.2174/1386207311004070628>
- [109] Bruzaca EES, Lopes IC, Silva EHC, Carvalho PAV, Tanaka AA. Electrochemical oxidation of the antitumor antibiotic mitomycin C and in situ evaluation of its interaction with DNA using a DNA-electrochemical biosensor. *Microchemical Journal*, 2017, 133, 81-89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.030>
- [110] Machini WBS, Fernandes IPG, Oliveira-Brett AM. Antidiabetic Drug Metformin Oxidation and in situ Interaction with dsDNA Using a dsDNA-electrochemical Biosensor. *Electroanalysis*, 2019, 31, 1– 12. doi: 10.1002/elan.201900162
- [111] Dogan-Topal B, Ozkan SA, Uslu B. The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis. *Open Chem. Biomed. Methods J.*, 2010, 3, 56–73. doi: <https://doi.org/10.2174/1875038901003010056>

- [112] Vyskočil V, Blašková M, Hájková A, Horáková E, Krejčová Z, Stávková K, Wang J. Electrochemical DNA biosensors – useful diagnostic tools for the detection of damage to DNA caused by organic xenobiotics (A Review). *Sens. Electroanal.*, 2012, 7, 141–162.
- [113] Diculescu VC, Vivan M, Oliveira Brett AM. Voltammetric behavior of antileukemia drug glivec. Part III: In situ DNA oxidative damage by the glivec electrochemical metabolite, *Electroanalysis*. 2006, 18. 1963–1970. <https://doi.org/10.1002/elan.200603602>.
- [114] Bunea M-C, Diculescu V-C, Enculescu M, Iovu H, Enache TA. Redox mechanism of azathioprine and its interaction with DNA. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 6805. <https://doi.org/10.3390/ijms22136805>.
- [115] Oliveira-Brett AM, Diculescu VC. Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors. *Bioelectrochemistry*, 2004, 64, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.05.002>
- [116] Chiorcea-Paquim AM, Corduneanu O, Oliveira SCB, Diculescu VC, Oliveira-Brett AM. Electrochemical and AFM evaluation of hazard compounds–DNA interaction. *Electrochimica Acta*, 2009, 54, 1978–1985. doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.07.032>
- [117] Oliveira SCB, Chiorcea-Paquim AM, Ribeiro SM, Melo ATP, Vivan M, Oliveira-Brett AM. In situ electrochemical and AFM study of thalidomide–DNA interaction. *Bioelectrochemistry*, 2009, 76, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.03.003>.
- [118] Kurbanoglu S, Dogan-Topal B, Hlavata L, Labuda J, Ozkan SA, Uslu B. Electrochemical investigation of an interaction of the antidepressant drug aripiprazole with original and damaged calf thymus dsDNA, *Electrochimica Acta*, 2015, 169, 233–240, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.04.087>
- [119] Erdem A, Kosmider B, Osiecka R, Zyner E, Ochocki J, Ozsoz M. Electrochemical genosensing of the interaction between the potential chemotherapeutic agent, cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) and DNA in comparison with cis-DDP. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2015, 38, 645–652. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.02.010>.
- [120] Ozkan D, Karadeniz H, Erdem A, Mascini M, Ozsoz M. Electrochemical genosensor for Mitomycin C-DNA interaction based on guanine signal. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2004, 35, 905–912, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.03.001>.
- [121] Dryhurst G, Elving PJ. Electrochemical Oxidation of Adenine -Reaction Products and Mechanisms. *J. Electrochem. Soc.*, 1968, 115, 1014-1022.
- [122] Dryhurst G. Adsorption of guanine and guanosine at the pyrolytic graphite electrode: Implications for the determination of guanine in the presence of guanosine. *Anal. Chim. Acta*, 1971, 57, 137-149
- [123] Yao T, Wasa T, Musha S. Anodic voltammetry of deoxyribonucleic-acid at a glassy carbon electrode. *Bul. Chem. Soc. Japan*, 1978, 51, 1235-1236.
- [124] Oliveira-Brett AM, Matysik FM. Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 1997, 429, 95-99.
- [125] Oliveira-Brett AM, Matysik FM. Sonoelectrochemical studies of guanine and guanosine. *Bioelectrochem. Bioener.*, 1997, 42, 111-116.
- [126] Oliveira-Brett AM, Piedade JAP, Silva LA, Diculescu VC. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Anal. Biochem.*, 2004, 332, 321-329.
- [127] Chiorcea-Paquim AM, Piedade JAP, Wombacher R, Jaschke A, Oliveira-Brett AM. Atomic force microscopy and anodic voltammetry characterization of a 49-mer Diels-Alderase ribozyme. *Anal. Chem.*, 2006, 78, 8256-8264

- [128] Oliveira SCB, Oliveira-Brett AM. DNA-electrochemical biosensors: AFM surface characterisation and application to detection of in situ oxidative damage to DNA. *Comb. Chem. High. T. Scr.*, 13, 2010, 628–640. doi: <https://doi.org/10.2174/1386207311004070628>
- [129] Santos PVF, Lopes IC, Diculescu VC, Oliveira-Brett AM. DNA - Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystin-LR and Nodularin Interaction: Electrochemical Evaluation, *Electroanalysis*. 2012, 24, p 547–553. doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201100516>
- [130] Radulović V, Aleksić MM, Kapetanović V. An electrochemical study of the adsorptive behaviour of varenicline and its interaction with DNA, *J. Serbian Chem. Soc.* 2012, 77, p 1409–1422. doi: <https://doi.org/10.2298/JSC120420073R>
- [131] Pang D. *Micromethod for the Investigation of the Interactions between DNA and Redox-Active*, Society. 1998, 70, p 3162–3169.
- [132] Aleksić M, Kapetanović V. An Overview of the Optical and Electrochemical Method for Detection of DNA – Drug Interactions. *Acta Chim. Slov.* 2014; 61: 555-573
- [133] Rupar J, Aleksić M, Dobričić V, Čudina O, Brborić J, Vladimirov S. Application of electrochemical biosensor for investigation of acridine derivatives – DNA interaction. *Physical Chemistry 2018, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, September 24-28, 2018, Belgrade, Serbia, Proceedings 379-382
- [134] Liu A, Wang K, Weng S, Lei Y, Lin L, Chen W, Lin X, Chen Y. Development of electrochemical DNA biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 37, p 101-111
- [135] Soro Z. *Elektrohemijski biosenzori za medicinsku primenu*, Farmaceutski fakultet – Univerzitet u Beogradu, završni rad, 2021.
- [136] Nowicka AM, Zabost E, Klim B, Mazerska Z, Stojek Z. Interactions of Dissolved dsDNA with Intercalating Drug by Anodic Voltammetry and Spectroscopy. Influence of Ph. *Electroanalysis*, 2009, 21, p 52–60. <https://doi.org/10.1002/ELAN.200804464>.
- [137] Rupar J, Dobričić V, Brborić J, Čudina O, Aleksić MM. Square wave voltammetric study of interaction between 9-acridinyl amino acid derivatives and DNA. *Bioelectrochemistry*, 2023, 149, 108323.
- [138] Brett CMA, Oliveira Brett AM. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, 1st ed., Oxford Science University Publications, Oxford, 1993. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(94\)80035-9](https://doi.org/10.1016/0013-4686(94)80035-9)
- [139] Qu F, Li N, Jiang Y. Electrochemical Studies of Porphyrin Interaction with DNA and Determination of DNA, *Microchem. J.* 1998, 58, p 39–51
- [140] Temerk Y, Ibrahim M, Ibrahim H, Kotb M. Interactions of an anticancer drug lomustine with single and double stranded DNA at physiological conditions analyzed by electrochemical and spectroscopic methods, *J. Electroanal. Chem.* 2016, 769, p 62–71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.03.020>
- [141] Tian X, Song Y, Dong H, Ye B. Interaction of anticancer herbal drug berberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 2008, 73, p 18–22. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECTCHEM.2008.02.005>
- [142] Rupar J, Aleksić MM, Nikolić K, Popović-Nikolić MR. Comparative electrochemical studies of kinetic and thermodynamic parameters of Quinoxaline and Brimonidine redox process, *Electrochim. Acta.* 2018, 271, p 220–231. doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.03.114>.
- [143] Javar HA, Garkani-Nejad Z, Noudeh GD, Mahmoudi-Moghaddam H. Development of a new electrochemical DNA biosensor based on Eu³⁺-doped NiO for determination of amsacrine as an anti-cancer drug: Electrochemical, spectroscopic and docking studies. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1133, 48–57. doi: 10.1016/j.aca.2020.07.071

- [144] Untiveros KL, Da Silva EG, De Abreu FC, Da Silva-Júnior EF, De Araújo-Junior JX, De Aquino TM, Armas SM, De Moura RO, Mendonça-Junior FJ, Serafim VL, Chumbimuni-Torres K. An electrochemical biosensor based on Hairpin-DNA modified gold electrode for detection of DNA damage by a hybrid cancer drug intercalation. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 133, 160–168. doi: 10.1016/j.bios.2019.02.071
- [145] Dobričić, V., Marković, B., Milenković, N., Savić, V., Jačević, V., Rančić, N., Čudina, O. (2014). Design, Synthesis, and Local Anti-Inflammatory Activity of 17 β -Carboxamide Derivatives of Glucocorticoids . *Arch Pharm (Weinheim)*, 347(11), 786–797. doi:10.1002/ardp.201400165
- [146] Tripathi A, Misra K. Molecular Docking: A Structure- Based Drug Designing Approach. *JSM Chem.* 2017, 5, 2, p 1042
- [147] Acharya R, Chacko S, Bose P, Lapenna A, Prasad Pattanayak S. Structure based multitargeted molecular docking analysis of selected furanocoumarins against breast cancer. *Sci Rep*, 2019;9:15743. doi: 10.1038/s41598-019-52162-0
- [148] Čurčić J. In silico određivanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških parametara i in vitro ispitivanje antiproliferativne aktivnosti novosintetisanih derivata N-sukcinimida, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Klinička medicina, 2020.
- [149] Turković N, Dizajniranje, sinteza i in vitro ispitivanja derivata propiofenona kao potencijalnih inhibitora enzima HIV-1 proteaze, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, doktorska disertacija, 2021.
- [150] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983, 65, 1-2, p 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- [151] Wang S, Sakhatskyy P, Chou T-HW, Lu S. Assays for the assessment of neutralizing antibody activities against Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) associated coronavirus (SCV), *Journal of Immunological Methods*, 2005, 301, p 21-30. doi: doi:10.1016/j.jim.2005.03.008
- [152] Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. 2000, 60, 14, p 3689–3695.
- [153] Stanojković T, Milović S, Matić I, Grozdanić N, Kljajić Z. In vitro ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakta suđera *Acanthella Acuta*. *Lek. Sirov.* XXXV, 2015, 35 p 89 – 101.
- [154] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995, 184, 39-51. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-i
- [155] Lee WY, Lee GD. Chapter 16 - A Novel Fungicidal Action of Silver Nanoparticles: Apoptosis Induction. *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases*, 2015, p 269-281.
- [156] Luković J. Ispitivanje in vitro antitumorskog efekta i mehanizma delovanja analoga halkona na ćelije tumora humanog porekla, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, doktorska disertacija, 2020.
- [157] Žlender V. Detekcija apoptoze. *Arh. Hig. Rada Toksikol*, 2006, 57, p 229-236
- [158] Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi J V. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *Journal of Immunological Methods.* 1994;170, p 145–57.
- [159] Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood.* 1994. 84, 5, p 1415-20

- [160] Chourpa I, Manfait M. Specific molecular interactions of acridine drugs in complexes with topoisomerase II and DNA. SERS and resonance Raman study of m-AMSA in comparison with o-AMSA. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1995. 26, 8-9, p 813–819. doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.1250260831>
- [161] Perrin DD, Dempsey B. *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall, London, 1974.
- [162] Pantić J, Aleksić M, Dobričić V, Čudina O, Brborić J, Vladimirov S. Electrochemical oxidation and interaction of 9-chloroacridine with DNA at glassy carbon electrode. *Physical Chemistry 2016, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, September 26-30, 2016, Belgrade, Serbia, Proceedings 383-386
- [163] Oliveira-Brett AM, Diculescu VC, Chiorcea-Paquim AM, Serrano SHP, DNA-electrochemical biosensors for investigating DNA damage, Chapter 20 in: S. Alegret and A. Merkoci (Eds) *Electrochemical sensor Analysis*, Elsevier B. V. Amsterdam The Netherlands, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2007, 49, p 413-438. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(06\)49020-6](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(06)49020-6).
- [164] Vyskočil V, Blašková M, Hájková A, Horáková E, Krejčová Z, Stávková K, Wang J. Electrochemical DNA biosensors – Useful diagnostic tools for the detection of damage to DNA caused by organic xenobiotics (A Review), Chapter 9 in: K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás (Eds.), *Sensing in Electroanalysis*, University Press Centre, Pardubice, Czech Republic, 2012, 7, p 141–162
- [165] Rodrigues Pontinha AD, Sparapani S, Neidle S, Oliveira-Brett AM. Triazole–acridine conjugates: Redox mechanisms and in situ electrochemical evaluation of interaction with double-stranded DNA. *Bioelectrochemistry*, 2013, 89, p 50–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.08.005>
- [166] Chiorcea-Paquim AM, Oliveira-Brett AM. DNA Electrochemical Biosensors for In Situ Probing of Pharmaceutical Drug Oxidative DNA Damage. *Sensors*, 2021, 21, p 1125. doi: <https://doi.org/10.3390/s21041125>
- [167] Wu CC, Li YC, Wang YR, Li TK, Chan NL. On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer drugs. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41, doi: 10630-10640 [10.1093/nar/gkt828](https://doi.org/10.1093/nar/gkt828)
- [168] <http://www.swissadme.ch/index.php> (25. 10. 2019.)
- [169] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 46, p 3-26. doi: [10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- [170] Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ, A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.*, 1999, 1, p 55-68. doi: [10.1021/cc9800071](https://doi.org/10.1021/cc9800071)
- [171] Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, p 2615-2623. doi: [10.1021/jm020017n](https://doi.org/10.1021/jm020017n)
- [172] Egan WJ, Merz Jr KM, Baldwin JJ. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, p 3867-3877. doi: [10.1021/jm000292e](https://doi.org/10.1021/jm000292e).
- [173] Muegge I, Heald SL, Brittelli D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J. Med. Chem.*, 2001, 44, p 1841-1846. doi: [10.1021/jm015507e](https://doi.org/10.1021/jm015507e)
- [174] Martin YC, A bioavailability score. *J. Med. Chem.*, 2005, 48, p 3164-3170. doi: [10.1021/jm0492002](https://doi.org/10.1021/jm0492002).

- [175] Schinkel AH. P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 1999, 36, p 179–194. doi: 10.1016/s0169-409x(98)00085-4
- [176] Samson MK, Fraile RJ, Baker LH, Cummings G, Talley RW. Phase II study of AMSA in lung cancer, *Cancer. Treat. Rep.* 1981, 65, p 655-658.
- [177] Micetich KC, Zwelling LA, Gormley P, Young RC. Phase I-II study of m-AMSA administered as a continuous infusion, *Cancer. Treat. Rep.* 1982, 66, p 1813-1817.
- [178] https://www.bionet-skola.com/w/%C4%86elijski_ciklus, 03. 04.2022.
- [179] DiPaola RS. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 2002, 8, p 3311–3314.
- [180] Stanojković T, Milović S, Matić I, Grozdanić N, Kljajić Z. *In vitro* ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakta suđera *acanthella acuta*. *LEK. SIROV. God. XXXV*, 2015, 35, p 89 – 101
- [181] https://hmn.wiki/sr/Nicoletti_assay#cite_note-2, 03. 04.2022
- [182] Ketron AC, Denny WA, Graves DE, Osheroff N. Amsacrine as a Topoisomerase II poison: Importance of Drug-DNA interactions. *Biochemistry*, 2012, 51, p 1730–1739. <https://doi.org/10.1021/bi201159b>
- [183] Oniščenko Anatolij I, Tkačenko AS, Kalašnik JM, Zubov PM, Gorbač TV, Babijčuk LjA, Nakonečna OA. Razlikovanje modaliteta ćelijske smrti leukocita korišćenjem protočne citometrije kod bolesnika sa hroničnim rinosinuzitisom bez nazalnih polipa. *Medicinski časopis*, 2019, 53, 2, p 43-48. doi: 10.5937/mckg53-17381
- [184] Manguera VM, Batista TM, Brito MT, Sousa TKG, Cruz RMDD, Abrantes RA, Veras RC, Medeiros IA, Medeiros KKP, Pereira ALDC, Serafim VL, Moura RO, Sobral MV. A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. *Biomed. Pharmacother*, 2017, 90, p 253–261. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.049
- [185] Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 2003, 99, p 167–181. doi: 10.1016/s0163-7258(03)00058-5
- [186] Chang L, Liu X, Wang D, Ma J, Zhou T, Chen Y, Sheng R, Hu Y, Du Y, He Q, Yang B, Zhu H. Hypoxia-targeted drug Q6 induces G2-M arrest and apoptosis via poisoning Topoisomerase II under hypoxia. *PLoS One*, 2015, 10, e0144506. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144506>
- [187] Schmidt F, Knobbe CB, Frank B, Wolburg H, Weller M. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. *Oncol. Rep.*, 2008, 19, p 1061–1066. doi: <https://doi.org/10.3892/or.19.4.1061>
- [188] Clifford B, Beljin M, Stark MG, Taylor WR. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res.*, 2003, 63, p 4074–4081.
- [189] Chourpa I, Manfait M. Specific molecular interactions of acridine drugs in complexes with topoisomerase II and DNA. SERS and resonance Raman study of m-AMSA in comparison with o-AMSA. *J. Raman Spectrosc*, 1995, 26, p 813–819. doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.1250260831>
- [190] Oliveira SCB, Chiorcea-Paquim AM, Ribeiro SM, Melo ATP, Vivan M, Oliveira-Brett AM. In situ electrochemical and AFM study of thalidomide-DNA interaction, *Bioelectrochemistry*. 2009, 76, p 201–207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.03.003>.
- [191] Compton RG, Banks CE, *Understanding Voltammetry 2nd Edition*, 2nd ed., Manchester, 2010

- [192] Shah AH, Shah A, Rana UA, Ud-Din Khan S, Hussain H, Khan SB, Qureshi R, Badshah A. Redox mechanism and evaluation of kinetic and thermodynamic parameters of 1,3-dioxolo[4,5-g]pyrido[2,3-b]-quinoxaline using electrochemical techniques, *Electroanalysis*. 2014, 26, p 2292–2300. doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201400324>.
- [193] Ramotowska S, Ciesielska A, Makowski M. What can electrochemical methods offer in determining DNA–drug interactions?. *Molecules*. 2021, 26, 3478. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26113478>
- [194] Yardım Y, Vandeput M, Çelebi M, Şentürk Z, Kauffmann JM. A Reduced Graphene Oxide-based Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Interaction between Cisplatin and DNA based on Guanine and Adenine Oxidation Signals, *Electroanalysis*. 2017, 29, p 1–9.
- [195] Moghaam NH, Salehzadeh S, Shahabadi N. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of antiviral drug nevirapine with calf thymus DNA, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2017, 36, p 1–18.
- [196] Wang J. *Analytical Electrochemistry*, 3rd ed., Wiley-VHC, New Jersey, 2006.
- [197] Arugula MA, Zhang Y, Simonian AL. Biosensors as 21st century technology for detecting genetically modified organisms in food and feed, *Anal. Chem*. 2014, 86, p 119–129. doi: <https://doi.org/10.1021/ac402898j>
- [198] Wang Y, Laborda E, Compton RG. Electrochemical oxidation of nitrite: Kinetic, mechanistic and analytical study by square wave voltammetry, *J. Electroanal. Chem*. 2012, 670, p 56–61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.02.016>.
- [199] Wu C, Shah A, Ye H, Chen X, Ye J, Jiang H, Chen B, Wang X, Yan H. Droplet electrochemical study of the pH dependent redox behavior of novel ferrocenyl-carborane derivatives and its application in specific cancer cell recognition, *Anal. Chim. Acta*. 2015, 857, p 39–45. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.019>
- [200] Kul D, Doğan-Topal B, Özkan SA, Uslu B. Poly(acridine orange)-modified glassy carbon electrodes: Electrosynthesis, characterisation and sensor application with uric acid, *J. Appl. Electrochem*. 2014, 44, p 831–840. doi: <https://doi.org/10.1007/s10800-014-0691-1>.
- [201] Adams RN. *Electrochemistry at solid electrodes*, Marcel Dekker Inc., New York, 1969.
- [202] Yasukouchi K, Taniguchi I, Yamaguchi H, Arakawa K. Anodic oxidation of acridine in acetonitrile, *J. Electroanal. Chem*. 1981, 121, p 231–240. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(81\)80581-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(81)80581-5).
- [203] Komorsky-Lovrić Š, Mirčeski V, Scholz F. Voltammetry of organic microparticles, *Mikrochim. Acta*. 1999, 132, p 67–77. doi: <https://doi.org/10.1007/PL00010075>
- [204] Bezuglyi VD, Sidom MB, Shapovalov VA, Gaidukevich AN. Polarographic study of acridine and 9-chloroacridine and its derivatives in dimethylformamide, *Chem. Heterocycl. Compd*. 1978, 14, p 1350–1354
- [205] Kaye RC, Stonehill HI. A polarographic study of the electroreduction of acridine, *J. Chem. Soc*. 1951, p 27–38. doi: <https://doi.org/10.1039/JR9510000027>.
- [208] Nafisi S, Saboury AA, Keramat N, Neault JF, Tajmir-Riahi HA. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue, *J. Mol. Struct*. 2007, 827, p 35–43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.05.004>.
- [209] Morawska K, Popławski T, Ciesielski W, Smarżewska S. Electrochemical and spectroscopic studies of the interaction of antiviral drug Tenofovir with single and double stranded DNA, *Bioelectrochemistry*. 2018, 123, p 227–232
- [210] Sochr J, Nemčková K, Černicová M, Campbell K, Milata V, Farkašová D, Labuda J. DNA Interaction with 17 α -Ethinylestradiol Studied Using Electrochemical Biosensors and

Biosensing in Solution, *Electroanalysis*. 2019, 31, p 1961–1968. doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201900091>

[211] Jensen CG, Bleumink AR, Wilson WR. Effects of Amsacrine and Other DNA-intercalating Drugs on Nuclear and Nucleolar Structure in Cultured V79 Chinese Hamster Cells and PtK2 Rat Kangaroo Cells, *Cancer Res.* 1985, 45, p 717–725

[212] Adams A, Guss JM, Collyer CA, Denny WA, Prakash AS, Wakelin LPG. Acridinecarboxamide topoisomerase poisons: Structural and kinetic studies of the DNA complexes of 5-substituted 9-amino-(N-(2-dimethylamino)ethyl)acridine-4-carboxamides, *Mol. Pharmacol.* 2000, 58, p 649–658. doi: <https://doi.org/10.1124/mol.58.3.649>

7. ПРИЛОЗИ

ПРИЛОГ 1. Списак публикованих радова и саопштења који чине део тезе

Научни радови објављени у врхунским међународним часописима

M21

1. Rupar J, Aleksić MM, Dobričić V, Brborić J, Čudina O. An electrochemical study of 9-chloroacridine redox behavior and its interaction with double-stranded DNA, *Bioelectrochemistry*, 2020, 135, 107579
2. Rupar J, Dobričić V, Brborić J, Čudina O, Aleksić MM. Square wave voltammetric study of interaction between 9-acridinyl amino acid derivatives and DNA. *Bioelectrochemistry*, 2023, 149, 108323.

Научни радови објављени у истакнутим међународним часописима

M22

1. Rupar J, Dobričić V, Grahovac J, Radulović S, Skok Ž, Ilaš J, Aleksić M, Brborić J, Čudina O. Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 9-acridinyl amino acid derivatives, *RSC Med. Chem.*, 2020, 11, p 378

Саопштења на међународним скуповима штампана у целини:

M33

1. Pantić J, Aleksić M, Dobričić V, Čudina O, Brborić J, Vladimirov S. Electrochemical oxidation and interaction of 9-chloroacridine with DNA at glassy carbon electrode. Physical Chemistry 2016, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 26-30, 2016, Belgrade, Serbia, Proceedings 383-386
2. Rupar J, Aleksić M, Dobričić V, Čudina O, Brborić J, Vladimirov S. Application of electrochemical biosensor for investigation of acridine derivatives – DNA interaction. Physical Chemistry 2018, 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, September 24-28, 2018, Belgrade, Serbia, Proceedings 379-382

Научни радови објављени у водећим часописима националног значаја

M51

1. Rupar J, Dobričić V, Aleksić M, Brborić J, Čudina O. A Review of Published Data on Acridine Derivatives with Different Biological Activities, Kragujevac J. Sci. 2018, 40, p. 83-101

8. БИОГРАФИЈА

Јелена Рупар је рођена 1990. године у Пожаревцу, где је као ђак генерације, 2009. године завршила средњу школу (Медицинска школа „Дулић др Војислав“).

Као студент пете године, 2013. године добила је Похвалницу у склопу годишње награде најбољим студентима интегрисаних академских студија Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета. Дипломирала је на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету 2014. године, са просечном оценом 9,37.

По завршетку студија обавила је приправнички стаж у З. У. „Апотека Пожаревац“. Након обављеног стажа, септембра 2015. положила је стручни испит за магистра фармације.

Докторске студије на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету, модул Фармацеутска хемија уписала је 2015. године. Од 2015. године била је ангажована као стручни сарадник у практичној настави на Катедри за физичку хемију и инструменталне методе Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, у звање асистента изабрана је априла 2017. године.

Члан је истраживачког тима Фармацеутског факултета. у оквиру истраживачке теме: „Развој молекула са антиинфламаторним и кардиопротективним дејством: структурне модификације, моделовање, физичкохемијска карактеризација и формулациона испитивања“ (од 2018. године).

Члан је истраживачког тима на пројекту „Идеје“, InfCanPlay, чији је руководилац др Владимир Добричић, ванр. проф. (од 2022. године).

Аутор је и коаутор 8 научних радова штампаних у часописима од међународног значаја од којих три рада чине део докторске тезе.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Рупар

Број индекса 5/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза, електрохемијско испитивање интеракција са ДНК и *in vitro* антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина

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

Потпис аутора

У Београду, 21. 09. 2023

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Рупар

Број индекса 5/2015

Студијски програм Докторске академске студије – фармацеутска хемија

Наслов рада **Синтеза, електрохемијско испитивање интеракција са ДНК и *in vitro* антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина**

Ментор Др сц. Оливера Чудина, редовни професор на Катедри за фармацеутску хемију, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Мара Алексић, редовни професор на Катедри за физичку хемију и инструменталне методе, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 21. 09. 2023.

Изјава о коришћењу

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

Синтеза, електрохемијско испитивање интеракција са ДНК и *in vitro* антитуморска активност аминокиселинских деривата акридина

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 21. 09. 2023.

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