

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Janko V. Ignjatović

Istraživanje antimikrobne aktivnosti i  
hromatografskog ponašanja sastojaka  
endofitnih gljiva primenom hemometrijskih  
metoda

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2022.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET



Janko V. Ignjatović

Istraživanje antimikrobne aktivnosti i  
hromatografskog ponašanja sastojaka endofitnih  
gljiva primenom hemometrijskih metoda

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2022.

II

UNIVERSITY IN BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY



Janko V. Ignjatović

Investigation of antimicrobial activity and  
chromatographic behavior of endophytic fungi  
constituents using chemometric methods

**Doctoral dissertation**

In Belgrade, 2022.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u Republici Srbiji i na Katedri za farmaceutsku biologiju Univerziteta u Ljubljani u Republici Sloveniji.

**Mentor:**

\_\_\_\_\_  
Vanr. prof. dr Biljana Otašević,  
Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

**Članovi komisije:**

1. \_\_\_\_\_  
Prof. dr Borut Štrukelj,  
Redovni profesor, Univerzitet u Ljubljani, Farmaceutski fakultet

2. \_\_\_\_\_  
Prof. dr Mira Zečević,  
Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

3. \_\_\_\_\_  
Vanr. prof. dr Ana Protić,  
Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

4. \_\_\_\_\_  
Vanr. prof. dr Brankica Filipić,  
Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Ocena doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

# Istraživanje antimikrobne aktivnosti i hromatografskog ponašanja sastojaka endofitnih gljiva primenom hemometrijskih metoda

## SAŽETAK

Rezistencija bakterija na delovanje antibiotika predstavlja globalni problem. Na polju razvoja novih lekova iz prirodnih izvora, nedavno je prepoznat potencijal endofitnih gljiva zahvaljujući sposobnosti da proizvedu sekundarne metabolite različitih bioloških aktivnosti. Biosinteza ovih jedinjenja je pod velikim uticajem brojnih faktora koji se vezuju za izbor biljke domaćina, klimatske uslove, ishranu i prisustvo drugih mikroorganizama u okruženju. Velika baza podataka vezanih za aktivnost endofitnih gljiva prema patogenim bakterijama pretaživana je primenom metode analize glavnih komponenti sa ciljem pronalaženja obrazaca u podacima koji bi ukazali na manji broj pravih kandidata za novih razvoj lekova. Na ovaj način, osvetljen je antimikrobni karakter gljive *Phomopsis species*. In vitro testovima je potvrđeno da dihlormetanski ekstrakt gljive izolovane iz četina bora inhibira rast bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Hromatografsko razdvajanje pojedinačnih jedinjenja ekstrakta optimizovano je primenom dizajna eksperimenata, a zatim je izvršeno izolovanje i karakterizacija njihove hemijske strukture korišćenjem masene spektrometrije i NMR spektroskopije. In silico metodama su definisani prediktori bioraspoloživosti i toksikološke aktivnosti jedinjenja (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-3,4-dihidroksipent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat i (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-4-hidroksi-3-oksopent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat. Za razliku od dosadašnjih istraživanja koja su se ograničavala *in vitro* testovima antimikrobne aktivnosti endofitnih gljiva i razrešavanjem hemijske strukture izolovanih biomolekula, ova disertacija predstavlja proširenje prethodnih istraživanja primenom *in silico* metoda. Studija molekuskog dokinga omogućila je razumevanje mehanizama interakcije biomolekula sa receptorima koji pripadaju patogenim bakterijama uobičajeno multirezistentnim na antibiotike. Primenom veštačkih neuronskih mreža nagrađeni su pouzdani modeli koji ukazuju na vezu između hemijske strukture, parametara interakcije i afiniteta vezivanja za receptore na osnovu kojih je moguć razvoj novih hemijski srodnih antibiotika.

**Ključne reči:** Antibakterijska aktivnost; Endofitne gljive; Hemometrijske metode u farmaceutskom istraživanju; *in silico* razvoj lekova;

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Analitika lekova

# Investigation of antimicrobial activity and chromatographic behavior of endophytic fungi constituents using chemometric methods

## ABSTRACT

Bacterial resistance towards antibiotics represents a global phenomenon. Potential of endophytic fungi as producers of secondary metabolites with wide spectra of different bioactivities in the field of drug discovery from natural resources has recently been introduced. The production of these compounds is under great impact of variety of factors related to the choice of plant host, climate conditions, nutrition and presence of other microorganisms in the same surrounding. Big data set comprising of indices of endophytic fungi antibacterial activity towards pathogen bacteria was evaluated using principal component analysis with the aim to find patterns in data and to point out to a limited number of proper candidates for future pharmaceutical research. This resulted in highlighting of the antimicrobial character of *Phomopsis species*. *In vitro* tests proved that dichloromethane extract of endophytic fungi isolated from conifer needles inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Chromatographic separation of individual components of extract was optimized using design of experiments followed by the isolation and chemical structure characterization using mass spectrometry and NMR spectroscopy. *In silico* methods were used to define the predictors of bioavailability and toxicological activity of compounds (Z)-(Z)-2-acetoxyprop-1-en-1-yl-3-(3-((E)-3,4-dihydroxypent-1-en-1-yl)oxiran-2-yl)acrylate and (Z)-(Z)-2-acetoxyprop-1-en-1-yl-3-(3-((E)-4-hydroxy-3-oxopent-1-en-1-yl)oxiran-2-yl)acrylate. Unlike up to date research outcomes limited to *in vitro* evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi and chemical structure elucidation of isolated biomolecules, this dissertation represents an extension to previous investigations using *in silico* methods. The molecular docking study enabled the comprehensive understanding of the mechanisms underlying the interaction of biomolecules with receptors belonging to usually multidrug resistant bacterial pathogens. The artificial neural networks were used to build reliable models relating chemical structure, parameters of interaction and the binding affinity to receptors, thus providing the essence for future development of new chemically related antibiotics.

**Key words:** Antibacterial activity; Endophytic fungi; Chemometric methods in pharmaceutical research; *in silico* drug discovery;

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific subfield:** Drug analysis



# SADRŽAJ

SAŽETAK .....	V
ABSTRACT .....	VII
1 UVOD.....	1
1.1 Problematika bakterijske rezistencije .....	2
1.2 Značaj endofitnih gljiva u razvoju antimikrobnih lekova.....	3
1.3 Savremeni alati u razvoju lekova i metoda za njihovo ispitivanje .....	5
1.3.1 Veštačke neuronske mreže.....	7
1.3.2 Pretraživanje velikih baza podataka.....	10
1.3.3 Simulacija molekuskog povezivanja.....	11
1.3.4 Kvantitativno iskazani odnosi između hemijske strukture, svojstva i aktivnosti .....	12
1.3.4.1 Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti .....	13
1.3.4.2 Kvantitativni odnos strukture i retencionog ponašanja i značaj lipofilnosti za biološku aktivnost .....	15
1.3.5 <i>In silico</i> metode za određivanje prediktora biološke aktivnosti novog leka .....	20
1.3.6 Dizajn eksperimenata .....	25
2 CILJEVI RADA .....	32
3 EKSPERIMENTALNI DEO .....	34
3.1 Analiza glavnih komponenti.....	35
3.1.1 Oprema .....	35
3.1.2 Postupak analize glavnih komponenti.....	35
3.2 Priprema endofitnog materijala .....	40
3.2.1 Oprema, materijali, hemikalije i reagensi .....	40
3.2.2 Postupak pripreme endofitnih ekstrakata .....	41

3.3	Tehnike za procenu bioaktivnosti.....	42
3.3.1	Oprema, materijali, hemikalije i reagensi .....	42
3.3.2	Postupak određivanja antimikrobne aktivnosti metodom mikrodilucije .....	43
3.3.3	Postupak metode disk difuzije za određivanje antibiotskog potencijala .....	44
3.4	Optimizacija razdvajanja komponenti ekstrakta tankoslojnom hromatografijom .....	45
3.4.1	Oprema, materijali, hemikalije i reagensi .....	45
3.4.2	Priprema endofitnog materijala.....	45
3.4.3	Postupak tankoslojne hromatografije.....	45
3.4.3.1	Eksperimentalni plan.....	46
3.5	Primena tankoslojne hromatografije za određivanje deskriptora lipofilnosti biomolekula endofitnih gljiva.....	47
3.5.1	Oprema, materijali, hemikalije i reagensi .....	47
3.5.2	Postupak primene tankoslojne hromatografije za određivanje deskriptora lipofilnosti biomolekula endofitnih gljiva.....	48
3.6	Izolovanje i karakterizacija hemijske strukture komponenti iz ekstrakta endofitnih gljiva.....	50
3.6.1	Oprema, materijali, hemikalije i reagensi .....	50
3.6.2	Postupak hromatografske analize i sakupljanja frakcija .....	52
3.6.3	Postupak masene spektrometrije.....	53
3.6.4	Postupak nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije.....	55
3.7	<i>In silico</i> procena fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti komponenti ekstrakta endofitnih gljiva .....	55
3.7.1	Oprema.....	55
3.7.2	Postupak <i>in silico</i> procene fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti komponenti ekstrakta endofitnih gljiva .....	55

3.8	<i>Docking</i> simulacije .....	56
3.8.1	Oprema .....	56
3.8.2	Postupak izvođenja <i>docking</i> simulacija .....	56
3.8.2.1	Priprema receptora i ligandnih molekula za <i>docking</i> studiju.....	58
3.9	QSAR studije primenom pristupa baziranom na receptoru .....	59
3.9.1	Oprema .....	59
3.9.2	Postupak izvođenja QSAR studije primenom pristupa baziranom na receptoru .....	59
4	REZULTATI I DISKUSIJA.....	61
4.1	Evaluacija rezultata analize glavnih komponenti .....	62
4.2	Evaluacija antibiotske aktivnosti ekstrakta endofitnih gljiva .....	68
4.3	Optimizacija razdvajanja bioaktivnih komponenti ekstrakta tankosojnom hromatografijom .....	70
4.4	Određivanje hromatografskih deskriptora lipofilnosti primenom tankoslojne hromatografije.....	81
4.5	Izolovanje aktivnih biomolekula i određivanje hemijske strukture.....	85
4.6	<i>In silico</i> procena fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti jedinjenja iz ekstrakta endofitnih gljiva.....	99
4.7	Molekularne <i>docking</i> studije .....	104
4.8	QSAR studije primenom pristupa baziranom na receptoru .....	115
5	ZAKLJUČAK.....	123
6	LITERATURA .....	129
7	PRILOZI.....	151
	DODATNI MATERIJAL.....	152
	LISTA SKRAĆENICA I SIMBOLA .....	164
	PUBLIKACIJE OBUHVACENE DOKTORSKOM DISERTACIJOM .....	177
	DODATNO OBRAZLOŽENJE.....	179

ZAHVALNICA.....	180
8 BIOGRAFIJA.....	181
9 IZJAVE AUTORA DOKTORSKE DISERTACIJE.....	184

## LISTA SLIKA

<i>Slika 1-1</i>	<i>Model veštačkog neurona.....</i>	<i>8</i>
<i>Slika 3-1</i>	<i>Standardne antimikrobne molekule korišćene u TLC analizi.....</i>	<i>48</i>
<i>Slika 4-1</i>	<i>Glavne komponente sa odgovarajućim eigen-vrednostima.....</i>	<i>63</i>
<i>Slika 4-2</i>	<i>Dijagrami glavnih komponenti sa aktivnim varijablama (A) i zapažanjima (B) . .....</i>	<i>65</i>
<i>Slika 4-3</i>	<i>Prikaz rezultata za glavne komponente.....</i>	<i>66</i>
<i>Slika 4-4</i>	<i>Grafički prikaz CCD-a za ispitivanje uticaja tri faktora.....</i>	<i>72</i>
<i>Slika 4-5</i>	<i>Površina R1 odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi.....</i>	<i>74</i>
<i>Slika 4-6</i>	<i>Površina R2 odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi.....</i>	<i>75</i>
<i>Slika 4-7</i>	<i>Površina R3 odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi.....</i>	<i>77</i>
<i>Slika 4-8</i>	<i>Površina R4 odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi.....</i>	<i>79</i>
<i>Slika 4-9</i>	<i>Površina R5 odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi.....</i>	<i>80</i>
<i>Slika 4-10</i>	<i>Hromatogram dihlorometanskog uparenog ekstrakta endofita Phomopsis species rastvorenog u smeši metanola i vode 50:50 (v/v) iz semi-preparativne HPLC analize .....</i>	<i>86</i>
<i>Slika 4-11</i>	<i>Apsorpcioni spektri jedinjenja koja odgovaraju pikovima 1, 2, 3, 4 i 5, iz dihlorometanskog uparenog ekstrakta rastvorenog u metanolu i vodi 50:50 (v/v) .....</i>	<i>87</i>
<i>Slika 4-12</i>	<i>Ukupni jonski hromatogram (A) i GC/MS spektri (B) jedinjenja 325-3 .....</i>	<i>90</i>
<i>Slika 4-13</i>	<i><sup>1</sup>H NMR spektar (A), <sup>13</sup>C NMR spektar (B) za toluen standard i jedinjenja 325-3 .....</i>	<i>91</i>
<i>Slika 4-14</i>	<i>HSQC (A) i COSY (B) spektri jedinjenja 325-3 .....</i>	<i>92</i>
<i>Slika 4-15</i>	<i>HMBC (A) i NOESY (B) spektri jedinjenja 325-3 .....</i>	<i>93</i>
<i>Slika 4-16</i>	<i>Molekulske strukture jedinjenja 325-3 (A) i 325-5 (B).....</i>	<i>94</i>
<i>Slika 4-17</i>	<i>Ukupni jonski hromatogram (A) i GC/MS spektar (B) jedinjenja 325-5 .....</i>	<i>95</i>
<i>Slika 4-18</i>	<i><sup>1</sup>H NMR spektar (A), <sup>13</sup>C NMR spektar (B) za toluen standard i jedinjenje 325-5 .....</i>	<i>96</i>
<i>Slika 4-19</i>	<i>HSQC (A) i COSY (B) spektri jedinjenja 325-5 .....</i>	<i>97</i>
<i>Slika 4-20</i>	<i>HMBC (A) i NOESY (B) spektri jedinjenja 325-5 .....</i>	<i>98</i>
<i>Slika 4-21</i>	<i>Hemijske strukture ispitivanih molekula liganada 325-3 (A), 325-5 (B), kurvularid A (C), kurvularid B (D), kurvularid C (E), kurvularid D (F), kurvularid E (G), jedinjenje 6 (H), jedinjenje 7 (I), fomol (J), fomoenamid (K) i fomonitroestar (L).....</i>	<i>106</i>

- Slika 4-22 *Doking konformacija liganada 325-3 (A), 325-5 (B), fomoenamida (C) i ampicilina (D) sa 1F0K receptor vezujućim džepom. Prikazan je samo deo receptora sa reziduama aminokiselina preko kojih se ostvaruje interakcija sa ligandima. Potencijal za formiranje ključnih vodoničnih veza između rezidua aminokiselina u receptorskom džepu za vezivanje i liganada naglašene su zelenom bojom..... 109*
- Slika 4-23 *Doking konformacija liganada 325-3 (A), 325-5 (B), fomoenamida (C) i ampicilina (D) sa 3G7B vezujućim mestu na receptoru. Prikazan je samo deo receptora sa reziduama aminokiselina preko kojih se ostvaruje interakcija sa ligandima. Potencijal za formiranje ključnih vodoničnih veza između rezidua aminokiselina u receptorskom džepu za vezivanje i liganada naglašene su zelenom bojom..... 112*
- Slika 4-24 *Doking koformacija liganada 325-5 (A), jedinjenja 7 (B), fomonitroestra (C) i ampicilina (D) sa ISHV vezujućim mestu na receptoru. Prikazan je samo deo receptora sa reziduama aminokiselina preko kojih se ostvaruje interakcija sa ligandima. Potencijal za formiranje ključnih vodoničnih veza između rezidua aminokiselina u receptorskom džepu za vezivanje i liganada naglašene su zelenom bojom..... 114*

## LISTA TABELA

Tabela 3-1	Podaci korišćeni za analizu glavnih komponenti – PCA.....	37
Tabela 3-2	Eksperimentalni plan za centralni kompozicioni dizajn.....	47
Tabela 3-3	Eksperimentalni plan TLC hromatografske analize.....	49
Tabela 4-1	Korelacioni matriks ispitivanih kvantitativnih varijabli .....	62
Tabela 4-2	Eigen-vektori i eigen-vrednosti generisanih glavnih komponenti (PC) .....	63
Tabela 4-3	Doprinosi, faktorska opterećenja i kvadrat kosinusa varijabli .....	64
Tabela 4-4	Prikaz izračunatih R <sub>f</sub> vrednosti za analite 1, 2 i 3 .....	72
Tabela 4-5	Prikaz rezultata za sva analizirana jedinjenja metodom TLC i pod svim eksperimentalnim uslovima .....	83
Tabela 4-6	Uporedni prikaz parametara kalibracione krive za sva ispitivana jedinjenja TLC metodom.....	84
Tabela 4-7	<sup>1</sup> H (400 MHz) i <sup>13</sup> C (100 MHz) spektralna analiza jedinjenja 325-3 i 325-5 ..	89
Tabela 4-8	Procena vrednosti particionog koeficijenta logP za aktivna jedinjenja iz Phomopsis ekstrakta .....	99
Tabela 4-9	Vrednosti deskriptora dobijenih in silico koji figurišu u pravilu Lipinskog...	100
Tabela 4-10	In silico izračunati deskriptori za Ghose pravilo .....	100
Tabela 4-11	In silico izračunati deskriptori za Veber –ovo pravilo .....	100
Tabela 4-12	In silico dobijeni parametri distribucije.....	101
Tabela 4-13	LD <sub>50</sub> vrednosti za aktivna jedinjenja iz ekstrakta endofita Phomopsis sp.....	102
Tabela 4-14	LD <sub>50</sub> vrednosti za referentne antibiotike .....	102
Tabela 4-15	Hromatografski dobijeni parametri lipofilnosti .....	103
Tabela 4-16	In silico parametri lipofilnosti.....	103
Tabela 4-17	Ekstrahovani eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1F0K receptorom.....	108
Tabela 4-18	Ekstrahovani eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3G7B receptorom.....	111
Tabela 4-19	Ekstrahovani eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1SHV receptorom.....	113
Tabela 4-20	QSAR eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1F0K receptorom. ....	117
Tabela 4-21	QSAR eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3G7B receptorom .....	119
Tabela 4-22	QSAR eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1SHV receptorom .....	121
Tabela 7-1	Koordinate centralnih tačaka mreže za sve testirane ligande.....	152
Tabela 7-2	Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1F0K receptorom.....	153
Tabela 7-3	Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3G7B receptorom.....	155
Tabela 7-4	Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1SHV receptorom.....	157

<i>Tabela 7-5</i>	<i>Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3VSL receptorom .....</i>	<i>159</i>
<i>Tabela 7-6</i>	<i>Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 4EMV receptorom....</i>	<i>160</i>
<i>Tabela 7-7</i>	<i>Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1JIIJ receptorom .....</i>	<i>161</i>
<i>Tabela 7-8</i>	<i>Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1KZN receptorom ....</i>	<i>162</i>
<i>Tabela 7-9</i>	<i>Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3K3P receptorom.....</i>	<i>163</i>



## LISTA PRILOGA

DODATNI MATERIJAL.....	152
LISTA SKRAĆENICA I SIMBOLA.....	164
PUBLIKACIJE OBUHVAĆENE DOKTORSKOM DISERTACIJOM .....	177
DODATNO OBRAZLOŽENJE.....	179
ZAHVALNICA.....	180
BIOGRAFIJA.....	181
IZJAVE AUTORA DOSKTORSKE DISERTACIJE.....	184

# **1 UVOD**

## 1.1 Problematika bakterijske rezistencije

Rezistencija na lekove i posebno otpornost bakterija na antibiotike, su vodeći svetski zdravstveni problemi. Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije, bakterijska rezistencija na antibiotike je u porastu u svim delovima sveta i predstavlja jednu od najvećih pretnji globalnom zdravlju [1-3]. Bakterije razvijaju nove mehanizme otpornosti na postojeće antimikrobne agense, što ukazuje na to da ustaljeni načini lečenja zaraznih bolesti postaju neefikasni. Mnoge medicinske procedure kao što su transplantacija organa, hemoterapija, lečenje dijabetesa i opsežne operacije, takođe su pod visokim rizikom bez efikasnih antimikrobnih agenasa za prevenciju i tretiranje infekcija. Iako se otpornost na antibiotike kod bakterija javlja prirodno, neracionalna primena antibiotika kod ljudi i životinja ubrzava proces razvoja rezistencije [4-6]. Rastuća lista zaraznih bolesti poput pneumonije, bolesti urinarnog sistema, tuberkuloze, gonoreje i bolesti uzrokovanih mikroorganizmima prisutnim u hrani, postaje sve veća, a ponekad je i nemoguće sprovesti lečenje jer antibiotici postaju sve manje efikasni [7, 8]. Otpornost na antibiotike dovodi do dužeg boravka pacijenata u bolnici, većih medicinskih troškova i povećanja smrtnosti [9, 10]. Prema podacima Evropske agencije za prevenciju i kontrolu bolesti, otpornost sojeva bakterija *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. je u porastu. Naime, testirani izolati bakterija bili su otporni na najmanje jednu antimikrobnu grupu lekova, a primećena je i kombinovana rezistencija na nekoliko grupa antimikrobnih lekova [11]. Pošto je savremena medicina izgrađena oslanjajući se na antibiotike, ne može se zamisliti svet bez njih [12-14]. Da bi se efikasno izborili sa izazovom kao što je antimikrobna rezistencija, važno je pridržavati se pravila u vezi upotrebe samo nužno potrebnih antibiotika za kontrolu bolesti. Razvoj novih antimikrobnih lekova je takođe neophodan kako bi se obezbedila adekvatna zamena za već postojeće antibiotike kojima efikasnost opada [15].

Istraživanje i razvoj u oblasti farmaceutskih nauka je u stalnoj potrazi za novim aktivnim supstancama. Među različitim strategijama koje se koriste za razvoj novih lekova, postoje dokazi da je istraživanje bazirano na prirodnim izvorima podjednako efikasno u otkrivanju novih jedinjenja kao i kombinatorna sintetska hemija [12]. U tom pogledu, endofitne gljive se mogu posmatrati kao prirodni, raznovrsni i održivi resursi za potencijalno otkrivanje novih aktivnih supstanci. Reč endofit vodi poreklo od grčkih reči *endo* – unutar i *phyton* – biljka.

Endofiti se definišu kao nepatogeni mikroorganizmi (bakterije ili gljivice), koji se nalaze u unutrašnjim tkivima biljaka i u simbiotskom su odnosu sa biljkom domaćinom [16-21]. Endofitne gljive su odnedavno prepoznate kao prirodni rezervoar potentnih jedinjenja ključnih za otkriće novih lekova [22-25]. Pretragom naučne literature ustanovljeno je da je za pojedine sekundarne metabolite poreklom iz endofitnih gljiva već potvrđeno da imaju antifungalnu, antibakterijsku, antivirusnu, citotoksičnu ili antioksidativnu aktivnost koja može predstavljati deo terapijskih protokola u humanoj populaciji [26].

## **1.2 Značaj endofitnih gljiva u razvoju antimikrobnih lekova**

Poznato je da su biljke tokom evolucije razvile određene sposobnosti, kao što je produkcija sekundarnih metabolita, u cilju odbrane od patogenih mikroorganizama, insekata ili drugih životinja koje se njima hrane [27]. Pored toga, utvrđeno je da su u brojnim biljnim tkivima prisutni mikroorganizmi koji u njima rastu i razmnožavaju se [17, 28-29]. U literaturi se pod terminom endofitizam označava ova jedinstvena i uzajamna asocijacija biljaka i mikroorganizama [30]. Stoga se mikroorganizmi koji žive u tkivima biljaka definišu kao endofiti [31-32], a taksonomski pripadaju kategoriji bakterija i gljiva [33].

Endofitne gljive su mikroorganizmi koji deo svog životnog ciklusa provode inter- i/ili intracelularno kolonizujući zdrava tkiva biljaka domaćina. Obično ne izazivaju nikakve očigledne simptome bolesti kod domaćina [28]. Naprotiv, endofne gljive i njihovi domaćini uspostavljaju poseban simbiotski odnos kojim se biljka domaćin štiti od potencijalnih pretnji u zamenu za održavanje i razmenu nutrijenata sa endofitnim gljivama. Da bi se olakšao opstanak ove simbioze, endofitne gljive često pomažu biljkama domaćinima da savladaju invaziju patogenih mikroorganizama i/ili insekata i drugih životinja tako što proizvode bioaktivne sekundarne metabolite [12-14, 17-21, 27-31, 34-36]. Takođe, postoje dokazi da endofiti proizvode metabolite za regulisanje rasta biljke, produktivnosti i fitoremedijacije [34-35, 37-42].

Postavlja se pitanje, međutim, zašto su endofitne gljive tako „kreativne” u sintezi novih jedinjenja i zašto predstavljaju dobar prirodni izvor za dalje istraživanje novih lekova koji imaju potencijal da preduprede danas aktuelne probleme bakterijske rezistencije. S’ jedne strane, ova grupa organizama nije ekstenzivno proučavana kao, na primer, biljni patogeni, što znači da je

manje verovatno da su izolovani metaboliti poznate strukture. Sa druge strane, metaboličke interakcije endofitnih gljiva sa biljkom domaćinom mogu ići na ruku sintezi biološki aktivnih sekundarnih metabolita [43-44]. Proizvodnja bioaktivnih jedinjenja od strane endofitnih gljiva, posebno onih ekskluzivnih za biljke domaćine, nije važna samo sa ekološke perspektive, već i sa biohemijskog i molekularnog stanovišta pošto endofitne gljive proizvode mnoštvo poznatih i novih biološki aktivnih sekundarnih metabolita za direktnu ili indirektnu primenu u terapiji brojnih bolesti [12, 45-46]. Sekundarni metaboliti endofitnih gljiva u hemijskom pogledu pripadaju različitim klasama jedinjenja uključujući alkaloidne, peptide, steroide, terpenoide, fenole, kinone i flavonoide [14]. U literaturi su pronađeni podaci o sekundarnim metabolitima sa priznatim terapijskim potencijalom, kao što je paklitaksel [25], podofilotoksin [47], deoksipodofilotoksin [48], kamptotecin [49], emodin [50], itd.

Ustanovljeno je da endofitne gljive imaju sposobnost proizvodnje širokog spektra sekundarnih metabolita čija je hemijska priroda strogo zavisna od faktora kao što su tip biljke domaćina, organ biljke, eventualna kohabitacija sa drugim sojevima mikroorganizama, klimatski uslovi, sezonske fluktuacije, mikroklima staništa, temperatura [17, 51-53], itd. Potvrđeno je da je za svaku biljku domaćina specifičan jedan rod endofitnih gljiva, a konkretna vrsta, odnosno predstavnik roda, je dodatno karakteristična za uslove i geografsku oblast u kojoj se biljka domaćin razvija [17-18, 20].

Podaci iz pretražene literature naglašavaju veoma značajnu antibakterijsku i antimikotičnu aktivnost endofitnih gljiva koje pripadaju rodu *Phomopsis* [36-38, 51-57]. Na primer, sekundarni metaboliti iz endofitne gljive vrste *Phomopsis sp.* koja je izolovana iz listova tropskog voća *Garcinia dulcis*, ispoljili su aktivnost prema *Mycobacterium tuberculosis* [38, 54]. Pored toga, endofitna gljiva vrste *Phomopsis sp.* izolovana iz morske mangrove pokazala je značajnu inhibitornu aktivnost prema vrstama *Candida albicans* i *Fusarium oxysporum* [36, 55]. Rakshith et al., 2013 [38], navode da je generalno posmatrano rod *Phomopsis* poznat kao bogat izvor bioaktivnih sekundarnih metabolita raznolike strukture i funkcije kao što su fomopsihalasin, citochalasin, konvolvulanska kiselina, izobenzofuranoni, oblongolid, fomopsolid, fomodiol, fomoksantoni i dimeri ksantona, fomoenamid, fomonitroestar, deacetilfomoksanton B, dicerandrol A, (1S, 2S, 4S)-p-mentan-1,2,4-triol, uridin, etil-2,4-dihidroksi-5,6-dimetilbenzoat i fomopsilacton [36, 38]. Te strukture su dodatno ispitivane i

pokazale su antibakterijsku, antifungalnu i antialgalnu aktivnost [36, 38]. Noviji literaturni podaci ukazuju na značajan potencijal endofitnih gljiva roda *Phomopsis* koje naseljavaju četinarske šume u planinskim regionima Slovenije [58].

Međutim, iako su ispitivane dugi niz godina, potencijal endofitnih gljiva još uvek nije dovoljno istražen. Važno je napomenuti da se do nedavno traganje za novim bioaktivnim proizvodima zasnivalo uglavnom na nasumičnom ispitivanju izolata endofitnih gljiva. Radi optimizacije potrage, važno je uzeti u obzir da sekundarni metaboliti koje endofiti sintetišu mogu korespondirati sa odgovarajućom ekološkom nišom endofite i njenog domaćina, kao i da međusobne metaboličke interakcije mogu da pospeše sintezu određenih sekundarnih metabolita [59-61]. Dodatno, pravilno razumevanje potencijala endofita kao potencijalnog resursa za farmaceutski razvoj suočava se sa poteškoćama u vezi sa velikim brojem podataka zabeleženih za različite vrste endofitnih gljiva, potom kombinacije endofitnih vrsta i različitih zeljastih biljaka ili drveća kao njihovih domaćina. Takođe, proizvodnja bioaktivnih supstanci od strane endofita zavisi i od razlike u delovima i starosti biljaka sa kojima su u simbiozi, tipa staništa, kao i eventualne kohabitacije sa drugim sojevima mikroorganizama. Istovremeno, čini se da klimatski uslovi i fluktuacije vremena tokom godišnjih doba igraju važnu ulogu u proizvodnji bioaktivnih molekula endofita. Takođe, u literaturi postoje dokazi, koji se odnose na upotrebu različitih mikrobnih ili ćelijskih kultura koje se koriste za otkrivanje bioaktivnosti, kao i primeri različitih i obično nestandardizovanih protokola koji se primenjuju u studijama bioprofilisanja [12-14, 17-21, 27-30, 34-35, 52-53, 58]. Zato je izuzetno važno kritički procenjivati potencijal ograničenog broja odgovarajućih kandidata ili obećavajućih tragova za otkrivanje lekova sa antimikrobnim delovanjem.

### **1.3 Savremeni alati u razvoju lekova i metoda za njihovo ispitivanje**

Otkrivanje i razvoj novih lekova je veoma skup i dugotrajan proces pun izazova [62]. Zbog toga postoji velika potreba da se ubrza sam proces pronalaženja novih terapeutika, kao i metodologija otkrivanja. Tokom ovog procesa, moraju se obaviti intenzivna istraživanja kako bi se pronašle aktivne strukture kao kandidati za lek koje imaju potencijal za pretklinička i klinička ispitivanja [63]. Postoji nekoliko glavnih koraka koji se sprovode tokom otkrivanja novih lekova. Prvi je da se identifikuju i validiraju potencijalna ciljna mesta delovanja leka za

specifični tip bolesti [64]. Sledeći korak predstavlja identifikacija vodećeg aktivnog jedinjenja, koje pokazuje željenu biološku ili farmakološku aktivnost. Nakon toga, vodeća jedinjenja odabrana tokom primarne selekcije se optimizuju kako bi se poboljšala njihova aktivnost, fizičko-hemijska i farmakokinetička svojstva, ali i kako bi se smanjili neželjeni efekti [64-65].

Znatni tehnološki napredak u informacionim naukama i molekularnoj biologiji omogućio je upotrebu različitih metoda kompjuterski potpomognutog dizajna lekova (eng. *Computer-aided drug design*, CADD) u različitim fazama otkrivanja i razvoja novih lekova [66]. Takođe, upotreba CADD pristupa u procesu racionalnog dizajna lekova omogućava brzu identifikaciju jedinjenja sa optimalnim farmakološkim profilom. Danas, CADD predstavlja efikasan i nezamenljiv alat, koji se široko koristi u medicinskoj hemiji za racionalni dizajna i sintezu novih farmaceutski aktivnih jedinjenja.

Kompjuterski potpomognut dizajn lekova je zasnovan na različitim *in silico* metodama koje doprinose racionalnom dizajnu novih lekova i sintezi aktivnih jedinjenja. Primena ovih metoda u ranim fazama istraživanja doprinose smanjenju broja eksperimenata koje je potrebno izvesti, ali takođe omogućavaju i procesiranje ogromne količine podataka [67]. Zato korišćenje CADD tehnika za identifikaciju aktivnih i vodećih struktura i odabir najboljih kandidata za dalju evaluaciju značajno smanjuje potrebno vreme i zahtevane resurse u procesu hemijske sinteze i bioloških ispitivanja [66]. Dakle, uvođenje CADD pristupa u racionalnom dizajnu potentnih lekova dovodi do poboljšanja ukupne efikasnosti tokom procesa otkrivanja lekova, kao i do smanjenog trajanja razvojnog puta leka na samo 6-8 godina [66-67].

CADD pristupi danas čine sastavni deo procesa otkrivanja lekova. Međutim, za postizanje navedenih rezultata potrebni su pouzdani i sofisticirani računarski sistemi namenjeni za analizu podataka poput tzv. mašinskog učenja (eng. *Machine learning*, ML). Izraz „mašinsko učenje“ u osnovi je „učenje od strane računara“. Učenje u ovom kontekstu predstavlja proces rezonovanja kroz prikupljanje podataka, konstrukciju modela i procenu rezultata [68-70]. Iako je danas poznata upotreba brojnih algoritama mašinskog učenja, najčešće se u farmaceutskim istraživanjima koriste veštačke neuronske mreže [69, 71-73].

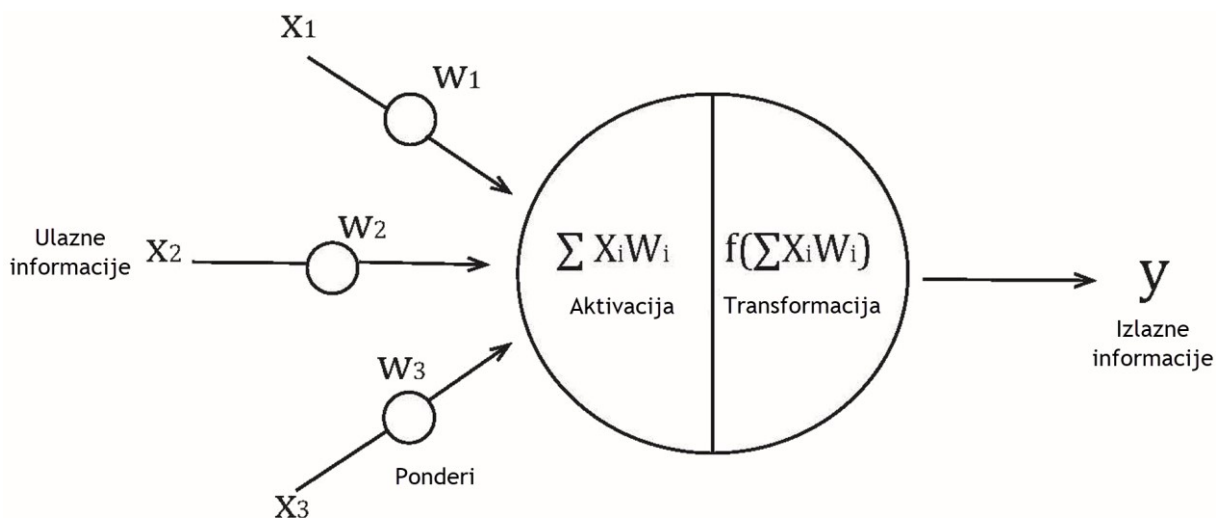
### 1.3.1 Veštačke neuronske mreže

Veštačka inteligencija (eng. *Artificial intelligence*, AI) je ustanovljena oblast računarstva posvećena proizvodnji softvera sposobnih za napredne i sofisticirane proračune koji su slični onima koje ljudski mozak rutinski izvodi [74-75]. Dakle, veštačka inteligencija obuhvata metode, alate i sisteme koji su posvećeni simulaciji ljudskih metoda logičkog, induktivnog zaključivanja i rešavanja problema. Zato postoje dve glavne kategorije razvoja veštačke inteligencije. Prva kategorija su takozvani ekspertske sistemi koji podrazumevaju razvoj metoda i sistema koji simuliraju ljudsko iskustvo i donošenje zaključaka na osnovu seta postavljenih pravila. Druga uključuje razvoj sistema koji modeliraju način na koji funkcioniše ljudski mozak. U ovu grupu možemo svrstati veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial neural networks*, ANN) [76].

Veštačke neuronske mreže su kompjuterski programi inspirisani biološkim funkcijama i dizajnirani da simuliraju način na koji ljudski mozak obrađuje informacije [77-78]. Veštačka neuronska mreža je računarski model koji je formiran iz stotinu pojedinačnih jedinica, takozvanih veštačkih neurona, koji su međusobno povezani koeficijentima (ponderima, faktorima opterećenja). Veštački neuroni zajedno čine neuronsku strukturu koja je organizovana u slojevima [79-80]. Veštačke neuronske mreže imaju sposobnost otkrivanja obrazaca (odnosa) između pojedinačnih podataka unutar baze podataka i na taj način interakcijom sa setom podataka se uče i/ili obučavaju primarno kroz iskustvo, a ne samo putem algoritama mašinskog učenja ili programiranja. Moć neuronskih proračuna proizilazi iz povezivanja neurona u mreži. Svaki element neuronske mreže definisan je ponderima ulaznih podataka, funkcijom prenosa i jednom izlaznom informacijom i u suštini njega definiše jednačina preko koje su ulazne i izlazne komponente (informacije) u ravnoteži. Ponašanje veštačke neuronske mreže je određeno funkcijama prenosa njenih pojedinačnih neurona, pravilima učenja i samom arhitekturom mreže. Ponderi predstavljaju podesive parametre i zato u tom smislu, veštačke neuronske mreže možemo okarakterisati kao parametrizovane sisteme. Ponderisani zbir svih ulaznih informacija vrši aktivaciju svakog veštakog neurona u mreži. Ovaj aktivacioni signal se dalje prenosi preko funkcije prenosa čime se formira jedna izlazna informacija iz svakog veštačkog neurona. Dolazeći signali odnosno ulazne informacije, koji su pomnoženi ponderima, se prvo sabiraju (kombinuju) a zatim svi novonastali podaci prolaze



kroz funkciju prenosa čime se dobija izlazna informacija za tu neuronsku ćeliju. Funkcija aktivacije predstavlja zbir svih neuronskih ulaza, a najčešće korišćena funkcija prenosa je sigmoidalna funkcija (Slika 1-1). Tokom obučavanja mreže, veze između procesnim jedinicama se optimizuju sve dok se greška u predviđanjima ne minimizira i mreža ne dostigne navedeni nivo tačnosti. Tek kada je mreža obučena i testirana, i mogu joj se dati nove ulazne informacije za predviđanje izlaznih informacija. ANN se mogu opisati prenosnim funkcijama njihovih procesnih elemenata, pravilom učenja i formulom veze. Zato su ANN takođe nazivane konekcionistički modeli jer zapravo mreža pondera predstavlja memoriju sistema. Iako pojedinačni neuron može obavljati jednostavne funkcije obrade podataka, prava snaga veštačkih neuronskih mreža potiče od povezivanja svih neurona u mreži. Slično kao pravi neuroni u organizmu, veštački neuroni mogu primiti ekscitatorne ili inhibitorne stimuluse odnosno ulazne informacije. Ekscitatorne ulazne informacije upućuju na funkciju sabiranja za sledeći neuron u nizu, dok inhibitorni ulazi ukazuju na funkciju oduzimanja za naredni neuron. Još jedna vrsta veze gde izlaz jednog sloja obrade podataka vraća nazad na ulaz prethodni sloj ili isti sloj je povratna informacija (eng. *Feedback*).



**Slika 1-1 Model veštačkog neurona**

ANN su u mogućnosti da obrade opsežnu količinu podataka i daju predviđanja koji su ponekad iznenađujuće tačna. To ih ne čini inteligentnim u uobičajenom ljudskom smislu, već ovo ponašanje možemo okarakterisati terminom kompjuterska inteligencija [77-78]. Postoji mnogo različitih pravila učenja i treniranja ANN, ali se najčešće koristi Delta pravilo ili pravilo „širenja

u nazad“ (eng. *Back-propagation*) [81-82]. ANN čita ulazne i izlazne vrednosti skupa podataka za trening mreže i posledično menja vrednost ponderisane veze kako bi se smanjila razlika između predviđene i ciljne vrednosti. Greška prilikom predviđanja se minimizira tokom više ciklusa treninga mreže, sve dok veštačka neuronska mreža ne dostigne određeni nivo tačnosti. Međutim, ako se trening ANN vrši predugo, može se desiti da mreža izgubi sposobnost generalizacije.

Postoje dva pristupa za obuku, učenje i/ili treniranje mreže – pod nadzorom (nadgledano) i bez nadzora (nenadgledano) [83].

Učenje ANN pod nadzorom se vrši sa ciljem da se predvidi jedna ili više ciljnih vrednosti na osnovu ulaznih informacija. Učenje pod nadzorom je u vidu regresije koja se oslanja na ulazni i izlazni skup podataka za obuku mreže. Nakon što je ANN obučena i omogućava željene izlazne informacije, ponderisane veze između procesnih jedinica se sačuvaju. Te vrednosti za ponderisane se zatim koriste za predviđanje rezultata za novi skup ulaznih podataka. Povezivanje obrazaca obično podrazumeva nadzirano učenje ANN, i zato ANN konkurišu statističkim metodama u prepoznavanju obrazaca, posebno u slučajevima kada ispitivani sistemi imaju visok nivo šuma i varijacija.

Treniranje ANN bez nadzora vrši se isključivo preko ulaznih podataka i bez bilo kakve informacije o željenim izlaznim informacijama. U ovom slučaju sam sistem odlučuje koje karakteristike će koristiti za grupisanje ulaznih podataka. Ova funkcionalnost se često naziva samoorganizacija ili adaptacija. Fenomen samoorganizacije može uključivati konkurenciju između ciljanih neurona mreže, njihovo povezivanje ili oboje. Neuroni u veštačkim mrežama su organizovani u slojevima. Na primer, u procesu kompetitivnog učenja, neuroni se grupišu na način da kada jedan neuron snažno reaguje na određene ulazne informacije on potiskuje ili inhibira izlazne informacije drugih neurona u grupi. U kooperativnom učenju neuroni unutar svake grupe rade zajedno kako bi intenzivirali svoj rezultat odnosno izlazne podatke. Zapravo je cilj treniranja ANN grupisanje sličnih obrazaca ponašanja čime se izdvajaju karakteristike nezavisnih promenljivih i uspostavlja sopstvena klasifikacija za ulazne promenljive. Dakle, ANN razmatra podatke koji su dostupni, otkriva određene obrasce svojstvene skupu podataka i uči da odražava ta svojstva prilikom dalje obrade i izračunavanja izlaznih varijanti.

Generalno posmatrano, ANN predstavlja obećavajuću tehniku modelovanja posebno za skupove nelinearnih podataka koji se često susreću u farmaceutskim procesima. U tom slučaju, veštačke neuronske mreže ne zahtevaju formalnu sveobuhvatnu statističku evaluaciju već su u stanju su da otkriju složene nelinearne odnose između zavisnih i nezavisnih varijabli i sve moguće interakcije bez upotrebe komplikovanih jednačina. Takođe, ANN mogu koristiti i više algoritama za obuku. ANN ne zahtevaju poznavanje izvora podataka u smislu specifikacije modela, ali pošto je često potrebna procena mnogih pondera, one zahtevaju veliku količinu podataka za obuku. Pored toga, za rešavanje problema ANN mogu kombinovati i inkorporirati eksperimentalno dobijene podatke i one koji su dostupni u literaturi sa ciljem rešavanja problema. Zato upotreba ANN ima veliki potencijal u oblasti farmaceutskih istraživanja [80, 84-85].

ANN se mogu primenjivati za klasifikaciju ili prepoznavanje obrazaca, predviđanje ili modelovanje. Zbog ovih sposobnosti ANN imaju široku primenu i potencijal u istraživanju koji se kreće od upotrebe u tumačenju analitičkih podataka (npr. modelovanje analitičkih podataka u kontroli kvaliteta), dizajnu aktivnih struktura lekova (npr. molekularno modelovanje) i za dizajn oblika farmaceutskih proizvoda (npr. tokom optimizacije proizvodnih procesa) do modeliranja farmakokinetikog ponašanja supstanci (farmakokinetičko i farmakodinamičko modeliranje, *in vitro/in vivo* korelacija) [81, 86-92].

### **1.3.2 Pretraživanje velikih baza podataka**

Opšte je poznata činjenica da su otkrivanje i razvoj lekova procesi koji zahtevaju mnogo vremena i resursa. Zbog te činjenice, prepoznat je veliki potencijal u primeni računarskih alata u kombinovanom hemijskom i biološkom prostoru kako bi se pojednostavilo otkrivanje, dizajn, razvoj i optimizacija lekova. U poslednje vreme, veliko interesovanje privlači primena savremenih tehnika za naprednu analizu podataka (eng. *Advanced data analytics*, ADA) koje omogućavaju istraživanje velikih skupova podataka sa ciljem otkrivanja složenih odnosa, međusobne povezanosti informacija, odnosno za otkrivanja smislenih obrazaca ponašanja unutar velike količine podataka. U ovakve tehnike spada takozvano *rudarenje kroz podatke* (eng. *Data mining*). *Rudarenje kroz podatke* predstavlja tehniku koja se koristi za istraživanje velikih količina podataka u potrazi za konzistentnim obrascima i/ili odnosima između varijabli i njihovo tumačenje u smislu predviđanja ili proceni očekivanog ishoda. *Rudarenje kroz*

podatke obuhvata tehnike za grupisanje, odnosno klasterovanje, klasifikaciju, regresiju i pravila asocijacije [68, 93-94].

Analiza glavnih komponenti (eng. *Principal component analysis*, PCA) je tehnika *rudarenja kroz podatke*, multivarijantnog modeliranja i analize koja se obično koristi kao način za identifikaciju obrazaca u podacima. Analizom PCA se može rekonstruisati i istovremeno komprimovati originalni skup podataka pronalaženjem niže-dimenzionalne linearne projekcije originalnih podataka visokih dimenzija. Ovo se postiže generisanjem ograničenog broja novih ortogonalnih osa ili promenljivih poznatih kao glavne komponente (eng. *Principal components*, PC). Ove glavne komponente (PC) nisu međusobno povezane i njima se izražava veći deo ukupne varijabilnosti u originalnom skupu podataka. Na taj način se postiže smanjenje broja dimenzija u PCA bez većeg gubitka informacija [93, 95-97].

Pregledom literature je ustanovljeno da se PCA uspešno primenjuje u različitim farmaceutskim istraživanjima, među kojima je i profilisanje bioaktivnosti biljaka. PCA je iskorišćena za istraživanje velikih baza bioaktivnih jedinjenja kako bi se ubrzalo i olakšalo identifikovanje potencijalno novih terapijskih agenasa [95].

### **1.3.3 Simulacija molekuskog povezivanja**

Još jedna od praktičnih računarskih tehnika koja se koristi za istraživanje biološke aktivnosti je simulacija molekuskog povezivanja (eng. *Molecular docking simulations*) kombinovanjem odabranih receptora preko kojih se ostvaruje biološki odgovor i određenih hemijskih struktura. U osnovi, molekularni *docking* podrazumeva računarsku proceduru traženja odgovarajućeg liganda koji energetski i geometrijski odgovara poznatom mestu vezivanja na ciljnom receptoru. Takođe, *docking* simulacija omogućava predviđanje energetski stabilne orijentacije fleksibilnog molekula (ligand) u odnosu na rigidnu strukturu receptora i potencijalno formiranje kompleksa između liganda i receptora. *Docking* studijom se simulira proces molekularnog prepoznavanja liganda i receptora time što se matematički procenjuje potencijal formiranja nekovalentnih veza (poput vodoničnih veza, hidrofobnih interakcija, Van der Valsovih sila i slično), sa ciljem minimizacije slobodne energije kompleksa ligand-receptor. Zbog mogućnosti predviđanja potencijalne interakcije liganda i receptora, molekularni *docking* je jedna od najčešće korišćenih metoda u računarskom dizajniranju lekova [98-100]. Rezultati njegove

primene mogu se iskoristiti za tačno merenje aktivnosti odabranih biomolekula u poređenju sa postojećim referentnim lekom ili supstancom, a potom i definisanje svojstava najboljih kandidata za lek i optimizaciju različitih procesa za njihovo dobijanje.

#### **1.3.4 Kvantitativno iskazani odnosi između hemijske strukture, svojstva i aktivnosti**

Često korišćeni računarski pristup u farmaceutskom istraživanju uključuje niz studija koje za cilj imaju definisanje odnosa između hemijske strukture jedinjenja (brojčano predstavljene putem molekulskih deskriptora) sa jedne strane i vrednošću od interesa koja može poticati od kvantitativno iskazane hemijske ili biološke aktivnosti jedinjenja (npr. koncentracija koja izaziva određeni biološki odgovor) (eng. *Quantitative structure activity relationship studies*, QSAR), izmerenih vrednosti odgovora u izabranom analitičkom sistemu (npr. retenciono ponašanje u hromatografiji) (eng. *Quantitative structure retention relationship*, QSRR) i konačno različitih svojstava jedinjenja ili hemijskog sistema kome jedinjenje pripada (eng. *Quantitative structure property relationships*, QSPR) [101-105]. Eksperimentalno određivanje pomenutih odnosa zahteva mnogo vremena, a često zavisi od ljudskih faktora i podleže greškama. QSXR modeli (X u ovom smislu može biti biološka aktivnost, druga kvantitativno iskazana osobina jedinjenja / sistema ili odgovor u hromatografiji) su teorijski, statistički modeli koji se dobijaju korišćenjem komercijalno dostupnih računarskih sistema zasnovanih najčešće na primeni multiple linearne regresije, kao i ANN kao jednog od algoritama mašinskog učenja.

Prvi korak u QSXR studijama je odabir reprezentativne grupe jedinjenja koja daju isti biološki odgovor (reaguju sa istim receptorom) ili se ispituju u istim analitičkim sistemima. Zatim se vrši izračunavanje mnoštva molekulskih deskriptora koji putem određenih matematičkih operacija odlikavaju svojsva hemijske strukture odabranih jedinjenja. Molekulski deskriptor predstavlja rezultat logičkog i matematičkog postupka kojim se hemijske informacije o ispitivanom jedinjenju pretvaraju u brojčanu vrednost ili rezultat standardizovanog eksperimenta, podržavajući pri tome sveobuhvatno razumevanje različitih karakteristika molekula [106]. Različite računarske tehnike mogu generisati i do 5000 različitih molekulskih deskriptora. Potrebno je međutim pronaći podskup ovih deskriptora koji najbolje korelira sa istraživanom osobinom / ponašanjem / odgovorom jedinjenja. U slučaju QSRR studija, često se uzimaju samo oni deskriptori koji se mogu po svojoj fizičko-hemijskoj interpretaciji dovesti u vezu sa retencionim ponašanjem jedinjenja u skladu sa Abrahamovom teorijom odnosa

linearane solvatacione energije (eng. *Linear solvation energy relationship theory*, LSER) kao osnovnom teorijom u hromatografiji [107]. Uopšteno posmatrano, u cilju izdvajanja odgovarajućeg manjeg broja molekulskih deskriptora iz velikih baza podataka, mogu se koristiti različite tehnike selekcije, kao što su višestruka regresiona analiza, regresiona analiza najmanjih kvadrata ili primena genetskog algoritma. Pošto se nađe odgovarajući podskup molekulskih deskriptora, u slučaju QSRR i QSPR studija, oni se pridružuju vrednostima koje odgovaraju određenom eksperimentu (npr. postavka eksperimenta u hromatografiji koja sadrži podatke o udelu i vrsti organskog radstvarača, sastavu i pH vrednost vodenog dela mobilne faze, temperaturi na kojoj se vrši analiza i sl.). Konačno, tako formirana osnovna grupa podataka se modeluje u odnosu na svojstvo / odgovor / ishod eksperimenta od interesa. Ukoliko se izgradnja modela vrši pomoću algoritama mašinskog učenja, formirana nova grupa podataka se deli na podskupove koji služe za učenje algoritma, testiranje naučenih obrazaca i podgrupu koja služi za validaciju modela [81, 88-91, 108-111]. Dobijeni QSXR modeli se procenjuju na osnovu vrednosti kvadrata koeficijenta korelacije (eng. *Square correlation coefficient*,  $R^2$ ), kvadrata srednje greške odstupanja (eng. *Root mean square error*, RMSE) i koeficijenta korelacije između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti izlaznih podataka. Nakon izgradnje QSXR modela, pristupa se validaciji modela kojom se potvrđuje validnost postavljenog matematičkog odnosa, odnosno upotrebna vrednost modela da predviđa svojstvo / odgovor / ishod eksperimenta od interesa na izabranoj podgrupi podataka. U ovom koraku se mogu koristiti različite metode interne i eksterne validacije [107, 112-113].

#### **1.3.4.1 Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti**

QSAR metoda dizajna lekova spada u tzv. indirektnu ili metode koje su zasnovane na ligandu u farmaceutskom razvoju i koristi se u slučajevima kada je nepoznata struktura za izabrano mesto delovanja. U ovom slučaju, racionalan dizajn novih jedinjenja se vrši na osnovu proučavanja 2D ili 3D struktura liganada za koje je poznato da stupaju u interakciju sa izabranim mestom delovanja [114]. Ova metoda se primarno zasniva na pretpostavci da jedinjenja sa sličnim strukturama takođe imaju slična fizičko-hemijska svojstva i shodno tome imaju slične načine vezivanja sa ciljnim mestom delovanja [110]. Zato je QSAR modelovanje jedna od glavnih računskih metoda, koja se koristi u istraživanjima već duži niz godina [115].

Najčešći pristupi za izgradnju QSAR modela su označeni kao 2D-QSAR i 3D-QSAR. 2D-QSAR metoda razmatra geometrijska i topološka svojstva molekule, ali isključuje uticaj 3D konformacije jedinjenja. Sa druge strane, 3D-QSAR metoda se fokusira na prostorna svojstva jedinjenja, koja su presudna za razlikovanje stereoizomera [116]. Presentacija molekularnih struktura pomoću izračunatih fizičko-hemijskih i 3D strukturnih deskriptora predstavlja kritičan korak za dalji razvoj modela i za predviđanje interakcije malih molekula i receptora [117]. Statističke metode se koriste za odabir najvažnijeg deskriptora za ispitivane molekule, kao i sa ciljem sticanja dubljeg uvida u ključne strukturne karakteristike ispitivane molekule [111, 115] na osnovu kojih će se nadalje usmeravati modifikacija strukture postojećih jedinjenja i poboljšanje njihovih aktivnosti, kao i za predviđanje aktivnost novih jedinjenja koja su proizvedena kao njihovi derivati. Osim ovakve primene, 3D-QSAR studije se takođe mogu koristiti za pregled baza podataka kako bi se pronašli novi aktivni molekuli [118-119].

Takođe, integracija rezultata 3D-QSAR modela i studije molekularnog *dokinga* u racionalnom dizajnu lekova predstavljaju primarnu strategiju za razvoj modela za predviđanje bioaktivnih konformacija jedinjenja, čime se dobijaju pouzdaniji rezultati analize odnosa strukture i aktivnost. Dodatno se rezultati dobijeni primenom različitih CADD metoda mogu koristiti za strukturne modifikacije i dizajn novih jedinjenja. Dakle, računarske i eksperimentalne metode zajedno predstavljaju komplementarne pristupe koji imaju važnu ulogu u procesu otkrivanja novih lekova. Racionalizacija procesa dizajniranja novih lekova kombinovanjem ovih metoda rezultira sveobuhvatnijim, inovativnijim i praktičnijim istraživanjem novih i potencijalno aktivnih jedinjenja.

U pristupu razvoja lekova označenom kao *receptor-based approach*, rezultati sprovedenih *docking* simulacija se pridružuju vrednostima molekularnih deskriptora ispitivanih biomolekula i uz pomoć algoritama mašinskog učenja (npr. primenom ANN) se grade teorijski matematički modeli. Za razliku od *ligand-based* QSAR modela koji uglavnom razmatraju molekulske deskriptore grupe jedinjenja, za potrebe *receptor-based* modelovanja će se koristiti set podataka sastavljen od specifičnih deskriptora ligand-receptor interakcija kao što su broj atoma liganda (eng. *Ligand atoms*), broj atoma liganda suprotstavljenih receptoru (eng. *Juxtaposed ligand/receptor atoms*) i uparene elektrostatičke energije (eng. *Pairwise electrostatic energies*), molekularni deskriptori kao što je npr. broj rotabilnih veza liganda i eksperimentalno određeni

indikatori biološke aktivnosti (npr. indikatori antimikrobne aktivnosti se mogu preuzeti iz *PDBbind-CN* otvorene baze podataka). ANN mreža se trenira tako da predviđa afinitet vezivanja liganda i receptora. Analiza ANN modela zasnovanih na rezultatima *docking* simulacija između različitih struktura i receptora, omogućava bolje sagledavanje potencijala ispitivanih jedinjenja i ukazuje na smernice za dalju optimizaciju hemijskih struktura i razvoj derivata osnovnih struktura sa ciljem razvoja kandidata za nove lekove sa povoljnijim biološkim odgovorima [120].

#### **1.3.4.2 Kvantitativni odnos strukture i retencionog ponašanja i značaj lipofilnosti za biološku aktivnost**

Za sve potencijalno nove lekove je od izuzetne važnosti procena njihovog farmakokinetičkog profila pored biološke aktivnosti. Dakle, pored zadovoljavajućeg terapijskog potencijala, gotovo je neophodno da molekula koja je kandidat za lek poseduje odgovarajuće farmakokinetičke osobine, čime se omogućava dostizanje i održavanje efektivne koncentracije leka na mestu delovanja, uz ispoljavanje niskog potencijala za toksičnost. Zato se već tokom ranih faza istraživanja, sa ciljem praktičnog izbora i selekcije aktivne vodeće molekule sa potencijalom da postane novi lek, upotrebljava veliki broj metoda za procenu biološke aktivnosti [121]. Suština primene svih tih metoda je prikupljanje podataka o optimalnim farmakokinetičkim i toksikološkim osobinama u bazi strukturno sličnih jedinjenja u odnosu na sve ispitivane biološki aktivne molekule. Ovaj pristup je prevashodno posledica činjenice da razvoj oko polovine sintetisanih jedinjenja kao kandidata za lekove biva odbačen iz daljeg istraživanja zbog neprihvatljive bioraspoloživosti, efikasnosti, lošije intestinalne apsorpcije ili nepoželjne metaboličke stabilnosti. Takođe, na osnovu podataka o prethodnim studijama je istaknuto da čak 40 % potencijalnih kandidata za lekove biva odbačeno zbog neodgovarajućeg toksikološkog profila [122-123]. Na ovaj način se postiže racionalizacija procesa razvoja lekova jer se istovremeno optimizuje i terapijska aktivnost kandidata za novi lek i svodi na minimum potencijalni neuspeh tokom kliničkih studija zbog lošeg farmakokinetičkog i farmakodinamskog profila [124-125].

Razumevanje fizičko-hemijskih parametara koji karakterišu ispitivani molekul koji se nalazi u ranoj fazi razvoja omogućava uvid u ponašanje potencijalno novog leka u biološkim sistemima. Lipofilnost predstavlja jedan od glavnih fizičko-hemijskih parametara koji je neophodno



razmotriti i po potrebi optimizovati. Lipofilnost se definiše kao sposobnost jedinjenja da se rastvori u lipidima, i posledično je odgovorna je za permeabilnost jedinjenja kroz biološke membrane procesom pasivne difuzije, vezivanjem za ciljna mesta dejstva i vezivanjem za proteine plazme. Takođe i ispoljavanje toksičnosti određenog jedinjenja u velikom stepenu koreliše sa njegovom lipofilnošću [126-134]. Naravno, osim za ispoljavanje efekata u živim organizmima, od ključnog značaja je i poznavanje odnosa lipofilnosti leka i kiselo / baznih uslova okruženja u kome se lek nalazi, odnosno odnosa lipofilnosti i jonizacionih svojstava leka jer sve to određuje biofarmaceutski aspekt leka, i način na koji će on biti formulisan u obliku konačnih preparata [131, 135-138].

Parametar lipofilnosti se u matematičkom smislu definiše kao logaritam particionog koeficijenta,  $\log P$  koji se karakteriše kao odnos ravnotežnih koncentracija supstance koja je raspedeljena između dva rastvarača koji se međusobno ne mešaju. Matematička jednačina kojom se izračunava lipofilnost je data ispod:

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_w}, \quad (1)$$

gde  $C_o$  predstavlja koncentraciju rastvorene supstance u nepolarnoj (organskoj) fazi, a  $C_w$  predstavlja koncentraciju rastvorene supstance u polarnoj (vodenoj) fazi. Pri standardnim uslovima za jedan tip rastvarača vrednost  $\log P$  je konstanta [139].

Upošteno se molekule sa velikim vrednostima podeonog koeficijenta  $\log P$  mogu okarakterisati kao lipofilne, dok molekule sa nižim vrednostima podeonog koeficijenta  $\log P$  imaju hidrofilni karakter. Porastom lipofilnosti, odnosno povećanjem vrednosti particionog koeficijenta, jedinjenja ispoljavaju i osobine toksičnosti ( $\log P > 5$ ).

*Lipinski pravilo od 5*, i kao *Phizer-ovo pravilo od 5*, se primenjuju kao jedan od glavnih prediktora bioraspoloživosti za nova aktivna jedinjenja koja kombinuju parametre lipofilnosti i veličine jedinjenja. *Pravilo od 5* je definisao Christopher A. Lipinski na osnovu opažanja da je većina oralno primenjivanih lekova relativno mala i da su to zapravo umereno lipofilna jedinjenja [140]. *Pravilom od 5* se mogu okarakterisati molekularne osobine jedinjenja koje su važne za farmakokinetiku aktivne molekule u ljudskom telu, što podrazumeva i njihovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje (eng. *Absorption, distribution, metabolism,*

*excretion*, ADME). Međutim, ovim pravilima se ne može predvideti da li su ispitivane molekule farmakološki aktivne. Stoga se očekuje da bi vodeća molekula za oralnu upotrebu sa dobrim parametrima bioraspoloživosti trebalo da ispuni bar tri od ukupno 5 pravila Lipinskog kako bi mogla da postigne adekvatne parametre apsorpcije, distribucije, ekskrecije, i odgovarajućeg metabolizma:

1. Molekulska masa jedinjenja nije veća od 500 Da
2. Molekula ne poseduje više od 5 donora vodonika (eng. *Number of hydrogen bond donors*, NHBD, izražava se kao suma OH- i NH- grupa)
3. Molekula ne poseduje više od 10 akceptora vodonika (eng. *Number of hydrogen acceptors*, NHBA, izražava se kao suma N i O)
4. Particioni koeficijent između oktanol i vode (logP) vrednost nije veća od 5, odnosno ako se kao deskriptor lipofilnosti upotrebljava MlogP onda treba da je MlogP vrednost manja od 4,15.

Međutim jedno od glavnih ograničenja pravila Lipinskog je činjenica da se apsorpcija pojedinih jedinjenja ne odvija samo pasivnom difuzijom, već aktivnim transportom i posredstvom specifičnih transportnih proteina. Na primer, većina lekova među kojima su pojedini antibiotici, određeni vitamini, kardiotonični glikozidi ili antigljivični lekovi odstupaju od pravila Lipinskog pošto kroz biološke membrane prolaze aktivnim transportom preko strukturno specifičnih proteinskih nosača, a ne procesom pasivne difuzije. Zato postoje modifikacije pravila Lipinskog koje omogućavaju bolju procenu potencijala jedinjenja da postane kandidat za lek [141]. U skladu sa tom činjenicom, pravila Lipinskog su modifikovana tako da su kriterijumi za fizičko-hemijske osobine molekula sledeći:

1. Particioni koeficijent između oktanol i vode (logP) vrednost je između 0,4 i 5,6
2. Molarna refraktivnost vodeće molekule je između 40 i 130
3. Molekulska masa vodeće molekule je između 160 i 480 Da
4. Broj atoma vodeće molekule je između 20 i 70

Dodatno, prema Veberovom pravilu dodat je i kriterijum da ukupna polarna površina vodeće molekule (suma površina svih polarnih atoma molekula) ne sme biti veća od  $140 \text{ \AA}^2$ , kao i kriterijum da vodeća molekula mora imati manje od 10 rotabilnih veza [142]. Pomenuti

kriterijumi pokazali su visoku korelaciju sa permeabilnošću jedinjenja kroz krvno-moždanu barijeru [143]. Takođe, za lekove za oralnu primenu je poželjno da imaju visok stepen intestinalne apsorpcije. Svi pomenuti parametri koji definišu svojstva potencijalno novog leka se mogu izračunati upotrebom računarskih metoda ili izvođenjem ograničenog broja specifičnih eksperimenata u ranoj fazi razvoja leka [144].

Metoda mućkanja (eng. *Shake-flask method*) predstavlja standardni način određivanja lipofilnosti koji se zasniva na raspodeli supstance između lipofilnog rastvarača (n-oktanol) i hidrofilnog rastvarača (vode). Metodom mućkanja se lipofilnost izražava kao logaritamska vrednost partitionog koeficijenta,  $\log P_{OV}$  [138, 145]:

$$\log P = \log \left( \frac{\text{Koncentracija u oktanolu}}{\text{Koncentracija u vodi}} \right) \quad (2)$$

Pošto je većina lekova delimično jonizovana u kontaktu sa rastvaračima različitih pH vrednosti, postoji potreba za definisanjem distribucionog koeficijenta, koji zapravo predstavlja zbir nejonizovanog i jonizovanog oblika leka u lipofilnom i hidrofilnom rastvaraču, i može se izraziti sledećom jednačinom [138, 145]:

$$\log D = \log \left( \frac{\text{Koncentracija u oktanolu, jonizovano} + \text{Koncentracija u oktanolu, nejonizovano}}{\text{Koncentracija u vodi, jonizovano} + \text{Koncentracija u vodi, nejonizovano}} \right) \quad (3)$$

Međutim, upotrebom ove metode nailazi se na dosta ograničenja, kao što su nemogućnost određivanja partitionog koeficijenta za ekstremno hidrofilna i lipofilna jedinjenja koja imaju  $\log P_{OV}$  vrednost manju od 2,0 i veću od 4,0. Takođe, ova procedura određivanja lipofilnosti je dugotrajna i zahteva upotrebu velike količine organskih rastvarača. Zbog navedenih izazova, ističe se značaj praktičnijih hromatografskih i *in silico* metoda u svrhu određivanja lipofilnosti [122].

Deskriptori lipofilnosti se eksperimentalno mogu odrediti na osnovu retencije analita u sistemu reverzno-fazne tankoslojne hromatografije (eng. *Reversed-phase thin layer chromatography*, RP-TLC) i reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *Reversed-phase high pressure liquid chromatography*, RP-HPLC). Veliku prednost hromatografskih metoda predstavlja njihova jednostavnost i praktičnost u izvođenju eksperimenata kao i ekonomična potrošnja rastvarača [122]. Stoga, hromatografske metode se mogu smatrati važnim

alternativama za određivanje lipofilnosti klasičnom postupku zasnovanom na mućkanju [146-147].

Reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (RP-TLC) je metoda koja se često upotrebljava u određivanju lipofilnosti organskih jedinjenja, pošto se smatra da iste osnovne intermolekulske interakcije određuju ponašanje jedinjenja u biološkom i hromatografskom sistemu [148-150]. Dokazano je da retencioni deskriptori jedinjenja dobijeni prilikom hromatografske analize dobro koreliraju sa parametrima lipofilnosti za ta ista jedinjenja [151-152]. Uspostavljanjem kvantitativne veze između strukture i retencije analita (QSRR studije) opisuje se način na koji molekulska struktura ispitivanog analita utiče na njegovu retenciju u ispitivanom hromatografskom sistemu [153-157]. Brojni matematički modeli, zasnovani najčešće na primeni analize glavnih komponenti ili višestrukoj linearnoj regresiji, koriste se za klasifikaciju jedinjenja preko parametara lipofilnosti dobijenih TLC analizom [158-159].

Ispitivanje lipofilnosti metodom tankoslojne hromatografije se najčešće zasniva na određivanju parametra  $R_M$  [160]. Relacija je prikazana u jednačini ispod [161]:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f - 1}\right), \quad (4)$$

gde  $R_f$  predstavlja retencioni faktor analita, koji se dobija izračunavanjem odnosa puta koji je analit prešao na TLC pločici prekrivenoj stacionarnom fazom i puta koji je prešla hromatografska mobilna faza.

Takođe, linearna korelacija  $R_M$  parametra i udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi ( $\varphi$ ) se može se definisati i sledećom jednačinom [161-162]:

$$R_M = R_M^O + m\varphi, \quad (5)$$

gde  $R_M^O$  predstavlja parametar lipofilnosti koji se dobija ekstrapolacijom krive za mobilnu fazu koja sadrži 0% organskog rastvarača, a  $m$  predstavlja nagib regresione krive koji odgovara specifičnoj hidrofobnoj površini supstance u kontaktu sa stacionarnom fazom [146, 163-164].

Odnos  $R_M^O$  i  $m$  može se takođe koristiti za izračunavanje parametra hidrofobnosti  $C_O$  prema jednačini ispod [161]:

$$C_O = \frac{1}{m} R_M^O, \quad (6)$$

u kojoj  $C_O$  predstavlja udeo zapremine organskog rastvarača u mobilnoj fazi kada je  $R_M = 0$  [161].

Kao što je istaknuto ranije lipofilnost zapravo predstavlja svojstvo jedinjenja da se rastvara u lipidnim rastvaračima. Nasuprot tome, hidrofobnost predstavlja odbojnost jedinjenja prema vodi kao rastvaraču, odnosno predstavlja težnju jedinjenja da se grupišu u kontaktu sa vodom i time smanjuju svoju kontaktnu površinu sa vodom kao rastvaračem. Dakle, povećanje polarnosti supstanci u RP-TLC metodi utiče i na povećavanje njihove  $R_f$  vrednost. Takođe, jedinjenja koja imaju izraženiju lipofilnost, takođe imaju i veći afinitet ka nepolarnoj stacionarnoj fazi, što utiče na smanjenje njihovih  $R_f$  vrednosti. Nasuprot ponašanju  $R_f$  vrednosti,  $R_M$  i  $R_M^O$  vrednosti jedinjenja se povećavaju sa porastom njihove lipofilnosti [165].

Osim za procenu hromatografskih deskriptora lipofilnosti, u literaturi je pronađena relativno nova metoda koja podrazumeva spajanje analitičkih metoda zasnovanih na hromatografskim eksperimentima, usmerenih na pripremu uzoraka, prečišćavanje i / ili izolovanje analita iz složenih bioloških materijala, sa metodama koje omogućavaju direktno merenje bioaktivnosti (antimikrobnih, antioksidativnih ili enzimskih reakcija). Ove metode su označene kao direktna bioautografija, a najčešće podrazumevaju praćenje retencionog ponašanja analita od interesa hromatografijom na tankom sloju, a zatim uranjanje razvijenih TLC pločica u sistem u kome je primenjeno određivanje antimikrobne aktivnosti metodom difuznog diska. Ova metoda takođe pruža mogućnost biokvantifikacije aktivnih jedinjenja bilo kao test bioekvivalencije (izračunat u odnosu na poznate referentne standarde) ili nakon njihove sopstvene izolacije i fizičko-hemijske karakterizacije konvencionalnim putem (izolacija iz ekstrakta pomoću polupreparativne HPLC, identifikacija koristeći masenu spektrometriju i NMR, i standardizaciju pomoću NMR) [166-167]. Na ovaj način omogućen je brži skrining bioaktivnosti uzoraka paralelno sa definisanjem retencionih deskriptora čiji značaj i veza sa specifičnim ponašanjem u *in vivo* uslovima je već pokazana.

### 1.3.5 *In silico* metode za određivanje prediktora biološke aktivnosti novog leka

Proces savremenog dizajniranja lekova i obezbeđivanja podataka o fizičko-hemijskom, farmakokinetičkom i toksikološkom profilu molekula kandidata za nove lekove podrazumeva

primenu *in silico* računarskih metoda, kojim se u virtualnom svetu mogu simulirati biološki procesi. Velika prednost upotrebe *in silico* metoda je što ne zahtevaju nikakav eksperimentalni rad u laboratoriji pošto koriste baze eksperimentalno dobijenih podataka za odgovarajuće molekule, i mogu da kvantifikuju uočene veze između strukturnih karakteristika leka kandidata, njegove vrste i prostornog rasporeda atoma sa ispoljenim osobinama. Ovo omogućava drastično smanjenje troškova broja potrebnih eksperimenata za profilisanje novih kandidata za lekove. Velika prednost upotrebe *in silico* metoda je svakako vezana i za izbegavanje problema povezanih sa bezbednošću samih eksperimentalnih procedura, posebno onih eksperimenata koji inače koriste životinjske modele, kao što je određivanje bioraspoloživosti na životinjama *in vivo*. Iz toga razloga, primena *in silico* metoda je dodatno i etički ispravnija [168-169]. Korišćenjem specifičnih *in silico* metoda se pomaže i u razumevanju uticaja patofiziološkog stanja na osobine molekule kandidata za lek, a dodatno se mogu predvideti i osobine ispitivane molekule u populacijama koje uglavnom ne učestvuju u kliničkim ispitivanjima poput trudnica, pedijatrijske i gerijatrijske populacije [170-171]. Iz svih pomenutih razloga, danas je prisutno dosta softverskih alata koji se koriste u *in silico* ispitivanjima, kao što su: *ChemOffice*, *SwissADME*, *ADME/percepta*, *ACD/i-lab*, i ostali.

Generalno se *in silico* metode za predviđanje lipofilnosti mogu podeliti u dve grupe. Prva podrazumeva metode koje se zasnivaju na fizičko-hemijskim osobinama molekula (eng. *Property-based methods*) i poznavanju svojstva molekula na osnovu empirijskog znanja, trodimenzionalne strukture i osnovnih deskriptora molekula koji su neophodni za izračunavanje specifičnih deskriptora lipofilnosti kao što su *AlogPs*, *AClogP* i *MlogP*. Druga grupa metoda se zasniva na analizi substrukture jedinjenja (eng. *Substructure-based methods*), i uključuje dve podgrupe. Prvu podgrupu čine metode zasnovane na fragmentima (eng. *Fragment-based methods*) na osnovu koje se lipofilnost molekula karakteriše kao suma doprinosa svih njegovih fragmenata. Izračunata suma se zatim koriguje specifičnim faktorom koji podrazumeva doprinos interakcija unutar molekula ukupnoj lipofilnosti. Ovom metodom se izračunavaju se parametri lipofilnosti kao što su: *logP*, *logD* i *milogP*. Drugu podgrupu predstavljaju metode koje se zasnivaju na atomima molekula (eng. *Atom-based methods*). Njima se karakteriše molekulaska hidrofobnost preko ukupnog doprinosa lipofilnosti svih njegovih atoma. Pomenute metode uobičajeno ne uključuju faktore korekcije i upotrebljavaju se za izračunavanje parametara: *AlogP*, *XlogP2* i *XlogP3* [122].

Parametri koji su dobijeni kompjuterskim alatima mogu da se porede sa eksperimentalno dobijenim deskriptorima lipofilnosti, čime se zapravo doprinosi konstantnom usavršavanju *in silico* metoda, ali i proceni validnosti eksperimentalnih hromatografskih metoda [165]. U literaturi je potvrđeno postojanje visoke korelacije između parametara lipofilnost leka, bilo onih koji su određeni eksperimentalnim putem ili primenom kompjuterskih tehnika, i parametara apsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti leka (eng. *Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*, ADMET). Ovi parametri se takođe mogu procenjivati upotrebom određenih softverskih paketa. Kao deo ADMET parametara se podrazumevaju sledeće varijable: oralna bioraspoloživost ( $% F$ ), prosečni indeksi rastvorljivosti ( $\log S_{average}$ ), afinitet vezivanja za proteine plazme ( $PPB$ ), nevezana frakcija u moždanom tkivu ( $f_u$ , *mozak*), koeficijent krvno-moždane barijere ( $\log BB$ ), koeficijent permeacije kroz kožu ( $\log Kp$ ), permeabilnost kroz crevni epitel Caco-2 ćelija (*Caco-2*), apsorpcija iz tankog creva (*HIA*), efektivna permeabilnost u jejunumu ( $P_{eff}$ ), regioselektivnost CYP450 metabolizma i srednja letalna doza ( $LD_{50}$ ) [172-173]. Uopšteno posmatrano, najvažniji prediktori biološke aktivnosti kandidata za novi lek koji pripadaju ADMET parametrima mogu se svrstati u sledeće kategorije: deskriptori intestinalne apsorpcije, deskriptori raspodele, deskriptori distribucije, deskriptori vezivanja za proteine plazme i deskriptori toksičnosti.

- Deskriptori intestinalne apsorpcije

Većina lekova prolazi kroz biološke membrane procesom pasivne difuzije. U procesu prolaska kroz membrane na mestu apsorpcije lekovita supstanca bi trebalo da bude u rastvorenom stanju, jer potom zapravo sledi rastvaranje lekovite molekule u lipidnim delovima membrana. Na brzinu i način rastvaranja najveći uticaj imaju fizičko-hemijske osobine molekule a primarno lipofilnost ispitivanog jedinjenja.

Parametri lipofilnosti, kao glavna fizičko-hemijska karakteristika ispitivanih jedinjenja, uslovljavaju prolazak leka kroz biološke membrane procesom pasivne difuzije, interakciju leka sa strukturno komplementarnim receptorima preko kojih se ispoljava farmakološko dejstvo ali takođe i distribuciju leka u organizmu vezivanjem za proteine krvne plazme [174]. Jedinjenja koja ispoljavaju veću lipofilnost se bolje apsorbuju u organizmu, bolje prodiru u tkiva i imaju veći stepen raspodele u odnosu na jedinjenja koja su manje lipofilna. Povrh svega lipofilnost utiče i na produženo dejstvo lekovitih molekula i takođe utiče i na njihov proces eliminacije iz

organizma. Na primer, jedinjenja koja imaju nižu lipofilnost se relativno dobro eliminišu putem urina, dok se nasuprot njima, jedinjenja koja su visoko lipofilna eliminišu preko jetre [175].

- Deskriptori raspodele

Raspodela ili distribucija je farmakokinetički proces u kome molekula povratno ili nepovratno prelazi u jedan ili više farmakokinetičkih prostora unutar organizma, kao što je na primer transfer između krvi i telesnih tečnosti i tkiva poput mozga, mišića ili masnog tkiva [176]. Glavni faktori koji utiču na proces distribucije su: veličina leka,  $pK_a$  leka, lipofilnost jedinjenja (njegova  $\log P$  vrednost),  $pH$  telesnih tečnosti, vezivanje za proteine plazme i tkiva, brzina protoka krvi (perfuzija), permeabilnost membrane, procesi eliminacije, veličina i površina organa/tkiva, i faktori varijabilnosti [168].

- Deskriptori distribucije

Volumen distribucije ( $V_d$ ) se definiše kao farmakokinetički parametar koji predstavlja onu hipotetičku zapreminu telesne tečnosti koja bi bila potrebna da rastvori ukupnu količinu leka u organizmu u istoj koncentraciji u kojoj se lek nalazi u krvi. Na osnovu pomenute definicije volumen distribucije se može izraziti i preko sledeće jednačine:

$$V_d = \frac{\text{Količina leka u organizmu}}{\text{Koncentracija leka u plazmi}} \quad (7)$$

U jedno-kompartmanskom farmakokinetičkom modelu za lekove, volumen distribucije je konstantan i izražava se jedinicom L/kg. Jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na volumen distribucije leka je njegova lipofilnost. U slučaju da lek ima višu  $V_d$  vrednost, može se smatrati da se lek vezuje za komponente tkiva i taloži u ćelijama. Nasuprot ovome, u slučaju da lek ima nižu  $V_d$  vrednost, podrazumeva se da lek ima tendenciju da se vezuje za proteine plazme i da posledično ima malo slobodne frakcije leka u telesnim tečnostima. Treba napomenuti da volumen distribucije pruža uvid u stepen raspodele ali ne tačno u kom organu.

- Deskriptori vezivanja za proteine plazme

Jedan od glavnih faktora od kojeg zavisi raspodela leka u organizmu je njegova sposobnost vezivanja za proteine plazme. Afinitet vezivanja leka za proteine plazme (eng. *Protein plasma*



*binding predictor*, PPB prediktor), se u matematičkom smislu može definisati se kao količnik koncentracije leka vezanog za proteine ( $C_{PP}$ ) i ukupne koncentracije leka u plazmi ( $C_{UK}$ ), što je očigledno iz sledeće jednačine:

$$PPB = \frac{C_{pp}}{C_{uk}} \quad (8)$$

Afinitet vezivanja leka za proteine plazme se izražava u procentima. Važno je napomenuti da je koncentracija leka vezanog u kompleks sa proteinom plazme i slobodnog oblika leka u dinamičkoj ravnoteži:



Dakle, ukupna koncentracija leka u plazmi predstavlja zbir koncentracije slobodnog oblika leka i koncentracije leka koji je u kompleksu sa proteinima plazme. Važno je istaći da je nevezana frakcija leka ona koja ispoljava farmakološku aktivnost, pošto samo slobodni molekuli mogu nesmetano da prolaze kroz biološke membrane. Takođe, vezivanje za proteine plazme je veoma bitno jer kompleksi koje molekuli leka grade sa proteinima predstavljaju jednu vrstu depoa, iz kojeg se zapravo lek postepeno oslobađa u slučaju da se koncentracija leka u plazmi smanji [177]. Imajući u vidu pomenute činjenice, vezivanje leka za proteine plazme se može posmatrati kao bitan faktor za farmakokinetiku i farmakodinamiku leka [178].

Dakle, farmakološki i fizičko-hemijski profil leka utiču na njegovu sposobnost vezivanja za proteine plazme. Posledično će doći do ispoljavanja neželjenih efekata, u slučaju da je frakcija slobodnog leka veća od ciljane vrednosti. Zbog toga je poznavanje parametara vezivanja za proteine plazme od izuzetnog značaja jer se na osnovu predviđene koncentracije slobodne frakcije zapravo utvrđuje bezbedan režim doziranja u toku kliničkih studija na pacijentima.

- Deskriptori toksičnosti

Deskriptori toksičnosti koji se najčešće upotrebljavaju su srednja letalna doza ( $LD_{50}$ ) ili srednja letalna koncentracija za glodare, najčešće miševe i pacove ( $LC_{50}$ ). Ovi deskriptori toksičnosti predstavljaju dozu koja dovodi do smrti polovine tretirane populacije glodara pod jasno definisanim uslovima. Poznavanje deskriptora toksičnosti i posledično razumevanje toksikološkog potencijala za nove lekove je od izuzetnog značaja u ranim fazama razvoja jer se

time eliminiše nepotrebno ulaganje sredstava u kliničkim ispitivanjima na pacijentima. Ovome u prilog ide i činjenica da američka Agencija za hranu i lekove (eng. *United States food and drug administration*, US-FDA) teži da modernizuje proces razvoja leka kroz različite inicijative tako što podstiče upotrebu i razvoj novih i efikasnijih alata za procenu bezbednosti potencijalnih lekova, što uključuje i računarske prediktivne modele, čime *in silico* toksikološki alati naročito dobijaju na značaju [179].

### 1.3.6 Dizajn eksperimenata

Osnovni cilj farmaceutske analize je obezbeđivanje kvaliteta aktivnih farmaceutskih sastojaka (eng. *Active pharmaceutical ingredient*, API), ekscipijenasa i gotovih formulacija lekova [180]. Sveukupna analiza lekova obuhvata brojne aktivnosti, kao što je procena čistoće, identifikacija i kvantifikacija farmaceutski aktivne komponente, kao i ispitivanje stabilnosti API u farmaceutskim supstancama (*in bulk*) i gotovim farmaceutskim doziranim oblicima [181]. Pošto su za farmaceutske proizvode propisani strogi zahtevi za kvalitet, upotrebljavaju se različite uglavnom instrumentalne tehnike od kojih se očekuje da pruže pouzdane rezultate. Ovo se obezbeđuje tokom postupka efikasnog razvoja analitičkih metoda. Validacija metode je postupak kojim se potvrđuje primenljivost razvijene metode za predviđenu namenu i podrazumeva procenu robusnosti metode, selektivnosti, preciznosti, tačnosti i ostalih validacionih parametara u zavisnosti od toga da li je metoda namenjena ispitivanju API ili njenih srodnih organskih nečistoća, ili za kvalitativnu ili kvantitativnu analizu [182].

Tradicionalan pristup u istraživanjima, pa tako i u razvoju analitičkih metoda koje zavise od efikasne kontrole velikog broja faktora, zasnivao se na primeni metode pokušaja i greške. Još jedna karakteristika tradicionalnog pristupa podrazumeva ispitivanje uticaja pojedinačnih faktora na rezultate eksperimentalnih merenja, odnosno odgovore koji se prate (eng. *One factor at a time*, OFAT), dok se svi ostali faktori u konkretnom eksperimentu drže konstantnim. Glavni nedostatak ovog pristupa je nemogućnost da se uoče interakcije između faktora koje potencijalno imaju značajniji uticaj na ukupni odgovor sistema. Takođe je za ovaj način ispitivanja potrebno uraditi veliki broj eksperimenata, što utiče na povećanje potrebnih resursa, vremena, troškova i reagenasa [183].

Nasuprot OFAT pristupu, savremeni pristup istraživanjima podrazumeva primenu hemometrijskih metoda. Hemometrija je savremena hemijska poddisciplina koja koristi principe matematike, statistike i formalne logike za dizajniranje optimalnih eksperimentalnih procedura. Jedna od najčešće primenjivanih hemometrijskih metoda prilikom razvoja analitičkih procedura je dizajn eksperimenata (eng. *Design of experiments*, DoE). Za njegovu primenu potrebno je izvođenje malog broja praktičnih eksperimenata kroz koje se namerno vrše promene određenih podešenja eksperimenata, a zatim se vrši analiza uticaja sprovedenih promena na rezultate eksperimentalnih merenja. Primena DoE podrazumeva sistematično planiranje broja i redosleda izvođenja eksperimenata koje obezbeđuje racionalizaciju eksperimentalnog rada, ali dodatno i primenu matematičkih i statističkih metoda sa ciljem povezivanja i razumevanja veze između osobina određenog hemijskog sistema i izmerenih odgovora koje on daje u različitim analitičkim tehnikama. Multifaktorski pristup koji je ovde prisutan predstavlja dragoceni dodatak analitičkim eksperimentima jer se veliki broj promenljivih može istovremeno varirati bez opasnosti od pogrešnog tumačenja njihovih pojedinačnih doprinosa i predviđanje ciljanog ponašanja sistema, odnosno eksperimentalnog ishoda od interesa [184-191]. Na ovaj način, primenom DoE, poboljšava se kvalitet naučnih istraživanja, bolje kontroliše varijabilnost procesa koji se ispituje i utiče se na smanjenje potrebnih resursa i vremena istraživanja [191-192].

Protokol koji obezbeđuje uspešnu primenu DoE podrazumeva sledeće korake:

#### 1) Definirati cilj eksperimenta

Prema klasičnom načinu razmišljanja, kada ste dobili rezultate vi može izvući bilo koju informaciju od interesa. Ovim pristupom se takođe potvrđuje uverenje da broj eksperimenata treba da bude što veći da bi se dobili pouzdani podaci. Naprotiv, u DoE studijama cilj (ispitivanje hromatografskog ponašanja analita, odvajanje blisko eluiranih analita) treba da bude postavljen pre sprovođenja eksperimenata, jer se racionalizuje obim eksperimenata i poboljšava njihov kvalitet [193].

#### 2) Sprovesti preliminarne studije

Preliminarni eksperimenti treba da budu u skladu sa konvencionalnim protokolom za razvoj i validaciju analitičke metode. Cilj ovog koraka je da se izaberu početni uslovi.

### 3) Odabir eksperimentalnih faktora i njihovih nivoa

Kvalitet istraživanja uz primenu DoE principa zavisi od pravilne identifikacije svih važnih varijabli. Ako važna varijabla nije definisana kao faktor (ulaz), može se uočiti nepravilno ponašanje analitičkog sistema. Sa druge strane, ako je određena beznačajna varijabla identifikovana kao faktor, faze istraživanja koje slede mogu postati nepotrebno komplikovane [194]. Izabrani faktori se u okviru DoE eksperimenata istražuju na različitim nivoima. Nivo faktora odgovara njegovoj veličini. Niži i viši nivoi faktora su praktično kodirani kao -1 i +1, respektivno. Korišćenjem pomenute iste skale za različite faktore omogućava se međusobno upoređivanje efekata faktora. Osim toga, kodirane vrednosti omogućavaju predstavljanje i kvalitativnih faktora u okviru DoE [195].

Broj faktora i izbor odgovarajućih nivoa se razlikuje u pojedinim vrstama eksperimentalnog dizajna, a odgovarajući izbor dizajna zavisi od njegove namene. Da bi se napravio pravilan izbor dizajna, bitno je naglasiti da se u analitici lekova DoE koristi tokom razvoja analitičke metode, kao i za procenu robusnosti tokom validacije razvijene analitičke metode [191]. Početna faza razvoja metode podrazumeva fazu pregleda (eng. skrining) tokom koje se definišu faktori koji statistički značajno utiču na odgovor analitičkog sistema, odnosno, isključuju se oni faktori čiji uticaj na odgovor nije statistički značajan. Tipovi dizajna koji se koriste u ovoj fazi imaju kapacitet za ispitivanje velikog broja faktora, ali su ograničeni na ispitivanje faktora na samo dva nivoa. Druga faza razvoja metode uključuje fazu optimizacije uslova za izvođenje eksperimenata, odnosno uslova za postizanje željenih ishoda eksperimenata, tokom koje se određeni faktori detaljnije ispituju primenom većeg broja eksperimenata i na većem broju nivoa za svaki faktor koji se optimizuje. U toku ispitivanja robusnosti metode, veći broj faktora se ispituje na nominalnom nivou koji se kodira kao 0 i na dva nivoa faktora koji su postavljeni simetrično u odnosu na nominalni nivo [194].

#### 4) Odabir odgovora

Odgovor je posmatrana ili izmerena kvantitativna ili kvalitativna vrednost, koja se koristi za procenu značaja faktora ili koju želimo da optimizujemo. Uobičajeno je da se definiše više odgovora koje treba pratiti tokom eksperimenata. U fazi skrininga tokom razvoja metode, odgovori kao što su faktor retencije i selektivnost se najčešće mere, a u fazi optimizacije se često prate faktor retencije, rezolucije i funkcija hromatografskog odgovora [196-197].

#### 5) Planiranje eksperimenata

U ovom koraku, se mora izabrati pogodan eksperimentalni dizajn. Preporučuje se da korišćeni dizajn ima dobre statističke karakteristike, kao što su npr. ortogonalnost i/ili rotabilnost [198]. U ortogonalnom dizajnu faktori se menjaju nezavisno jedni od drugih [191]. U slučaju da ne postoji korelacija između varijanse predviđanja i procenjene udaljenosti iz centra dizajna, eksperimentalni dizajn se definiše kao rotirajući [199]. Kako je već rečeno, pravilan izbor odgovarajuće vrste eksperimentalnog dizajna zavisi pre svega od njegove namene, odnosno od faze razvoja analitičke metode. Najčešće korišćene vrste skrining dizajna su pun faktorski (eng. *Full factorial design*) i frakcioni faktorski dizajn (eng. *Fractional factorial design*). U fazi optimizacije se obično koriste centralni kompozicioni dizajn (eng. *Central composite design*, CCD), Box-Behnken-ov dizajn, simpleks dizajn, dizajn zvezde, Doehlert-ov dizajn, itd. U toku ispitivanja robusnosti metode, najčešće se koriste redukovani faktorski dizajni kao što su frakcioni faktorski i Placket-Burman-ov dizajn [191].

#### 6) Izvođenje eksperimenata

Eksperimentalni rad se smatra manje važnim u metodologiji DoE, ali je svakako neophodan za sprovođenje i generisanje rezultata. Da bi se dobili pouzdani rezultati, eksperimenti moraju biti izvedeni nasumičnim redosledom kako bi se minimizirali efekti nekontrolisanih varijabli [193]. Takođe je preporučljivo izvoditi eksperimente u replikacijama, odnosno ponavljanjima od nekoliko puta pod istim eksperimentalnim uslovima, koji se koriste za procenu eksperimentalnih greška [191, 200-202].

## 7) Analiziranje dobijenih podataka

U ovom koraku, eksperimentalno dobijeni podaci se prevode u informacije (najčešće matematičke zapise i prateće grafikone) na osnovu kojih se donose valjani zaključci o analitičkom sistemu. Statistička obrada podataka obuhvata regresionu analizu i analizu varijanse (ANOVA). Grafička analiza podataka predstavlja komplementarno sredstvo za vizuelno razotkrivanje značajnih faktora i odnosa između varijabli, a izvodi se putem konstruisanja 3D i 2D dijagrama poput (polu)normalnih grafikona verovatnoće, Pareto grafikona, dijagrama kontura, dijagrama površine odgovora, dijagrama perturbacija i dijagrama reziduala [203].

Regresiona analiza se koristi za procenu odnosa između faktora (varijabli) i odgovora [192]. S' obzirom na to da mnogobrojne varijable treba uklopiti u sveobuhvatan matematički model, najčešće primenjivana tehnika regresione analize je višestruka linearna regresija (eng. *Multiple linear regression*, MLR) [191]. Zavisnosti jedne ili više promenljivih (eksperimentalnih varijabli) se obično opisuju matematičkim modelima koji imaju oblik polinoma u koje spadaju polinom prvog reda ili linearni model i polinom drugog reda ili kvadratni model. U optimizacionom dizajnu se uglavnom teži definisanju kvadratne zavisnosti jer se time omogućava konstruisanje višedimenzionalnih grafika površine odgovora. Analiziranjem grafika površine odgovora, moguća je identifikacija regiona, odnosno vrednosti faktora koji su optimalni za željeni odgovor sistema. Linearni i kvadratni modeli za više faktora ( $x_1, x_2, x_3, \dots, x_N$ ) se mogu predstaviti jednačinama (10) i (11), respektivno:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + \varepsilon \quad (10)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_Nx_N + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{(N-1)N}x_{(N-1)}x_N + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + \dots + b_{NN}x_N^2 + \varepsilon \quad (11)$$

U datim jednačinama,

$y$  predstavlja izmereni odgovor sistema,

$x$  je ispitivani faktor,

$N$  je ukupan broj promenljivih,

$b_0$  je odsečak,

$b_1, b_2$  i  $b_3$  predstavljaju linearne koeficijente (za parametre modela prvog reda),  
 $b_{12}, b_{23}$  i  $b_{13}$  predstavljaju koeficijente za parametre interakcije,  
 $b_{11}, b_{22}$  i  $b_{33}$  predstavljaju kvadratne članove (za parametre modela drugog reda) i  
 $\varepsilon$  je ostatak odnosno, greška sistema [187].

Generalno, apsolutna vrednost koeficijenta daje uvid u veličinu i značaj efekta faktora. Negativan ili pozitivan koeficijent pokazuje da li se odgovor smanjuje ili povećava u slučaju povećanja vrednosti faktora. Ostaci predstavljaju razlike između dobijene i predviđene vrednosti datog odgovora. U idealnom slučaju, svi ostaci su 0 i tada model savršeno predviđa unutar istraživanog eksperimentalnog domena. Rezidual zapravo predstavlja razliku između odgovora koji su izračunati definisanim matematičkim modelom i vrednosti koje su dobijene eksperimentalno. Vrednosti ostatka  $\varepsilon$  se izračunavaju na osnovu replikacija u centralnoj tački, kada su svi faktori na nominalnom nivou. Poželjno je vrednost reziduala bude što manja. U predloženom matematičkom modelu rezidual  $\varepsilon$  se sastoji iz greške samog modela (eng. *Lack of fit*, LOF) i eksperimentalne greške (eng. *Pure error*, PE).

Pošto greška modela (LOF) predstavlja razliku između srednje vrednosti eksperimentalno dobijenog odgovora i odgovora izračunatog upotrebom matematičkog modela, njeno izračunavanje se vrši primenom analize varijanse (ANOVA). ANOVA statističkom metodom se ispituje uticaj jedne ili više nezavisnih promenljivih na jednu zavisnu promenljivu. Ovom metodom se dobija vrednost parametra  $p$ , čija vrednost manja od 0,05 ukazuje na statistički značajan uticaj posmatranih faktora na ispitivani odgovor [191]. Eksperimentalna greška predstavlja razliku između eksperimentalno dobijenih vrednosti odgovora i srednje vrednosti odgovora za replikacije. Njome se zapravo definiše mera nepouzdanosti sistema.

Preko koeficijenata linearnih članova modela uspostavlja se direktna veza između posmatranih odgovora sistema i ispitivanih faktora. Takođe, koeficijenti kvadratnih članova modela prouzrokuju zakrivljenost površine odgovora i pojavu maksimuma i minimuma kod optimizacionih tipa dizajna, čime se omogućava definisanje optimalnih nivoa ispitivanih faktora. Koeficijenti članova interakcija karakterišu potencijalne interakcije između faktora. Ako se faktori istražuju na dva nivoa (npr. tokom skrining dizajna), može se nagraditi samo linearni model i tada se ne dobija zakrivljenost, a samim tim ni minimum ni maksimum u 3D grafikonima. Linearni odnos nije pogodan za izbor optimalnih eksperimentalnih uslove, ali je

veoma koristan za procenu značaja i efekata faktora. Ako se faktori istražuju na tri nivoa, kvadratni odnos može biti prilagođen podacima i može se dobiti značajna zakrivljenost. U tom slučaju, značajna zakrivljenost, koja proizilazi iz kvadratnih termina, omogućava istraživaču da razume ponašanje sistema i izabere optimalne eksperimentalne uslove pronalaženjem minimuma ili maksimuma odgovora. Ukoliko postoji više odgovora od interesa, potrebno je izvršiti višekriterijumsko odlučivanje da bi se pronašli optimalni uslovi, s' obzirom da se jedan model koristi za samo jedan odgovor [197].

Koeficijenti ( $b_1, \dots, b_N$ ) mogu biti sa negativnim ili pozitivnim predznakom što određuje da li su faktor i odgovor sistema u direktno ili obrnuto srazmerni. Na primer, ako je koeficijent sa pozitivnim predznakom, sa povećanjem vrednosti ispitivanog faktora, povećava se i vrednost posmatranog odgovora sistema. U obrnutom slučaju, ako je vrednost koeficijenta negativna, sa povećanjem vrednosti faktora, smanjuje se vrednost odgovora sistema [191].

Najbitniji statistički parametri kojima se potvrđuje pouzdanost matematičkog modela su greška modela (LOF) i koeficijent multiple determinacije  $R^2$ . Preko vrednosti koeficijenta multiple determinacije definiše se moć predviđanja datog matematičkog modela.  $R^2$  može biti u rasponu od 0 do 1 i cilj je dobiti matematički model sa što višom vrednošću kojim se potvrđuje da matematički model dobro opisuje dobijeni odgovor i da je odgovor pod značajnim uticajem variranja ispitivanih faktora. Male vrednosti  $R^2$  ukazuju na to da matematički model nije adekvatan. Generalno se pouzdanim matematičkim modelima smatraju oni koji imaju visoku vrednost  $R^2$  (veću od 0,8), i čija vrednost LOF parametra nije statistički značajna [191].



## **2 CILJEVI RADA**

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje antimikrobnog potencijala biomolekula endofitnih gljiva primenom savremenih računarskih tehnika koji je postignut kroz sledeće specifične ciljeve:

- Identifikacijom ključnih faktora koji ukazuju na potencijalnu antimikrobnu aktivnost endofitnih gljiva prema patogenim bakterijama primenom napredne analize podataka;
- Procenom antimikrobne aktivnosti sekundarnih metabolita endofitnih gljiva *Phomopsis spp.* izolovanih iz četina četinara u Sloveniji, primenom bujon mikrodilucionog testa;
- Izolovanjem i karakterizacijom hemijske strukture bioaktivnih molekula primenom separacionih (tankoslojna hromatografija, gasna hromatografija i tečna hromatografija pod visokim pritiskom) i spektroskopskih metoda (spektrofotometrija, masena spektrometrija, nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija);
- Primenom algoritama mašinskog učenja za razvoj i validaciju modela za opisivanje veze između hemijske strukture, ponašanja u izabranim analitičkim sistemima i eksperimentalno izmerenog (*in vitro*) ili *in silico* procenjenog biološkog odgovora sekundarnih metabolita endofitnih gljiva;
- Predviđanjem strukturnih karakteristika jedinjenja za ciljane vrednosti biološkog odgovora, kao i predviđanjem ključnih fizičko-hemijskih parametra, lipofilnosti molekule i pKa vrednosti, kao prediktora biološke raspoloživosti nakon *in vivo* primene potencijalno novog leka;
- Ispitivanjem najverovatnijih mehanizama antimikrobnog delovanja biomolekula endofitnih gljiva na receptorima koji predstavljaju potvrđeno ciljno mesto delovanja do sada poznatih antimikrobnih lekova izvođenjem studija molekuskog *dokinga* i procenom mogućnosti za optimizaciju hemijske strukture i postizanje povoljnijeg antimikrobnog efekta;
- Analizom rezultata primene računarskih tehnika i upoređivanjem sa eksperimentalno dobijenim podacima.

### **3 EKSPERIMENTALNI DEO**

## 3.1 Analiza glavnih komponenti

### 3.1.1 Oprema

Za potrebe analize glavnih komponenti upotrebljen je softver:

- Microsoft Excel 2016 sa ekstenzijom XLStat 2019, proizvođač *Microsoft* (Redmond, Vašington, Sjedinjene Američke Države, SAD)
- XLSTAT statistički softver, verzija 2021.4, proizvođač *Addinsoft* (Njujork, SAD)

### 3.1.2 Postupak analize glavnih komponenti

Potencijal endofitnih gljiva kao proizvođača sekundarnih metabolita sa širokim spektrom različitih bioaktivnosti je ispitivan primenom metoda napredne analize podataka. Budući da je proizvodnja ovih jedinjenja pod velikim uticajem različitih faktora, izvršena je evaluacija dostupnih literaturnih podataka, kao i primarnih eksperimentalno dobijenih podataka istraživača sa Katedre za farmaceutsku biologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani. Razmatrana je aktivnost vrsti endofita koje rastu na različitim biljnim domaćinima (zimzeleno ili listipadno drveće i zeljaste biljke, uključujući razlike u ispitivanim biljnim delovima, starosti i staništima, klimatskim uslovima, sezonskim fluktuacijama i eventualnoj kohabitaciji sa drugim sojevima mikroorganizama u okruženju) prema nekoliko vrsta patogenih bakterija, taksonomskoj klasifikaciji endofita i prijavljenih indikatora antibakterijske aktivnosti. Pretežna distribucija endofita sa antimikrobnim potencijalom primećena je među biljnim porodicama *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae* i *Araceae*, ali neki istraživači su ukazali da to nije ekskluzivna karakteristika. Istraživačka grupa profesora Boruta Štrukelja raspolaže dostupnim rezultatima skrininga bioaktivnosti endofitnih gljiva koje rastu u četinarskim šumama Slovenije potvrđene na oko 60 vrsta endofitnih gljiva [12, 58]. Posebna pažnja je posvećena endofitnim gljivama *Phomopsis spp.* iz različitih izvora / ekstrakata budući da su, prema izvodima iz literature i rezultatima aktivnosti sprovedenih u okviru bilateralnog projekta Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, već identifikovane kao izvor velikog broja sekundarnih metabolita.

Skup podataka za PCA analizu je zasnovan na eksperimentalno dobijenim rezultatima biološke aktivnosti utvrđenim za različite endofitne gljive koje rastu na četinama četinara sakupljene sa vrste *Pinaceae* iz nezagađenih regiona Republike Slovenije. Zbog sporog rasta u njihovom prirodnom izvoru, endofitne gljive su izolovane i zasejane na hranljivoj podlozi krompir

dekstroznog agra na sobnoj temperaturi tokom mesec dana kako bi se podstakao njihov rast. Iz ovog materijala dihlometanom i/ili etanolom su ekstrahovani sekundarni metaboliti, a pripremljeni ekstrakti su dalje korišćeni za procenu antibakterijske aktivnosti. Procedura obrade uzorka i mikrodilucionni test za procenu antimikrobne aktivnosti zasnovani su na prethodnim dostignućima slovenačke istraživačke grupe koja je dodatno bila fokusirana i na genetska svojstva odabranih endofitnih gljiva [12, 58]. Ova saznanja su uspešno primenjena u daljim zajedničkim istraživanjima i karakterizaciji hemijske strukture sekundarnih metabolita izolovanih iz endofita koji rastu na vrsti *Pinaceae* [204]. Dominantna distribucija endofita sa antimikrobnim potencijalom primećena je među biljnim porodicama *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae* i *Araceae*, ali su pojedini autori ukazali da to nije njihova jedina karakteristika [13, 34]. Stoga je primarna eksperimentalno generisana baza podataka koja se sastoji od endofita koji rastu u simbiozi sa vrstom *Pinaceae* dodatno dopunjena literaturnim zapisima o biološkim testovima za iste endofitske vrste koje rastu na različitim biljnim domaćinima, listopadnim biljkama i zeljastim biljkama rasprostranjenim širom sveta u različitim klimatskim zonama [12-14, 17-21, 27-30, 34-35, 52-53, 58]. U obzir je uzet ukupan broj od 18 porodica biljnih domaćina i 59 endofitnih vrsta. Posmatrane su različite endofitske vrste označene kao kvantitativne varijable u skupu podataka u odnosu na njihove aktivnosti prema bakterijama, multirezistentnim patogenima *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*. Zbog raznolikosti u pristupima koji se koriste za procenu antibakterijskog potencijala, početni podaci su shodno tome skalirani i sve metrike bioaktivnosti su stavljene na istu bezdimenzionalnu skalu u rasponu od 0-100 [205]. Za proračun je korišćena jednačina (12):

$$x(\text{skalirano}) = 100 * \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}, \quad (12)$$

gde  $x(\text{skalirano})$  predstavlja skaliranu vrednost izmerene bioaktivnosti u okviru korišćene metode ispitivanja,  $X_{\max}$  predstavlja maksimalnu vrednost dobijenu za referentni antibiotički lek i  $X_{\min}$  vrednost dobijenu za kontrolni uzorak korišćenjem iste metode ispitivanja.

Bez obzira na gore pomenutu raznolikost u merenju bioaktivnosti, analiza omogućava istovetno izražavanje kvalifikacije antibakterijskog potencijala kao niska, umerena ili visoka bioaktivnost. Pored toga, taksonomska rasprostranjenost endofita u okviru carstva *Fungi*, roda *Ascomycota*, je takođe uzeta u obzir kao kvalitativna varijabla (endofitne vrste koje pripadaju

23 porodicama). Odabir podataka je na dostupnosti pouzdanih eksperimentalnih i/ili literaturnih zapisa [12-14, 17-21, 27-30, 34-35, 52-53, 58, 204].

PCA analiza korišćena je za istraživanje formiranog skupa podataka i pronalaženje obrazaca u podacima, kako bi se eventualno izdvojio ograničeni broj odgovarajućih kandidata za dalja istraživanja. Dakle, za potrebe PCA analize, pojedine vrste gljiva uvezene sa prethodno opisanim kvalitativnim faktorima diverziteta, označene su kao nezavisno promenljive (eng. *observations*), dok su u formiranom skupu podataka parametri antimikrobne aktivnosti označeni kao kvantitativne varijable. PCA analiza je izvršena u softveru *Microsoft Excel verzija 2016 sa ekstenzijom XLStat 2019*.

Odabrani podaci za PCA analizu predstavljeni su u tabeli 3-1.

**Tabela 3-1 Podaci korišćeni za analizu glavnih komponenti – PCA**

Vrsta endofita	Skalirana aktivnost			Familija endofita	Familija biljke domaćina
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
<i>Phoma herbarum</i>	28,148	0,112	0,100	<i>Didymellaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Eutypella parasitica</i>	11,561	0,112	0,100	<i>Diatrypaciae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Diplodia</i>	10,346	0,112	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Dothiorella iberica</i>	6,603	0,112	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	11,801	0,112	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Dothiorella parva</i>	7,781	0,1117	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Hypoxylon Adans</i>	43,309	51,918	0,100	<i>Hypoxylaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Nectria galigena</i>	38,878	0,112	0,100	<i>Nectriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Ustulina deusta</i>	37,231	0,112	0,100	<i>Xylariaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Gremmeniella abietina</i>	36,762	0,112	0,100	<i>Helotiaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Chalara fraxinea</i>	46,468	0,112	0,100	<i>Helotiaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	22,367	20,633	0,100	<i>Xylariaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Phomopsis theicola</i>	19,276	31,657	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	26,052	0,112	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Epicoccum nigrum</i>	56,719	63,836	0,100	<i>Didymellaceae</i>	<i>Pinaceae</i>

Vrsta endofita	Skalirana aktivnost			Familija endofita	Familija biljke domaćina
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
<i>Diaporthe viticola</i>	49,971	0,112	0,100	<i>Diaporthaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Bjerkandera adusta</i>	31,565	0,112	0,100	<i>Meruliaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Phomopsis</i>	7,915	15,829	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Alternaria alternata</i>	8,068	0,112	0,100	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Phoma</i>	53,024	0,112	0,100	<i>Didymellaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Strobilurus</i>	47,856	0,112	0,100	<i>Physalacriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	2,861	0,112	0,100	<i>Herpotrichiellaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Hypoxylon howeanum</i>	4,316	0,112	0,100	<i>Hypoxylaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Ophiostoma brunneociliatum</i>	6,938	54,153	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Ophiostoma piceae</i>	26,933	59,667	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Grosmannia cucullata</i>	41,184	0,112	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Grosmannia piceaperda</i>	9,2641	0,112	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Grosmannia panicillata</i>	16,806	0,112	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Ceratocystis polonica</i>	23,678	0,112	0,100	<i>Ceratocystidaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Leptographium</i>	31,001	0,112	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Ophiostoma fuscum</i>	54,804	0,112	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Ceratocystiopsis minuta</i>	54,402	0,112	0,100	<i>Ceratocystidaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Chaetomium</i>	48,315	0,112	0,100	<i>Chaetomiaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Coniochaeta</i>	45,597	0,112	0,100	<i>Coniochaetaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Fusarium</i>	39,366	0,112	0,100	<i>Nectriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Graphium</i>	32,580	0,112	0,100	<i>Papilionidae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Hyalodendriella</i>	36,207	0,112	0,100	<i>Hyaloscyphaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Hypocrea</i>	40,687	0,112	0,100	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Ophiostoma novoulmi</i>	29,354	0,112	0,100	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Rhizoctonia butinii</i>	20,099	0,112	0,100	<i>Ceratobasidiaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Diplodia seriata</i>	43,080	0,112	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Pinaceae</i>
<i>Pezicula eucrita</i>	9,524	14,286	0,100	<i>Dermateaceae</i>	<i>Pinaceae</i>

Vrsta endofita	Skalirana aktivnost			Familija endofita	Familija biljke domaćina
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
<i>Phomopsis</i>	9,524	9,524	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Rhizophoraceae</i>
<i>Phomopsis</i>	9,524	0,112	4,762	<i>Valsaceae</i>	<i>Salicaceae</i>
<i>Phomopsis</i>	9,524	9,524	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Apocynaceae</i>
<i>Phomopsis</i>	9,524	9,524	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Anacardiaceae</i>
<i>Phomopsis</i>	9,524	9,524	4,762	<i>Valsaceae</i>	<i>Fabaceae</i>
<i>Phomopsis</i>	14,286	9,524	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Asteraceae</i>
<i>Phomopsis</i>	42,857	9,524	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Cistaceae</i>
<i>Phomopsis</i>	14,286	9,524	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Calophyllaceae</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	9,524	9,524	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Nyssaceae</i>
<i>Phoma</i>	9,524	9,524	4,762	<i>Didymellaceae</i>	<i>Commelinaceae</i>
<i>Phoma</i>	9,524	9,524	4,762	<i>Didymellaceae</i>	<i>Araceae</i>
<i>Phoma</i>	9,524	9,524	0,100	<i>Didymellaceae</i>	<i>Poaceae</i>
<i>Phoma</i>	9,524	9,524	4,762	<i>Didymellaceae</i>	<i>Plantaginaceae</i>
<i>Phoma</i>	9,524	9,524	4,762	<i>Didymellaceae</i>	<i>Taxaceae</i>
<i>Phomopsis</i>	9,524	47,619	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Moraceae</i>
<i>Phomopsis</i>	9,524	9,524	0,100	<i>Valsaceae</i>	<i>Clusiaceae</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	14,286	19,048	0,100	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Meliaceae</i>

PCA analiza ima sposobnost da rekonstruiše i istovremeno kompresuje izvorni skup podataka pronalaženjem niže dimenzionalne linearne projekcije visokodimenzionalnih originalnih podataka. Ovo se postiže stvaranjem ograničenog broja novih međusobno ortogonalnih osa ili promenljivih poznatih kao glavne komponente (PC). Ove PC međusobno nisu u korelaciji i izražavaju veći deo ukupne promenljivosti u originalnom skupu podataka. Na taj način se postiže smanjenje broja dimenzija u PCA bez većeg gubitka informacija. Tokom PCA analize, korelacije između ispitivanih varijabli određene su na osnovu vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije, koji procenjuje postojanje linearnog odnosa između dve kvantitativne varijable sa nivoom značajnosti  $\alpha = 0,95$  i nivoom verovatnoće  $p < 0,05$ . Svaki PC je zatim okarakterisan vektorom poznatim kao *eigenvector*, dok je varijansa duž vektora opisana kroz *eigenvalue* vrednost. Prema Kaiser-ovom pravilu, razmatran je samo PC čije *eigenvalue*



vrednosti prelaze 1,0. Svaki PC je dodatno okarakterisan putem karakterističnih *loading* vrednosti koje su grafički predstavljane u dvodimenzionalnom prostoru i služile su za analizu međusobnog položaja promenljivih i njihove korelacije (varijable koje su najbliže jedna drugoj i daleko su od koordinatnog početka u snažnoj pozitivnoj korelaciji ili direktno proporcionalne, dok su promenljive nasuprot jedna drugoj u negativnoj korelaciji ili obrnuto proporcionalne) [93, 95-97, 204-205]. Na osnovu rezultata analize PCA 2D dijagrama, tumačeni su obrasci u posmatranim podacima, sličnosti i razlike između grupa podataka, i konačno, definisani su faktori ključni za pojavu bioaktivnosti endofitnih gljiva, kao i selekcija najpotentnijih kandidata za dalja istraživanja.

## **3.2 Priprema endofitnog materijala**

### **3.2.1 Oprema, materijali, hemikalije i reagensi**

U svrhu izvođenja mikrobioloških ispitivanja, zasejavanja endofita ili bakterija, i pripremu ekstrakta endofita, korišćeni su:

- Endofitne gljive vrste *Phomopsis species* izolovane iz četina bora (Katedra za šumarstvo i tehnologiju Biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Republika Slovenija)
- Krompir-dekstroza agar - PDA, nivoa čistoće 200, proizvođača *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Dihlorometan, čistoće  $\geq 99,0\%$ , proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Etanol, čistoće  $\geq 99,9\%$ , proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Metanol, čistoće  $\geq 99,9\%$ , proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka)
- Homogenizator Ultra Turrax, proizvođač *Ika* (Staufen, Nemačka)
- Petrijeve šolje, proizvođač *Sigma-Aldrich/Merck* (Darmštadt, Nemačka )
- Ultrazvučno kupatilo Sonorex RK 52H, proizvođač *Bandelin* (Berlin, Nemačka)
- Rotacioni vakuum uparivač Rotavapor R-114, proizvođač *Büchi* (Flavil, Švajcarska)
- Najlon membrana, proizvođač *Agilent Technologies* (Santa Klara, SAD)
- Aluminijska folija, proizvođač *Profissimo DM* (Karlsruhe, Nemačka)
- Filter papir, proizvođač *Macherey-Nagel* (Duren, Nemačka).

### 3.2.2 Postupak pripreme endofitnih ekstrakata

Endofitne gljive vrste *Phomopsis species* izolovane iz četina bora obezbedila je Katedra za šumarstvo i tehnologiju Biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Slovenija. Dakle, u istraživanju su korišćeni uzorci endofitnih gljiva prisutnih u četinarskim šumama Slovenije koji se nalaze u registru Biotehničkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani gde je izvršena njihova identifikacija i taksonomska klasifikacija. Zbog relativno sporog rasta u prirodnom izvoru, endofitne gljive su bile izolovane iz odgovarajućeg biljnog materijala (npr. četine četinara) i kultivisane na krompir-dekstroza agaru (PDA) i ostavljene da rastu na sobnoj temperaturi (oko 25 °C) tokom mesec dana posle čega je sadržaj bio samleven i pomešan u homogenizatoru. PDA je pripremljen rastvaranjem 8,4 g suve smeše u 200 mL ultra čiste vode, potom je izliven u petrijeve šolje i ostavljen da očvrstne u sterilnim uslovima. Zatim je uzorak sa endofitnim gljivama zasejan na PDA pločama i ostavljen da raste na sobnoj temperaturi (oko 25 °C) tokom mesec dana posle čega je sadržaj šolje samleven i pomešan u homogenizatoru Ultra Turrax (Ika, Staufen, Nemačka). Ova procedura za uzgajanje endofita i posledične ekstrakcije sekundarnih metabolita, preporučena je u većini literarnih izvoda [206-210].

Različiti rastvarači za ekstrakciju sekundarnih metabolita su bili ispitivani. Među njima, prioritet je bio dat dihlorometanu i etanolu u skladu sa preporukama koje se uglavnom odnose na dovoljno izražene razlike u polarnosti i sledstveno sposobnosti ekstrahovanja potencijalnih sekundarnih metabolita (broj ekstrahovanih bioaktivnih molekula i prinos ekstrakcije) [58]. Nakon procesa homogenizacije materijala sa naraslom endofitnom gljivom, usledilo je odvojeno dodavanje po 50 mL ekstraktanta, dihlorometana ili apsolutnog etanola, u posebnim sudovima i temeljno mešanje. Nakon toga, smeše su podvrgnute uticaju ultrazvuka tokom 15 minuta, pokrivene tankom folijom i ostavljene tokom noći na sobnoj temperaturi da bi se ekstrakcija postepeno odvijala. Zatim su smeše filtrirane kroz filter papir, a rastvarač je uklonjen pomoću rotacionog vakum uparivača podešenog na 50 °C pri pritisku od 700 mbar. Nadalje, dihlorometanski rastvor je u potpunosti uparen iz ekstrakta pomoću sniženog pritiska, dok je uzorak etanolnog ekstrakta morao da se dodatno ostavi preko noći na sobnoj temperaturi kako bi ostatak etanola i preostale vode mogli slobodno da ispare. Potom su oba suva ekstrakta izmerena i odvojeno rastvorena u približno 5 ml smeše metanola i ultra čiste vode (50:50, v/v) tako da je koncentracija oba ekstrakta bila približno po 8 mg/mL. Ova faza je poboljšana

primenom ultrazvuka u trajanju od približno 10 minuta. Posle toga su oba uzorka filtrirana kroz 0,22 µm najlon membrane (Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) [58].

### 3.3 Tehnike za procenu bioaktivnosti

#### 3.3.1 Oprema, materijali, hemikalije i reagensi

- *Escherichia coli* (soj DH5-α) i *Staphylococcus aureus* (soj ACTC 10788) dobijeni iz permanentnih kultura kultivisanjem u inkubatoru na 37 °C u Luria-Bertani (LB) bujonu
- Dihlorometanski i etanolni ekstrakt endofitne gljive vrste *Phomopsis species* izolovane iz četina bora, dobijeni prethodno opisanom metodom (Katedra za šumarstvo i tehnologiju Biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Republika Slovenija)
- Luria-Bertani (LB) bujon, nivoa čistoće 200, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Mueller-Hinton agar, nivoa čistoće 100, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Dihlorometan, čistoće ≥ 99,0%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Etanol, čistoće ≥ 99,9%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Metanol, čistoće ≥ 99,9%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka)
- Ampicilin USP standardna supstanca, čistoće 99,3%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka).
- Dimetil sulfoksid (DMSO), čistoće ≥ 99%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- Speed Vac Plus, proizvođač *Savant*, (Valtham, Sjedinjene Američke Države)
- Čitač mikrotitarskih ploča Infinite M1000, proizvođač *Tecan* (Grodig, Austria)
- Inkubator, proizvođač *Thermo Electron*, (Osterode, Nemačka)
- Centrifuga minispin plus, proizvođač *Eppendorf* (Hamburg, Nemačka)
- Mikrotitarske ploče sa 96 mesta, proizvođač *Sigma-Aldrich/Merck* (Darmštadt, Nemačka)
- Ependorf epice, proizvođač *Eppendorf* (Hamburg, Nemačka)
- Petrijeve šolje proizvođač *Sigma-Aldrich/Merck* (Darmštadt, Nemačka).

Nakon opsežnog pregleda literature, ustanovljena je antimikrobna aktivnost endofitnih gljiva prema različitim vrstama Gram-pozitivnih (G<sup>+</sup>) i Gram-negativnih (G<sup>-</sup>) bakterija. U inicijalnoj

fazi, izvršena je procena aktivnosti prema vrstama za koje je do danas najčešće potvrđena aktivnost (vrste *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*) [58], a zatim je spektar antimikrobnog delovanja bio proširen testiranjem na patogenima koji su svrstani u tzv. „ESKAPE“ kategoriju (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*) po tome što predstavljaju uzročnike najvećeg broja bolničkih infekcija, a pri tome uspešno odolevaju (eng. *escape*) dejstvu antibiotika [12]. Ispitivanja antimikrobne aktivnosti su se izvršila na Katedri za farmaceutsku biologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani.

### 3.3.2 Postupak određivanja antimikrobne aktivnosti metodom mikrodilucije

Za određivanje antibiološke aktivnosti pripremljenih ekstrakata *Phomopsis species* iz endofita, izolovanog iz iglica četinara, korišćene su kulture *Escherichia coli* (soj DH5- $\alpha$ ) i *Staphylococcus aureus* (soj ACTC 10788) dobijene iz permanentnih kultura kultivisanjem u inkubatoru na 37 °C u Luria-Bertani (LB) bujonu. LB bujon za kultivaciju bakterija pripremljen je rastvaranjem 8 g suve smeše u 400 mL ultra čiste vode. Zatim je pripremljena bakterijska suspenzija tako što je 20 mL LB podloge dodato u posudu za centrifugiranje posle čega su *Escherichia coli* ili *Staphylococcus aureus* posebno zasejane iz permanentne kulture. Posuda centrifuge je ostavljena preko noći u inkubatoru na 37 °C radi efektivne multiplikacije bakterija.

Pripremljeni su rastvori prethodno osušenog dihlorometanskog i etanolnog ekstrakta endofita u smeši metanola i vode i upotrebljeni za inicijalno ispitivanje antimikrobne aktivnosti priemenom bujon mikrodilucionog testa [211-215]. Dakle, 2 mg dihlorometanskog i 2 mg etanolnog suvog ekstrakta endofita su posebno rastvoreni u po 1 mL smeše metanola i ultra čiste vode (50:50, v/v) i upotrebljeni za inicijalno ispitivanje antimikrobne aktivnosti u sklopu mikrodilucijskog testa. Pre izvođenja ispitivanja mikrodilucije, rastvoreni ekstrakti endofita u smeši metanola i ultra čiste vode (50:50, v/v) su dodatno koncentrisani korišćenjem Speed Vac Plus do željene zapremine, potrebne za mikrodilucijski test.

Bakterijske suspenzije su bile razblažene u LB bujonu radi podešavanja odgovarajuće optičke gustine između 0,08 i 0,10 merenjem apsorbance smeše na  $\lambda = 600$  nm [214-215]. Test određivanja antimikrobne aktivnosti je bio izveden na mikrotitarskoj ploči ispitivanjem u duplikatu za aktivnost ekstrakta kao i za pozitivnu i negativnu kontrolu. Aktivnost ekstrakta je

ispitivana u smeši od 90  $\mu\text{L}$  rastvora suspenzije *Escherichia coli* ili *Staphylococcus aureus* u LB bujonu i 10  $\mu\text{L}$  ekstrakta dobijenog na već opisani način [58]. Negativna kontrola je pripremljena korišćenjem 90  $\mu\text{L}$  rastvora suspenzije *Escherichia coli* ili *Staphylococcus aureus* u LB bujonu i 10  $\mu\text{L}$  smeše metanola i ultra čiste vode (50:50, v/v). Pozitivna kontrola je pripremljena mešanjem 90  $\mu\text{L}$  suspenzije *Escherichia coli* ili *Staphylococcus aureus* u LB bujonu sa 1  $\mu\text{L}$  100 mg/mL rastvorom referentnog kontrolnog antibiotika ampicilina, koji je rastvoren u 9  $\mu\text{L}$  50% (v/v) rastvora metanola u vodi. Predložena ispitivanja su isplanirana na osnovu podataka iz literature i prethodnih iskustava istraživačke grupe prof. Štrukelja [58].

Svi uzorci na mikrotitarskim pločama su odmah ispitivani pri apsorbanici od 600 nm i ostavljeni preko noći na temperaturi inkubacije od 37 °C radi rasta bakterija i merene su takođe sledećeg dana da bi se detektovale sve promene u rastu bakterija. Promene apsorbanice usled bakterijskog rasta korišćene su za izračunavanje stope bakterijske inhibicije za svaki tip ekstrakta endofitne gljive *Phomopsis species*. Određivanje mikrobiološke aktivnosti mikrodilucionim testom je urađeno za svaki pripremljeni uzorak u duplikatu i izračunat je prosečni rezultat.

### **3.3.3 Postupak metode disk difuzije za određivanje antibiotskog potencijala**

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti je takođe izvedeno i primenom difuzione metode na agaru. Difuzioni metod je uglavnom planiran za potvrdu aktivnosti delova ekstrakata dobijenih prikupljanjem frakcija nakon izvedenih eksperimenata preparativne hromatografije, a u cilju povezivanja antimikrobne aktivnosti sa eventualno prisutnim pojedinačnim komponentama ekstrakta. Za potrebe ovih ispitivanja, kulture *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* su bile razblažene u fiziološkom rastvoru do gustine od 0,5 McFarland. Obe kulture su bile zasejane na posebnim Mueller-Hinton agar pločama. Zatim je po 15  $\mu\text{L}$  sakupljenih frakcija pikova 3, 4 i 5 dodato na odvojenim mestima na zasejanim Mueller-Hinton agar pločama, dok je 15  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida (DMSO) služilo kao kontrola na svakoj od petri ploča. Ploče su bile inkubirane u termostatu na 37 °C u periodu 16-24 h nakon čega je očitavan prečnik zone inhibicije rasta posle inkubacije za svaku frakciju pika [216-218].

### 3.4 Optimizacija razdvajanja komponenti ekstrakta tankoslojnom hromatografijom

#### 3.4.1 Oprema, materijali, hemikalije i reagensi

- Dihlorometanski i etanolni ekstrakt endofitne gljive vrste *Phomopsis species* izolovane iz četina bora, dobijeni prethodno opisanom metodom (Katedra za šumarstvo i tehnologiju Biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Republika Slovenija)
- Metanol, čistoće  $\geq 99,9\%$ , proizvođač *Sigma-Aldrich* (Štajnhajm, Nemačka)
- Amonijum hidroksid, proizvođač *Centrohem d.o.o.* (Stara Pazova, Republika Srbija)
- TLC silica gel ploče tipa 60 RP-18 F254 u obliku aluminijumskih ploča dimenzija 5 x 10 cm, proizvođač *Merck* (Darmštad, Nemačka)
- Aparatura za aplikaciju Nanomat-4, proizvođač *Camag* (Mutenc, Švajcarska)
- Rotacioni vakuum uparivač Rotavapor R-114, proizvođač *Büchi* (Flavil, Švajcarska)
- Mikrolitarski špric, proizvođač *Thermo Fisher Scientific* (Valtam, SAD)
- TLC hromatografska komora twin-trough chamber, 10 x 10 cm, proizvođač *Camag* (Mutenc, Švajcarska)
- UV lampa UV Cabinet 4, proizvođač *Camag* (Mutenc, Švajcarska)
- Softverski paket za dizajn eksperimenata (DoE) Design expert 11.0.0, proizvođač *Stat-Ease* (Mineapolis, Minesota, SAD).

#### 3.4.2 Priprema endofitnog materijala

Nakon obavljenih hemijskih i mikrobioloških analiza, iz endofitnog materijala vrste *Phomopsis species* su ekstrahovana tri analita koja su ispoljila potencijal za antimikrobnu aktivnost. Nakon procesa ekstrakcije analita iz sirovine endofita, upotrebljavani su upareni etanolni i dihlometanski rastvarači iz faze ekstrakcije. Dobijeni ekstrakti rekonstituisani su u metanolu tako da je ciljana koncentracija rastvora analita koji ispoljava antimikrobnu aktivnost 2 mg/ml [204].

#### 3.4.3 Postupak tankoslojne hromatografije

Kao deo aparature upotrebljen je TLC silica gel tipa 60 RP-18 F254 u obliku aluminijumskih ploča dimenzija 5 x 10 cm i aparatura za aplikaciju ukupno 30  $\mu$ L uzoraka upotrebom 10  $\mu$ L

mikrolitarskog šprica na rastojanju od 0,5 cm. Razdvajanje na tretiranim pločicama je izvršeno u hromatografskoj komori koja je prethodno saturisana mobilnom fazom u trajanju od ukupno 20 minuta, a detekcija je izvršena pod UV lampom nakon sušenja na talasnoj dužini od 254 nm.

#### **3.4.3.1 Eksperimentalni plan**

Eksperimentalni uslovi za svaki eksperiment su određeni upotrebom rotirajućeg centralnog kompozicionog dizajna upotrebom softverskom paketa Design Expert 11.0.0 za dva ispitivana faktora koji su, identifikovani kao statistički značajni, na osnovu preliminarnih rezultata, i za koje se smatra potencijalno utiču na retenciono ponašanje analita. Ti identifikovani značajni faktori su: udeo metanola u mobilnoj fazi (% v/v) i udeo amonijum hidroksida u mobilnoj fazi (% v/v). Eksperimentalni plan se sastojao od ukupno 9 eksperimenata i 3 ponavljanja u centralnoj tački. Variranje vrednosti oba ekperimentalna faktora na pet nivoa u okviru eksperimentalnog plana je prikazano u tabeli 3-2, u kojoj su prikazane kodirane vrednosti (niža (-1), viša (+1), nominalna(0), donja alfa ( $-\alpha$ ) i alfa ( $+\alpha$ )).

**Tabela 3-2**      **Ekperimentalni plan za centralni kompozicioni dizajn**

<b>Broj eksperimenta</b>	<b>Faktor A</b>	<b>MeOH [%, v/v]</b>	<b>Faktor B</b>	<b>NH3 [%, v/v]</b>
1	-1	60,00	-1	4,00
2	+1	80,00	-1	4,00
3	-1	60,00	+1	6,00
4	+1	80,00	+1	6,00
5	-1,414	55,86	0	5,00
6	+1,414	84,14	0	5,00
7	0	70,00	-1,414	3,59
8	0	70,00	+1,414	6,41
9	0	70,00	0	5,00
10	0	70,00	0	5,00
11	0	70,00	0	5,00
12	0	70,00	0	5,00

### **3.5 Primena tankoslojne hromatografije za određivanje deskriptora lipofilnosti biomolekula endofitnih gljiva**

#### **3.5.1 Oprema, materijali, hemikalije i reagensi**

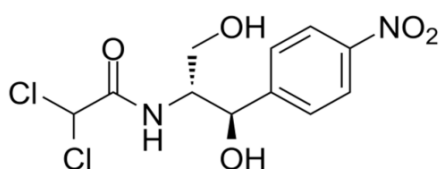
- Dihlorometanski i etanolni ekstrakt endofitne gljive vrste *Phomopsis species* izolovane iz četina bora, dobijeni prethodno opisanom metodom (Katedra za šumarstvo i tehnologiju Biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Republika Slovenija)
- Metanol, čistoće  $\geq 99,9\%$ , proizvođač *Sigma-Aldrich* (Štajnhajm, Nemačka)
- Standardni antibiotik hloramfenikol, Ph. Eur. referentni standard
- Standardni antibiotik ciprofloksacin, Ph. Eur. referentni standard
- Standardni antibiotik ofloksacin, Ph. Eur. referentni standard
- Standardni antibiotik sulfacetamid, Ph. Eur. referentni standard
- Amonijum hidroksid, proizvođač *Centrohema d.o.o.* (Stara Pazova, Republika Srbija)
- TLC silica gel ploče tipa 60 RP-18 F254 u obliku aluminijumskih ploča dimenzija 5 x 10 cm, proizvođač *Merck* (Darmštad, Nemačka)



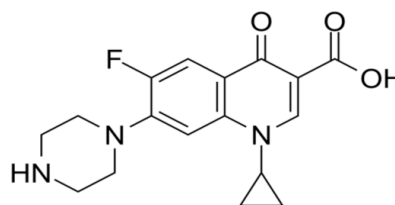
- Aparatura za aplikaciju Nanomat-4, proizvođač *Camag* (Mutenc, Švajcarska)
- Mikrolitarski špric, proizvođač *Thermo Fisher Scientific* (Valtam, SAD)
- TLC hromatografska komora twin-trough chamber, 10 x 10 cm, proizvođač *Camag* (Mutenc, Švajcarska)
- UV lampa UV Cabinet 4, proizvođač *Camag* (Mutenc, Švajcarska)
- Softverski paket za dizajn eksperimenata (DoE) Design expert 11.0.0, proizvođač *Stat-Ease* (Mineapolis, Minesota, SAD).

### 3.5.2 Postupak primene tankoslojne hromatografije za određivanje deskriptora lipofilnosti biomolekula endofitnih gljiva

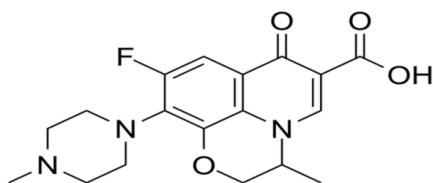
U istom TLC hromatografskom sistemu je analizirano ponašanje uzoraka ekstrakta endofita koji sadrže analit 1 i 2, kao i odabranih standardnih antimikrobinih molekula: hloramfenikola, ciprofloksacina, ofloksacina i sulfacetamid-natrijuma (Slika 3-1).



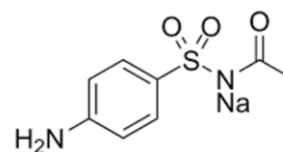
Hloramfenikol  
(Mr = 323,13 g/mol)



Ciprofloksacin  
(Mr = 331,34 g/mol)



Ofloksacin  
(Mr = 361,37 g/mol)



Sulfacetamid-natrijum  
(Mr = 236,23 g/mol)

*Slika 3-1 Standardne antimikrobne molekule korišćene u TLC analizi*

Odabrani standardni antibiotici hloramfenikol, ciprofloksacin, ofloksacin i sulfacetamid-natrijum su rastvoreni u metanolu tako da su dobijeni standardni rastvori koncentracije od 1 mg/ml. Zatim je na pločice sukcesivno nanošeno po 40  $\mu$ l uzoraka ekstrakta endofita 1 i 2, kao i po 10  $\mu$ l rastvora standarda na međusobnom rastojanju od 0,5 cm pomoću mikrolitarskog šprica preko aparature za aplikaciju uzoraka. Potom su tretirane pločice spuštene u hromatografsku komoru koja je prethodno bila saturisana parama mobilne faze u trajanju od 20 minuta. Uzorci su se razvijali na ploči u uzlaznom modu u kadici koja je prethodno bila zasićena parama mobilne faze tokom 15 minuta. Na osnovu prethodnih rezultata koji su dobijeni tokom razvoja TLC hromatografske metode za analizu aktivnih komponenata endofitnog ekstrakta *Phomopsis speces*, potvrđeno je optimalno retenciono ponašanje analita primenom sastava mobilne faze koja sadrži zapreminski udeo metanola u opsegu od 60 do 80% (v/v). Za potrebe određivanja deskriptora lipofilnosti vodena faza imala konstantan sastav, odnosno zapreminski udeo amonijum-hidroksida je u svim eksperimentima bio 5% (v/v). Ovim su bili obezbeđeni uslovi da tokom određivanja deskriptora lipofilnosti ne dolazi do promene jonizacionog stanja ispitivanih analita, što bi posledično moglo uticati na retenciono ponašanje i određivanje vrednosti deskriptora lipofilnosti. Eksperimentalni plan dobijen softverskim paketom za dizajn eksperimenata Design expert 11.0.0 prikazan je u tabeli 3-3. Nakon procesa razvijanja hromatograma i sušenja, TLC hromatografske pločice analizirane su upotrebom UV lampe na talasnoj dužini od 254 nm i 366 nm.

**Tabela 3-3**      **Eksperimentalni plan TLC hromatografske analize**

<b>Komponente mobilne faze</b>	<b>Eksperiment 1</b>		<b>Eksperiment 2</b>		<b>Eksperiment 3</b>	
	<b>% v/v</b>	<b><math>\varphi</math></b>	<b>% v/v</b>	<b><math>\varphi</math></b>	<b>% v/v</b>	<b><math>\varphi</math></b>
Metanol	80	0,80	70	0,70	60	0,60
Voda	15	0,15	25	0,25	35	0,35
Amonijum-hidroksid	5	0,05	5	0,05	5	0,05

Za razdvojena jedinjenja, izračunavana je  $R_f$  vrednosti i vrednosti parametra  $R_M$  prema Bate-Smith-ovoj i Vestall-ovoj jednačini, odnosno  $R_{0M}$  vrednosti ekstrapolacijom na 0% modifikatora organske mobilne faze u skladu sa jednačinom Soczevinskog-Vachmeistera. Na

osnovu nagiba regresione krive, definisana je karakteristična vrednost  $m$  koja predstavlja specifičnu hidrofobnost površine supstance u kontaktu sa stacionarnom fazom. Parametar hidrofobnosti  $C_0$ , koji predstavlja zapreminski udeo organskog modifikatora u mobilnoj fazi za  $R_M = 0$ , je bio izračunat kao odnos  $R_{0M}$  i  $m$  [165-167]. U literaturi je pokazano da su svi pobrojani hromatografski parametri u dobroj linearnoj korelaciji sa parametrima lipofilnosti određenim drugim metodama (računarskim ili klasičnim) tako da su se koristili za dalje fizičko-hemijsko profilisanje izolovanih jedinjenja.

### **3.6 Izolovanje i karakterizacija hemijske strukture komponenti iz ekstrakta endofitnih gljiva**

#### **3.6.1 Oprema, materijali, hemikalije i reagensi**

Za izvođenje hromatografskih analiza i sakupljanje frakcija korišćeni su:

- Dihlorometanski ekstrakt endofitne gljive vrste *Phomopsis species* izolovane iz četina bora, dobijeni prethodno opisanom metodom (Katedra za šumarstvo i tehnologiju Biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Republika Slovenija)
- Metanol, čistoće  $\geq 99,9\%$ , proizvođač *Sigma-Aldrich* (Štajnhajm, Nemačka)
- Dionex Ultimate 3000 HPLC sistem sa DAD detektorom, proizvođač *Thermo Fisher Scientific* (Dreieih, Nemačka)
- Reverzno-fazna semi-preparativna Hypersil Gold kolona za HPLC sistem (C18, veličina čestica  $5\ \mu\text{m}$ , dužina 150 mm, unutrašnji prečnik 10 mm), proizvođač *Thermo Fisher Scientific* (Dreieih, Nemačka)
- Acetonitril, čistoće 99,99%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka),
- 0,1% (v/v) rastvor mravlje kiseline u vodi, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka)
- Rotacioni vakuum uparivač Rotavapor R-114, proizvođač *Büchi* (Flavil, Švajcarska)
- Ependorf epice, proizvođač *Eppendorf* (Hamburg, Nemačka).

Za izvođenje metode masene spektrometrije korišćeno je:

- Dihlorometanski ekstrakt endofitne gljive vrste *Phomopsis species* izolovane iz četina bora, dobijeni prethodno opisanom metodom (Katedra za šumarstvo i tehnologiju Biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, Republika Slovenija)
- Metanol, čistoće  $\geq 99,9\%$ , proizvođač *Sigma-Aldrich* (Štajnhajm, Nemačka)
- Dionex Ultimate 3000 HPLC sistem sa DAD detektorom, proizvođač *Thermo Fisher Scientific* (Dreieih, Nemačka)
- Reverzno-fazna semi-preparativna Hypersil Gold kolona za HPLC sistem (C18, veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ , dužina 150 mm, unutrašnji prečnik 10 mm), proizvođač *Thermo Fisher Scientific* (Dreieih, Nemačka)
- Softverski paket za dizajn eksperimenata (DoE) Design expert 11.0.0, proizvođač *Stat-Ease* (Mineapolis, Minesota, SAD)
- Rotacioni vakuum uparivač Rotavapor R-114, proizvođač *Büchi* (Flavil, Švajcarska)
- Ependorf epice, proizvođač *Eppendorf* (Hamburg, Nemačka)
- Integrisani kvadruploni maseni analizator i analizator na bazi merenja vremena preleta jona proizvedenih tehnikom elektrosprej jonizacije uzorka. (QTOF), proizvođač *Waters Micromass* (Mančester, Ujedinjeno Kraljevstvo).
- Waters Ackuiti sistem tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom (UPLC), proizvođač *Waters* (Milford, SAD)
- Kolona *Ascentis Express C18 HPLC* (2  $\mu\text{m}$ , 50 mm x 2,1 mm), proizvođač *Sigma-Aldrich /Merck* (Darmštad, Nemačka)
- Komprimovani azot gas, čistoće 99.999%, proizvođač *Messer* (Črnuče, Slovenia)
- Argon (kolizioni gas), čistoće 99.995%, proizvođač *Messer* (Črnuče, Slovenia)
- Softverski paket za obradu podataka Mass Link v 4.1, proizvođač *Micromass* (Mančester, Ujedinjeno Kraljevstvo).
- Agilent Technologies 5975C MS sistem, proizvođač *Agilent Technologies*, (Santa Klara, SAD) u sprezi sa Agilent Technologies 6890N GC sistemom, proizvođač *Agilent Technologies* (Santa Klara, SAD)
- HP-5 5% fenil metil siloksan, Agilent 19091J-433 kolona, (unutrašnji prečnik 0,25 mm, dužina 30,0 m, debljina filma 0,25 mm, format kolone 7 inča), proizvođač *Agilent Technologies* (Santa Klara, SAD)
- Helijum gas, čistoće 99,999%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka).

Za izvođenje metode nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije korišćeno je:

- Ascend 400 (400 MHz) spektrometar, proizvođač *Bruker* (Bilerika, SAD)
- Rotacioni vakuum uparivač Rotavapor R-114, proizvođač *Büchi* (Flavil, Švajcarska)
- Deuterisani hloroform, čistoće 99,9%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka)
- Tetrametilsilan kao interni standard, čistoće > 99,99%, proizvođač *Sigma-Aldrich* (Taufkirhen, Nemačka).

### 3.6.2 Postupak hromatografske analize i sakupljanja frakcija

Pre hromatografske i spektralne analize, 2 mg uparenog dihlorometanskog ekstrakta endofita rastvoreno je u 1 mL metanola i ultra čiste vode (50:50, v/v). Izolovanje i sakupljanje komponenti iz endofitnog ekstrakta izvršeno je na Dionex Ultimate 3000 HPLC sistemu opremljenog DAD detektorom i binarnom pumpom. Razdvajanje je postignuto na reverzno-fazni semi-preparativni Hypersil Gold koloni za HPLC sistem (C18, veličina čestica 5 µm, dužina 150 mm, unutrašnji prečnik 10 mm) na 25 °C. Pre analize uzorci su održavani na 10 °C u autosampleru. Injekciona zapremina iznosila je 100 µL. Program gradijentne elucije sadržao je acetonitril kao mobilnu fazu A i 0,1% rastvor (v/v) mravlje kiseline u vodi kao mobilnu fazu B. Gradijentni program je započeo sa 95% (v/v) mobilne faze B. Tokom 28 minuta, procenat mobilne faze B smanjivao se do 5% (v/v), nakon čega je procenat mobilne faze B povraćen na početni odnos u toku od 0,05 minuta. Kolona je zatim ponovo ekvilibrirana, tako da je ukupno vreme izvođenja pojedinačne analize iznosilo 40 minuta pri protoku od 2 mL/min. Detektovanje je vršeno istovremeno, merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 220 nm, 235 nm, 254 nm i 285 nm kako bi se osiguralo registrovanje svih mogućih komponenti sa različitim spektralnim svojstvima.

Postupak sakupljanja frakcije obavljen je na uzorku uparenog dihlorometanskog ekstrakta *Phomopsis species* rastvorenom u 50% (v/v) rastvoru metanola u vodi, korišćenjem ranije pomenute hromatografske metode na Dionex Ultimate 3000 HPLC sistemu sa DAD detekcijom. U Eppendorf epicama je ručno sakupljeno pet izraženih pikova iz hromatograma pri vremenima retencije od oko 12,88 min, 13,67 min, 14,40 min, 16,02 min i 17,13 min.

Rastvarač iz posebnih frakcija pikova uklonjen je korišćenjem rotacionog uparivača podešenog na 50 °C pri pritisku od 700 mbar, a rezidui uparenih pikova korišćeni su za dalja ispitivanja.

### 3.6.3 Postupak masene spektrometrije

Spektralne metode, zasnovane pre svega na primeni masene spektrometrije (eng. *Mass spectrometry*, MS) i nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije (eng. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) nadovezivale se na rezultate razdvajanja i izolovanja pojedinih komponenata ekstrakata gljiva primenom tečne hromatografije (eng. *Liquid chromatography*, LC) i gasne hromatografije (eng. *Gas chromatography*, GC). LC-MS analiza je izvršena na Katedri za analitiku lekova Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta i Institutu Jožef Štefan u Ljubljani, GC-MS analiza na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a snimanje NMR spektara na Katedri za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Za potrebe izvođenja ovih eksperimenata, tačna masa uparenog ekstrakta endofita je bila rastvorena u smeši metanola i ultra čiste vode (50:50, v/v). Izolovanje i sakupljanje komponenti iz endofitnog ekstrakta je izvedeno na dostupnom *Dionex Ultimate 3000* HPLC sistemu opremljenog DAD detektorom i binarnom pumpom. Hromatografsko razdvajanje je bilo izvedeno na reverzno-faznoj semi-preparativnoj *Thermo scientific Hypersil Gold* koloni (C18, veličina čestica 5 µm, dužina 150 mm, unutrašnji prečnik 10 mm) termostatiranoj na 25 °C. Pre analize, uzorci su bili održavani na stabilnoj temperaturi u autosampleru. Maksimalna zapremina uzorka od 100 µL je injektovana. Primenom DoE, optimizovan je program gradijentne elucije sa acetonitrilom kao mobilnom fazom A i 0,1% rastvorom (v/v) mravlje kiseline u vodi kao mobilnom fazom B. Prema planu eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn (eng. *Central composite design*, CCD) preuzetom iz softvera *Design Expert 11.0.0* sprovedeni su eksperimenti u kojima su se menjali početni i krajnji udeo mobilne faze A, vreme trajanja gradijenta i protok mobilne faze, a zatim su analizom dobijenih matematičkih modela 3D dijagrama površine odgovora sistema koji opisuju hromatografsko ponašanje svih registrovanih pikova komponenata ekstrakata definisani optimalni uslovi za njihovo hromatografsko razdvajanje i posledično prikupljanje pojedinačnih frakcija. Detektovanje prisutnih komponenata iz ekstrakata je bilo izvršeno merenjem apsorbanca na talasnoj dužini od 220 nm, 235 nm, 254 nm i 285 nm istovremeno kako bi se osiguralo registrovanje svih

mogućih komponenti sa različitim spektralnim svojstvima. Postupak sakupljanja frakcija je obavljen na uzorku ekstrakta dobijenom iz prethodne faze istraživanja koji je najpre uparen na rotacionom uparivaču (50 °C pri pritisku od 700 mbar), pa ponovo rastvoren u smeši metanola i vode.

LC-MS analize su bile izvedene uz primenu hibridnog masenog analizatora u kome su integrisani kvadruploni maseni analizator i analizator na bazi merenja vremena preleta jona proizvedenih tehnikom elektrosprej jonizacije uzorka. (QTOF). Maseni spektrometar je povezan sa *Waters Ackuiti* sistemom tačne hromatografije pod ultra visokim pritiskom (eng. *Ultra high pressure liquid chromatography*, U(H)PLC) na kome je bila postavljena kolona *Ascentis Express C18 HPLC* (2 µm, 50 mm x 2,1 mm). Komprimovani azot je bio korišćen kao gas za sušenje i za raspršivanje uzorka. Protok gasa za raspršivanje je bio podešen na 20 L/h, a desolvacionog gasa na 600 L/h. Napon konusa od 20 V i kapilarni napon od 3,0 kV su korišćeni u režimu formiranja pozitivnih jona, odnosno 2,5 kV u režimu negativne jonizacije. Temperatura desolvatacije je bila podešena na 300 °C, a temperatura jonskog izvora na 100 °C. MS spektri su se snimali u opsegu *m/z* vrednosti od 50-1000 u vremenu skeniranja 0,2 s i vremenu trajanja 0,025 s. Za MS/MS eksperimente, argon je bio korišćen kao kolizioni gas pod pritiskom od  $2 \times 10^{-5}$  mbar. Spektri jona proizvoda su bili generisani pri energijama sudara od 15 V. Za obradu podataka korišćen je softver *Mass Link v 4.1*.

Analize metodom masene spektrometrije su izvršene na Agilent Technologies 5975C MS sistemu u sprezi sa Agilent Technologies 6890N GC sistemom. Početna temperatura peći GC sistema bila je 60 °C, a maksimalna temperatura 325 °C. Prednji dovod sistema je podešen na režim za odnos razdvajanja 10:1, dok je početna temperatura podešena na 200 °C, pritisak na 14,47 psi, a protok razdvajanja je bio 10,0 mL/min. Razdvajanje je izvršeno na Agilent Technologies HP-5 5% fenil metil siloksan, Agilent 19091J-433 koloni, (unutrašnji prečnik 0,25 mm, dužina 30,0 m, debljina filma 0,25 mm, format kolone 7 inča), a helijum gas je upumpavan pri brzini protoka od 1 mL/min. Pri ovim uslovima, izvršena je optimizacija dodatnih parametara koji mogu uticati na efikasnost separacije: ukupno vreme razdvajanja, početna i maksimalna temperatura peći, početna temperatura i pritisak. Frakcije pikova sakupljene semi-preparativnom HPLC analizom sa koncentracijom od 0,1 mg/ml uvedene su u GC-MS sistem injektiranjem zapremine od 1 µL, a ukupno vreme izvođenja bilo je 44 minuta.

Režim jonizacije bio je udar elektrona pri 70 eV. Parametar niskog masenog skena za MS bio je 10, dok je parametar visokog masenog skena bio 550.

#### **3.6.4 Postupak nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije**

Za dobijanje spektra nuklearne magnetne rezonance (NMR) na Bruker Ascend 400 (400 MHz) spektrometru, frakcije pikova sakupljene semi-preparativnom HPLC analizom uparavane su na rotacionom uparivaču Rotavapor R-114, a suvi sadržaj, težine oko 5 mg, je rastvoren u 250  $\mu$ L deuterohloroforma. NMR spektri su zabeleženi na 25 °C, a hemijska pomeranja su prikazana u delovima na milion (eng. Parts per milion -  $\delta$ ) u poređenju sa tetrametilsilanom kao internim standardom.

### **3.7 *In silico* procena fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti komponenti ekstrakta endofitnih gljiva**

#### **3.7.1 Oprema**

Za potrebe *in silico* procene fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti komponenata ekstrakta endofitnih gljiva upotrebljen je softverski paket:

- Marvin Sketch 4.1.13, proizvođač *ChemAxon* (Budimpešta, Mađarska)
- SwissADME verzija iz 2021. godine, proizvođač *Švajcarski Institut za Bioinformatiku* (Lozana, Švajcarska)
- ACD/i-lab verzija 2.0, proizvođač *ACD/Labs* (Toronto, Kanada).

#### **3.7.2 Postupak *in silico* procene fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti komponenti ekstrakta endofitnih gljiva**

Svrha eksperimenata u ovoj fazi istraživanja je bila procena toksikoloških i farmakokinetičkih parametara upotrebom *in silico* metoda za aktivne sekundarne metabolite endofitne gljive *Phomopsis species* poreklom iz četina četinara u Sloveniji. ADME parametri su izračunavani za jedinjenja označena kao 325-3 i 325-5 Molekularne strukture ispitivanih analita iz endofitnih gljiva su prikazane na slici 4-16.

Logaritam podeonog koeficijenta ( $\log P$ ) izračunavan je pomoću računarskog programa *Marvin Sketch* 4.1.13. Dodatno su vrednosti deskriptora lipofilnosti za pravilo Lipinskog i Ghose pravilo dobijeni *in silico* primenom programa *SwissADME*. Volumen distribucije, Veber-ovo



pravilo, kao i procenat vezivanja ispitivanih jedinjenja za proteine plazme određivani su pomoću softvera *ACD/i-lab*, preko kojeg su takođe izračunavane i vrednosti toksikoloških parametara za dve vrste glodara (za miša i pacova) u zavisnosti od načina aplikacije supstance.

### 3.8 *Doking* simulacije

#### 3.8.1 Oprema

Za izvođenje *doking* simulacija korišćeni su programi:

- Baza podataka za proteine: RCSB Brookhaven Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) [219]
- Microsoft Excel verzija 2016 sa ekstenzijom XLStat 2019, proizvođač *Microsoft* (Redmond, Vašington, SAD)
- Chem Draw Ultra verzija 7.0.0, proizvođač *Cambridgesoft* (Valtam, SAD)
- CS Chem 3D Ultra verzija 7.0.0 proizvođač *Cambridgesoft* (Valtam, SAD)
- UCSF Chimera verzija 1.15, proizvođač *Univerzitet u Kaliforniji* (San Francisko, SAD)
- AutoDock program verzija 4.2, proizvođač *Istraživački institut „Scripps“* (La Hola, SAD)
- AutoDockTools verzija 1.5.6. i AutoGrid algoritam, proizvođač *Istraživački institut „Scripps“* (La Hola, SAD)

#### 3.8.2 Postupak izvođenja *doking* simulacija

Opšte je poznato da mnogi antimikrobni lekovi izražavaju svoj efekat kroz specifičnu interakciju sa ciljnim receptorima prisutnim na mikroorganizmima [220-221]. Danas u skladu sa eksperimentalnim *in vitro* testiranjem aktivnosti i interakcije između liganda i receptora, kao i zbog dostignuća u oblasti računarskih nauka, omogućena je jedinstvena prilika za dizajniranje lekovitih supstanci potpomognuta računarskim tehnikama i mogućnošću simulacije interakcije aktivnih struktura i receptora [120, 222-224]. *In silico* metode omogućavaju skrining velikog broja potencijalnih kandidata za lekove i uvođenje principa racionalizacije farmaceutskih istraživanja koje je bazirano na podacima.

Imajući u vidu ovu činjenicu, kao i već dokazanu aktivnost biomolekula endofitnih gljiva iz roda *Phomopsis*, koje rastu na iglicama četinara, protiv *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* [204], predložena studija uzela je u obzir zajedničke ciljne receptore poznatih antibiotika

povezanih sa ovim patogenima. Odlučeno je da se antimikrobna aktivnost protiv G<sup>+</sup> bakterije *Staphylococcus aureus* ispita upotrebom receptora: 3VSL (penicilin vezujući protein 3 iz meticilin rezistentne bakterije *Staphylococcus aureus*), 3G7B (*Staphylococcus aureus* giraza B) [225] i 1JJJ (tirozil-tRNK sintetaza bakterije *Staphylococcus aureus*) [225]. Takođe je receptor 3K3P iz bakterije *Streptococcus mutans* (apo-forma D-alanina: D-alanin ligaza) [226] uključen kao bitan trag u daljem razumevanju otpornosti G<sup>+</sup> bakterija na već poznate lekove. Dodatno su za procenu antimikrobne aktivnosti korišćeni često upotrebljavani receptori bakterije *Escherichia coli*, kao najzastupljenijeg predstavnika G<sup>-</sup> bakterija: 1F0K (1,9 Å struktura transferaze bakterije *Escherichia coli*) [227], 1KZN (24 kDa domen izomeraze bakterije *Escherichia coli*) [226] i 4EMV (struktura ATP inhibitora topoizomeraze bakterije *Escherichia coli*) [227]. Pored toga, autori ističu i važnost 1SHV receptora iz bakterije *Klebsiella pneumoniae* (SHV-1 β-laktamaza) [227] kao dodatnu potencijalnu metu za inhibiciju G<sup>-</sup> bakterija.

Bioaktivne komponente označene kao 325-3 i 325-5 korišćene su kao referenca za temeljnu literaturnu pretragu za aktivnim sekundarnim metabolitima iz drugih sojeva *Phomopsis species*, kao i za strukturalno slične bioaktivne komponente [14, 36-38, 54, 56-57, 228-230]. Odabran je skup molekula koji se sastoji od fomoenamida i fomonitroestra, koji predstavljaju sekundarne metabolite iz endofita *Phomopsis species* iz soja PSU-D15, za koji već postoje podaci o umerenoj *in vitro* antibakterijskoj aktivnosti protiv bakterije *Mycobacterium tuberculosis* [14, 54]. Pet strukturno sličnih komponenti, hibridnih peptido-poliketida nazvanih kurvularidi A–E, koji su dobijeni iz endofitne gljive *Curvularia geniculata* izolovane iz grana biljne vrste *Catunaregam tomentosa*, su izabrani u daljem procesu zbog već potvrđene antifungalne aktivnosti protiv gljivice *Candida albicans* [228]. Ovaj set izabranih jedinjenja je upotpunjen i takozvanim komponentama 6 i 7 izolovanih iz endofitne gljive *Phomopsis species* iz biljne vrste *Notobasis syriaca*, koje su takođe pokazale značajnu antibakterijsku, antifungalnu i aktivnost protiv algi [36]. Takođe set odabranih struktura uključivao je i fomol izolovan iz endofita *Phomopsis species* medicinske biljke *Erythrina crista-galli*, za koji je od skora takođe potvrđena antimikrobna aktivnost [229].

### 3.8.2.1 Priprema receptora i ligandnih molekula za *docking* studiju

*Docking* studije, simulacije i evaluacije rezultata su bile izvedene koristeći set okarakterisanih strukturalno sličnih jedinjenja sa eksperimentalno potvrđenom aktivnošću aktivnih komponenti iz endofita *Phomopsis spp.*, strukture poznatih antibiotika kao kontrolnih liganada (npr. ampicilin), kao i kristalne strukture receptora dobijene iz *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) [219] baze koji su dokazano odgovorni za ispoljavanje antibiološke aktivnosti (receptori 3G7B (*Staphylococcus aureus* giraza B), 3VSL (penicilin-vezujući protein 3 iz meticilin-rezistentnog soja *Staphylococcus aureus*), 1F0K (1,9 Å struktura transferaze *Escherichia coli*), 1SHV (*Klebsiella pneumoniae* SHV-1 β-laktamaze), 4EMV (struktura topoizomeraze ATP inhibitora *Escherichia coli*), 1JIJ (tirozil-tRNK sintetaza soja *Staphylococcus aureus*), 1KZN (24 kDa domen izomeraze soja *Escherichia coli*), 3K3P (*Streptococcus mutans* apo-forma D-alanina: D-alanin ligaze)) [224-227] i receptora koji su u literaturi označeni kao nova mesta za delovanje lekova koji mogu poslužiti za prevazilaženje problema rezistencije bakterija (npr. 6CYF receptor - sekrecijski sistemski protein tip III soja *Pseudomonas aeruginosa*) [231].

Ligandi su bili pripremljeni za *docking* simulaciju upotrebom softverskog paketa *Chem Draw Ultra* i *CS Chem 3D Ultra* čime su sve testirane strukture bile iscrtane u softveru i energetski minimizirane koristeći MOPAC algoritam sa 100 iteracija. Nakon toga, su energetski minimizirane strukture bile pretvorene u zahtevani format za *docking* simulacije pomoću *UCSF Chimera* programa, i učitane u *AutoDock* program verzija 1.5.6. sa ciljem izvođenja simulacija. Za izvođenje *docking* studije, korišćen je program *AutoDockTools* verzija 1.5.6. Kako bi se pripremile odabrane molekularne strukture za *docking* studiju, prvo se je uz upotrebu *AutoGrid* algoritma izvršilo preračunavanje 3D mreže interaktivnih energija prema odabranom receptoru (makromolekulu). Ovaj postupak je podrazumevao kreiranje kubične mreže kako bi se predstavila aktivna oblast u kojoj je potencijalna interakcija fleksibilnog liganda sa receptorom. Ovi automatizovani *docking* eksperimentalni protokoli omogućavaju procenu slobodne energije vezivanja liganada i receptora. Prema literaturnim podacima preporučena je upotreba Lamarkijanovog genetskog algoritma u cilju identifikacije najboljih konformacija liganda prilikom interakcije sa receptorom [232-233]. Potrebni *docking* parametri su bili podešeni u softveru za sprovođenje 100 nezavisnih *docking* simulacija za svaku kombinaciju odabranih

receptora i liganada. U ovom slučaju, svaka *docking* simulacija se je izvršavala između fleksibilnih liganada i statičnih receptora (makromolekula, odnosno proteina). Softver izvršava i evaluira proces potencijalnog povezivanja liganda na receptoru, dok ligand nasumično menja konformaciju sa bilo kojim stepenom slobode. Na osnovu preporuka za evaluaciju *docking* simulacija u literaturi, za pojedinačnu simulaciju program izračunava energiju interakcije liganda i receptora i to za svaku moguću konformaciju liganda. Uobičajeni eksperimentalni protokol upućuje na to da za dalje procene treba uzimati u obzir izračune samo za konformaciju liganda sa najboljom srednjom vrednošću kvadratnog odstupanja (RMSD) [234-236]. Za svaku od struktura od interesa (ligand) je izvršena *docking* simulacija u kombinaciji sa svakim od receptora, što je omogućilo procenu energija vezivanja i razumevanja orijentacije i interakcije potencijalno vezanih molekula na receptor. Glavni kriterijumi za rangiranje eksperimenata za svaku od kombinacija *docking* simulacije su bili: izračunata slobodna energija vezivanja, koja zavisi od unutrašnje, intermolekularne i torzione slobodne energije liganda, kao i od mogućnosti uspostavljanja vodoničnih veza sa receptorom; potencijal za formiranje vodoničnih veza između liganda i receptora; izračunata konstanta inhibicije (Ki) i RMSD vrednost [237].

### 3.9 QSAR studije primenom pristupa baziranom na receptoru

#### 3.9.1 Oprema

Za izvođenja QSAR studije primenom pristupa baziranom na receptoru (eng. *receptor based approach*) korišćeni su sledeći programi:

- Baza podataka za proteine: RCSB Brookhaven Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) [219]
- Chem Draw Ultra verzija 7.0.0, proizvođač *Cambridgesoft* (Valtam, SAD)
- CS Chem 3D Ultra verzija 7.0.0, proizvođač *Cambridgesoft* (Valtam, SAD)
- Marvin Sketch verzija 4.1.13, proizvođač *ChemAxon* (Budimpešta, Mađarska)
- Microsoft Excel verzija 2016 sa ekstenzijom XLStat 2019, proizvođač *Microsoft* (Redmond, Vašington, SAD).

#### 3.9.2 Postupak izvođenja QSAR studije primenom pristupa baziranom na receptoru

Kako bi značaj rezultata *docking* studija dobio dodano na svom značaju, nagrađeni su QSAR modeli primenom pristupa baziranom na receptoru (eng. *receptor-based*) sa ciljem pouzdanog predviđanja afiniteta vezivanja biomolekula za određeni tip receptora. Iz sprovedenih *docking*

studija na 3 reprezentativna receptora (1F0K - 1,9 Å transferaza *Escherichia coli*, 3G7B - *Staphylococcus aureus* giraza B i 1SHV -  $\beta$ -laktamaza *Klebsiella pneumoniae*), iskorišćeno je 10 parametara koji opisuju prirodu interakcije biomolekula sa receptorima (efikasnost liganda, konstanta inhibicije, intermolarna energija, VdW HB desolvatacijska energija, elektrostatička energija, ukupna interna energija, torziona energija, nevezana energija, refRMS i broj vodoničnih veza). Njima su pridruženi molekularni deskriptori 12 jedinjenja (325-3, 325-5, kulvularidi A-E, jedinjenja 6 i 7, fomol, fomoenamid i fomonitroestar) koji opisuju fizičko-hemijske karakteristike molekula i njihovu sklonost za stupanje u reakcije kao što su particioni koeficijent  $\log P$ , molekulska težina i molekularni volumen koji opisuju tendencije ka hidrofobnim interakcijama, zatim kvantum hemijski deskriptori poput energije najviše okupirane molekulske orbitale (*EHOMO*), energije najniže neokupirane molekulske orbitale (*ELUMO*), indeksa elektrofilnosti ( $\omega$ ), hemijske tvrdoće molekula ( $\eta$ ), hemijske mekoće molekula ( $S$ ) i hemijskog potencijala ( $\mu$ ) i drugi molekularni deskriptori koji karakterišu sklonost molekula ka građenju vodoničnih veza, stupanje u elektron donorske i akceptorske interakcije i elektrostatičke interakcije [238]. Prilikom izračunavanja molekularnih deskriptora, molekuli su najpre prevedeni u konformacije koje su sadržale minimum energije primenom MOPAC/AM1 metode u *Chem 3D Ultra 7.0.0* programu, zatim su molekularni deskriptori izračunavani pomoću *Marvin Sketch 4.1.13* i *Chem 3D Ultra 7.0.0* programa.

Dakle, baza podataka pomoću koje je vršeno modelovanje sadržala je ukupno 37 parametara koji su predstavljali ulazne podatke, dok je afinitet vezivanja za receptor bio izlazni podatak. QSAR modeli su građeni pomoću algoritma mašinskog učenja baziranog na veštačkim neuronskim mrežama. Za potrebe građenja mreža, početni set podataka je podeljen na 3 dela za potrebe treniranja, validacije i testiranja mreže. Tokom treniranja kroz 1000 epoha, parametri mreže su optimizovani tako da se postignu najniže moguće vrednosti greške (eng. *Root mean square error*, RMSE) za trening i validacioni set podataka. Dobijene su 3 pojedinačne mreže za svaki od 3 izabrana receptora, koje su se sastojale od više slojeva (ulazni, skriveni sa različitim neurona i izlazni sloj). Mreže su trenirane algoritmom povratnog prolaska greške.

## **4      REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4.1 Evaluacija rezultata analize glavnih komponenti

Tokom PCA analize, korelacije između ispitivanih varijabli su određene preko vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije, kojim se opisuje jačina linearne veze između dve kvantitativne varijable sa nivoom značajnosti  $\alpha = 0,95$  i vrednošću verovatnoće  $p < 0,05$ . Korelaciona matrica je predstavljena u tabeli 4-1. Svaka glavna komponenta (PC) je okarakterisana kao „*eigen-vektor*“ (sopstveni vektor) varijanse – matrice kovarijanse, dok je varijansa duž vektora poznata kao „*eigen-vrednost*“ (sopstvena vrednost) (Tabela 4-2 i Slika 4-1).

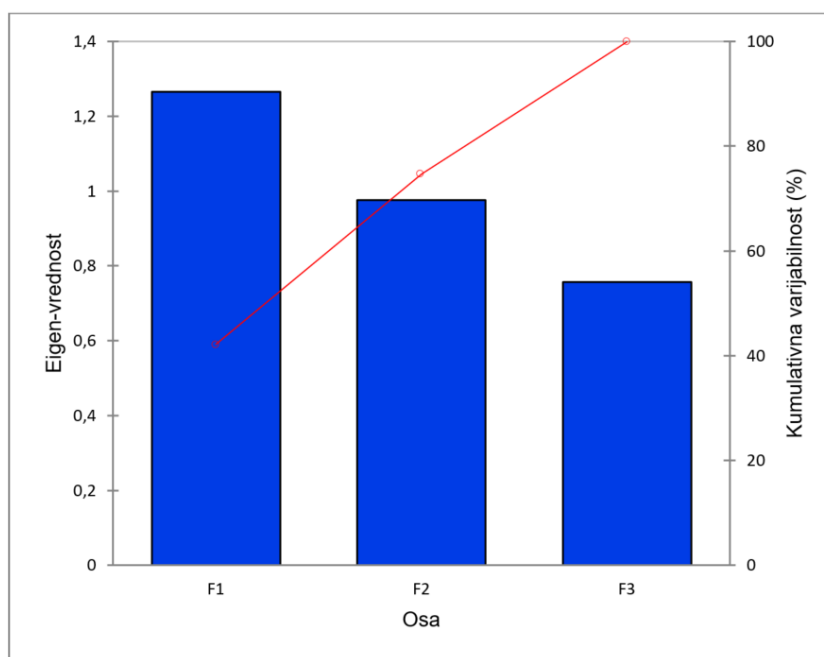
Prva glavna komponenta (PC1) imala je najveću *eigen-vrednost* od 1,305 i predstavljala je maksimalan iznos varijabilnosti u skupu podataka od 43,510 %. Druga i treća glavna komponenta (PC2 i PC3) su imali sopstvene vrednosti od 1,006 i 0,689 i činile su 33,520 % i 22,970 % varijanse u podacima, respektivno. Samo su *eigen-vrednosti* veće od 1,0 smatrane značajnim deskriptorima varijanse podataka prema Kajzerovom pravilu [93, 95-96]. Treća generisana glavna komponenta je imala manje *eigen-vrednosti* i stoga nije opravdala značajnu varijabilnost u podacima. Iz tog razloga su za dalje proučavanje korišćene samo prve dve glavne komponente sa kumulativnom varijabilnošću od 77,030%. Ovo je dobar rezultat, ali ipak je preporučljivo biti oprezan sa tumačenjem mapa jer neke informacije mogu biti skrivene u preostalim glavnim komponentama.

*Tabela 4-1 Korelacioni matriks ispitivanih kvantitativnih varijabli*

<b>Varijabla</b>	<b>Skalirana vrednost <i>E. coli</i></b>	<b>Skalirana vrednost <i>S. aureus</i></b>	<b>Skalirana vrednost <i>P. aeruginosa</i></b>
<b>Skalirana vrednost <i>E. coli</i></b>	1	-0,052	-0,303
<b>Skalirana vrednost <i>S. aureus</i></b>	-0,052	1	-0,017
<b>Skalirana vrednost <i>P. aeruginosa</i></b>	-0,303	-0,017	1

**Tabela 4-2** *Eigen-vektori i eigen-vrednosti generisanih glavnih komponenti (PC)*

Glavna komponenta (PC)		PC1	PC2	PC3
<i>Eigen-vektor</i>	Skalirana vrednost <i>E. coli</i>	-0,709	-0,052	0,703
	Skalirana vrednost <i>S. aureus</i>	0,082	0,984	0,155
	Skalirana vrednost <i>P. aeruginosa</i>	0,700	-0,168	0,694
<i>Eigen-vrednost</i>		1,305	1,006	0,689
Varijabilnost (%)		43,510	33,520	22,970
Kumulativna vrednost (%)		43,510	77,030	100,000



**Slika 4-1** *Glavne komponente sa odgovarajućim eigen-vrednostima*

Vrednosti koje odgovaraju glavnim komponentama su izračunate iz korelacione matrice. Te vrednosti predstavljaju značajan doprinos varijabli ukupnoj varijabilnosti objašnjenj generisanim glavnim komponentama (Tabela 4-3). Specifični obrasci korelacije između testiranih varijabli se takođe mogu vizualizovati korišćenjem analize dijagrama konstruisanih za glavne komponente PC1 i PC2 koji objašnjavaju značajnu varijabilnost u ispitivanom skupu podataka (Slike 4-2 i 4-3). Ovaj dijagram takođe omogućava identifikaciju važnih varijabli. Cilj ove projekcije je da omogući vizualizaciju položaja varijabli jedne u odnosu na drugu u dvodimenzionalnom prostoru i njihovu odgovarajuću korelaciju. Varijable koje su najbliže jedna drugoj i udaljene od početka dijagrama su u pozitivnoj korelaciji (ili direktno

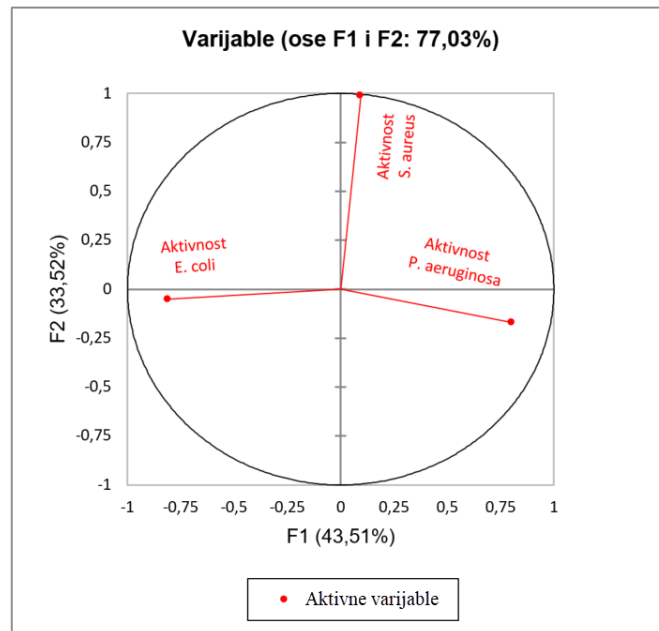


proporcionalne), dok su varijable suprotne jedna drugoj na dijagramu u negativnoj korelaciji (ili obrnuto proporcionalne). Dužina strelice koja pripada promenljivoj takođe definiše jačinu njene povezanosti sa glavnim komponentama. Dijagram takođe može objasniti odnose između dve varijable preko njihovog ugla od centra dijagrama. Koeficijent korelacije između dve varijable je definisan kao kosinus ugla između njihovih odgovarajućih vektora na dijagramu. Kosinus od  $180^\circ$  je 1, i stoga ukazuje na negativnu korelaciju. Na osnovu ovog matematičkog pravila, nekorelisane varijable su ortogonalne i javljaju se pod pravim uglom jedna u odnosu na drugu jer je kosinus ugla između njih od  $90^\circ$  jednak 0. Shodno tome, kosinus od  $0^\circ$  je 1, što označava pozitivnu korelaciju između promenljivih. Da bi se potvrdilo da je promenljiva dobro povezana sa osom, analizirani su kvadratni kosinusi. Ako su kvadrati kosinusa date promenljive blizu nule, rizik od pogrešne interpretacije rezultata u smislu trendova na odgovarajućoj osi je veći (Tabela 4-3).

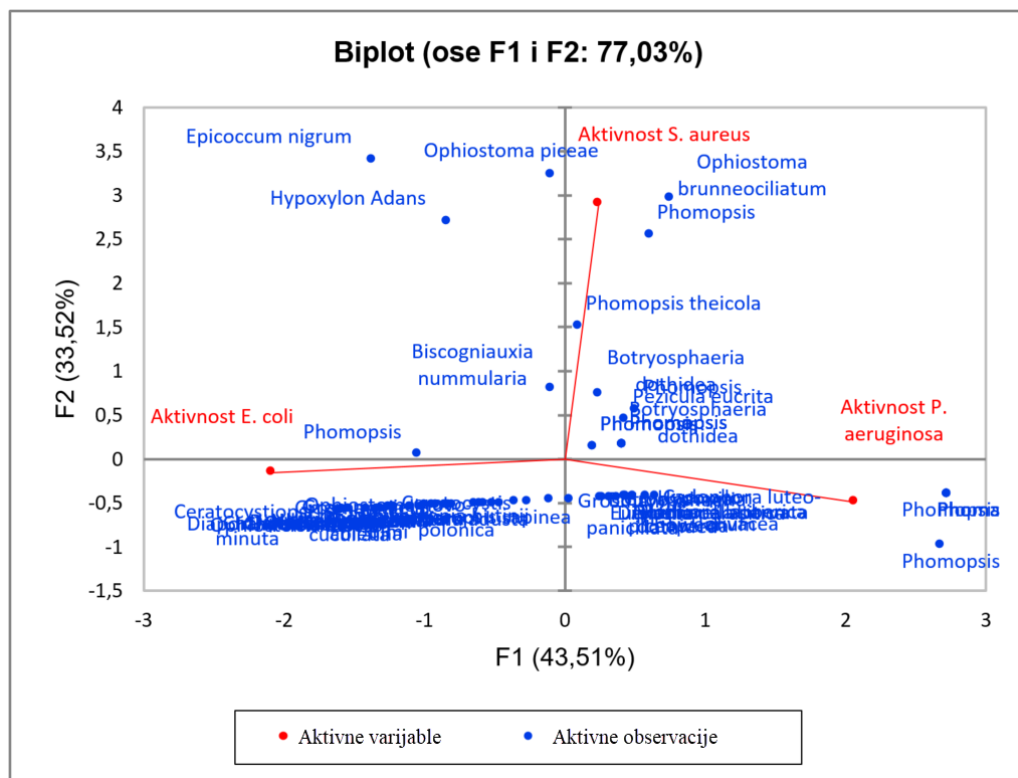
**Tabela 4-3      Doprinosi, faktorska opterećenja i kvadrat kosinusa varijabli**

	<b>Glavna komponenta (PC)</b>	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>	<b>PC3</b>
<b>Doprinos varijabli (%)</b>	<b>Skalirana aktivnost <i>E. coli</i></b>	50,318	0,268	49,414
	<b>Skalirana aktivnost <i>S. aureus</i></b>	0,672	96,919	2,409
	<b>Skalirana aktivnost <i>P. aeruginosa</i></b>	49,011	2,813	48,176
<b>Faktor opterećenja</b>	<b>Skalirana aktivnost <i>E. coli</i></b>	50,318	0,268	49,414
	<b>Skalirana aktivnost <i>S. aureus</i></b>	0,672	96,919	2,409
	<b>Skalirana aktivnost <i>P. aeruginosa</i></b>	49,011	2,813	48,176
<b>Kvadrat kosinusa</b>	<b>Skalirana aktivnost <i>E. coli</i></b>	0,657	0,003	0,341
	<b>Skalirana aktivnost <i>S. aureus</i></b>	0,009	0,975	0,017
	<b>Skalirana aktivnost <i>P. aeruginosa</i></b>	0,640	0,028	0,332

**A**



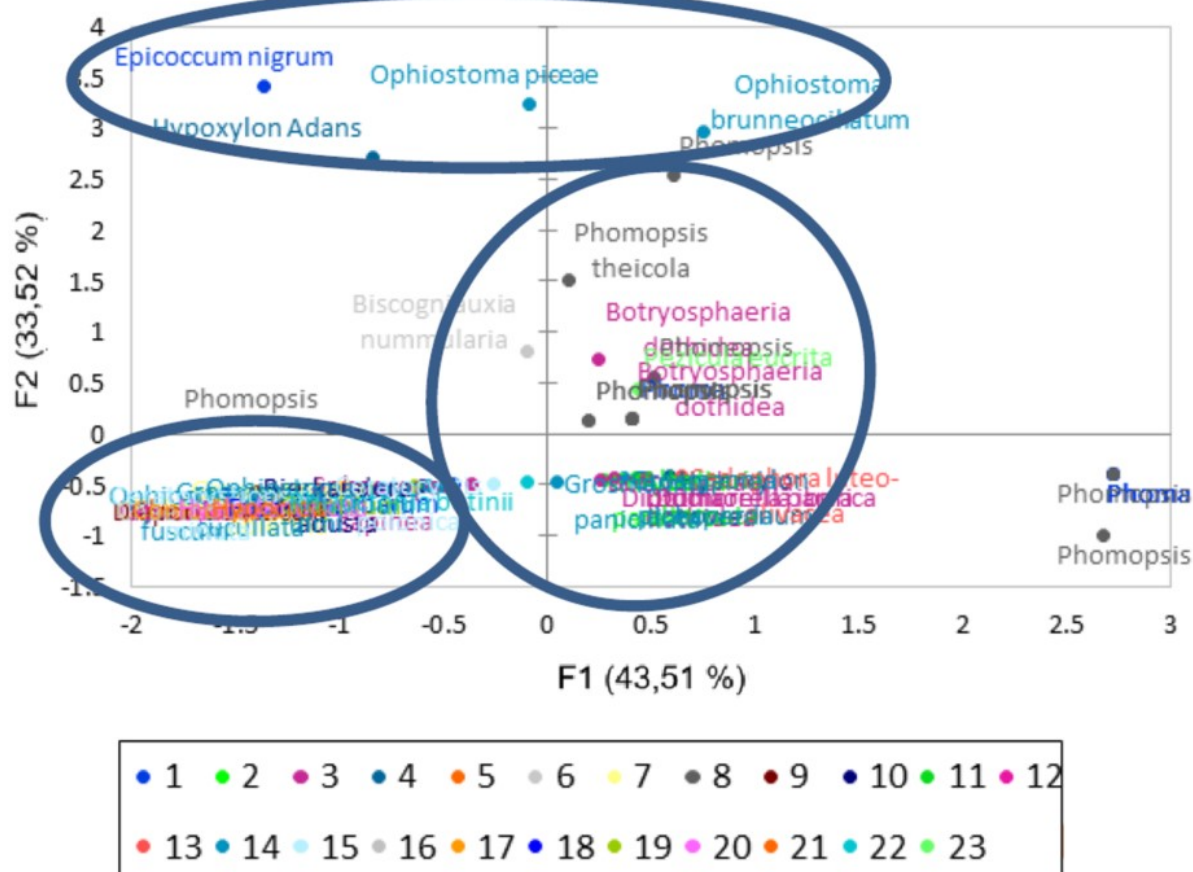
**B**



*Slika 4-2*

*Dijagrami glavnih komponenti sa aktivnim varijablama (A) i zapažanjima (B)*

## Zapažanja (ose F1 i F2: 77,03 %)



Slika 4-3 Prikaz rezultata za glavne komponente

**Legenda:** 1: Didymellaceae, 2: Diatripiaceae, 3: Botryosphaeriaceae, 4: Hypoxylaceae, 5: Nectriaceae, 6: Xylariaceae, 7: Helotiaceae, 8: Valsaceae, 9: Diaporthaceae, 10: Meruliaceae, 11: Pleosporaceae, 12: Physalacriaceae, 13: Herpotrichiellaceae, 14: Ophiostomataceae, 15: Ceratocystidaceae, 16: Chaetomiaceae, 17: Coniochaetaceae, 18: Nectriaceae, 19: Papilionidae, 20: Hyaloscyphaceae, 21: Hypocreaceae, 22: Ceratobasidiaceae, 23: Dermateaceae

Varijanse u PC1, koja objašnjavaju najveću varijabilnost u skupu podataka, ukazuju na to da imaju visok doprinos skaliranoj aktivnosti protiv *Escherichia coli* (0,81) i *Pseudomonas aeruginosa* (0,80). Nasuprot skaliranoj aktivnosti protiv *Escherichia coli* koje je pokazala negativnu vrednost, skalirana aktivnost protiv *Pseudomonas aeruginosa* imala je pozitivnu vrednost u skladu sa znakom značajnog odnosa njihovog doprinosa varijabilnosti podataka. PC2 je pokazala visoku pozitivnu vrednost opterećenja za skaliranu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* (0,987), dok je doprinos drugih varijabli bio manje izražen. Skalirana

aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* nije u korelaciji sa drugim varijablama, dok su skalirane aktivnosti protiv *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* u jakoj negativnoj korelaciji. Ovakav ishod se može opravdati činjenicom da su *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* su Gram negativne bakterije, dok je *Staphylococcus aureus* Gram pozitivna bakterija.

Dijagram analize glavnih komponenti je omogućio identifikaciju važnih varijabli i njihovih odnosa, dok su konačni rezultati takođe pokazali da li su zapažanja slična ili različita, tipična ili netipična. Rezultati poređenja PC1–PC2 otkrili su tri različite grupe endofita (Slika 4-3). Može se zaključiti da predstavnici endofitnih gljiva koje pripadaju porodicama 7, 10, 15 i 17 (*Helotiaceae*, *Meruliaceae*, *Ceratocistidaceae*, i *Coniochaetaceae*, respektivno) pokazuju slične profile bioaktivnosti koji su bili različiti od porodica 2 i 3 (*Diatrypaciae* and *Botryosphaeriaceae*, respektivno). Endofitne gljive koje pripadaju porodici 8 (*Valsaceae*, različite vrste roda *Phomopsis*) mogu se naći u svakoj grupi i u jakoj su korelaciji sa svim varijablama. Ova činjenica je dovela do sugestije da su zapažanja odražavala mali uticaj biljnih domaćina sa kojima ove endofitne gljive formiraju simbiotske zajednice (istražene su bile biljke domaćini iz porodica: *Pinaceae*, *Rhizophoraceae*, *Salicaceae*, *Apocinaceae*, *Anacinaceae*, *Anacardiaceae*, *Asteraceae*, *Asteraceae*, *Cariophilaceae* i *Moraceae*). Ovaj zaključak je u skladu sa eksperimentalno generisanim podacima koji su dobijeni korišćenjem endofita koji rastu na četinama vrste *Pinaceae* i indeksima bioaktivnosti pronađenim u literaturnim zapisima [12-14, 17-21, 27-30, 34-35, 52-53, 58, 204]. Nekoliko istupajućih vrednosti se takođe mogu videti u dijagramu zbog njihove visoke skalirane vrednosti aktivnosti prema *Pseudomonas aeruginosa*. Ovo se može objasniti ukupnim iznosom varijabilnosti za PC1 i PC2 (77,03%), kao i relativno sličnom količinom varijabilnosti za PC2 i PC3 (33,52% i 22,92%, respektivno), što znači da pojedina tumačenja mogla ostati skrivena u PC3.

Treba napomenuti da postoje ograničeni podaci za pojedine predstavnike unutar najveće grupe u tabeli (različiti tipovi *Phomopsis* i *Phoma* vrsta) koja pokazuje aktivnost protiv *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, i *Mycobacterium tuberculosis* [12, 17, 36-38, 52-54, 56-57, 239]. Dodatno, postoje predstavnici iste grupe koji su pokazali drugu vrstu bioaktivnosti - antifungalnu aktivnost protiv *Candida albicans* [54, 239]. Dakle, u skladu sa ekspanzijom broja bakterijskih vrsta sa kojima bi u budućnosti mogla biti istraživana antimikrobna aktivnost, bilo bi dobro takođe usmeriti napore i istraživati nove antigljivične

agense među biomolekulima. Ovo je jednako važno pitanje poput već naglašene otpornosti bakterija pošto je primećeno da se svet danas suočava i rezistencijom gljivičnih infekcija na poznatu terapiju. Izolacija i detaljniji pregled hemijskih struktura sekundarnih metabolita koji potiču od ovih endofitnih gljiva bi verovatno otkrili vodeće strukture aktivnih jedinjenja.

Prema njihovom položaju na odgovarajućim kvadrantima na dijagramu, PCA analizom se ističe endofitna vrsta *Phomopsis* kao najpotentnija i time predstavlja dobar osnov za dalja farmaceutska istraživanja. Takođe je pregledom literature potvrđeno je da je rod *Phomopsis* već prepoznat kao bogat izvor sekundarnih metabolita različitih struktura kao što su fomopsihalazin, citohalazin, konvolvulanska kiselina, izobenzofuranoni, oblongolid, fomopsolid, fomodiol, fomoksanton i ksantonski dimeri, fomoenamid, fomonitroestar, deacetilfomoksanton B, dicerandrol A, (1S, 2S, 4S)-p-mentan-1,2,4-triol, uridin, etil-2,4-dihidroksi-5,6-dimetilbenzoat, fomopsilakton i niz poliketida. Za nekoliko od navedenih jedinjenja je već dokazana antibakterijska, antialgalna i antifungalna aktivnost [12, 38, 54, 58, 239]. Zahvaljujući širokoj prirodnoj rasprostranjenosti *Phomopsis* vrste, već priznatim pokazateljima njene bioaktivnosti i uz pomoć nalaza i rezultata *rudarenja kroz podatke*, trebalo bi postići produktivnije sakupljanje sirovog gljivičnog materijala i pripremu ekstrakata bogatijih sekundarnim metabolitima. Iako bakterije stalno menjaju mehanizme delovanja i njihove karakteristike, ove endofitne gljive sa jedinstvenom strukturom svojih biomolekula mogle bi da postanu dostojan protivnik u borbi sa sojevima bakterija koji su otporni na lekove.

## **4.2 Evaluacija antibiotske aktivnosti ekstrakta endofitnih gljiva**

Određivanje antibiotske aktivnosti dihlorometanskog ekstrakta prema *Escherichia coli* posle 24 h, vršeno je metodom mikrodilucije i prosečna vrednost apsorbance bila je 0,4603 za negativnu kontrolu, a 0,1590 za pozitivnu kontrolu. Dihlorometanski ekstrakt endofita *Phomopsis species* je pokazao vrednost apsorbance od 0,2812. Stoga je zaključeno da je ovaj ekstrakt pokazao stopu inhibicije od 59,44 %. Isti set eksperimenata sa mikrodilucionim ispitivanjem antimikrobne aktivnosti ponovljen je korišćenjem uparenog etanolnog ekstrakta endofita i oni su takođe ukazali na prisustvo antibakterijske aktivnosti. Osim toga, opaženo je da je etanolni ekstrakt pokazao stopu inhibicije od 51,63 % prema *Escherichia coli*.

U cilju dalje evaluacije odnosa između koncentracije ekstrakta i nivoa antibiotske aktivnosti na *Escherichia coli*, eksperiment određivanja antimikrobne aktivnost mikrodilucijom je ponovljen korišćenjem dodatnih 4 nižih volumetrijskih odnosa dihlometanskog ekstrakta pošto je bolja inhibiciona zavisnost opažena u poređenju sa etanolnim ekstraktom gljive. Negativna kontrola u istim volumetrijskim odnosima je takođe korišćena u ovom eksperimentu. Stoga su uzorci dihlometanskog ekstrakta *Phomopsis species* pripremljeni tako da je procenat rastvora dihlometanskog ekstrakta *Phomopsis species* u suspenziji *Escherichia coli* u LB bujonu bio oko 10 %, 5 %, 2,5 % ili 1 % (v/v). Iz rezultata je opaženo da je antibiotska aktivnost zavisila od koncentracije prisutnog dihlometanskog ekstrakta *Phomopsis species*. Konkretno, prosečna vrednost apsorbance od 0,2812 izmerena je za 10 % (v/v) ekstrakt, 0,3305 za 5 % (v/v) ekstrakt, 0,3275 za 2,5 % (v/v) ekstrakt i 0,3896 za 1 % (v/v) ekstrakt. Kao što se očekivalo, u uzorcima sa nižom koncentracijom ekstrakta, odnosno kontrolnog uzorka rast *Escherichia coli* je bio izraženiji. Osim toga, čak je i uzorak sa najnižom koncentracijom dihlometanskog ekstrakta *Phomopsis species* takođe ispoljio antibiotsko dejstvo u poređenju sa negativnom kontrolom, što se može zaključiti iz prosečne vrednosti apsorbance za ekstrakt (0,3896 pri 1 %, v/v) u poređenju sa prosečnom vrednošću apsorbance za negativnu kontrolu (0,4603). Na osnovu prikazanih podataka, izračunato je da inhibiciona koncentracija dihlometanskog ekstrakta, koja uništava 50 % bakterija (IC50), iznosi 6,95 %.

Nadalje, isti postupak je još jednom izveden radi procene antibakterijske aktivnosti ekstrakata endofitnih gljiva prema *Staphylococcus aureus* posle 24 h inkubacije. Tokom preliminarnih ispitivanja je primećeno da je etanolni ekstrakt pokazao visoku stopu inhibicije od 92,80 % na rast *Staphylococcus aureus*. Sa druge strane, dihlometanski ekstrakt nije pokazao primetnu antibakterijsku aktivnost prema *Staphylococcus aureus*. Iz tog razloga smo nastavili sa određivanjem antimikrobnog potencijala mikrodilucijskim testom isključivo sa etanolnim ekstraktom endofita *Phomopsis species*. Uzorci za mikrodilucionu test su pripremljeni tako da su koncentracije etanolnog ekstrakta *Phomopsis species* u finalnoj suspenziji *Staphylococcus aureus* bile približno 10 %, 5 % i 1 % (v/v). Iz rezultata je opažena antibiotska aktivnost zavisna od koncentracije ekstrakta. Konkretno, prosečna vrednost apsorbance od 0,1755 je izmerena za 10 % (v/v) ekstrakt, 0,1805 za 5 % (v/v) ekstrakt i 0,2010 za 1 % (v/v) ekstrakt. Rezultat apsorbance za negativnu kontrolu bio je 0,4655, a za pozitivnu kontrolu 0,1530. Štaviše, čak je i uzorak sa najnižim ispitivanim razblaženjem od 1 % (v/v) etanolnog ekstrakta *Phomopsis*

*species* imao izrazitu antibiotsku aktivnost u poređenju sa pozitivnom i negativnom kontrolom. Iz raspoloživih podataka, izračunata je IC50 vrednost etanolnog ekstrakta *Phomopsis species* za *Staphylococcus aureus* i iznosila je 1,30 %.

Ovi podaci idu u prilog hipotezi da biomolekuli iz istraživanih endofitnih gljiva imaju potencijal da postanu kandidati za nove antimikrobne lekove, imajući u vidu rastući trend antibakterijske rezistencije, pošto pokazana bioaktivnost može da predstavlja dragocen doprinos sadašnjoj antibakterijskoj terapiji. Na osnovu prikazanih podataka i imajući u vidu buduću industrijsku eksploataciju pripremljenih ekstrakata, mi smo nastavili sa detaljnom analizom komponenata dihlorometanskog ekstrakta *Phomopsis species* korišćenjem spektralnih i hromatografskih alata, zbog njegove stabilnosti i olakšane pripreme uparenog ekstrakta u poređenju sa etanolnim ekstraktom. Takođe smo na osnovu prethodnog iskustva istraživačke grupe [58], očekivali da bi potentniji sekundarni metaboliti mogli biti ekstrahovani iz fungalnog materijala korišćenjem dihlorometana kao rastvarača za ekstrakciju.

U svakom slučaju, sekundarni metaboliti uparenog etanolnog ekstrakta *Phomopsis species* mogli bi biti predmet daljih analitičkih istraživanja korišćenjem metoda koje su predložene u ovom radu a koje smo razvili za karakterizaciju komponenti dihlorometanskog ekstrakta *Phomopsis species*.

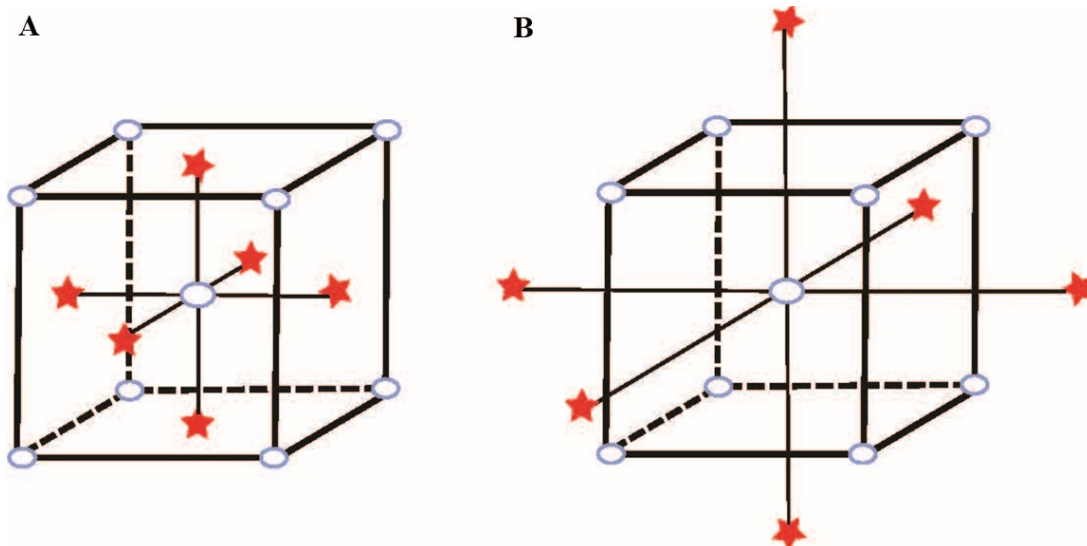
### **4.3 Optimizacija razdvajanja bioaktivnih komponenti ekstrakta tankosojnom hromatografijom**

Metodologija površine odgovora (eng. *Response surface methodology*, RSM) je pristup u optimizaciji analitičkih metoda koji predstavlja sastavni deo metodologije dizajna eksperimenata. Najčešće se nadovezuje na primenu optimizacionih vrsta eksperimentalnog dizajna, kao što su centralni kompozicioni dizajn i Boks-Behnken-ov dizajn. Grafičkim prikazom kvadratne zavisnosti izabranog odgovora sistema od jednog ili više faktora, dobija se 3D grafik površine odgovora i analizom njegovog izgleda mogu se odrediti optimalni, odnosno poželjni regioni odgovora sistema u zavisnosti od postavljenog cilja, koji može biti minimizacija, maksimizacija odgovora sistema ili dobijanje tačno određene ciljane vrednosti [183].

Centralni kompozicioni dizajn (eng. *Central composite design*, CCD) je vrsta dizajna koja zahteva izvođenje  $2^{k-p} + 2k + C_p$  eksperimenata, pri čemu je  $k$  broj varijabli,  $p$  je veličina razlomka, a  $C_p$  je centralna tačka eksperimentalnog domena [194-195]. CCD kombinuje puni ili frakcioni faktorski dizajn ( $2^{k-p}$ ), dizajn zvezde ( $2k$  aksijalnih tačaka) i centralnu tačku. U centralnoj tački se rade replikacije za potrebu procene eksperimentalne greške i izvođenje ANOVA analize. Grafički prikaz plana eksperimenata prema CCD dizajnu za ispitivanje uticaja tri faktora prikazan je na slici 4-4. U uglovima kocke, centru kocke kao i na pozicijama označenim zvezdom nalaze se koordinate eksperimenata koje je potrebno izvesti. Koordinate u ovom grafičkom prikazu plana eksperimenata se tumače na isti način kao u x-, y-, z- matematičkom koordinatnom sistemu, pri čemu se vrednosti nivoa faktora predstavljaju pomoću kodiranih vrednosti. Udaljenost pojedinih tačaka od centra kocke (koordinate (0,0,0) odgovara dužini kraka zvezde i može biti jednaka 1, kada se govori o CCD orjentisanom ka centru (eng. *Face centered central composite design*) prikazanom na slici 4-4 A, ili može biti jednaka poluprečniku kružnice koja opisuje kocku stranice 2, kada se govori o rotabilnom CCD (eng. *Rotatable central composite design*) prikazanom na slici 4-4 B.

U ovoj disertaciji, korišćen je CCD orjentisan ka centru. Plan eksperimenata je, zajedno sa dobijenim rezultatima TLC eksperimenata, prikazan tabelarno. Nakon razdvajanja analita na TLC pločama, izvršen je proces detekcije hromatografskih mrlja pod UV lampom, lenjirom je mereno rastojanje koje su analiti i mobilna faza prešli i potom su izračunavane  $R_f$  vrednosti. Dobijene  $R_f$  vrednosti analita 1, 2 i 3 su prikazani u tabeli 4-4, zajedno sa ispitivanim faktorima (udeo metanola, odnosno amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi), kao i razlike između  $R_f$  vrednosti kojima se opisuje razdvojenost susednih analita na TLC pločici. Da bi se eliminisao uticaj spoljašnjih faktora, svi eksperimenti su izvođeni nasumičnim redosledom.





Slika 4-4 Grafički prikaz CCD-a za ispitivanje uticaja tri faktora

Tabela 4-4 Prikaz izračunatih Rf vrednosti za analite 1, 2 i 3

Std.	MeOH [% , v/v]	NH <sub>3</sub> [% , v/v]	R <sub>1</sub> odgovor (Rf <sub>1</sub> )	R <sub>2</sub> odgovor (Rf <sub>2</sub> )	R <sub>3</sub> odgovor (Rf <sub>3</sub> )	R <sub>4</sub> odgovor (Rf <sub>1</sub> -Rf <sub>2</sub> )	R <sub>5</sub> odgovor (Rf <sub>3</sub> -Rf <sub>2</sub> )
6	84,14	5,00	0,81	0,51	0,53	0,40	0,12
8	70,00	6,41	0,74	0,53	0,66	0,21	0,13
1	60,00	4,00	0,63	0,43	0,53	0,20	0,10
11	70,00	5,00	0,84	0,50	0,59	0,34	0,09
2	80,00	4,00	0,67	0,40	0,48	0,27	0,08
9	70,00	5,00	0,76	0,46	0,63	0,30	0,17
4	80,00	6,00	0,81	0,59	0,64	0,22	0,05
12	80,00	5,00	0,80	0,47	0,58	0,33	0,11
10	70,00	5,00	0,76	0,49	0,63	0,27	0,14
7	70,00	3,59	0,59	0,47	0,49	0,12	0,02
3	60,00	6,00	0,85	0,45	0,70	0,40	0,25
5	55,86	5,00	0,70	0,42	0,66	0,28	0,24

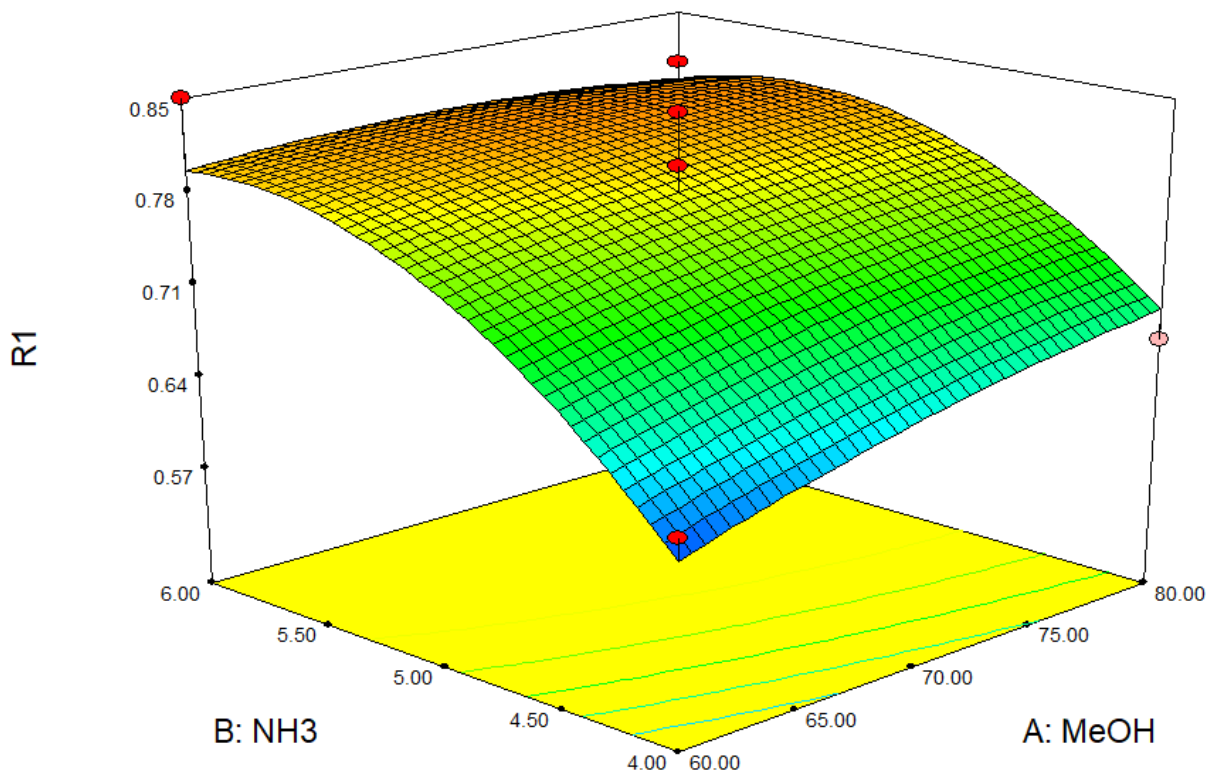
Kako bi se bolje razumelo retenciono ponašanje analita, konstruisani su matematički modeli i analizom 3D dijagrama površine odgovora je utvrđen uticaj ispitivanih faktora.

Matematički model za ispitivane eksperimentalne parametre i  $R_f$  vrednost za analit 1 sledi:

$$R_1 = 0,79 + 0,019*A + 0,072*B - 0,020*A*B - 1,000E^{-002}*A^2 - 0,055*B^2 \quad (13)$$

Izračunata je niska  $p$ -vrednost ( $p < 0,05$ ) za koeficijent modela za udeo amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi (faktor  $B$ ,  $p = 0,0040$ ) što ukazuje da faktor udela amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi statistički značajno utiče na ukupni odgovor sistema. Nasuprot ovoj činjenici, dobijene  $p$ -vrednosti za koeficijente modela za udeo metanola u mobilnoj fazi (faktor  $A$ ) u dvofaktorskoj interakciji za faktore  $A$  i  $B$  ( $p = 0,2640$  i  $p = 0,4048$ , respektivno) ukazuju da nemaju statistički značajan uticaj na konačni odgovor sistema ( $p > 0,05$ ). Visoka vrednost  $R^2$  od 0,8444, kao i vrednosti za prilagođeni (eng. *adjusted*)  $R^2$  od 0,7148, potvrđuju da je procenat varijacije  $R_f$  vrednost analita 1 posledica varijacije vrednosti posmatranih faktora. Na osnovu dobijene  $p$ -vrednosti za  $LOF$  od 0,3338 se može zaključiti da greška uklapanja eksperimentalno dobijenih rezultata sa matematičkim modelom nije statistički značajna u odnosu na čistu eksperimentalnu grešku ( $p > 0,05$ ). Dakle, ovim je potvrđeno da predloženi matematički model dobro opisuje analitički sistem.

Na osnovu apsolutne vrednosti koeficijenata članova i interakcija u predloženom matematičkom modelu, može se zaključiti da najveći uticaj na odgovor  $R_f$  ima član  $B$ . Dodatna procena uticaja ispitivanih faktora na  $R_f$  odgovor sistema odrađen je analizom 3D grafika (Slika 4-5), gde su na  $x$  i  $y$  osama predstavljene vrednosti udela metanola (% v/v) i amonijum-hidroksida (% v/v) u mobilnoj fazi, a na  $z$  osi je predstavljen  $R_f$  odgovor koji zavisi od ova dva faktora.



**Slika 4-5** *Površina  $R_1$  odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi*

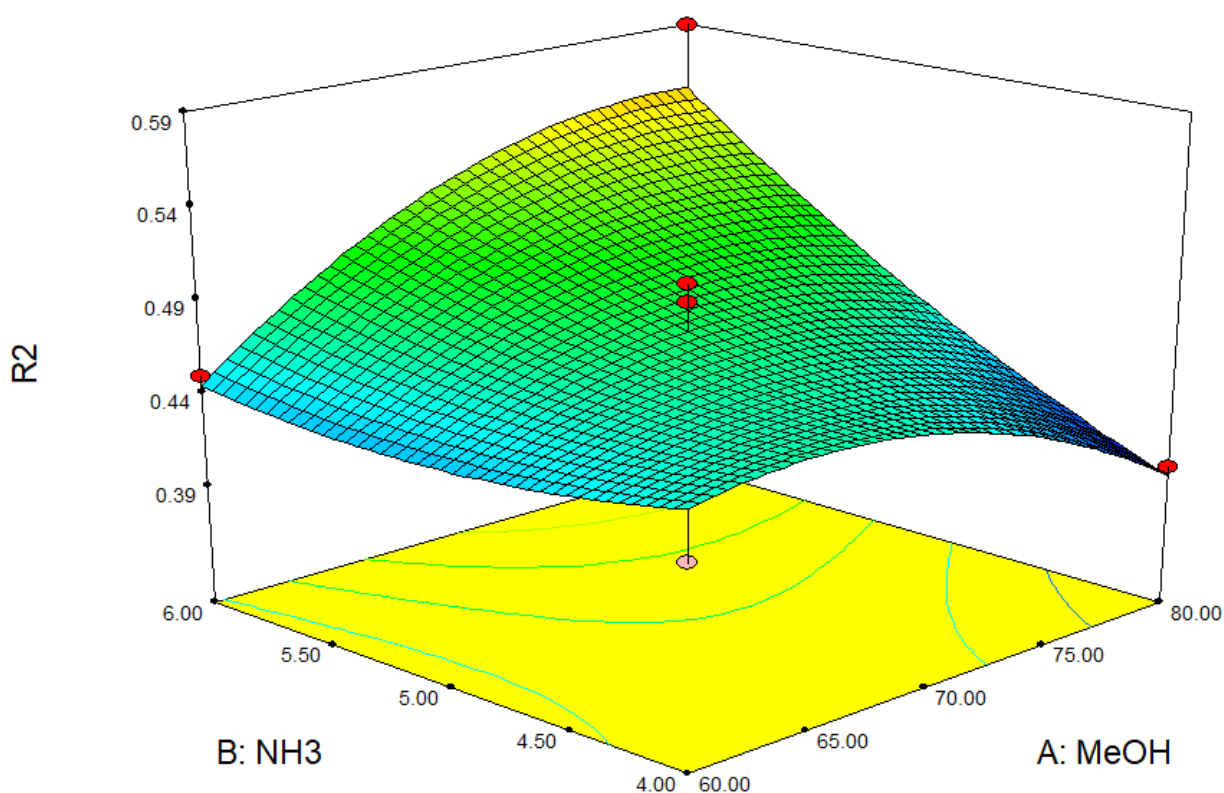
Takođe je primećeno da se  $R_f$  vrednost za analit 1 povećava sa povećanjem zapreminskog udela amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi. Takođe i povećanje zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi dovodi do zadržavanja analita 1 na TLC stacionarnoj fazi, međutim, uticaj zapreminskog udela amonijum-hidroksida je izraženiji od uticaja udela metanola. Najviša  $R_f$  vrednost za analit 1 je primećena pri zapreminskom udelu amonijum hidroksida od 6 % (v/v) i zapreminskom udelu metanola od 80 % (v/v).

Dobijen je matematički model za ispitivane eksperimentalne parametre i  $R_f$  vrednost za analit 2:

$$R_2 = 0,48 + 0,012 \cdot A + 0,037 \cdot B + 0,043 \cdot A \cdot B - 0,030 \cdot A^2 + 0,013 \cdot B^2 \quad (14)$$

Dobijene su niske  $p$ -vrednosti (manje od 0,05) za koeficijente modela amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi (faktor  $B$ ) i dvofaktorskoj interakciji faktora  $A$  i  $B$  ( $p = 0,0116$  i  $p = 0,0266$ , respektivno) na osnovu čega se može zaključiti da pomenuti faktori statistički značajno utiču

na konačni odgovor sistema. Izračunata  $p$ -vrednost od 0,2885 za faktor  $A$ , odnosno koeficijent modela koji odgovara zapreminskom udelu metanola u mobilnoj fazi ukazuje na to da ovaj faktor ne utiče značajno na konačni odgovor sistema. Visoka vrednost  $R^2$  od 0,8429, kao i vrednosti za prilagođeni  $R^2$  od 0,7120, potvrđuju da je procenat varijacije  $R_f$  vrednost analita 2 posledica varijacije vrednosti posmatranih faktora. Na osnovu dobijene  $p$ -vrednosti za  $LOF$  od 0,1390 se može zaključiti da greška uklapanja eksperimentalno dobijenih rezultata sa matematičkim modelom nije statistički značajna u odnosu na čistu eksperimentalnu grešku ( $p > 0,05$ ). Dakle, ovim je potvrđeno da predloženi matematički model dobro opisuje analitički sistem.



**Slika 4-6** *Površina  $R_2$  odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi*

Na osnovu apsolutne vrednosti koeficijenata članova i interakcija u predloženom matematičkom modelu, može se zaključiti da najveći uticaj na odgovor  $R_2$  ima interakcija članova  $A$  i  $B$ . Dodatna procena uticaja ispitivanih faktora na  $R_2$  odgovor sistema odrađena je analizom 3D grafika (Slika 4-6), gde su na  $x$  i  $y$  osama predstavljene vrednosti udela metanola

(%, v/v) i amonijum-hidroksida (%, v/v) u mobilnoj fazi, a na z osi je predstavljen  $R_2$  odgovor koji zavisi od ova dva faktora.

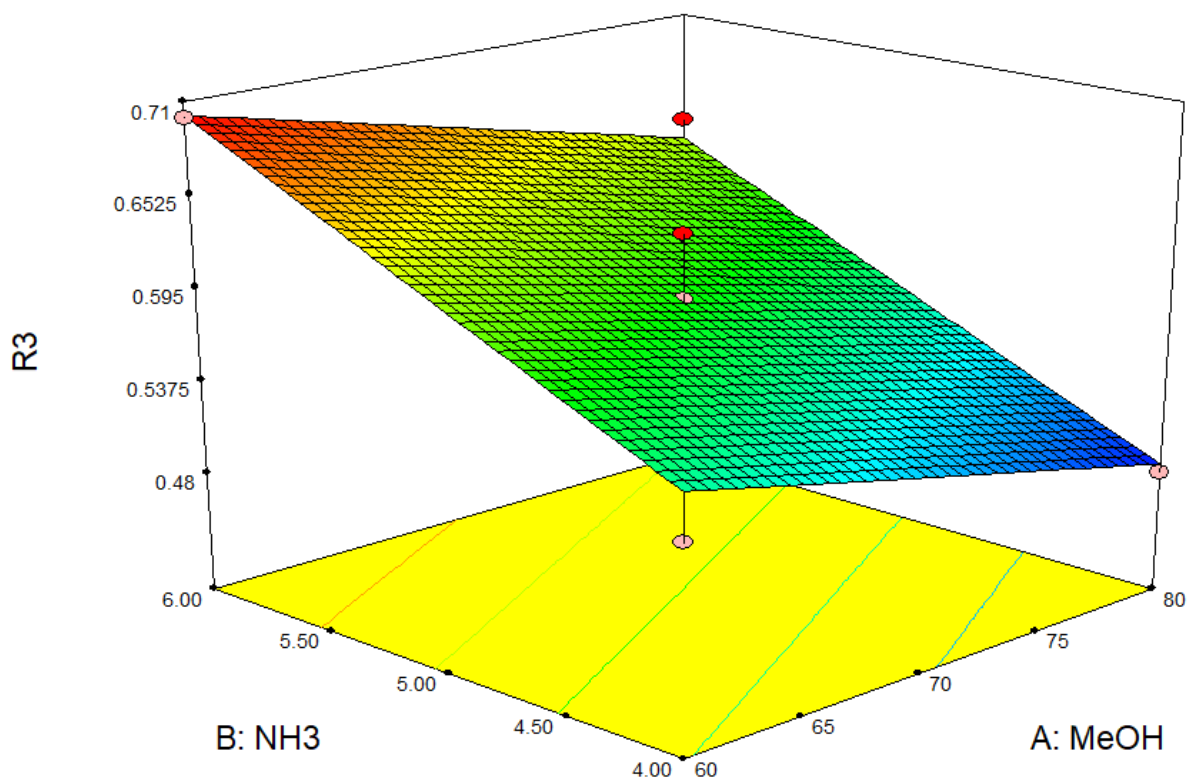
Može se utvrditi da  $R_f$  vrednost za analit 2 nije statistički značajno zavisna od zapreminskog udela amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi. Takođe, povećanjem zapreminskog udela metanola do 70 % (v/v) u mobilnoj fazi utiče na porast  $R_f$  vrednosti, dok udeo metanola veći od 70 % (v/v) utiče na smanjenje  $R_f$  vrednost. Najviša  $R_f$  vrednost za analit 2 je zabeležena pri zapreminskom udelu amonijum-hidroksida od 6 % (v/v) i zapreminskom udelu metanola od 70 % (v/v).

Analizom odgovora primenom programa Design-Expert 7.0.0. definisan je matematički model kojim se mogu definisati relacije između eksperimentalnih parametara i  $R_f$  vrednosti za analit 3.

$$R_3 = 0,59 - 0,037 \cdot A + 0,071 \cdot B \quad (15)$$

Dobijene  $p$ -vrednosti manje od 0,05 za koeficijente modela zapreminskog udela metanola (faktor  $A$ ) i zapreminskog udela amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi (faktor  $B$ ) ( $p = 0,0022$  i  $p = 0,0001$ , respektivno) ukazuju na to da udeli metanola i amonijum-hidroksida statistički značajno utiču na konačni odgovor sistema. Viša vrednost za  $R^2$  od 0,9050, i za prilagođeni  $R^2$  od 0,8839, ukazuju da je procenat varijacije  $R_f$  vrednosti za analit 3 posledica varijacije vrednosti ispitivanih faktora. Na osnovu izračunate  $p$ -vrednosti za  $LOF$  od 0,6274 može se zaključiti da greška eksperimentalno dobijenih rezultata u poređenju sa matematičkim modelom nije statistički značajna u odnosu na čistu ekperimentalnu grešku, gde je  $p > 0,05$ . Dakle, predloženi matematički model dobro opisuje analitički sistem.

Na osnovu visokih apsolutnih vrednosti koeficijenata članova i interakcija u matematičkom modelu, primećeno je da najveći uticaj na odgovor  $R_3$  ima član  $B$ . Procena uticaja ispitivanih faktora na  $R_3$  odgovor sistema odrađena je analizom 3D grafika (Slika 4-7), gde su na  $x$  i  $y$  osama predstavljene vrednosti udela metanola (%, v/v) i amonijum-hidroksida (%, v/v) u mobilnoj fazi, a na  $z$  osi je predstavljen  $R_3$  odgovor koji zavisi od ova dva faktora.



**Slika 4-7**      ***Površina  $R_3$  odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi***

Kao što se može primetiti sa dijagrama  $R_f$  vrednost za analit 3 ispoljava značajan pravolinijski rast sa povećanjem zapreminskog udela amonijum-hidroksida, a blagi pad sa povećanjem zapreminskog udela metanola. Najveća vrednost  $R_f$  zabeležena je pri zapreminskom udelu amonijum-hidroksida od 6 % (v/v) i najnižoj vrednosti udela metanola od 60 % (v/v).

Dakle, analizom odgovora sva tri analita se može zaključiti da su svi analiti pokazali najvišu  $R_f$  vrednost pri skoro najvišoj vrednosti ispitivanog zapreminskog udela amonijum-hidroksida, a da je pritom zapreminski udeo metanola u mobilnoj fazi u manjoj meri ispoljio uticaj na  $R_f$  vrednost pokazujući najviše rezultate u opsegu od 60 % (v/v) do 80 % (v/v). Uopšteno, za najoptimalnije uslove prilikom TLC razdvajanja ispitivanih analita, mogu da se definišu zapreminski udeo amonijum-hidroksida od 6 % i zapreminski udeo metanola od 70 % (v/v), što zapravo predstavlja prosečnu vrednost svih najoptimalnijih zapreminskih udela metanola za postizanje najviših  $R_f$  vrednosti za sva tri analita. U tom slučaju  $R_f$  vrednosti za analite 1, 2 i 3 su: 0,8, 0,5 i 0,7, respektivno.

Takođe se može zaključiti da najhidrofilnija svojstva iskazuje analit 1 jer ima najviši afinitet za hidrofilnu mobilnu fazu. Nešto manje hidrofilna svojstva ispoljio je analit 3, a najmanje hidrofilna svojstva pokazao je analit 2, čija je  $R_f$  vrednost bila najniža. Pošto hidrofilnosti mobilne faze najviše doprinosi bazna supstanca, mogu se izvesti određene pretpostavke i poređenja kiselosti ispitivanih komponenti. Analit 1 je najviše vremena proveo u baznoj mobilnoj fazi, stoga se on može dodatno okarakterisati i kao najkiseliji. Na osnovu toga zaključujemo da je analit 3 nešto manje kiseo, dok najmanju kiselost ispoljava analit 2 koji je potencijalno najmanje jonizovan u ispitivanim baznim uslovima i stoga ispoljava najniži afinitet ka hidrofilnoj mobilnoj fazi.

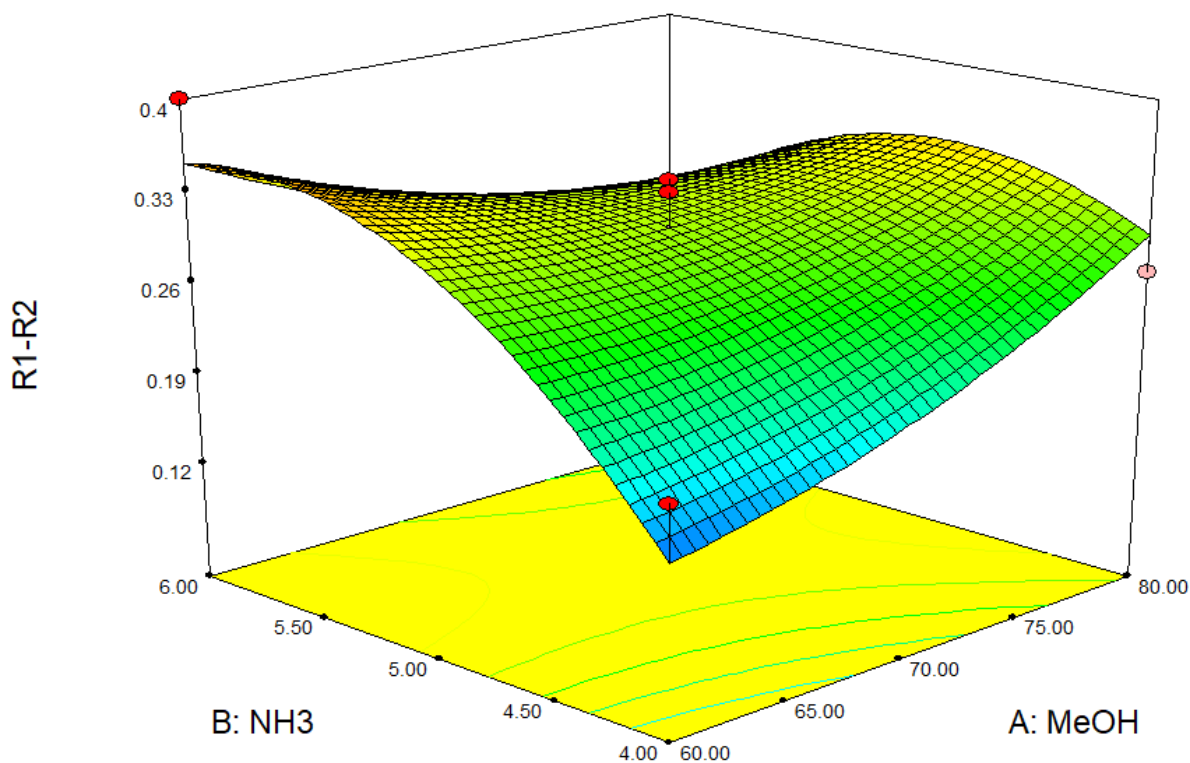
Dodatno je za potrebe optimizacije razdvajanja analita izračunavano i rastojanje između susednih mrlja. Generalni cilj optimizacije je postići najveće moguće rastojanje između susednih mrlja, što je razmatrano analizom dodatnih 3D dijagrama.

Razlika između  $R_{f1}$  i  $R_{f2}$  vrednosti je praćena kao odgovor  $R_4$  koja opisno karakteriše razdvojenost analita 1 i 2. Takođe je i u ovom slučaju za analizu upotrebljen program *Design-Expert* da bi se konstruisao matematički model kojim se može definisati relacija između  $R_f$  vrednosti analita 1 i 2 i ispitivanih eksperimentalnih parametara.

$$R_1 - R_2 = 0,31 + 0,7463^{-3} * A + 0,035 * B - 0,062 * A * B + 0,020 * A^2 - 0,067 * B^2 \quad (16)$$

Dobijene  $p$ -vrednosti za koeficijente modela koji odgovaraju zapreminskom udelu metanola (faktor  $A$ ,  $p = 0,6735$ ) i zapreminskom udelu amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi (faktor  $B$ ,  $p = 0,0856$ ) su veće od 0,05 pa se može zaključiti da ovi faktori nemaju statistički značajan uticaj na konačni odgovor sistema.  $P$ -vrednost od 0,0395 ( $p < 0,05$ ) je izračunata za koeficijent modela koji odgovara interakciji faktora  $A$  i  $B$ , što implicira da jedino istovremena promena oba faktora dobija ispoljavaju statistički značajan uticaj na konačni odgovor sistema. Viša vrednost za  $R^2$  od 0,8204, i za prilagođenu  $R^2$  vrednost od 0,6707, ukazuju da je procenat varijacije razlike  $R_f$  vrednosti analita 1 i 2 posledica varijacije vrednosti ispitivanih faktora. Na osnovu izračunate  $p$ -vrednosti za  $LOF$  od 0,1630 može se zaključiti da greška eksperimentalno dobijenih rezultata u poređenju sa matematičkim modelom nije statistički značajna u odnosu na čistu ekperimentalnu grešku, gde je  $p > 0,05$ . Dakle, i u ovom slučaju predloženi matematički model dobro opisuje analitički sistem.

Na osnovu visokih apsolutnih vrednosti koeficijenata članova i interakcija u matematičkom modelu, primećeno je da najveći uticaj na odgovor  $R_4$  ima član  $B^2$ . Procena uticaja ispitivanih faktora na  $R_4$  odgovor sistema odrađena je analizom 3D grafika (Slika 4-8), gde su na x i y osama predstavljene vrednosti udela metanola (% v/v) i amonijum-hidroksida (% v/v) u mobilnoj fazi, a na z osi je predstavljen  $R_4$  odgovor koji zavisi od ova dva faktora.



**Slika 4-8**      **Površina  $R_4$  odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi**

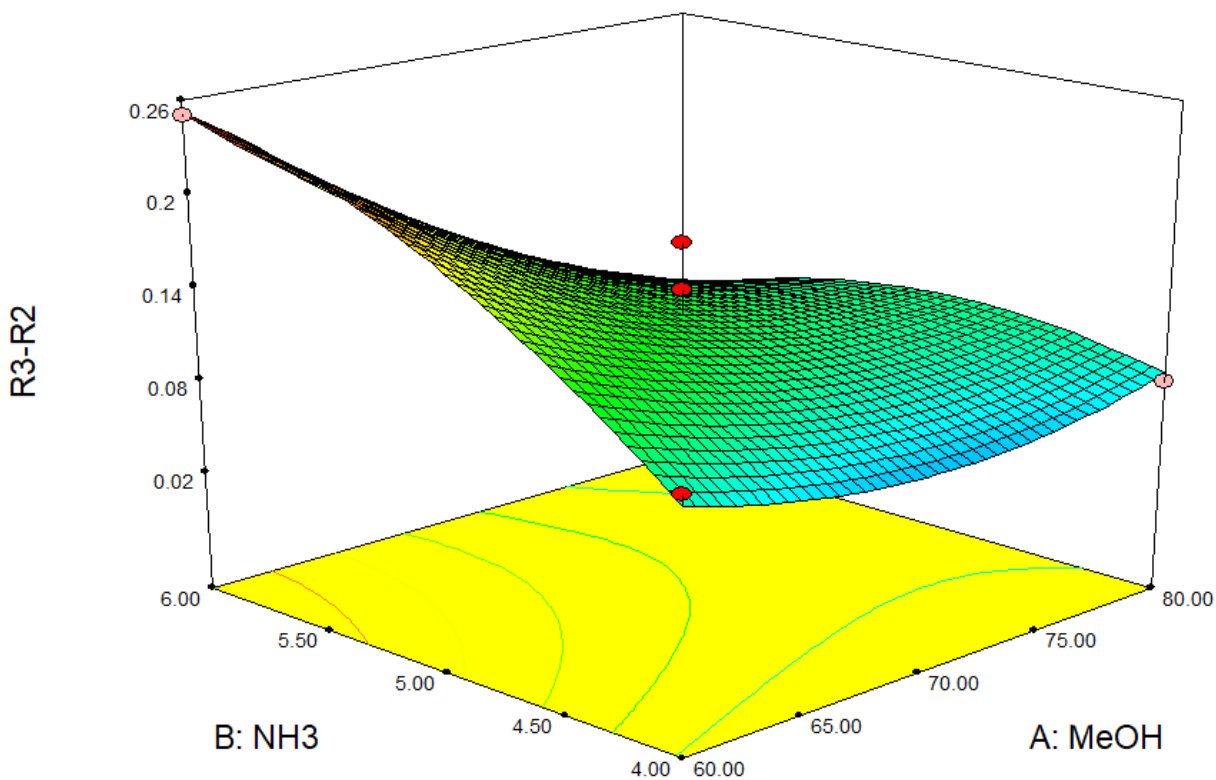
Dakle, razlika između vrednosti  $R_{f1}$  i  $R_{f2}$  se značajno povećava sa povećanjem zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi, a posebno sa povećanjem udela zapreminskog amonijum-hidroksida. Najveća razdvojenost između analita 1 i 2 se postiže pri zapreminskom udelu amonijum-hidroksida od 6 % (v/v) i udelu metanola od 70 % (v/v) do 75 % (v/v).

Razlika između  $R_{f3}$  i  $R_{f2}$  vrednosti je praćena kao  $R_5$  odgovor i njome se može okarakterisati razdvojenosti analita 2 i 3. Jednačina matematičkog modela kojim se može definisati odnos eksperimentalnih parametara i razlika  $R_f$  vrednosti za analite 2 i 3 je dobijena primenom programa *Design-Expert 7.0.0*.



$$R_3-R_2 = 0,13 - 0,049*A + 0,034*B - 0,045*A*B + 0,024*A^2 - 0,028*B^2 \quad (17)$$

Izračunate niske  $p$ -vrednosti za koeficijente modela koji odgovaraju zapreminskom udelu metanola (faktor  $A$ ,  $p = 0,0021$ ), zapreminskom udelu amonijum-hidroksida u mobilnoj fazi (faktor  $B$ ,  $p = 0,0106$ ) i njihovom međusobnom interakcijom ( $p = 0,0149$ ) upućuju na zaključak da ovi faktori imaju statistički značajan uticaj na konačni odgovor sistema ( $p < 0,05$ ). Visoka vrednost za  $R^2$  od 0,9179, i broj stepeni slobode prilagođene  $R^2$  vrednosti od 0,8495, ukazuju da je varijacija  $R_f$  vrednosti analita 2 i 3 posledica varijacije ispitivanih faktora. Na osnovu izračunate  $p$ -vrednosti za  $LOF$  od 0,9169 može se zaključiti da greška eksperimentalno dobijenih rezultata u poređenju sa matematičkim modelom nije statistički značajna u odnosu na čistu ekperimentalnu grešku, gde je  $p > 0,05$ . Dakle, i u ovom slučaju je zaključeno da predloženi matematički model dobro opisuje analitički sistem.



Slika 4-9

*Površina  $R_5$  odgovora koja je konstruisana u zavisnosti od zapreminskog udela amonijum-hidroksida i metanola u mobilnoj fazi*

Na osnovu visokih apsolutnih vrednosti koeficijenata članova i interakcija u matematičkom modelu, primećeno je da najveći uticaj na odgovor  $R_5$  ima interakcija između članova  $A$  i  $B$ . Procena uticaja ispitivanih faktora na  $R_5$  odgovor sistema odrađena je analizom 3D grafika (Slika 4-9), gde su na  $x$  i  $y$  osama predstavljene vrednosti udela metanola (% v/v) i amonijum-hidroksida (% v/v) u mobilnoj fazi, a na  $z$  osi je predstavljen  $R_5$  odgovor koji zavisi od ova dva faktora.

Primećeno je da se najbolja razdvojenost između analita 2 i 3 postiže je pri zapreminskom udelu amonijum hidroksida u mobilnoj fazi od 6 % (v/v), dok zapreminski udeo metanola u mobilnoj fazi nije ispoljio značajan uticaj.

Konačno se može zaključiti da se najbolja razdvojenost između analita postiže pri zapreminskom udelu amonijum-hidroksida od 6 % (v/v) u mobilnoj fazi, dok zapreminski udeo metanola ne ispoljava značajne varijacije u rezultatima za razdvojenost analita, stoga se kao primerena vrednost može definisati zapreminski udeo metanola od 70 % (v/v). Na osnovu priloženih jednačina matematičkih modela koje opisuju svaku površnu odgovora ponaosob, kao i na osnovu koeficijenata multiple determinacije koji su u svim slučajevima bili veći od granične vrednosti od 0,8 se može potvrditi pouzdanost predviđanja predloženih matematičkih modela.

#### **4.4 Određivanje hromatografskih deskriptora lipofilnosti primenom tankoslojne hromatografije**

Posle procesa razdvajanja analita na TLC pločama, izvršena je detekcija hromatografskih mrlja pod UV lampom, lenjirom je mereno rastojanje koje su analiti i mobilna faza prešli i potom su izračunavane  $R_f$  vrednosti. Obrada rezultata je rađena u programu SwissADME sa ciljem procene farmakokinetičke, sličnosti sa aktivnim lekovima i prihvatljivosti malih molekula prema načelima medicinske hemije. Eksperimentalni rezultati za pređeni put, i izračunate  $R_f$  i  $R_M$  vrednosti svih analiziranih jedinjenja za sve eksperimentalne uslove su prikazani u tabeli 4-5.

Na osnovu rezultata u eksperimentalnim uslovima u kojima je mobilna faza sadržala 80 % metanola (v/v) izvedeni su sledeći zaključci. Najmanji afinitet za stacionarnu fazu zabeležen je u primeru standarda sulfacetamid-natrijuma, koji ima najveću  $R_f$  i najnižu  $R_M$  vrednost.

Standardi ofloksacina i ciprofloksacina imaju izražen afinitet prema stacionarnoj fazi, dok su standard hloramfenikola i ispitivani uzorci koji sadrže aktivne komponente ekstrakata endofita (označeni kao jedinjenje 1 i 2) pokazali najveći afinitet za stacionarnu fazu, što je zaključeno na osnovu njihove niske  $R_f$  i visoke  $R_M$  vrednosti. Takođe, ekstrakt endofita koji sadrži jedinjenje 1 ima izraženiji afinitet od ekstrakta endofita koji sadrži jedinjenje 2.

Smanjenjem zapreminskog udela organskog rastvarača metanola na 70 % (v/v) primećeno je generalno povećanje afiniteta svih ispitivanih jedinjenja prema stacionarnoj fazi. U ovom slučaju, ekstrakt endofita koji sadrži jedinjenje 2 poseduje viši afinitet od ekstrakta endofita koji sadrži jedinjenje 1. Daljim smanjenjem zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi na 60 % (v/v) potvrđen je trend linearnog povećanja afiniteta svih ispitivanih analita prema stacionarnoj fazi. I u ovom primeru ekstrakt endofita koji sadrži jedinjenje 1 ima izraženiji afinitet od ekstrakta endofita koji sadrži jedinjenje 2. Dakle, detaljnom analizom rezultata dobijenih pod sva tri eksperimentna uslova se može zaključiti da smanjenje zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi utiče na povećanje parametra  $R_M$  i retencije analita.

Dodatno je za svaki od ispitivanih jedinjenja i standarda sačinjena kalibraciona kriva, a relevantni koeficijenti i izračunati parametri su uporedno prikazani u tabeli 4-6. Zapreminski udeo metanola u mobilnoj fazi je unosen kao parametar  $x$  ose, a posledični odgovor  $R_M$  je očitavan na  $y$  osi. Dobijene kalibracione krive su takođe okarakterisane nagibom ( $m$ ) i izvedenim parametrima  $R_M^0$  i  $C_0$  što takođe prikazano u uporednoj tabeli. Izračunat je i koeficijent korelacije ( $r$ ), čijim se vrednostima većim od 0,99 dodatno potvrđuje linearna zavisnost između zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi i retencije svih ispitivanih jedinjenja.

**Tabela 4-5**      *Prikaz rezultata za sva analizirana jedinjenja metodom TLC i pod svim eksperimentalnim uslovima*

Tip eksperimenta		Pređeni put (mm)	Rf vrednost	$R_M = \log(1/R_f - 1)$
MeOH, 80%, v/v	Mobilna faza	78	/	/
	Sulfacetamid-Na	75	0,962	-1,398
	Ciprofloksacin	37	0,474	0,045
	Ofloksacin	57	0,731	-0,434
	Hloramfenikol	28	0,359	0,252
	Jedinjenje 1	27	0,346	0,276
	Jedinjenje 2	29	0,372	0,228
MeOH, 70%, v/v	Mobilna faza	77	/	/
	Sulfacetamid-Na	72	0,935	-1,158
	Ciprofloksacin	33	0,429	0,125
	Ofloksacin	48	0,623	-0,219
	Hloramfenikol	20	0,260	0,455
	Jedinjenje 1	20	0,260	0,455
	Jedinjenje 2	17	0,221	0,548
MeOH, 60%, v/v	Mobilna faza	75	/	/
	Sulfacetamid-Na	68	0,907	-1,987
	Ciprofloksacin	29	0,387	0,200
	Ofloksacin	34	0,453	0,081
	Hloramfenikol	15	0,200	0,602
	Jedinjenje 1	13	0,173	0,678
	Jedinjenje 2	18	0,107	0,923

*Tabela 4-6 Uporedni prikaz parametara kalibracione krive za sva ispitivana jedinjenja TLC metodom*

<b>Analit</b>	<b>X (φ MeOH)</b>	<b>Y (R<sub>M</sub>)</b>	<b>r</b>	<b>m</b>	<b>R<sub>M</sub><sup>0</sup></b>	<b>C<sub>0</sub> = R<sub>M</sub><sup>0</sup> / m</b>
<b>Sulfacetamid-Na</b>	0,80	-1,398				
	0,70	-1,158	0,9954	-2,0526	0,256	0,125
	0,60	-0,987				
<b>Ciprofloksacin</b>	0,80	0,045				
	0,70	0,125	0,9998	-0,7789	0,669	0,858
	0,60	0,200				
<b>Ofloksacin</b>	0,80	-0,434				
	0,70	-0,219	0,9955	-2,5748	1,612	0,626
	0,60	0,081				
<b>Hloramfenikol</b>	0,80	0,252				
	0,70	0,455	0,9958	-1,7512	1,662	0,949
	0,60	0,602				
<b>Jedinjenje 1</b>	0,80	0,276				
	0,70	0,455	0,9979	-2,0112	1,878	0,934
	0,60	0,678				
<b>Jedinjenje 2</b>	0,80	0,228				
	0,70	0,548	0,9989	-3,4759	2,999	0,863
	0,60	0,923				

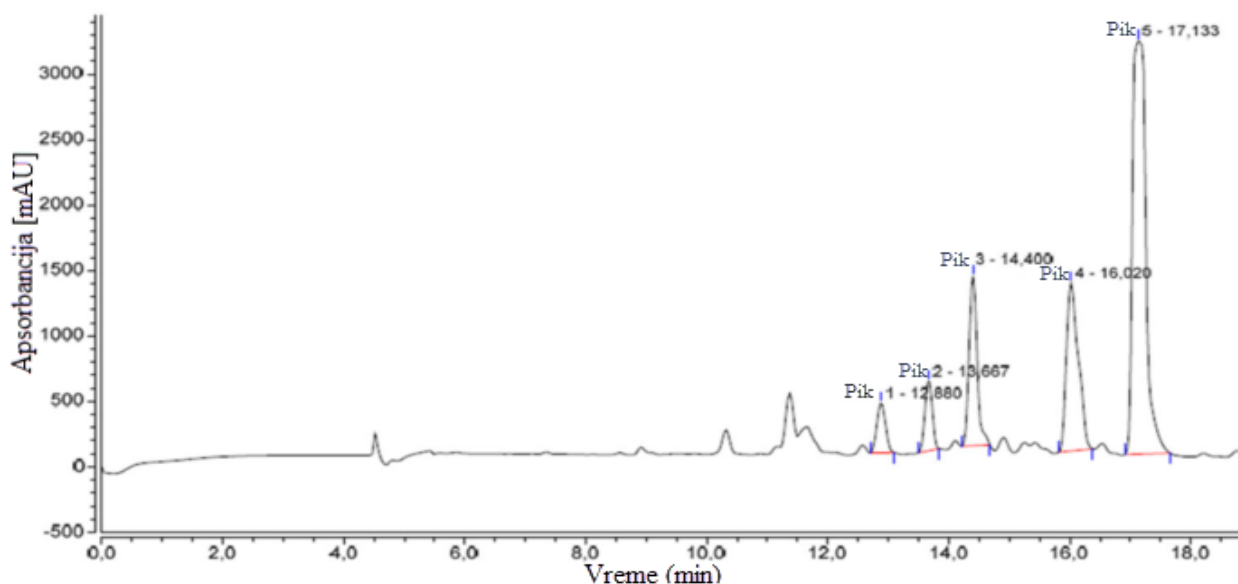
Visoka  $R_M^O$  vrednost za ekstrakt endofita sa koji sadrži jedinjenja 1 i 2 ukazuje da oba jedinjenja imaju veći afinitet prema stacionarnoj fazi u odnosu na ostale ispitivane antimikrobne standarde. Pošto testirani ekstrakt endofita koji sadrži jedinjenje 2 ima višu  $R_M^O$  vrednost od ekstrakta endofita koji sadrži jedinjenje 1, može se zaključiti da jedinjenje 2 ima izraženije parametre retencije u mobilnoj fazi bez organskog rastvarača. Nasuprot tome, više  $R_M$  vrednosti za jedinjenje 1 u poređenju sa jedinjenjem 2, potvrđuju da jedinjenje 1 ispoljava bolje parametre retencije u mobilnoj fazi koja sadrži metanol kao organski rastvarač. Ovakvi rezultati potvrđuju zadovoljavajuću lipofilnost i posledično odgovarajuću bioraspoloživost ispitivanih jedinjenja 1 i 2. Na osnovu vrednosti parametra hidrofobnosti ( $C_O$ ) može se zaključiti da jedinjenje 1 ima izraženiji afinitet i vrednost retencije u poređenju sa jedinjenjem 2. Takođe je na osnovu  $C_O$  vrednosti zapaženo da standard hloramfenikola iskazuje bolje parametre retencije u poređenju sa ostalim testiranim standardima.

Osim svih navedenih rezultata određivanja hromatografskih deskriptora lipofilnosti koje se oslanja samo na trendove retencionog ponašanja, tokom izrade ove doktorske disertacije zaključeno je da se ne mogu graditi QSRR modeli koji bi imali smisla. Naime, osim zajedničkog eksperimentalnog prostora koji se definiše obrascima retencionog ponašanja u TLC / HPLC sistemu, neophodno je obezbediti dovoljno veliku grupu strukturno srodnih jedinjenja čiji bi molekularni deskriptori bili pridodati eksperimentalnim hromatografskim podacima tokom formiranja osnovne baze ulaznih podataka za QSRR modelovanje. Referentni antibiotici korišćeni tokom prethodnog rada nisu ispunili ovaj preduslov. Pri tome, broj bioaktivnih jedinjenja koja bi se mogla izolovati iz ekstrakta endofitne gljive *Phomopsis species* nije bio dovoljno veliki da obezbedi statističku stabilnost QSRR modela.

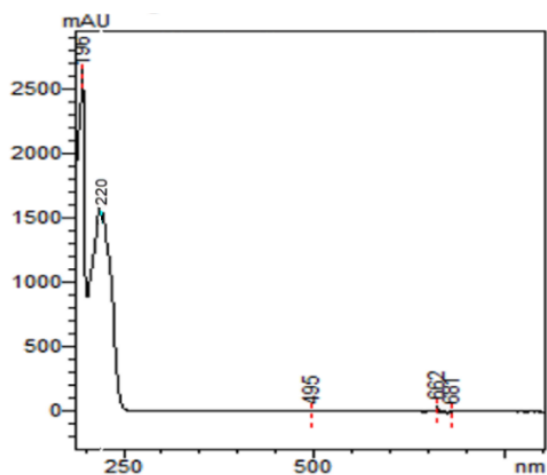
#### **4.5 Izolovanje aktivnih biomolekula i određivanje hemijske strukture**

Upareni dihlormetanski ekstrakt endofita *Phomopsis species*, rastvoren u 50 % (v/v) rastvoru metanola u vodi, je dodatno analiziran korišćenjem semi-preparativne HPLC metode. Identifikovano je pet pikova izraženih pikova na hromatogramu pri vremenima retencije od 12,88 min, 13,67 min, 14,40 min, 16,02 min odnosno 17,13 min (Slika 4-10). Opažena su njihova relativno slična spektralna svojstva (Slika 4-11), tako da ih je sve bilo moguće analizirati zajedno na talasnoj dužini detekcije od 235 nm. Kao što se očekivalo, zbog razlika u

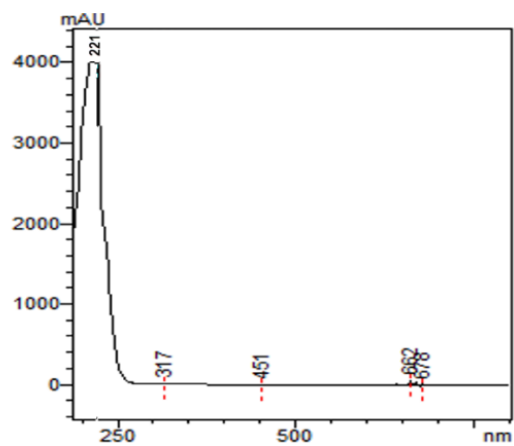
hromatografskim sistemima (npr. sastav mobilne faze i karakteristike stacionarne faze, tehničke karakteristike korišćenih instrumenata) korišćenih za vreme sakupljanja uzoraka i za prateće GC-MS analize, ranije saopštena vremena retencije razlikovala su se od onih u zabeleženom totalnom jonskom hromatogramu (Slike 4-12 i 4-17). Uprkos tome, pouzdano praćenje pikova postignuto je istim redosledom elucije tako da su očuvana sva relativna vremena retencije. Mada je postojao rizik da prva dva pika koja eluiraju pripadaju jedinjenjima sa aktivnošću merenom za celokupan ekstrakt, mi smo ih namerno izostavili iz daljeg rada i dodatne analize preparativnom hromatografijom i sakupljanja frakcija za objašnjenje hemijske strukture. Uložen je napor da se hromatografski razdvoje svi pikovi za dalju obradu. Međutim, čistoća frakcija je predstavljala ozbiljno ograničenje kao i nivo koncentracije jedinjenja u sakupljenoj frakciji. Zato što je hromatografski šum bio suviše veliki, nije bila moguća tačna analiza podataka izuzev za poslednja tri pika.



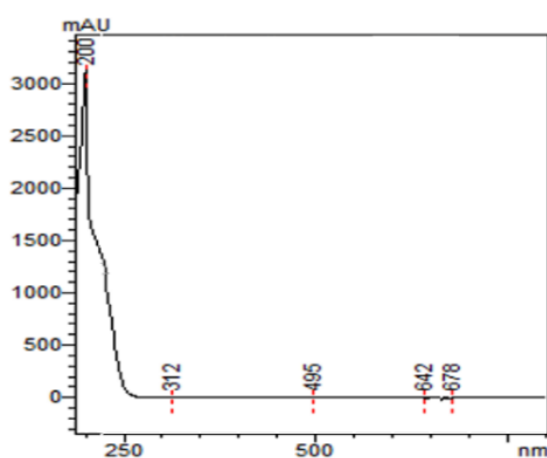
**Slika 4-10** *Hromatogram dihlometanskog uparenog ekstrakta endofita Phomopsis species rastvorenog u smeši metanola i vode 50:50 (v/v) iz semi-preparativne HPLC analize*



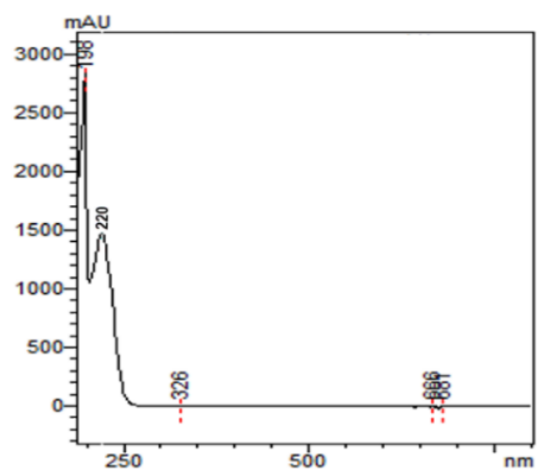
**Pik 1**



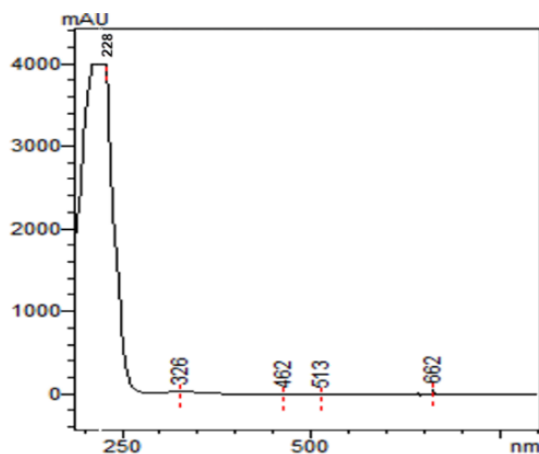
**Pik 2**



**Pik 3**



**Pik 4**



**Pik 5**

*Slika 4-11      Apsorpcioni spektri jedinjenja koja odgovaraju pikovima 1, 2, 3, 4 i 5, iz dihlorometanskog uparenog ekstrakta rastvorenog u metanolu i vodi 50:50 (v/v)*



Uporedo sa sakupljanjem frakcija pikova, primenjena je metoda difuzije sa diska za određivanje antibiotskog potencijala frakcija kao potvrda bioaktivnosti, kako bi se osiguralo da pripisana bioaktivnost celokupnog ekstrakta može da se dovede u vezu sa sakupljenim frakcijama. Ispitana koncentracija frakcije pika 3 i 4 iznosila je 1 mg/mL, dok je koncentracija frakcije pika 5 bila 3 mg/mL. Rezultati su otkrili da nije bilo aktivnosti ni na jednom od ispitivanih mikroorganizama za frakciju pika 4. Za frakciju pika 3, inhibiciona zona prečnika 6 mm je opažena na ploči sa zasejanim *Staphylococcus aureus*, dok na ploči zasejanoj sa *Escherichia coli* nije opažena nikakva antimikrobna aktivnost. Osim toga, za frakciju pika 5, inhibiciona zona prečnika 7 mm opažena je prema *Staphylococcus aureus*, a inhibiciona zona prečnika 4 mm zabeležena je na ploči sa zasejanom *Escherichia coli*. Ispitivanje je ukazalo da su jedino pikovi sa elucionim redosledom 3 i 5 pokazali bioaktivnost.

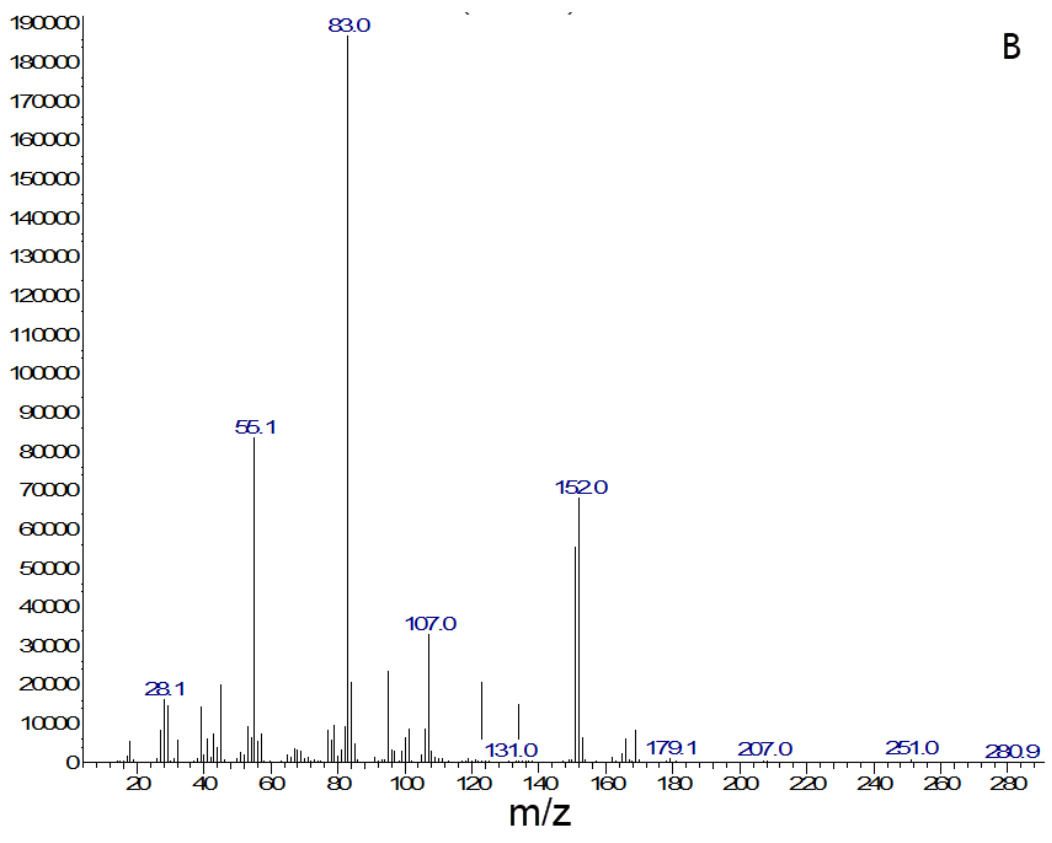
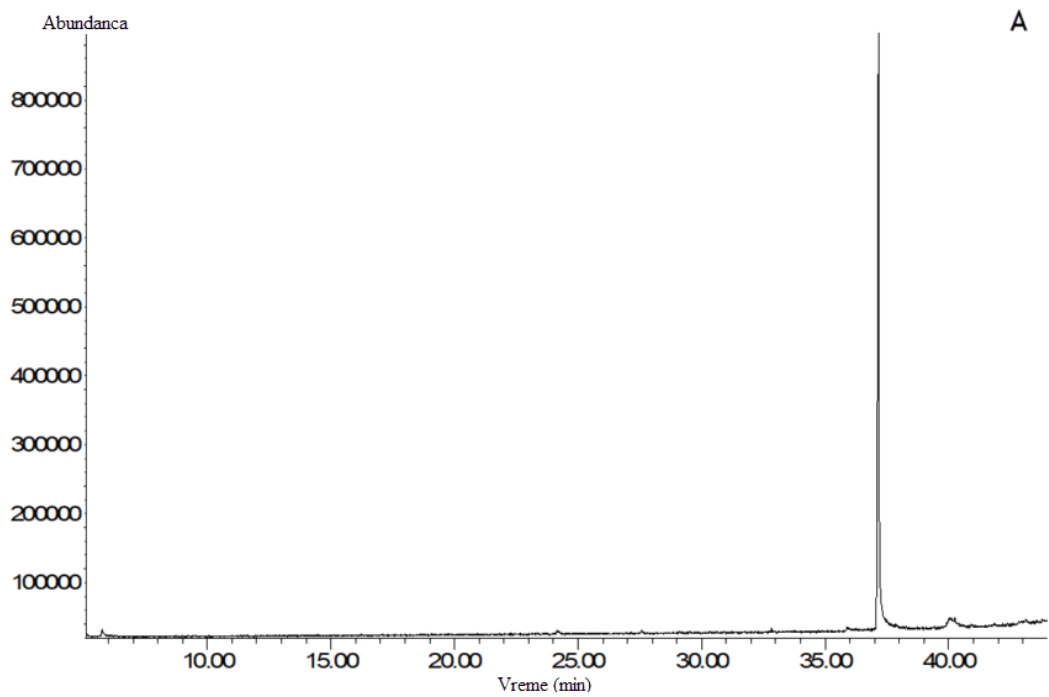
Dakle, posle sakupljanja frakcija pikova i merenja uparenih frakcija, primećeno je da je suva masa jedinjenja koji odgovaraju pikovima 3 i 5 sakupljenih frakcija bila najmanje 5 mg. Ta masa uparenih frakcija je bila razblažena sa deuterohloroformom u kivetu do zapremine od 250  $\mu$ L, sa time u vezi je konačna koncentracija jedinjenja bila dovoljno visoka za izvođenje odgovarajuće NMR analize. Evidencioni broj endofita *Phomopsis species* je 325, stoga se jedinjenja koja odgovaraju pikovima 3 i 5 u daljem tekstu pominju kao 325-3 odnosno 325-5.

Jedinjenje koje odgovara piku 3 u hromatogramu na Slici 4-10, označeno kao 325-3, dobijeno je kao bezbojno ulje sa molekulskom formulom  $C_{15}H_{20}O_7$  (zabeleženo GC-MS metodom kao jon  $[M+H-OH-CH_3] = 281$ , izračunato 313,1282, Slika 4-12). Broj vodonikovih i ugljenikovih atoma opaženih u  $^1H$ - i  $^{13}C$ -NMR spektrima zabeleženih u deuterisanom hloroformu  $CDCl_3$  (Tabela 4-7) bili su u saglasnosti sa molekulskom formulom jedinjenja.  $^1H$  NMR (Slika 4-13A) podaci ukazuju na postojanje pet  $sp^2$  metinskih (H-2, H-3, H-6, H-7 and H-1'), četiri oksigeniranih  $sp^3$  metina (H-4, H-5, H-8 i H-9), dve hidroksil i tri metil grupe (H-10, H-3' i H-2'').  $^{13}C$  NMR (Slika 4-13B) i HSQC spektri (Slika 4-14A) naznačili su 15 ugljenika, koji su bili klasifikovani kao šest olefinskih ugljenika (C-2, C-3, C-6, C-7, C-1' i C-2'), četiri oksigeniranih  $sp^3$  metinskih ugljenika (C-4, C-5, C-8 i C-9), tri  $sp^3$  metil ugljenika (C-10, C-3' i C-2'') i dva karbonil ugljenika (C-1 i C-1'').  $^1H$ - $^1H$  COSY spektar jedinjenja 325-3 (Slika 4-14B) potvrdio je sve očekivane veze između vodonika i susednih ugljenika od H-2 do H-10 i od H-1' do H-3'. HMBC korelacija (Slika 4-15A) od H-2 do C-1, H-3' do C-2' i H-2'' do C-2'

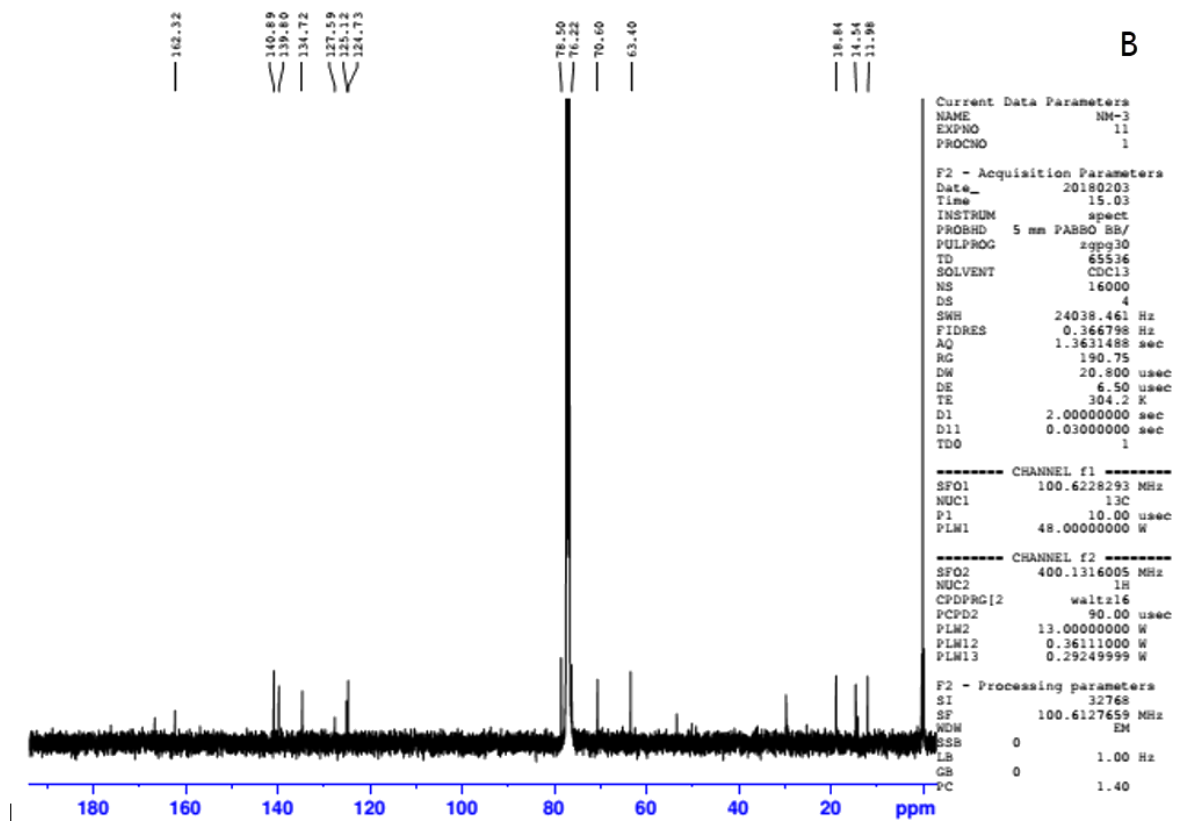
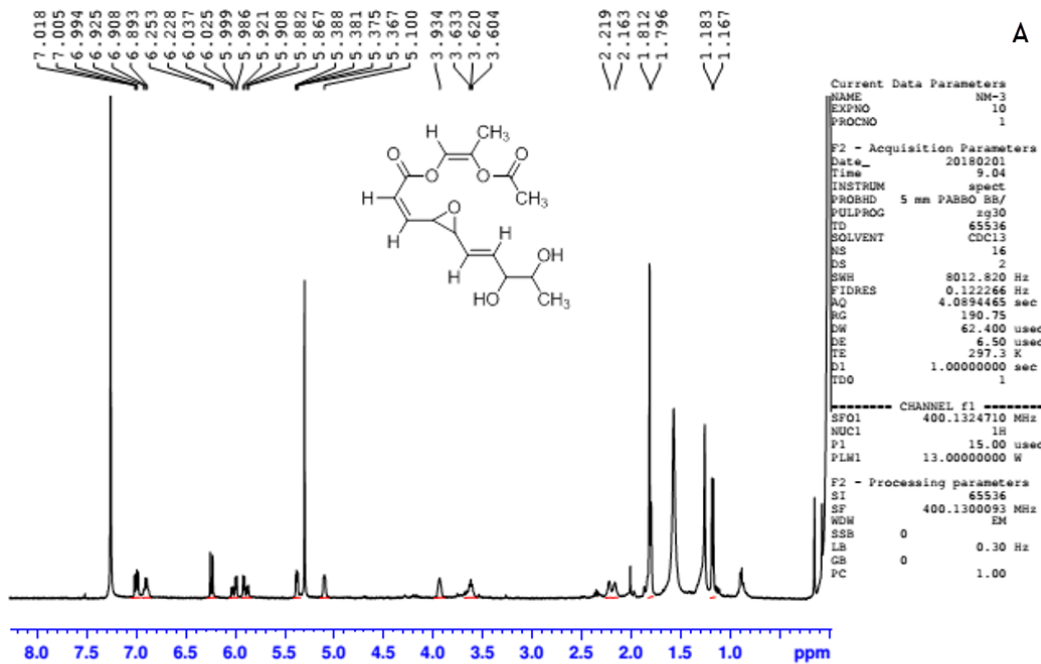
takođe su dokazale predloženu strukturu. *Z* geometrije C-1'/C-2' i C-2/C-3 dvostruke veze razotkrivene su pomoću NOESY unakrsnih pikova između H-2 i H-3 i H-1' i H-3' (Slika 4-15B). Isto tako, odsustvo NOESY unakrsnog pika između H-6 i H-7 ukazuje na *E* konfiguraciju C-6/C-7 dvostruke veze. Osim toga, konfiguracije svih dvostrukih veza su potvrđene vrednostima konstanti kuplovanja u <sup>1</sup>H-NMR spektrima. Time je struktura jedinjenja 325-3 konačno objašnjena kao (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-3,4-dihidroksipent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat (Slika 4-16A). Nisu detektovani geometrijski izomeri ovog jedinjenja.

**Tabela 4-7** <sup>1</sup>H (400 MHz) i <sup>13</sup>C (100 MHz) spektralna analiza jedinjenja 325-3 i 325-5

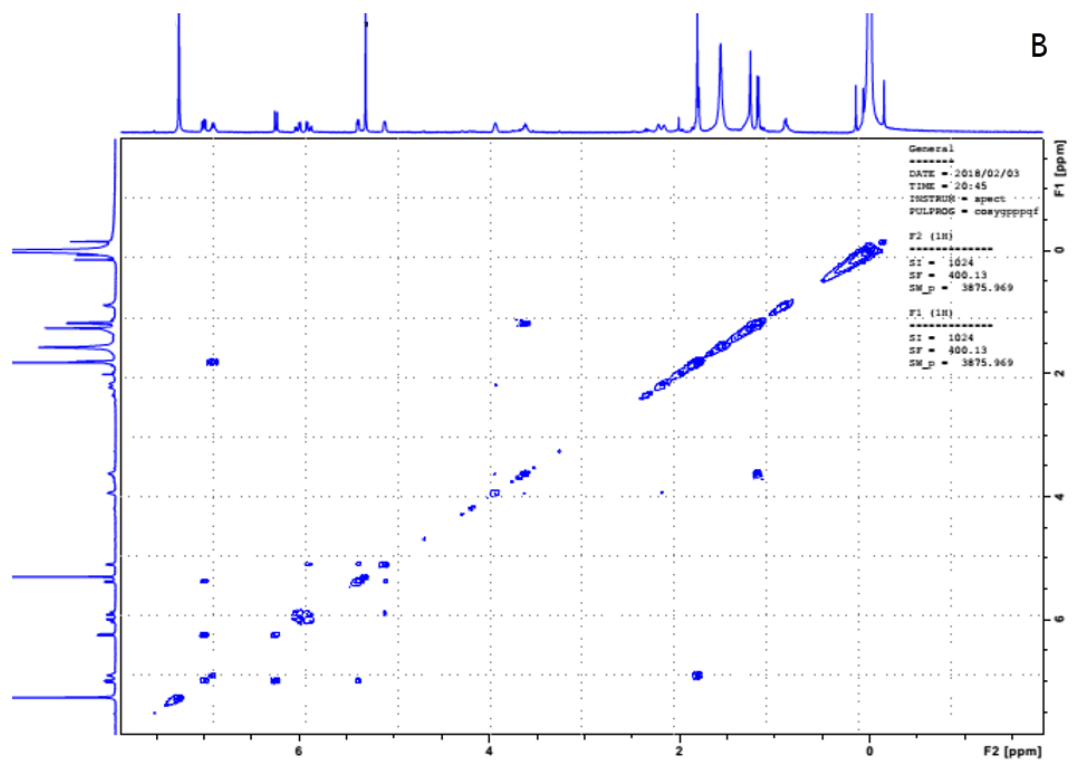
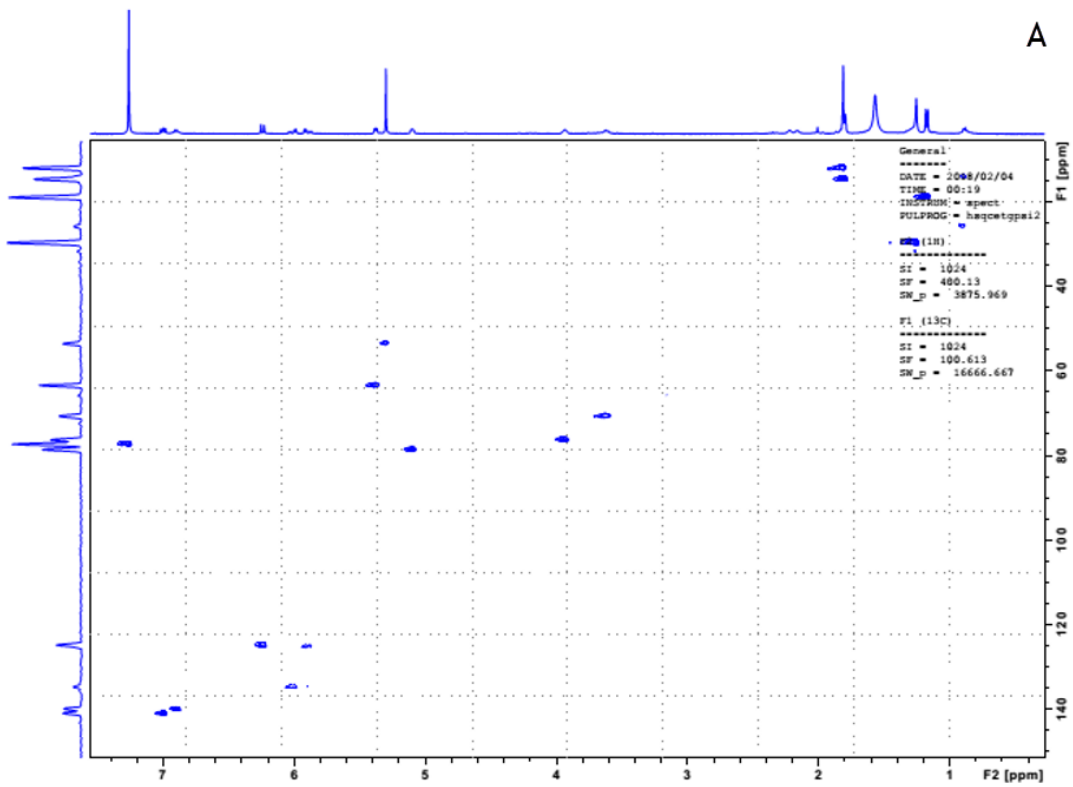
Pozicija	Jedinjenje 325-3		Jedinjenje 325-5	
	$\delta_H$ (J u Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J u Hz)	$\delta_c$
1		162,33		161,95
2	6,24 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H)	125,12	6,25 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H)	124,12
3	7,00 (dd, $J = 9,7, 5,5$ Hz, 1H)	140,89	7,10 (dd, $J = 9,7, 5,9$ Hz, 1H)	141,00
4	5,38 (dd, $J = 5,5, 3,0$ Hz, 1H)	63,41	5,66 (dd, $J = 5,8, 2,8$ Hz, 1H)	63,20
5	5,10 (s, 1H)	78,50	5,98 (dd, $J = 4,7, 2,8$ Hz, 1H)	76,85
6	5,89 (dd, $J = 16,0, 5,8$ Hz, 1H)	124,73	H-6/H-7: 6,42 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H) *	142,97
7	6,01 (dd, $J = 15,5, 5,2$ Hz, 1H)	134,72	H-6/H-7: 6,42 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H) *	124,54
8	3,93 (s, 1H)	76,22		202,04
9	3,62 (s, 1H)	70,60	4,36 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H)	73,14
10	1,17 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H)	11,98	1,40 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H)	19,59
1'	6,90 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H)	140,89	6,86 (dd, $J = 7,3, 1,7$ Hz, 1H)	139,57
2'		127,60		127,53
3'	1,80 (s, 3H)*	18,84	1,79 (s, 3H)*	14,54
1''		166,74		166,50
2''	1,81 (s, 3H)*	14,54	1,80 (s, 3H)*	12,00
OH	C-8/C-9: 2,22 (bs, 1H); 2,16 (bs, 1H)		C-9: 3,36 (bs, 1H)	



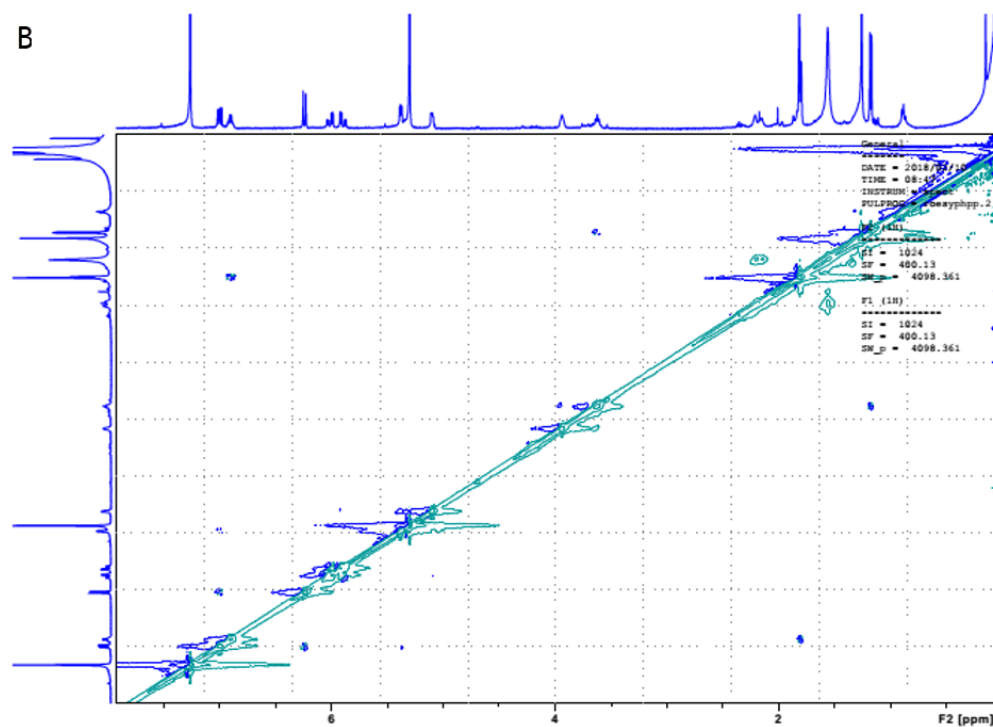
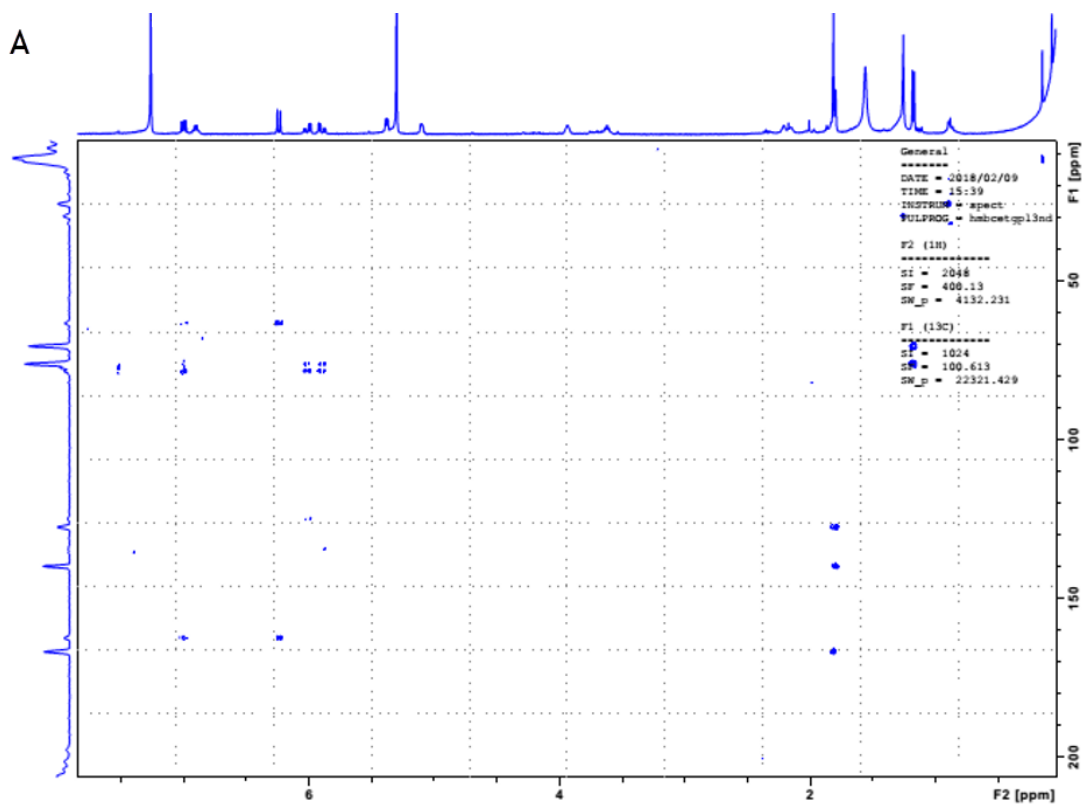
Slika 4-12 Ukupni jonski hromatogram (A) i GC/MS spektri (B) jedinjenja 325-3



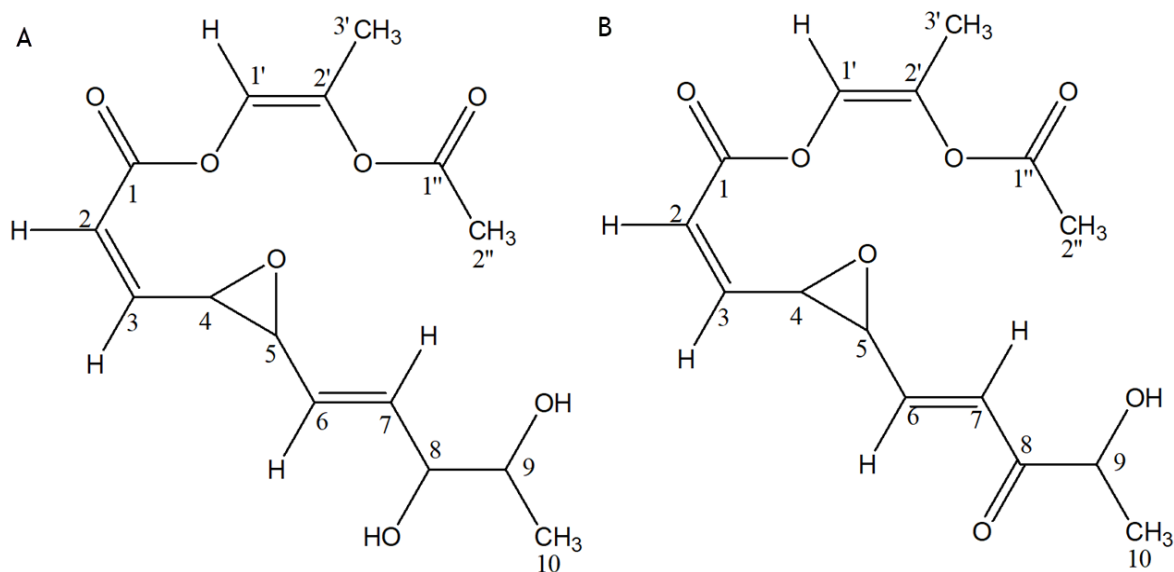
Slika 4-13  $^1\text{H}$  NMR spektar (A),  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (B) za toluen standard i jedinjenja 325-3



*Slika 4-14 HSQC (A) i COSY (B) spektri jedinjenja 325-3*

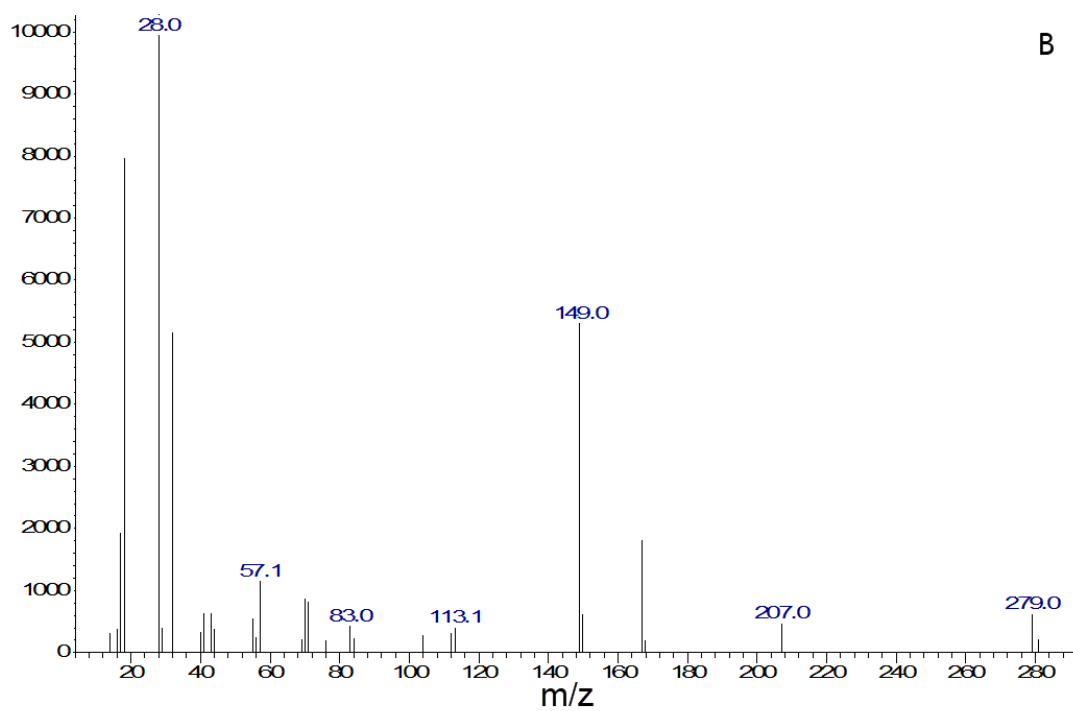
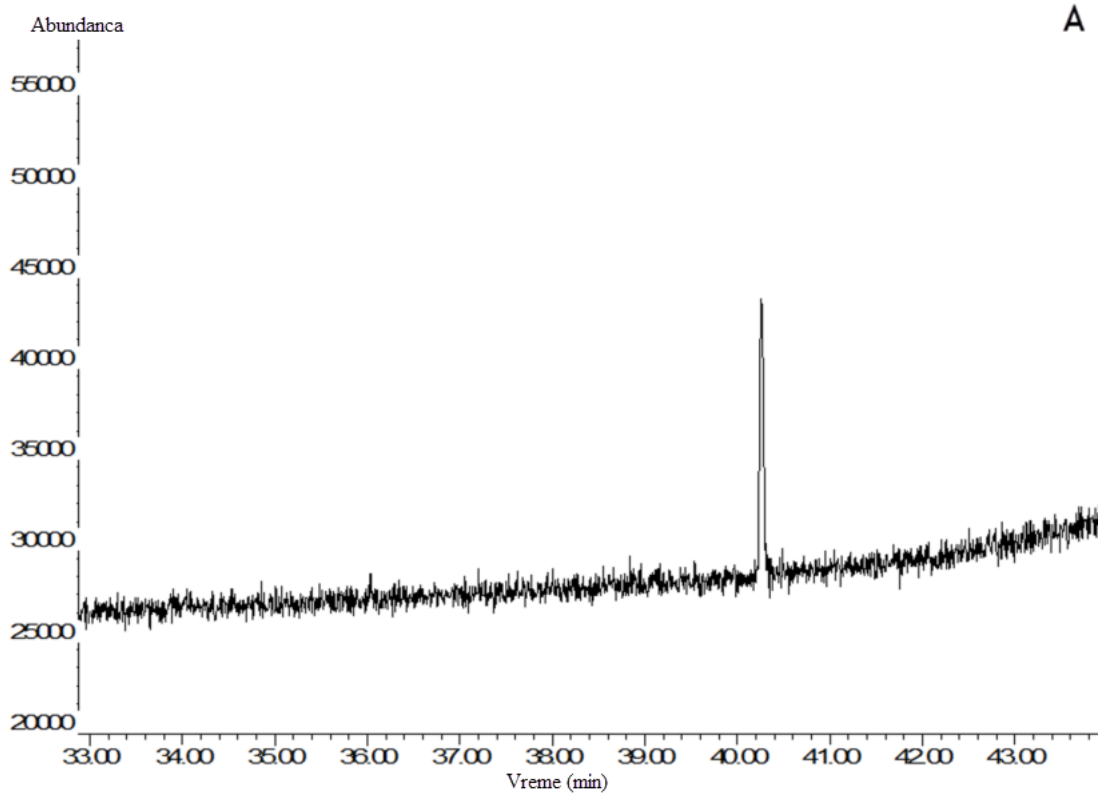


*Slika 4-15 HMBC (A) i NOESY (B) spektri jedinjenja 325-3*



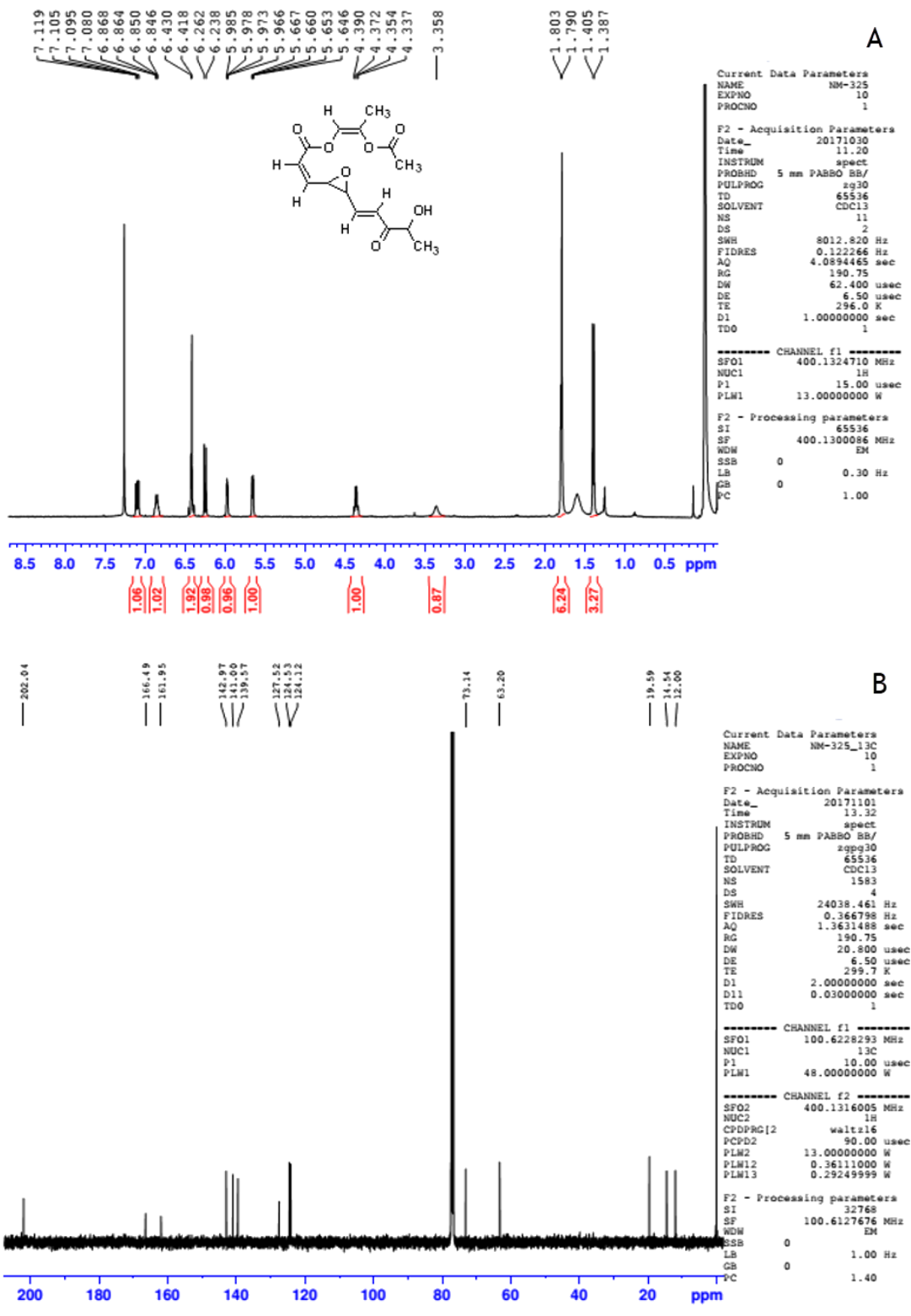
**Slika 4-16** Molekulske strukture jedinjenja 325-3 (A) i 325-5 (B)

Jedinjenje 325-5 takođe je dobijeno kao bezbojno ulje sa molekulskom formulom C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub> (zabeleženo GC-MS metodom kao jon [M+H-OH-CH<sub>3</sub>] = 279, izračunato 311,1125, Slika 4-17). Upoređivanjem <sup>1</sup>H spektara (Slika 4-18A) pokazalo se da je jedinjenje 325-5 imalo iste spektroskopske karakteristike kao i jedinjenje 325-3, sa jednim oksigeniranim *sp*<sup>3</sup> metinom i jednom hidroksil grupom manje. U <sup>13</sup>C NMR spektru jedinjenja 325-5 (Slika 4-18B), detektovana su tri karbonil signala ugljenika i tri oksigenirana *sp*<sup>3</sup> metina, što ukazuje na to da je jedinjenje 325-5 proizvod oksidacije jedinjenja 325-3. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Slika 4-19B) spektar je potvrdio veze između vodonika i susednih ugljenika od H-2 do H-7, a veza od H-9 do H-10 ukazuje na karbonil grupu na C-8. HMBC korelacija (Slika 4-20A) od H-7 do dodatne karbonil grupe takođe podržava ovu pretpostavku. Na osnovu analize NOESY spektra (Slika 4-20B) i veličine konstanti kuplovanja, utvrđeno je da su konfiguracije svih dvostrukih veza iste kao kod jedinjenja 325-3. Na osnovu toga, struktura jedinjenja 325-5 određena je kao (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-4-hidroksi-3-oksopent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat (Slika 4-16B). Nisu detektovani geometrijski izomeri ovog jedinjenja.

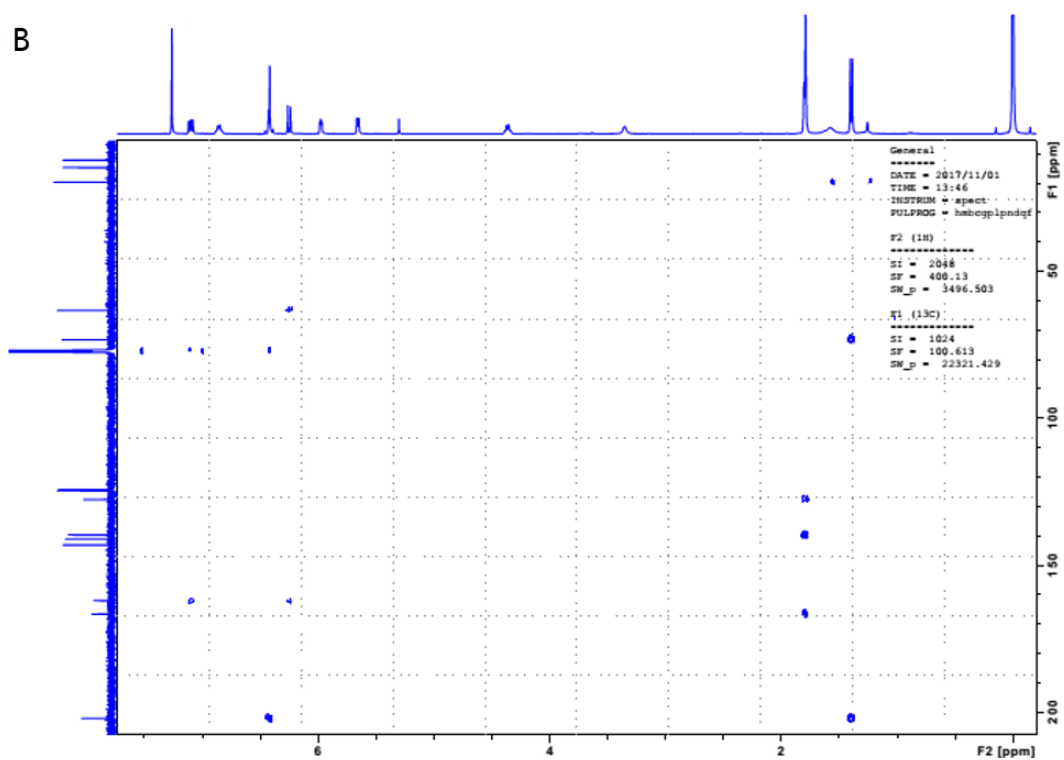
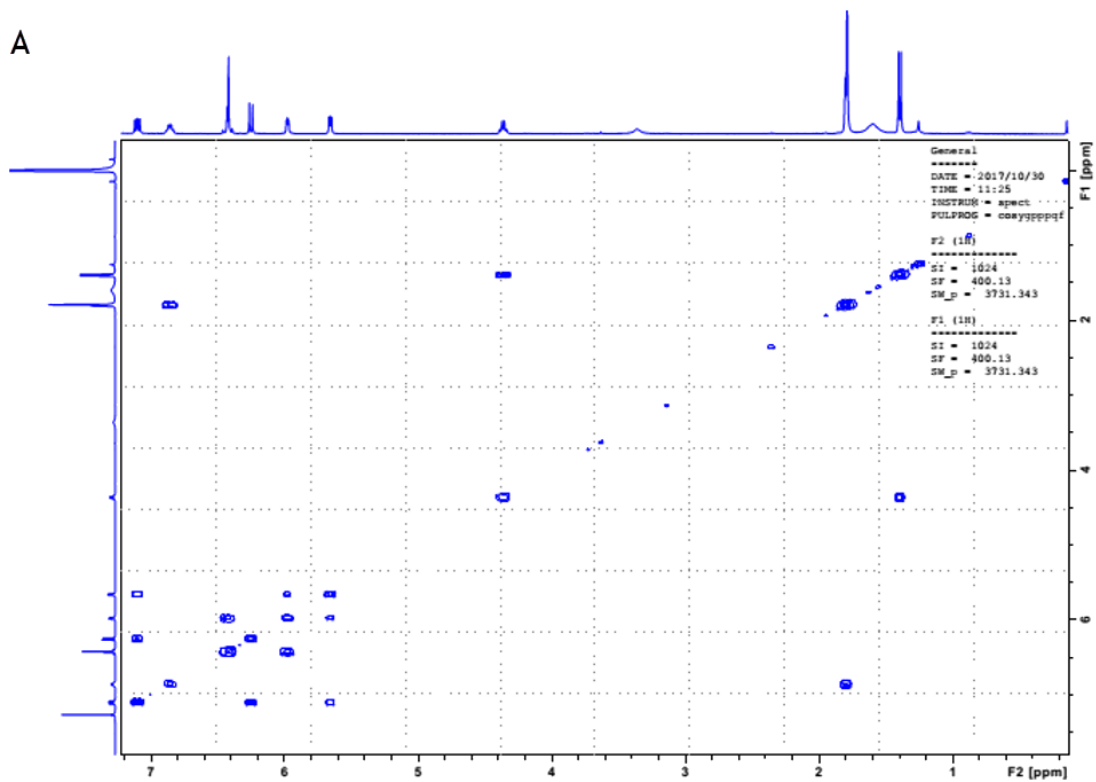


*Slika 4-17 Ukupni jonski hromatogram (A) i GC/MS spektar (B) jedinjenja 325-5*

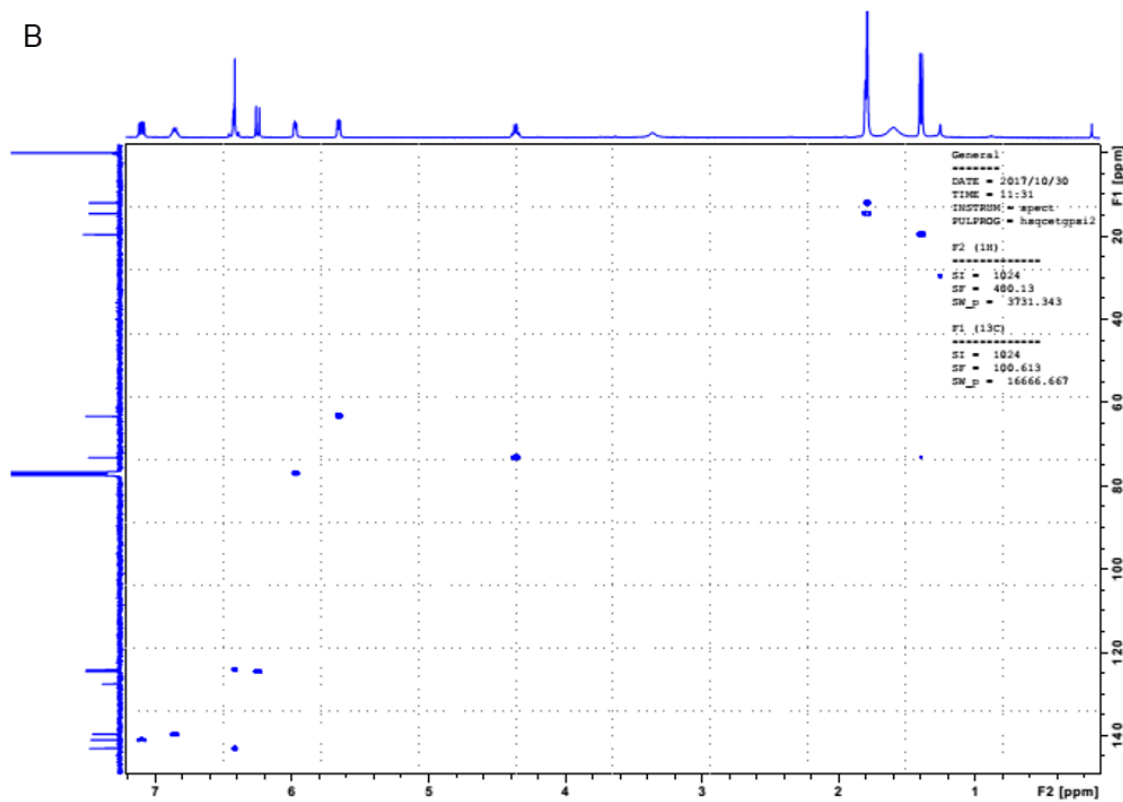
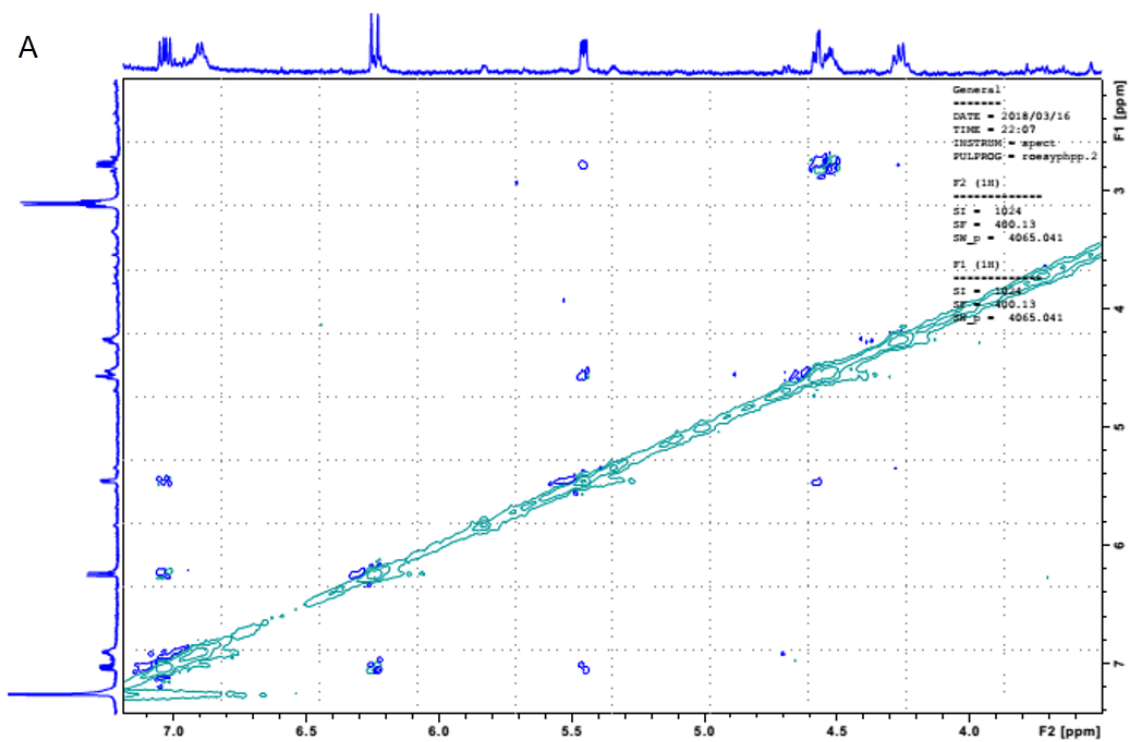




Slika 4-18  $^1\text{H}$  NMR spektar (A),  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (B) za toluen standard i jedinjenje 325-5



*Slika 4-19 HSQC (A) i COSY (B) spektri jedinjenja 325-5*



*Slika 4-20 HMBC (A) i NOESY (B) spektri jedinjenja 325-5*

*Phomopsis sp.* je već prepoznat kao moćan proizvođač bioaktivnih jedinjenja. Međutim, bitno je napomenuti da je vrsta *Phomopsis sp.* u mogućnosti da proizvede mnogo različitih sekundarnih metabolita koji se veoma razlikuju po hemijskom sastavu. Među njima, relativno mali molekul koji je sličan jedinjenjima koja su okarakterisana u našoj studiji, je fomoenamid, metabolit *Phomopsis sp.* PSU-D15 izolovanog iz lišća *Garcinia dulcis (Roxb.) Kurz.*, koji ima umerenu aktivnost prema *Mycobacterium tuberculosis* [54]. Druga endofitna gljiva, *Culvularia geniculate* dobijena iz grana *Catunaregam tomentosa*, proizvodi pet metabolita poznatih kao kurvularidi A - E, sa strukturno sličnim molekulima *Phomopsis species* vrste koja smo okarakterisali. Za kurvularide A - E je utvrđena antifungalna aktivnost prema *Candida albicans* [228]. Prema tome, možemo smatrati da bi budući nastavak ovog istraživanja mogao biti usmeren ka proširenoj evaluaciji i određivanju antimikrobnog potencijala endofita *Phomopsis species* u skladu sa pomenutim indeksima iz literature.

#### 4.6 ***In silico* procena fizičko-hemijskih parametara i prediktora biološke aktivnosti jedinjenja iz ekstrakta endofitnih gljiva**

Upotrebom programa *Marvin Sketch 4.1.13* izračunate su vrednosti za particioni koeficijent (*logP*) kao glavni fizičko-hemijski parametri lipofilnosti za jedinjenja 325-3 i 325-5, što je prikazano u tabeli 4-8 ispod. Dobijene vrednosti particionog koeficijenta su manje od 1, na osnovu čega se može zaključiti da su oba ispitivana jedinjenja hidrofilnog karaktera.

**Tabela 4-8 Procena vrednosti particionog koeficijenta *logP* za aktivna jedinjenja iz *Phomopsis* ekstrakta**

Jedinjenje	<i>logP</i> vrednost
325-3	0,745
325-5	0,130

Dodatno su, korišćenjem softvera *SwissADME* za aktivna jedinjenja 325-3 i 325-5 procenjivane vrednosti fizičko-hemijskih parametara, koji su bili uključeni kao kriterijumi za pravilo Lipinskog, i u Ghose-ov filter.

Na osnovu pravila Lipinskog za oralnu aplikaciju lekova je preporučeno da lek kandidat ispunjava bar 3 od ukupno četiri zahteva. Prema Stokes – Einsteinovom-om jednačini, koeficijent difuzije nekog molekula je obrnuto proporcionalan njegovom poluprečniku, što

utiče na kriterijum za graničnu masu molekule. Nasuprot tome se za granične vrednosti akceptora odnosno donora vodonične veze može protumačiti da iskazuju negativnu korelaciju koju polarni molekuli inače ostvaruju permeacijom kroz biološke membrane. U tabeli 4-9 su prikazani rezultati vezani za kriterijume Lipinskog, na osnovu čega se može zaključiti da su ispitivana jedinjenja dobri kandidati za oralnu formulaciju pošto oba jedinjenja ispunjavaju sva 4 zahteva Lipinskog. Oralna aplikacija leka je u prednosti pošto njome pacijenti postižu bolju komplijansu tokom terapije.

**Tabela 4-9 Vrednosti deskriptora dobijenih in silico koji figurišu u pravilu Lipinskog**

Jedinjenje	Broj donora vodonika (NHBD)	Broj akceptora vodonika (NHBA)	Molekulka masa MW(g/mol)	MlogP
325-3	1,0	7,0	310,30	-0,27
325-5	2,0	7,0	312,32	-0,19

Daljom *in silico* analizom korišćenjem Ghose-ovog filtera za ispitivane molekule i na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 4-10, se potvrđuje da su jedinjenja primerena za oralnu formulaciju.

**Tabela 4-10 In silico izračunati deskriptori za Ghose pravilo**

Jedinjenje	LogP	Molarna refraktivnost (MR)	Molekulka masa MW(g/mol)	Broj teških atoma (NHA)
325-3	0,130	75,70	310,30	22,0
325-5	0,745	76,66	312,32	22,0

Ispitivane molekule su takođe zadovoljavale i kriterijume Veber-ovih pravila (Tabela 4-11.). Pošto je izračunato da ispitivana jedinjenja nemaju polarnu površinu veću od 140 Å<sup>2</sup>, i kako je broj rotirajućih veza bio manji od 10, može se zaključiti da ispitivana jedinjenja mogu da postignu dobru oralnu bioraspoloživost.

**Tabela 4-11 In silico izračunati deskriptori za Veber –ovo pravilo**

Jedinjenje	Topološka polarna površina (TPSA)	Broj rotirajućih veza (NRB)
325-3	111,66	9,0
325-5	114,82	9,0

Imajući u vidu činjenicu da je potvrđeno da jedinjenja 325-3 i 325-5 zadovoljavaju kriterijume pravila Lipinskog i sve ostale varijante pravila, jedinjenja 325-3 i 325-5 se mogu klasifikovati kao potencijalni kandidati za lek sa zadovoljavajućom oralnom bioraspoloživošću.

Upotrebom softverskog paketa *ACD/iLab* izračunati su parametri za volumen distribucije (*Vd*) i vezivanje za proteine plazme (*PPB*) kao glavni farmakokinetički parametri kojima se može opisati raspodela potencijalnog leka u organizmu. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4-12.

**Tabela 4-12      *In silico* dobijeni parametri distribucije**

<b>Jedinjenje</b>	<b>Volumen distribucije – Vd (L/kg)</b>	<b>Vezivanje za proteine plazme – PPB (%)</b>
<b>325-3</b>	1,06	38,09
<b>325-5</b>	1,02	27,13

Za ispitivana jedinjenja su izračunate vrednosti za volumen distribucije manje od 2 L/kg, što upućuje na zaključak da analizirani molekuli imaju tendenciju da ostaju u sistemske cirkulaciji i da se distribuiraju u intervaskularnoj tečnosti, odnosno krvotoku. Posledično se na osnovu rezultata za volumen distribucije može zaključiti da ispitivana jedinjenja nemaju tendenciju za raspoređivanje u masnom tkivu pacijenata i da je verovatno da neće ispoljiti neželjena dejstva akumulacije u tkivima. Lekovi koji su distribuirani u sistemske cirkulaciji mogu biti vezani za proteine plazme, lokalizovani u krvnim ćelijama ili rastvoreni u plazmi.

Rezultati za vezivanje za proteine plazme su za oba ispitivana jedinjenja manja od 40 % što ukazuje da ispitivani analiti iskazuju srednji afinitet vezivanja za proteine plazme.

#### Toksikološki deskriptori

Softverski paket *ACD/iLab 2.0* za *in silico* analize na području medicinske hemije je korišćen za izračunavanje toksikoloških parametara koji zavise od načina uzimanja leka za dve vste glodara – pacova i miša. Rezultati *in silico* analiza za predviđenu dozu leka koja ubija 50 % tretiranih životinja (*LD<sub>50</sub>*) su prikazani u tabeli 4-13. Dodatno su *in silico* određivane i *LD<sub>50</sub>* vrednosti za standardne antibiotike koji pokazuju antimikrobno delovanje za bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Zapravo je za antibiotik koji inhibira rast bakterije *Escherichia coli* izabran amoksicilin, a analizirani antibiotik koji inhibira rast bakterije

*Staphylococcus aureus* je bio levofloksacin. Rezultati  $LD_{50}$  vrednosti za referentne antibiotike su prikazani u tabeli 4-14.

**Tabela 4-13**  $LD_{50}$  vrednosti za aktivna jedinjenja iz ekstrakta endofita *Phomopsis sp.*

Jedinjenje	Miš – i.p.	Miš – p.o.	Pacov – i.p.	Pacov – p.o.
325-3	210	760	270	1900
325-5	310	1100	300	1100

*i.p. – interperitonealna primena; p.o. – per os primena*

**Tabela 4-14**  $LD_{50}$  vrednosti za referentne antibiotike

Jedinjenje	Miš – i.p.	Miš – p.o.	Pacov – i.p.	Pacov – p.o.
325-3	40	1803	20	1478
325-5	3590	>25	2870	>15

*i.p. – interperitonealna primena; p.o. – per os primena*

Analizom rezultata je utvrđeno da jedinjenje 325-3 potencijalno može ispoljiti veću toksičnost pri *per os* primeni u poređenju sa levofloksacinom kao referentim antibiotikom, za obe vrste glodara (miš i pacov). U poređenju sa amoksicilinom, jedinjenje 325-3 potencijalno ispoljava veću toksičnost pri intraperitonealnoj primeni, što je takođe relevantno za obe vrste glodara.

Takođe, parametri za ispitivano jedinjenje 325-5 imaju isti trend, imajući u vidu da je primećeno da jedinjenje 325-5 potencijalno ispoljava veću tendenciju toksičnosti u poređenju sa referentnim antibiotikom levofloksacinom pri oralnoj primeni. Slični rezultati veće tendencije toksičnosti jedinjenja 325-5 u poređenju sa referentnim antibiotikom amoksicilinom su primećeni pri intraperitonealnoj primeni. Jedinjenja 325-3 i 325-5 imaju sličnu strukturu, i posledično slične toksikološke parametre. Bitno je napomenuti da razlika u dobijenim vrednostima za standardne antibiotike i ispitivana jedinjenja nije u tolikoj meri značajna da bi se ispitivana jedinjenja mogla okarakterisati kao znatno toksična. Posledično se može zaključiti da aktivna jedinjenja 325-3 i 325-5 iz ekstrakta endofita *Phomopsis species* imaju prihvatljiva parametre toksičnosti.

Dodatno se deskriptori lipofilnosti koji su prethodno dobijeni eksperimentalno metodom hromatografije (prikazani u tabeli 4-15) mogu uporediti sa mnogobrojnim kompjuterski izračunatim deskriptorima lipofilnosti.

**Tabela 4-15 Hromatografski dobijeni parametri lipofilnosti**

Molekula	X logP	Y R <sub>M</sub> <sup>O</sup>	m	Co
<b>Sulfadiazin</b>	-0,200	1,810	-3,282	0,551
<b>Ciprofloksacin</b>	0,280	0,669	-0,779	0,858
<b>Gatifloksacin</b>	0,151	0,881	-0,792	1,113
<b>Ofloksacin</b>	0,135	0,981	-1,006	0,975
<b>Horamfenikol</b>	-0,230	1,902	-3,021	0,630
<b>Jedinjenje 1</b>	-0,560	2,771	-3,378	0,820
<b>Jedinjenje 2</b>	-0,740	2,999	-3,476	0,863

**Tabela 4-16 In silico parametri lipofilnosti**

Molekula	Mw	LogS	Vd	PPB	clogP	logP	ilogP	XlogP3	WlogP	mlogP
<b>Sulfadiazin</b>	250,28	-3,79	0,48	58	0,099	-0,20	0,76	-0,10	1,76	-0,19
<b>Ciprofloksacin</b>	331,34	-3,50	1,68	30	-1,146	0,28	2,24	-1,08	1,18	1,28
<b>Gatifloksacin</b>	375,39	-3,76	1,8	20	-0,687	1,51	2,44	-0,74	1,58	0,95
<b>Ofloksacin</b>	361,14	-3,01	1,5	32	-0,879	1,35	2,49	-0,39	1,20	0,98
<b>Horamfenikol</b>	323,13	-2,39	0,7	60	1,283	-0,23	1,17	1,14	0,58	0,02
<b>Jedinjenje 1</b>	312,32	0,55	/	/	-2,117	-0,56	3,20	-0,26	0,58	-0,19
<b>Jedinjenje 2</b>	310,30	0,07	/	/	0,318	-0,74	2,89	0,06	0,78	-0,27

Molekula	Permeacija logKp (cm/s)	Donor H veze	Akceptor H veze	Refraktivnost	Broj rotabilnih veza	Broj teških atoma	Topološka polarna površina
<b>Sulfadiazin</b>	-7,89	2	4	63,55	3	17	106,35
<b>Ciprofloksacin</b>	-9,09	2	5	95,25	3	24	74,57
<b>Gatifloksacin</b>	-9,12	2	6	106,55	4	27	83,80
<b>Ofloksacin</b>	-8,78	1	6	101,83	2	26	75,01
<b>Horamfenikol</b>	-7,46	3	5	74,38	7	20	115,38
<b>Jedinjenje 1</b>	-8,39	2	7	76,66	9	22	105,59
<b>Jedinjenje 2</b>	-8,15	1	7	75,70	9	22	102,43

Za standardna antimikrobna jedinjenja su korišćenjem *in silico* računarskih alata *Chemaxon* paketa, izračunati parametri *clogP* i *logP*, a uporebom programa *SwissADME* su dobijeni parametri *logS*, parametri permeacije kroz kožu, *Vd*, *PPB*, *ilogP*, *XlogP3*, *WlogP*, broj donora i akceptora vodonične veze, *MlogP*, molarna refraktivnost, broj teških atoma, topološka polarna



površine jedinjenja i broj rotabilnih veza. Uporedni prikaz *in silico* deskriptora lipofilnosti koji su dobijeni računarskim putem su prikazani u tabeli 4-16.

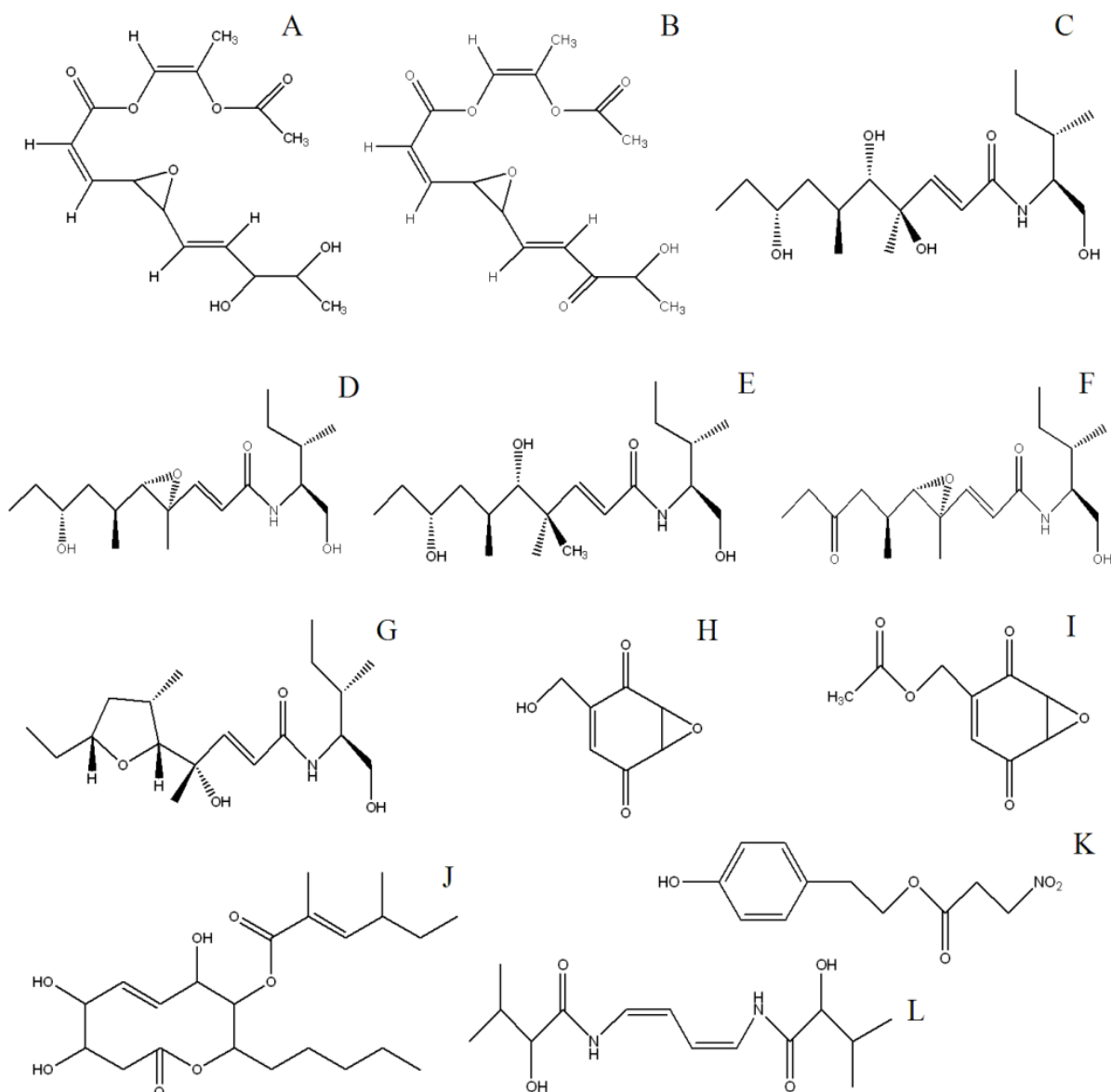
Zatim je za svaki od parametara lipofilnosti dobijenih hromatografskim putem i *in silico* proračunima svih prediktora biološke aktivnosti izračunat koeficijent korelacije  $r$ , koji je u svim slučajevima bio veći od 0,8. Ovim rezultatima se potvrđuje postojanje dobre korelacije između eksperimentalnih i *in silico* metodama određenih prediktora biološke aktivnosti i stoga se može zaključiti da deskriptori dobijeni računarskim metodama mogu biti korisni dodatni pokazatelji budućeg *in vivo* ponašanja leka u organizmu.

#### 4.7 Molekularne *docking* studije

Dakle, molekularni *docking* je praktična *in silico* metoda koja se koristi kako bi se predvidela orijentacija liganda u receptorskom džepu za vezivanje [232, 240]. Za izvođenje *docking* studije korišćen je *Autodock v4.2* koji je inače besplatno dostupan, dok je za analizu *docking* simulacija korišćen softver *AutoDockTools 1.5.6*. Pre svake *docking* simulacije ligandi i receptori su adekvatno pripremljeni, tako što su ligandske strukture optimizovane da postignu konformaciju sa minimalnom energijom, dok su receptorske strukture preuzete iz Brookhaven baze podataka za proteine. Prethodno izračunavanje 3D mreže interakcijskih energija izvedeno je pomoću programa *AutoGrid* a na osnovu detektovane makromolekularne mete. Tokom ove procedure, kreirana je kubična mreža i mapa mreže, koje su zapravo predstavljale aktivno područje receptora u koje se je potom ugrađivala testna izvorna molekularna struktura [241]. Mreža od 40 tačaka u x-, y- i z-pravcima sa razmakom mreže od 0,375 Å je bila postavljena centralno u odnosu na ligand. Najveći broj procena energije bio je 2.500.000. Lamarckian genetički algoritam korišćen je sa ciljem da se identifikuju najbolje konformacije liganada u interakciji sa receptorom [232-233]. Tokom simulacija je u obzir uzet najveći mogući broj od po 100 jedinstvenih konformera za svako jedinjenje. *Docking* eksperimenti su izvedeni ispitivanjem interakcija između fleksibilnih liganada (testiranih molekularnih struktura) i statičnih proteinskih receptora, što je omogućilo evaluaciju slobodne energije vezivanja liganada i makromolekula. *Docking* konformacije sa najboljim rezultatom funkcije bodovanja RMSD (koren srednjeg kvadratnog odstupanja) svih usidrenih konformacija ocenjivanje su međusobno prema utvrđenim ključnim parametrima interakcije [234-235].

Kristalne strukture receptora  $G^+$  i  $G^-$  bakterija preuzete su iz baze podataka za proteine (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org/>) [225-227]. Set molekula liganada uključivao je jedinjenja 325-3 i 325-5, kurvularide A, B, C, D, E, jedinjenja 6 i 7, fomol, fomoenamid i fomonitroestar (Slika 4-21) [14, 36, 54, 228-229]. Antibiotik ampicilin služio je kao kontrolni ligand. Svi molekuli liganada postavljeni su u njihovu konformaciju sa minimalnom energijom uz pomoć MOPAC/AM1 metode (opis zahvata: minimiziranje RMS gradijenta na 0,100; način prikaza: svaka pojedinačna iteracija; AM1 teorija; funkcija: „closed shell“ ) u programu Chem 3D Ultra 7.0.0, *Cambridgesoft*.

Kao rezultat prethodnih istraživanja, jedinjenja 325-3 i 325-5 su izolovana iz endofitne gljive *Phomopsis species* i njihova aktivnost protiv bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* sojeva je eksperimentalno evaluirana. Kako bi se razumeo mehanizam delovanja koji leži u osnovi interakcije između jedinjenja 325-3 ili 325-5 sa različitim tipovima receptora i kako bi se identifikovali receptori koji ispoljavaju antimikrobni efekat nakon aktivacije ligandom, dodatno je sprovedena studija molekularnog *dokinga*. Takođe, obim tesiranih liganada proširen je sa još deset endofitnih biomolekula pronađenih prilikom detaljnog pregleda literature. Najstabilnije konformacije liganada, koje su se isticale tokom *doking* studije, izabrane su na osnovu njihove vrednosti minimalne energije vezivanja u interakciji sa receptorom, što inače doprinosi favorizovanju termodinamičnijeg puta formiranja strukture ligand-receptor.



**Slika 4-21** Hemijske strukture ispitivanih molekula liganada 325-3 (A), 325-5 (B), kurvularid A (C), kurvularid B (D), kurvularid C (E), kurvularid D (F), kurvularid E (G), jedinjenje 6 (H), jedinjenje 7 (I), fomol (J), fomenamid (K) i fomonitroestar (L)

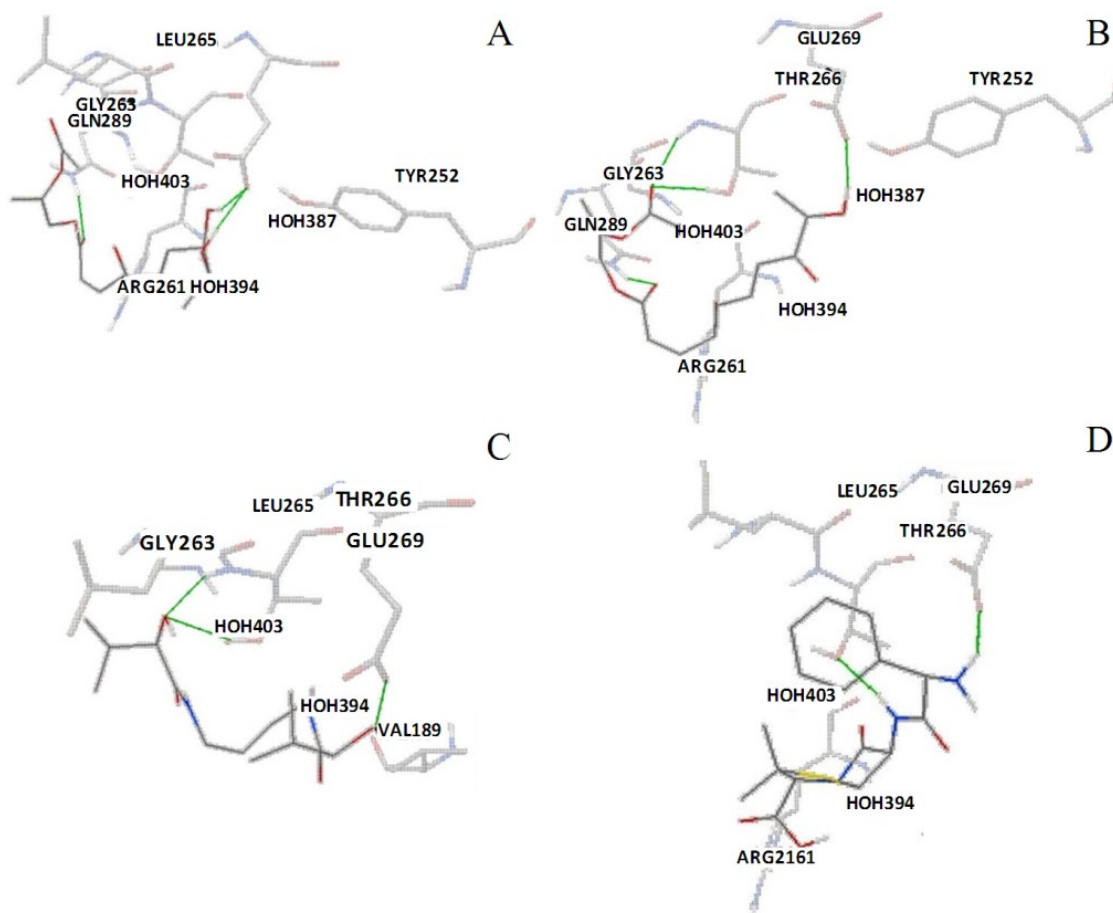
Svaka interakcija evaluirana je preko karakterističnih parametara, kao što su konstanta inhibicije ( $K_i$ ), RMSD vrednost, vrednost slobodne energije vezivanja i potencijala za prisustvo vodoničnih veza između testiranih liganada i receptora. Generalno se pouzdanim indikatorima potencijalnog vezivanja testiranih liganada i receptora smatraju: niže vrednosti konačne energije i energije vezivanja, niže vrednosti konstante inhibicije, srednja vrednost kvadratne

devijacije (RMSD) sa graničnom vrednošću do 2 Å i potencijal za formiranje vodoničnih veza u slučaju bliske interakcije liganada i receptora [237]. Koordinate centralnih tačaka mreže za sve testirane ligande date su u Tabeli 7-1 kao deo dopunskog materijala.

Ishodi *docking* simulacije za 1F0K receptor sa ligandima (Tabela 4-17 i Tabela 7-2) demonstrirali su da je od svih testiranih liganda, ampicilin prikazao najveći potencijal vezivanja ostvarujući 2 vodonične veze sa receptorom (Slika 4-22), i imajući pritom najnižu energiju vezivanja od -6,47 kcal/mol, konstantu inhibicije ( $K_i$ ) od 18,08  $\mu$ M i RMSD vrednost od 5,08. Prilikom poređenja afiniteta drugih liganada sa ampicilinom isticala su se jedinjenja 325-3, 325-5, fomoenamid i fomol. Od pomenutih jedinjenja, vrednost najniže slobodne energija vezivanja uočena je za jedinjenje 325-3 (-5,14 kcal/mol), fomoenamid (-4,97 kcal/mol) i jedinjenje 325-5 (-4,78 kcal/mol), respektivno. Interesantna je činjenica i da je najniža  $K_i$  vrednost koja upućuje na visoki potencijal vezivanja za 1F0K receptor, uočena je za fomol ( $K_i = 60,52 \mu$ M), praćena vrednošću  $K_i$  za jedinjenje 325-3 ( $K_i = 172,04 \mu$ M) i fomoenamid ( $K_i = 227,74 \mu$ M). Najniža RMSD vrednost zabeležena je u slučaju fomola (RMSD = 3,26), praćena jedinjenjima 325-3 i 325-5 koja su mala istu vrednost RMSD od 3,72 i fomoenamidom sa RMSD vrednošću od 4,46. Potencijal za formiranje četiri vodoničnih veza je zabeležen u slučaju jedinjenja 325-5 i kurvularida A, premda su oba liganda ispoljavala potencijal vezivala za aminokiselinu GLN289 na receptoru, dok su dodatne vodonične veze uspostavljene sa drugim aminokiselinama LEU265, SER192 i GLN193. Ovo može dovesti do zaključka da su 2 vezujuća mesta na receptoru 1F0K u neposrednoj blizini. Jedinjenje 325-3, fomol i fomoenamid imaju potencijal u uspostavljanju 3 vodnične veze sa receptorom. S' obzirom da jedinjenje 325-5 i fomoenamid imaju potencijal u formiranju vodoničnih veza preko aminokiseline THR266 i da oba jedinjenja 325-3 i 325-5 imaju potencijal u formiranju vodoničnih veza sa aminokiselinom GLN289 na 1F0K receptoru, može se pretpostaviti da se jedinjenja 325-3, 325-5 i fomoenamid vezuju za isti receptorski džep za ligande. Sa druge strane, fomol ispoljava potencijal u formiranju vodonične veze sa aminokiselinama GLY190 i GLN193 što upućuje na zaključak da se fomol ne vezuje za isto mesto na receptoru kao jedinjenja 325-3, 325-5 i fomoenamid.

**Tabela 4-17 Ekstrahovani eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1F0K receptorom.**

<b>Ligand</b>	<b>Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)</b>	<b>Konstanta inhibicije <math>K_i</math> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>RMSD (<math>\text{Å}</math>)</b>	<b>Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru</b>
Ampicilin	-6,47	18,08	5,08	THR266
Jedinjenje 325-3	-5,14	172,04	3,72	GLN289
Jedinjenje 325-5	-4,78	313,49	3,72	THR266 GLN289
Kurvularid A	-4,76	324,52	6,17	LEU265 SER192 GLN193 GLN289
Kurvularid B	-4,10	994,76	6,79	GLN289
Kurvularid C	-4,70	361,64	4,74	VAL189
Kurvularid D	-4,74	334,92	6,42	LEU265
Kurvularid E	-4,73	343,80	4,90	GLU269
Fomoenamid	-4,97	227,74	4,46	THR266
Jedinjenje 6	-3,88	1430	7,35	LEU265 THR266
Jedinjenje 7	-4,56	454,39	5,83	ARG164 THR266
Fomol	-5,75	60,52	3,26	GLY190 GLN193
Fomonitroestar	-4,81	296,63	5,89	GLU269 GLN289



**Slika 4-22** *Doking konformacija liganada 325-3 (A), 325-5 (B), fomoenamida (C) i ampicilina (D) sa 1F0K receptor vezujućim džepom. Prikazan je samo deo receptora sa reziduama aminokiselina preko kojih se ostvaruje interakcija sa ligandima. Potencijal za formiranje ključnih vodoničnih veza između rezidua aminokiselina u receptorskom džepu za vezivanje i liganada naglašene su zelenom bojom*

Analiza *doking* rezultata procene afiniteta liganada za 3G7B receptor pokazala je, kao što je i očekivano, da je među ispitivanim ligandima, najniža energija vezivanja od -6,10 kcal/mol zabeležena u slučaju ampicilina, koji je zapravo predstavljao i kontrolni ligand (Tabela 4-18 i Tabela 7-3). Od svih testiranih liganada, jedinjenje 325-3 je pokazalo najnižu energiju vezivanja od -5,27 kcal/mol. Povrh toga, niska energija vezivanja sa 3G7B receptorom takođe je uočena i za fomoenamid i jedinjenje 325-5. Dodatno su rezultati *doking* simulacija ukazivali i na potencijal za uspostavljanje 4 vodonične veze između receptora 3G7B i liganada 325-3 i fomoenamida. Takođe, potencijal za formiranje 3 vodonične veze uočeno je u slučaju jedinjenja 325-3 i 3G7B receptora. Slična vezujuća mesta na 3G7B receptoru (preko aminokiselina na

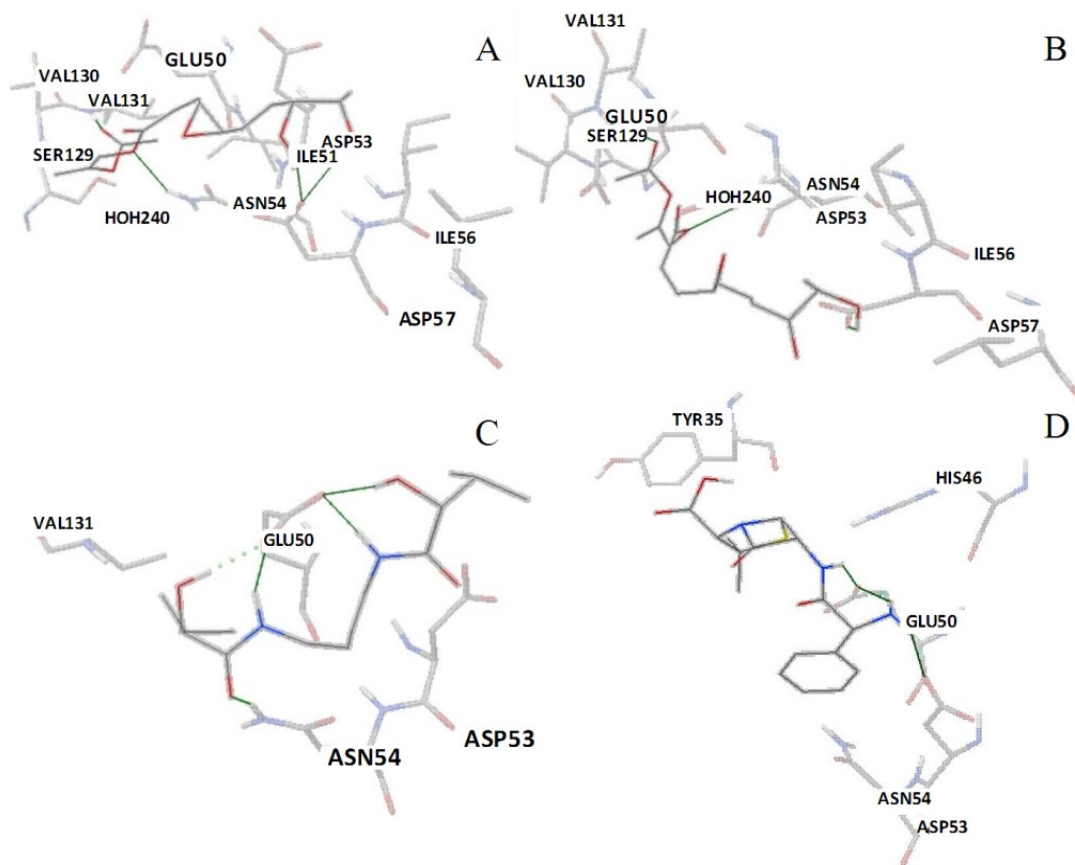
poziciji ASP57, ASN54 i VAL131 na receptoru 3G7B, Tabela 7-3) su zabeležena u slučaju oba jedinjenja 325-3 i 325-5 (Slika 4-23), čime se može objasniti eksperimentalno potvrđena antimikrobna aktivnost protiv bakterije *Staphylococcus aureus* u našim prethodnim istraživanjima. Ova opservacija takođe upućuje na zaključak da jedinjenja 325-3 i 325-5 interaguju sa istim vezujućim mestima na receptoru, dok se fomoenamid i ampicilin vezuju druge džepove na 3G7B receptoru. Najniže RMSD vrednosti zabeležene su za fomoenamid (RMSD = 3,27) i jedinjenje 325-5 (RMSD = 3,92). Takođe su i drugi testirani ligandi pokazali potencijal za interakciju i vezivanje sa 3G7B receptorom, međutim sudeći po vrednostima slobodne energije vezivanja, konstanti inhibicije i RMSD vrednosti, jedinjenje 325-3 ( $K_i = 135,56 \mu\text{M}$ , RMSD = 5,04), jedinjenje 325-5 ( $K_i = 425,42 \mu\text{M}$ , RMSD = 3,92) i fomoenamid ( $K_i = 397,98 \mu\text{M}$ , RMSD = 3,27) pokazali su najveći potencijal.

Ovi rezultati upućuju na zaključak da je najveći afinitet za receptor 3G7B zapažen za kontrolni ligand - antibiotik ampicilin. Od svih testiranih liganada, nešto niži afinitet zapažen je za ligande 325-3, 325-5 i fomoenamid, respektivno. Interesantno je zapažanje da su vezujuća mesta za ampicilin i fomoenamid uključivala interakcije sa receptorskim džepom u neposrednoj blizini aminokiseline GLU50, dok su kod oba jedinjenja 325-3 i 325-5 zapažene interakcije sa aminokiselinskim reziduama ASP57, ASP54 i VAL131 na drugom mestu vezivanja za receptor (Slika 4-23). Kako je uočena razlika u vezujućim mestima za receptor pomenutih jedinjenja, ova opservacija upućuje na potencijalne razlike u mehanizmu aktivnosti ampicilina ili fomoenamida u poređenju sa jedinjenjima 325-3 i 325-3.

**Tabela 4-18** Ekstrahovani eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3G7B receptorom.

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije $K_i$ ( $\mu$ M)	RMSD ( $\text{\AA}$ )	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
Ampicilin	-6,10	33,93	5,77	ASP53 GLU50
Jedinjenje 325-3	-5,27	135,56	5,04	ASP57 ASN54 VAL131
Jedinjenje 325-5	-4,60	425,42	3,92	ASP57 VAL131 ASN54
Kurvularid A	-2,58	12930	4,21	ASP53 GLU50 ASN54
Kurvularid B	-4,36	632,03	3,98	GLU50 HIS46
Kurvularid C	-3,21	4440	4,50	ASP57
Kurvularid D	-4,51	495,24	4,19	ASP53 ASN54 VAL131
Kurvularid E	-4,47	532,45	4,15	ASP52 ASN54
Fomoenamid	-4,64	397,98	3,27	ASN54 GLU50
Jedinjenje 6	-3,75	1790	6,72	VAL131 ASN54 GLU50
Jedinjenje 7	-4,20	838,08	4,80	ASN54 VAL131
Fomol	-3,74	1800	4,89	ASP53 ASN206
Fomonitroestar	-3,88	1440	6,80	VAL130 GLU50 HIS46 VAL131





**Slika 4-23** *Doking konformacija liganada 325-3 (A), 325-5 (B), fomoenamida (C) i ampicilina (D) sa 3G7B vezujućim mestu na receptoru. Prikazan je samo deo receptora sa reziduama aminokiselina preko kojih se ostvaruje interakcija sa liganima. Potencijal za formiranje ključnih vodoničnih veza između rezidua aminokiselina u receptorskom džepu za vezivanje i liganada naglašene su zelenom bojom.*

Opšte je poznata činjenica da određeni antibiotici ispoljavaju svoj efekat inhibicijom enzima  $\beta$ -laktamaza. Stoga su izvedene i evaluirane *docking* simulacije između SHV-1  $\beta$ -laktamaze kao receptora i svih ispitivanih liganada (Tabela 4-19 i Tabela 7-4). Ampicilin ligand je pokazao najnižu slobodnu energiju vezivanja od -1,90 kcal/mol i RMSD od 5,08. Međutim, jedinjenje 7 i fomonitroestar ispoljili su najnižu slobodnu energiju vezivanja (-2,85 kcal/mol i -2,67 kcal/mol, respektivno), praćeno jedinjenjem 6 (-2,48 kcal/mol) i jedinjenjem 325-5 (-1,79 kcal/mol). Ova činjenica navodi na zaključak da ova jedinjenja potencijalno imaju veći afinitet za receptor u poređenju sa ampicilinom kao kontrolnim ligandom. Za sva jedinjenja, zapažene su veće vrednosti konstante inhibicije. Najniža vrednost konstante inhibicije od 8,10 mM je bila u slučaju jedinjenja 7. Takođe, potencijal za ostvarivanje 4 vodonične veze zapažen je u primeru

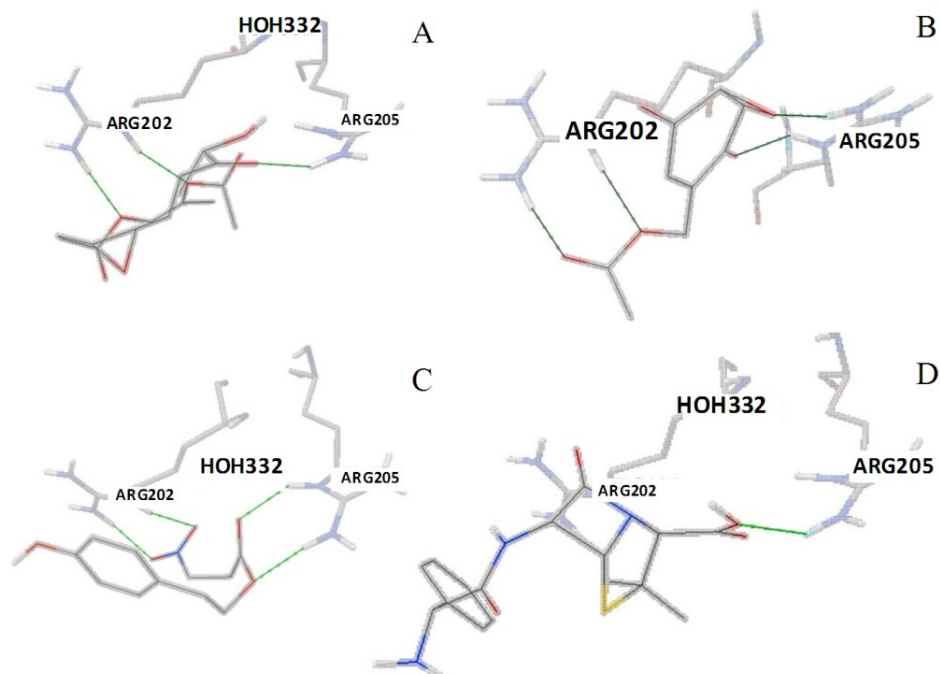
jedinjenja 7 i fomonitroestra, dok su 3 potencijalne vodonične veze formirane između jedinjenja 325-5 i aminokiselina ARG202 i ARG205 na 1SHV receptoru.

**Tabela 4-19** Ekstrahovani eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1SHV receptorom.

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije $K_i$ ( $\mu$ M)	RMSD ( $\text{\AA}$ )	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
Ampicilin	-1,90	40320	5,08	ARG205
Jedinjenje 325-3	0,33	N.A.	7,26	ARG205
Jedinjenje 325-5	-1,79	48870	5,65	ARG202 ARG205
Kurvularid A	-0,41	497240	5,07	ARG202
Kurvularid B	-0,92	210410	7,41	ARG202 ARG205
Kurvularid C	0,75	N.A.	4,74	Bez potencijala za formiranje vodonične veze
Kurvularid D	-1,57	70350	6,97	ARG202 ARG205
Kurvularid E	-1,27	116590	5,05	ARG202 ARG205
Fomoenamid	-1,78	49500	6,51	GLU92
Jedinjenje 6	-2,48	15230	7,48	ARG202 ARG205
Jedinjenje 7	-2,85	8100	5,97	ARG202 ARG205
Fomol	-0,55	395820	5,28	ARG202 ARG205
Fomonitroestar	-2,67	11060	7,46	ARG202 ARG205

Generalno je primećen niži potencijal vezivanja u slučaju *dokinga* svih testiranih liganda sa 1SHV receptorom u poređenju sa 1F0K i 3G7B receptorima. Takođe, dodatno je zabeležen niži potencijal vezivanja u slučaju *dokinga* svih testiranih liganda sa 1SHV receptorom u poređenju sa 1F0K i 3G7B receptorima. Ipak, najveći afinitet za 1SHV receptor uočen je za jedinjenje 7 praćeno fomonitroestrom, ampicilinom i jedinjenjem 325-5. Budući da je potencijal za

formiranje svih vodoničnih veza sa aminokiselinama receptora 1SHV na pozicijama ARG202 i ARG205, dolazi se do zaključka da je receptorski džep za vezivanje unutar receptora isti za sve ligande (Slika 4-24).



**Slika 4-24** *Doking koformacija liganada 325-5 (A), jedinjenja 7 (B), fomonitroestra (C) i ampicilina (D) sa 1SHV vezujućim mestu na receptoru. Prikazan je samo deo receptora sa reziduama aminokiselina preko kojih se ostvaruje interakcija sa ligandima. Potencijal za formiranje ključnih vodoničnih veza između rezidua aminokiselina u receptorskom džepu za vezivanje i liganada naglašene su zelenom bojom.*

Prilikom *doking* simulacija sa receptorom 3VSL, sva ispitivana jedinjenja su pokazala slabiji potencijal za interakciju sa receptorom (Tabela 7-5). Nijedno od ispitivanih jedinjenja nije pokazalo potencijal za formiranje vodoničnih veza, takođe su zabeležene visoke vrednosti slobodne energije vezivanja upućujući na slab potencijal za bilo koju interakciju sa receptorom, pa se stoga konstanta inhibicije nije mogla izračunati. Evidentiran je sličan nedostatak potencijala interakcije svih ispitivanih jedinjenja sa 4EMV, 1JIJ, 1KZN i 3K3P receptorima (Tabela 7-6 do 7-9 u sklopu dodatnih materijala). Prema dobijenim podacima, može se zaključiti da nijedno od ispitivanih jedinjenja ne stupa u interakciju sa pomenutim receptorima (3VSL, 4EMV, 1JIJ, 1KZN i 3K3P).

## 4.8 QSAR studije primenom pristupa baziranom na receptoru

Rezultati izvedenih studija molekuskog *docking*-a ukazali su na najvažnije interakcije između izabranih liganada i receptora. Na osnovu poređenja rezultata dobijenih za bioaktivne molekule poreklom iz endofitnih gljiva sa rezultatima dobijenim nakon *docking* eksperimenata sa poznatim antimikrobnim agensima (referentnim antibioticima), može se ukazati na potencijal biomolekula da ostvari željeno delovanje u *in vitro* ili *in vivo* uslovima. Direktnom analizom vrednosti energije vezivanja koja se javlja u toku interakcije između liganda i receptora, može se procenjivati terapijska efikasnost potencijalnog novog leka, kao i najverovatniji mehanizam antimikrobnog delovanja. Međutim, da bi značaj rezultata *docking* studija dobio dodatno na svom značaju, nagrađeni su QSAR modeli primenom pristupa baziranom na receptoru (eng. *receptor-based*) sa ciljem pouzdanog predviđanja afiniteta vezivanja biomolekula za određeni tip receptora. Iz sprovedenih *docking* studija na 3 reprezentativna receptora (1F0K - 1,9 Å transferaza *Escherichia coli*, 3G7B - *Staphylococcus aureus* giraza B i 1SHV - β-laktamaza *Klebsiella pneumoniae*), iskorišćeno je 10 parametara koji opisuju prirodu interakcije biomolekula sa receptorima (efikasnost liganda, konstanta inhibicije, intermolarna energija, *VdW HB* desolvatacijska energija, elektrostatička energija, ukupna interna energija, torziona energija, nevezana energija, *refRMS* i broj vodoničnih veza). Njima su pridruženi molekularni deskriptori 12 jedinjenja (325-3, 325-5, kurvularidi A-E, jedinjenja 6 i 7, fomol, fomoenamid i fomonitroestar) koji opisuju fizičko-hemijske karakteristike molekula i njihovu sklonost za stupanje u reakcije kao što su particioni koeficijent *logP*, molekulska težina i molekularni volumen koji opisuju tendencije ka hidrofobnim interakcijama, zatim kvantum hemijski deskriptori poput energije najviše okupirane molekulske orbitale (*EHOMO*), energije najniže neokupirane molekulske orbitale (*ELUMO*), indeksa elektrofilnosti ( $\omega$ ), hemijske tvrdoće molekula ( $\eta$ ), hemijske mekoće molekula (*S*) i hemijskog potencijala ( $\mu$ ), kao i drugi molekularni deskriptori koji karakterišu sklonost molekula ka građenju vodoničnih veza, stupanje u elektron donorske i akceptorske interakcije i elektrostatičke interakcije [238]. Prilikom izračunavanja molekularnih deskriptora, molekuli su najpre prevedeni u konformacije koje su sadržale minimum energije primenom MOPAC/AM1 metode u *Chem 3D Ultra 7.0.0* programu, zatim su molekularni deskriptori izračunavani pomoću *Marvin Sketch 4.1.13* i *Chem 3D Ultra 7.0.0* programa (Tabele 4-20, 4-21 i 4-22 za tri receptora 1F0K, 3G7B i 1SHV redom). Baza podataka pomoću koje je vršeno modelovanje sadržala je ukupno 37 parametara koji su predstavljali

ulazne podatke, dok je afinitet vezivanja za receptor bio izlazni podatak. QSAR modeli su građeni pomoću algoritma mašinskog učenja baziranog na veštačkim neuronskim mrežama (ANN). Za potrebe građenja mreža, početni set podataka je podeljen na 3 dela za potrebe treniranja, validacije i testiranja mreže. Tokom treniranja kroz 1000 epoha, parametri mreže su optimizovani tako da se postignu najniže moguće vrednosti greške (eng. *Root mean square error*, RMSE) za trening i validacioni set podataka. Dobijene su 3 pojedinačne mreže za svaki od 3 izabrana receptora, koje su se sastojale od više slojeva (ulazni, skriveni sa sa različitim neurona i izlazni sloj). Mreže su trenirane algoritmom povratnog prolaska greške.

Veštačku neuronsku mrežu za predviđanje vezivanja biomolekula za receptor 1F0K karakteriše topologija 37-19-1, stopa učenja (eng. *learning rate*) 0,3, momentum 0,05, RMSE za trening, validacioni i test set podataka redom 0,7321, 1,521 i 1,679 i koeficijent korelacije za trening, validacioni i test set podataka redom 0,9998, 0,9981 i 0,9924. Topologija veštačke neuronske mreže koja služi da predviđa vezivanje biomolekula za 3G7B receptor bila je 37-19-1, imala je stopu učenja podešenu na 0,3 i momentum na 0,01. RMSE za trening, validacioni i test set podataka za ovu mrežu su iznosile 0,3034, 1,751 i 1,737, redom, a vrednost koeficijenta korelacije između vrednosti vezivanja ligand-receptor dobijenih iz *docking* studija i onih koje predviđa mreža za trening, validacioni i test set podataka iznosio je 0,9999, 0,9433 i 0,8034, tim redom. Veštačka neuronska mreža za predviđanje vezivanja biomolekula za receptor 1SHV imala je sledeće karakteristike: topologija 37-9-1, stopa učenja 0,55, momentum 0,02, RMSE za trening, validacioni i test set podataka redom 0,5176, 1,614 i 1,527 i koeficijent korelacije za trening, validacioni i test set podataka redom 0,9227, 0,8589 i 0,9822.

U svim ANN-QSAR modelima, niske vrednosti greške za trening i validacioni set podataka, vrednosti koeficijenta korelacije što bliže 1 i niska vrednost greške za test set podataka, ukazuju na to da nagrađeni model ima dobru sposobnost predviđanja. Svi nagrađeni modeli mogu poslužiti za predviđanje bioaktivnosti serije molekula strukturno srodnih biomolekulima iz korišćenog seta podataka, a koji potencijalno mogu nastati usled prirodnih varijacija u uslovima okruženja u kojima se endofitna gljiva razvija i/ili kultiviše, kao i optimizacijom strukture putem sinteze derivata poznatih biomolekula.

**Tabela 4-20 QSAR eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1F0K receptorom**

Ligand	Efikasnost liganda	Konstanta inhibicije	Intermolarna energija	VdW HB desolvaciona E	Elektrostatika energija	Ukupna interna energija	Torziona energija	Nevezana energija	ref RMS	Broj vodoničnih veza	Polarizabilnost	Polarna površina	NHBD	NHBA	logP	Refraktivnost	VDV volumen	Min projekcijski radijus	Max projekcijski radijus
Jedinjenje 325-3	0,23	172,04	8,42	7,94	0,48	2,30	3,28	2,30	3,72	3	31,57	96,36	2	5	0,82	82,09	288,11	5,30	7,91
Jedinjenje 325-5	0,22	313,49	7,76	7,35	0,41	1,14	2,98	1,14	3,72	4	31,03	93,20	1	5	1,44	81,32	281,56	5,08	7,98
Kurvularid A	-0,20	324,52	-9,23	-9,02	-0,21	-2,48	4,47	-2,48	6,17	4	37,35	110,02	5	5	1,02	95,25	358,73	6,24	7,64
Kurvularid B	-0,18	994,76	-7,68	-7,54	-0,14	-1,85	3,58	-1,85	6,79	1	36,06	82,09	3	4	2,18	91,74	338,42	4,64	9,88
Kurvularid C	-0,20	361,64	-8,87	-8,52	-0,35	-2,97	4,18	-2,97	4,74	2	38,55	89,79	4	4	2,40	98,28	367,34	5,44	8,95
Kurvularid D	-0,21	334,92	-8,02	-8,08	0,06	-0,81	3,28	-0,81	6,42	1	35,51	78,93	2	4	2,38	90,72	331,77	4,79	8,41
Kurvularid E	-0,21	343,80	-7,71	-7,52	-0,19	-1,79	2,98	-1,79	4,90	2	39,74	78,79	3	4	2,74	101,02	374,03	4,92	8,94
Jedinjenje 6	-0,35	1,43	-4,48	-4,37	-0,11	-0,27	0,60	-0,27	7,35	2	13,53	66,90	1	4	-0,49	35,26	121,51	3,59	4,63
Jedinjenje 7	-0,33	454,39	-5,45	-4,97	-0,48	-0,18	0,89	-0,18	5,83	2	17,39	72,97	0	4	-0,05	44,41	158,07	3,93	5,63
Fomol	-0,20	60,52	-9,33	-9,14	-0,19	-4,48	3,58	-4,48	3,26	3	34,31	113,29	3	5	1,26	87,30	322,12	5,27	6,95
Fomoenamid	-0,25	227,74	-7,65	-7,38	-0,27	-2,25	2,68	-2,25	4,46	3	29,97	98,66	4	4	0,08	76,74	286,52	4,60	7,90
Fomonitoroestar	-0,28	296,63	-7,20	-5,96	-1,24	-0,33	2,39	-0,33	5,89	2	22,90	89,67	1	4	1,60	58,49	209,35	4,33	7,43

Ligand	Masa	MW	Energija formacije	VdW 1,4 energija	Ukupna energija	Energija torzije	Energija savijanja i istezanja	Energija istezanja	Ne-VdW 1,4 energija	Dipol-dipol	Energija savijanja	Ovalnost	Hemijski potencijal	Hemijska tvrdoća	Indeks elektrofilnosti	Hemijska mekoća	LUMO	HOMO	Energija vezivanja
	Jedinjenje 325-3	310,14	310,35	-856,12	10,76	25,00	6,91	0,01	1,29	-7,04	5,25	7,83	1,55	-7,45	3,46	8,01	0,29	62	61
Jedinjenje 325-5	308,13	308,33	-811,19	11,44	21,44	7,66	0,02	1,27	-10,40	2,38	9,08	1,44	-7,91	3,15	9,94	0,32	61	60	4,78
Kurvularid A	345,25	345,47	-1053,91	12,65	15,35	8,23	0,64	2,30	-8,87	-4,35	4,76	1,59	-6,95	4,82	5,01	0,21	72	71	-4,76
Kurvularid B	327,24	327,46	-799,72	12,09	24,36	14,41	0,25	1,71	-5,78	-4,12	5,81	1,60	-6,99	4,82	5,06	0,21	68	67	-4,10
Kurvularid C	343,27	343,50	-922,32	14,62	19,98	8,88	0,64	2,58	-7,39	-4,30	4,94	1,59	-6,94	4,87	4,94	0,21	72	71	-4,70
Kurvularid D	325,23	325,44	-754,79	11,23	21,56	12,81	0,16	1,55	-5,17	-4,62	5,61	1,61	-6,89	4,75	4,99	0,21	67	66	-4,74
Kurvularid E	355,27	355,51	-856,61	13,35	42,84	16,57	0,75	3,21	-5,16	-3,55	17,67	1,54	-6,73	4,70	4,82	0,21	74	73	-4,73
Jedinjenje 6	154,03	154,12	-561,69	3,84	13,38	2,55	-0,16	0,49	-1,65	5,29	3,02	1,28	-9,26	1,90	22,62	0,53	30	29	-3,88
Jedinjenje 7	196,04	196,16	-768,02	7,69	20,03	0,42	-0,01	0,81	-1,03	7,92	4,24	1,40	-9,25	1,94	22,10	0,52	38	37	-4,56
Fomol	342,17	342,38	-1344,55	17,23	17,52	-0,17	0,74	2,41	-11,35	0,85	7,81	1,51	-7,61	4,19	6,92	0,24	69	68	-5,75
Fomoenamid	286,19	286,37	-765,07	9,93	-4,04	6,29	0,22	0,93	-13,42	-11,67	3,68	1,48	-5,75	5,27	3,14	0,19	59	58	-4,97
Fomonitroestar	239,08	239,22	-748,41	8,57	5,37	-8,01	0,21	0,65	-2,21	2,76	2,52	1,51	-6,63	5,57	3,94	0,18	47	46	-4,81

Tabela 4-21 QSAR eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3G7B receptorom

Ligand	Efikasnost liganda	Konstanta inhibicije	Intermolarna energija	VdW HB desolvaciona E	Elektrostatička energija	Ukupna interna energija	Torziona energija	Nevezana energija	ref RMS	Broj vodoničnih veza	Polarizabilnost	Polarna površina	NHBD	NHBA	logP	Refraktivnost	VDV volumen	Min projekcijski radijus	Max projekcijski radijus
Jedinjenje 325-3	-0,24	135,56	-8,55	-7,83	-0,72	-2,26	3,28	-2,26	5,04	4	31,57	96,36	2	5	0,82	82,09	288,11	5,30	7,91
Jedinjenje 325-5	-0,21	425,42	-7,58	-7,42	-0,16	-1,58	2,98	-1,58	3,92	3	31,03	93,20	1	5	1,44	81,32	281,56	5,08	7,98
Kurvularid A	-0,11	12,93	-7,05	-6,30	-0,75	-3,36	4,47	-3,36	4,21	4	37,35	110,02	5	5	1,02	95,25	358,73	6,24	7,64
Kurvularid B	-0,19	632,03	-7,94	-7,31	-0,64	-1,85	3,58	-1,85	3,98	3	36,06	82,09	3	4	2,18	91,74	338,42	4,64	9,88
Kurvularid C	-0,13	4,44	-7,39	-6,72	-0,67	-0,62	4,18	-0,62	4,50	3	38,55	89,79	4	4	2,40	98,28	367,34	5,44	8,95
Kurvularid D	-0,20	495,24	-7,79	-7,63	-0,16	-1,24	3,28	-1,24	4,19	3	35,51	78,93	2	4	2,38	90,72	331,77	4,79	8,41
Kurvularid E	-0,19	532,45	-7,45	-7,36	-0,09	-1,01	2,98	-1,01	4,15	2	39,74	78,79	3	4	2,74	101,02	374,03	4,92	8,94
Jedinjenje 6	-0,34	1,79	-4,35	-4,08	-0,27	0,05	0,60	0,05	6,72	3	13,53	66,90	1	4	-0,49	35,26	121,51	3,59	4,63
Jedinjenje 7	-0,30	838,08	-5,09	-4,83	-0,26	0,15	0,89	0,15	4,80	2	17,39	72,97	0	4	-0,05	44,41	158,07	3,93	5,63
Fomol	-0,13	1,80	-7,32	-7,14	-0,19	-3,51	3,58	-3,51	4,89	2	34,31	113,29	3	5	1,26	87,30	322,12	5,27	6,95
Fomoenamid	-0,23	397,98	-7,32	-6,76	-0,56	-2,44	2,68	-2,44	3,27	4	29,97	98,66	4	4	0,08	76,74	286,52	4,60	7,90
Fomonitoroestar	-0,23	1,44	-6,26	-6,25	-0,01	-0,41	2,39	-0,41	6,80	4	22,90	89,67	1	4	1,60	58,49	209,35	4,33	7,43



Ligand	Masa	MW	Energija formacije	VdW 1,4 energija	Ukupna energija	Energija torzije	Energija savijanja i istezanja	Energija istezanja	Ne-VdW 1,4 energija	Dipol-dipol	Energija savijanja	Ovalnost	Hemijski potencijal	Hemijska tvrdoća	Indeks elektrofilnosti	Hemijska mekoća	LUMO	HOMO	Energija vezivanja
Jedinjenje 325-3	310,14	310,35	-856,12	10,76	25,00	6,91	0,01	1,29	-7,04	5,25	7,83	1,55	-7,45	3,46	8,01	0,29	62	61	-5,27
Jedinjenje 325-5	308,13	308,33	-811,19	11,44	21,44	7,66	0,02	1,27	-10,40	2,38	9,08	1,44	-7,91	3,15	9,94	0,32	61	60	-4,60
Kurvularid A	345,25	345,47	-1053,91	12,65	15,35	8,23	0,64	2,30	-8,87	-4,35	4,76	1,59	-6,95	4,82	5,01	0,21	72	71	-2,58
Kurvularid B	327,24	327,46	-799,72	12,09	24,36	14,41	0,25	1,71	-5,78	-4,12	5,81	1,60	-6,99	4,82	5,06	0,21	68	67	-4,36
Kurvularid C	343,27	343,50	-922,32	14,62	19,98	8,88	0,64	2,58	-7,39	-4,30	4,94	1,59	-6,94	4,87	4,94	0,21	72	71	-3,21
Kurvularid D	325,23	325,44	-754,79	11,23	21,56	12,81	0,16	1,55	-5,17	-4,62	5,61	1,61	-6,89	4,75	4,99	0,21	67	66	-4,51
Kurvularid E	355,27	355,51	-856,61	13,35	42,84	16,57	0,75	3,21	-5,16	-3,55	17,67	1,54	-6,73	4,70	4,82	0,21	74	73	-4,47
Jedinjenje 6	154,03	154,12	-561,69	3,84	13,38	2,55	-0,16	0,49	-1,65	5,29	3,02	1,28	-9,26	1,90	22,62	0,53	30	29	-3,75
Jedinjenje 7	196,04	196,16	-768,02	7,69	20,03	0,42	-0,01	0,81	-1,03	7,92	4,24	1,40	-9,25	1,94	22,10	0,52	38	37	-4,20
Fomol	342,17	342,38	-1344,55	17,23	17,52	-0,17	0,74	2,41	-11,35	0,85	7,81	1,51	-7,61	4,19	6,92	0,24	69	68	-3,74
Fomoenamid	286,19	286,37	-765,07	9,93	-4,04	6,29	0,22	0,93	-13,42	-11,67	3,68	1,48	-5,75	5,27	3,14	0,19	59	58	-4,64
Fomonitroestar	239,08	239,22	-748,41	8,57	5,37	-8,01	0,21	0,65	-2,21	2,76	2,52	1,51	-6,63	5,57	3,94	0,18	47	46	-3,88

**Tabela 4-22** *QSAR eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa ISHV receptorom*

Ligand	Efikasnost liganda	Konstanta inhibicije	Intermolarna energija	VdW HB desolvaciona E	Elektrostatička energija	Ukupna interna energija	Torziona energija	Nevezana energija	ref RMS	Broj vodoničnih veza	Polarizabilnost	Polarna površina	NHBD	NHBA	logP	Refraktivnost	VDV volumen	Min projekcijski radijus	Max projekcijski radijus
Jedinjenje 325-3	0,02	N.A.	2,95	2,86	0,09	4,75	3,28	4,75	7,26	1	31,57	96,36	2	5	0,82	82,09	288,11	5,30	7,91
Jedinjenje 325-5	0,08	48,87	4,77	4,40	0,37	2,19	2,98	2,19	5,64	3	31,03	93,20	1	5	1,44	81,32	281,56	5,08	7,98
Kurvularid A	-0,02	497,24	-4,89	-4,68	-0,21	-5,60	4,47	-5,60	5,07	1	37,35	110,02	5	5	1,02	95,25	358,73	6,24	7,64
Kurvularid B	-0,04	210,41	-4,50	-4,21	-0,29	-1,96	3,58	-1,96	7,41	3	36,06	82,09	3	4	2,18	91,74	338,42	4,64	9,88
Kurvularid C	0,03	N.A.	-3,43	-3,29	-0,14	-5,10	4,18	-5,10	4,74	0	38,55	89,79	4	4	2,40	98,28	367,34	5,44	8,95
Kurvularid D	-0,07	70,35	-4,85	-4,47	-0,38	-2,01	3,28	-2,01	6,97	2	35,51	78,93	2	4	2,38	90,72	331,77	4,79	8,41
Kurvularid E	-0,06	116,59	-4,26	-3,90	-0,36	-2,87	2,98	-2,87	5,05	3	39,74	78,79	3	4	2,74	101,02	374,03	4,92	8,94
Jedinjenje 6	-0,23	15,23	-3,08	-2,75	-0,33	-0,41	0,60	-0,41	7,48	2	13,53	66,90	1	4	-0,49	35,26	121,51	3,59	4,63
Jedinjenje 7	-0,20	8,10	-3,75	-3,43	-0,32	-0,21	0,89	-0,21	5,97	4	17,39	72,97	0	4	-0,05	44,41	158,07	3,93	5,63
Fomol	0,02	395,82	-4,13	-3,89	-4,13	-4,47	3,58	-4,47	5,28	2	34,31	113,29	3	5	1,26	87,30	322,12	5,27	6,95
Fomoenamid	-0,09	49,50	-4,47	-4,13	-0,33	-4,23	2,68	-4,23	6,51	1	29,97	98,66	4	4	0,08	76,74	286,52	4,60	7,90
Fomonitoroestar	-0,16	11,06	-5,06	-3,70	-1,35	-0,57	2,39	-0,57	7,46	4	22,90	89,67	1	4	1,60	58,49	209,35	4,33	7,43

Ligand	Masa	MW	Energija formacije	VdW 1,4 energija	Ukupna energija	Energija torzije	Energija savijanja i istezanja	Energija istezanja	Ne-VdW 1,4 energija	Dipol-dipol	Energija savijanja	Ovalnost	Hemijski potencijal	Hemijska tvrdoća	Indeks elektrofilnosti	Hemijska mekoća	LUMO	HOMO	Energija vezivanja
Jedinjenje 325-3	310,14	310,35	-856,12	10,76	25,00	6,91	0,01	1,29	-7,04	5,25	7,83	1,55	-7,45	3,46	8,01	0,29	62	61	0,33
Jedinjenje 325-5	308,13	308,33	-811,19	11,44	21,44	7,66	0,02	1,27	-10,40	2,38	9,08	1,44	-7,91	3,15	9,94	0,32	61	60	1,79
Kurvularid A	345,25	345,47	-1053,91	12,65	15,35	8,23	0,64	2,30	-8,87	-4,35	4,76	1,59	-6,95	4,82	5,01	0,21	72	71	-0,41
Kurvularid B	327,24	327,46	-799,72	12,09	24,36	14,41	0,25	1,71	-5,78	-4,12	5,81	1,60	-6,99	4,82	5,06	0,21	68	67	-0,92
Kurvularid C	343,27	343,50	-922,32	14,62	19,98	8,88	0,64	2,58	-7,39	-4,30	4,94	1,59	-6,94	4,87	4,94	0,21	72	71	0,75
Kurvularid D	325,23	325,44	-754,79	11,23	21,56	12,81	0,16	1,55	-5,17	-4,62	5,61	1,61	-6,89	4,75	4,99	0,21	67	66	-1,57
Kurvularid E	355,27	355,51	-856,61	13,35	42,84	16,57	0,75	3,21	-5,16	-3,55	17,67	1,54	-6,73	4,70	4,82	0,21	74	73	-1,27
Jedinjenje 6	154,03	154,12	-561,69	3,84	13,38	2,55	-0,16	0,49	-1,65	5,29	3,02	1,28	-9,26	1,90	22,62	0,53	30	29	-2,48
Jedinjenje 7	196,04	196,16	-768,02	7,69	20,03	0,42	-0,01	0,81	-1,03	7,92	4,24	1,40	-9,25	1,94	22,10	0,52	38	37	-2,85
Fomol	342,17	342,38	-1344,55	17,23	17,52	-0,17	0,74	2,41	-11,35	0,85	7,81	1,51	-7,61	4,19	6,92	0,24	69	68	-0,55
Fomoenamid	286,19	286,37	-765,07	9,93	-4,04	6,29	0,22	0,93	-13,42	-11,67	3,68	1,48	-5,75	5,27	3,14	0,19	59	58	-1,78
Fomonitroestar	239,08	239,22	-748,41	8,57	5,37	-8,01	0,21	0,65	-2,21	2,76	2,52	1,51	-6,63	5,57	3,94	0,18	47	46	-2,67

## **5 ZAKLJUČAK**

Prirodni proizvodi imaju ogroman potencijal u razvoju i otkrivanju novih lekova u farmaceutskoj industriji. Godinama su napori usmeravani na istraživanje terapeutskog potencijala biljaka, međutim danas su endofitne gljive prepoznate kao novi podjednako dragocen prirodni izvor aktivnih molekula. Proizvodnja bioaktivnih sekundarnih metabolita endofitnih gljiva je pod uticajem širokog spektra faktora koji se odnose na tip biljnog domaćina, klimatske uslove, nutritivne faktore, prisustvo drugih mikroorganizama u istom okruženju, itd.

U okviru doktorske disertacije istaknuta je relevantnost pomenutih varijabilnosti kao i sličnosti ili različitosti u profilu antimikrobne aktivnosti endofitnih gljiva. Iako je analiza glavnih komponenti (PCA) isključivo bila korišćena za prepoznavanje obrazaca u definisanom skupu podataka, detaljna analiza PCA ishoda i dijagrama rezultata otkrila je tri glavne grupe endofita među kojima učesnici prate slične i specifične trendove ispoljavanja bioaktivnosti. Ovo vredno saznanje može biti od pomoći u svim daljim istraživanjima endofitnih gljiva jer pruža pouzdano predznanje o antimikrobnom potencijalu endofitnih vrsta. Na osnovu rezultata PCA analize i rasprostranjenosti u PCA dijagramima istaknut je veoma obećavajući antibakterijski karakter vrsta *Phomopsis* kao i perspektiva te vrste endofita u terapijskoj upotrebi kao antifungalnih agenasa. Zaključeno je da je proizvodnja biomolekula *Phomopsis* endofitnih vrsta i njihov potencijal kao antimikrobnih agenasa obećavajući i relativno stabilan u uslovima koji su ispitivani, i da stoga biomolekule *Phomopsis* endofitnih vrsta imaju potvrđen neophodan preduslov za dalja farmaceutska istraživanja.

Izvršena je uspešna optimizacija hromatografskih uslova za analizu tankoslojne hromatografije za grupu od 3 analita koji potiču od različitih ekstrakata endofitne gljive *Phomopsis species*. Sa ciljem optimizacije relativno velikog broja eksperimenata i identifikacije najznačajnijih eksperimentalnih faktora i njihovih međusobnih interakcija, upotrebljena je metoda eksperimentalnog dizajna. Sudeći po preliminarnim rezultatima, identifikovana su dva faktora kao statistički najznačajnija, pa su posledično varirana u predloženom opsegu: udeo metanola (60 – 80 %, v/v) u mobilnoj fazi i udeo amonijum-hidroksida (4 – 6 %, v/v) u mobilnoj fazi. Hromatografska separacija je postignuta na TLC silika gel pločicama 60 RP-18 F254. Najviši udeo amonijum-hidroksida od 6 % v/v je identifikovan kao najoptimalniji u procesu razdvajanja mrlja. Nasuprot tome, udeo metanola u opsegu od 60 do 80 % nije pokazao značajniji uticaj. Najizraženiji afinitet za baznu hidrofilnu mobilnu fazu je pokazao analit 1, potom sledi analit

3, dok je najmanji afinitet za baznu hidrofilnu mobilnu fazu je pokazao analit 2. Predložena TLC metoda se nakon postupka validacije takođe može koristiti za razdvajanje i analizu ekstrakata endofitnih gljiva kao i za određivanje sastava potencijalno biološki aktivnih sekundarnih metabolita. Takođe nakon razdvajanja je moguće i testiranje bioaktivnosti analita procesom takozvane direktne TLC bioautografije (TLC-DB).

U toku procesa razvoja lekova u ranoj fazi istraživanja se praktikuje određivanje i modulisanje fizičko-hemijskih parametara aktivnih molekula, među kojima lipofilnost pokazuje najbolju korelaciju sa biološkom raspoloživošću i aktivnošću. Lipofilnost jedinjenja se može iskazivati kroz niz izvedenih parametara, koji se mogu dobiti eksperimentalno ili pomoću različitih kompjuterskih programa i alata. Potvrđeno je da je reverzno-fazna tankoslojna hromatografija (RP-TLC) praktična i efikasna metoda za razdvajanje analita, kao i za određivanje različitih deskriptora lipofilnosti na osnovu njihovog ponašanja u hromatografskom sistemu.

Jedinjenja sa potvrđenom antimikrobnom aktivnošću koja su izolovana iz endofita *Phomopsis sp.* prepoznati su kao potencijalni novi aktivni principi, stoga su određeni različiti parametri lipofilnosti nakon hromatografskog razvijanja. U dodatnom istraživanju separacija analita 1 i 2 iz ekstrakta endofita je postignuta metodom tankoslojne hromatografije na TLC silica gel 60 RP-18 F254 pločama, pri konstantnom zapreminskom udelu amonijum-hidroksida od 5 % (v/v) i različitom udelu metanola od 60 do 80 % (v/v) u mobilnoj fazi. Takođe, evaluacija procesa separacije je urađena u poređenju sa poznatim antibioticima: hloramfenikol, ciprofloksacin, ofloksacin i sulfacetamid-natrijum.

Generalno je primećeno da smanjenje zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi utiče na povećanje afiniteta prema stacionarnoj fazi za ispitivana jedinjenja 1 i 2, kao i kontrolnih antibiotika iz endofitnog ekstrakta *Phomopsis species*. Na osnovu parametara  $R_M$  i  $C_O$  se može zaključiti da uzorak ekstrakta endofita koji sadrži jedinjenje 2 pokazuje niže parametre lipofilnosti u odnosu na uzorak endofita koji sadrži jedinjenje 1. Ovi parametri lipofilnosti su komparabilni sa lipofilnošću hloramfenikola i viši od ostalih ispitivanih standarda (ofloksacina, ciprofloksacina i sulfacetamid natrijuma). Parametar  $R_M^O$  je viši za jedinjenje 1 u odnosu na jedinjenje 2 iz uzorka i svih ispitivanih standardnih supstanci, čime je potvrđeno da jedinjenje 1 pokazuje najbolje retenciono ponašanje u korišćenoj mobilnoj fazi. Na osnovu poređenja specifičnih parametara lipofilnosti ( $R_f$ ,  $R_M$  i  $R_M^O$ ) i visokog afiniteta za stacionarnu fazu, može

se zaključiti da ispitivani analiti pokazuju visoke i komparabilne vrednosti lipofilnosti sa referentim antibioticima, što ukazuje na njihovu potencijalno visoku bioraspoloživost ispitivanih aktivnih jedinjenja u organizmu

Određen je antibiotski potencijal endofitne gljive *Phomopsis species*, izolovane iz iglica četinara, prema bakterijama *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Istraživana su dominantna jedinjenja koja su potencijalno odgovorna za antimikrobnu aktivnost. Na osnovu njihove antimikrobne aktivnosti i jedinstvenih strukturnih obeležja u poređenju sa već poznatim lekovima iz iste terapijske kategorije, okarakterisana su dva dominantna jedinjenja (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-3,4-dihidroksipent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat (označen kao jedinjenje 325-3) i (Z)-(Z)-2-acetoksiprop-1-en-1-il-3-(3-((E)-4-hidroksi-3-oksopent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat (označen kao jedinjenje 325-5). Takođe, na osnovu svojih specifičnih svojstava, ovi biomolekuli bi mogli da služe kao vodeće strukture za buduće otkriće antibiotskih lekova. Evaluacija odnosa između hemijske strukture i intenziteta antibakterijske aktivnosti može da služi kao smernica za razvoj nove serije derivata i dalje poboljšanje njihove bioaktivnosti.

Istraživanje novih lekova i njihovo dizajniranje se zasniva na ispitivanju njihove biološke aktivnosti, međutim takođe je veoma važno generisati podatke o toksičnim i farmakokinetičkim osobinama leka. Sa stanovišta etike, postoji težnja da se podaci o toksičnim i farmakokinetičkim osobinama leka dobijaju upotrebom *in silico* metoda.

Kao nastavak istraživanja aktivnosti sekundarnih metabolita endofitne gljive *Phomopsis species* poreklom iz četine četinara na teritoriji Slovenije izvršena je *in silico* procena toksikoloških i farmakokinetičkih parametara.

Glavni faktor za procenu lipofilnosti  $\log P$  (logaritam podeonog koeficijenta) sekundarnih metabolita sa potvrđenom aktivnošću protiv Gram negativnih (*Escherichia coli*) i Gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus*) bakterija izračunat je korišćenjem programa *MarvinSketch 4.1.13*. Dodatno su vrednosti *in silico* deskriptora za pravilo Lipinskog kao i za Ghose pravilo izračunati primenom programa *SwissADME*. Volumen distribucije, Veber-ovo pravilo, toksikološki parametri kao i procenat vezivanja jedinjenja za proteine plazme su izračunati upotrebom softverskog paketa *ACD/i-lab*.

Na osnovu dobijenih rezultata je potvrđeno da aktivne molekule izolovane iz ekstrakta endofitnih gljiva ispunjavaju kriterijume definisane pravilom Lipinskog. Zato se može zaključiti da se ispitivani aktivni sekundarni metaboliti iz ekstrakta *Phomopsis species* mogu dobro apsorbovati kroz intestinalnu sluznicu, pošto dobijene niske vrednosti ukazuju na mogućnost brze apsorpcije. Dobijene su srednje vrednosti za volumen distribucije aktivnih jedinjenja, stoga se može pretpostaviti da ispitivana jedinjenja nemaju tendenciju da se akumuliraju u masnom tkivu pacijenta. Takođe se može zaključiti da ispitivana jedinjenja iz ekstrakta *Phomopsis species*, koji su takođe potencijalni kandidati za lek, imaju srednji afinitet vezivanja za proteine plazme. Dodatno je primećeno da se toksičnost ispitivanih jedinjenja ne razlikuje znatno u poređenju sa referentnim antibioticima koji su bili ispitivani kao standardna kontrola.

Kao nastavak *in vitro* eksperimenata za antimikrobnu procenu, razdvajanje i karakterizaciju biomolekula endofitnih gljiva, predložen je *in silico* molekularni *docking* sa ciljem ulaganja dodatnih napora za pouzdano prepoznavanje koje aktivne strukture mogu poslužiti kao vodeće molekule za dalje otkriće antibiotika *in silico* metodama. U okviru ovog istraživanja, ispitivane su interakcije između seta od dvanaest jedinjenja i njihovih potencijalnih ciljanih receptora. Prema kriterijumima za ocenjivanje *docking* simulacija koji su uključivali, vrednost slobodne energije vezivanja, konstante inhibicije, RMSD vrednosti i potencijala za uspostavljanje vodoničnih veza sa receptorom, zaključeno je da najveći potencijal za *docking* interakciju zapažen u slučaju 3G7B, 1F0K i 1SHV receptora lociranih na patogenima *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Rezultati iz ovog *docking* istraživanja sugerišu da strukturne sličnosti kao i neka specifična svojstva jedinjenja 325-3, 325-5, fomoenamida i fomola se u budućnosti mogu koristiti kao smernice za dalji razvoj njihovih derivata kao novih antibiotika sa snažnim delovanjem širokog spektra. Osim toga, ova otkrića mogu ukazati na to kako izvršiti dalju optimizaciju proizvodnje biomolekula iz endofitnih gljivama i/ili efikasniju obradu prikupljenog biomaterijala. Pored toga, ispitivana jedinjenja bi mogla da ispoljavaju i drugačije mehanizme delovanja i interaguju i sa drugim receptorima.

Rezultati izvedenih studija molekulskog *docking*-a ukazali su na najvažnije interakcije između izabranih liganada i receptora. Na osnovu pređenja rezultata dobijenih za bioaktivne molekule poreklom iz endofitnih gljiva sa rezultatima dobijenim nakon *docking* eksperimenata sa



poznatim antimikrobnim agensima (referentnim antibioticima), može se ukazati na potencijal biomolekula da ostvari željeno delovanje u *in vitro* ili *in vivo* uslovima. Direktnom analizom vrednosti energije vezivanja koja se javlja u toku interakcije između liganda i receptora, može se procenjivati terapijska efikasnost potencijalno novog leka, kao i najverovatniji mehanizam antimikrobnog delovanja. Međutim, kako bi značaj rezultata *docking* studija dobio dodatno na svom značaju, nagrađeni su QSAR modeli primenom pristupa baziranom na receptoru sa ciljem pouzdanog predviđanja afiniteta vezivanja biomolekula za određeni tip receptora. Iz sprovedenih *docking* studija na 3 reprezentativna receptora (1F0K - 1,9 Å transferaza *Escherichiae coli*, 3G7B - *Staphylococcus aureus* giraza B i 1SHV - β-laktamaza *Klebsiella pneumoniae*). U svim ANN-QSAR modelima, niske vrednosti greške za trening i validacioni set podataka, vrednosti koeficijenta korelacije što bliže 1 i niska vrednost greške za test set podataka, ukazuju na to da nagrađeni ANN-QSAR modeli imaju dobru sposobnost predviđanja. Stoga svi nagrađeni modeli mogu poslužiti za predviđanje bioaktivnosti serije molekula strukturno srodnih biomolekulima iz korišćenog seta podataka, a koji potencijalno mogu nastati usled prirodnih varijacija u uslovima okruženja u kojima se endofitna gljiva razvija i/ili kultiviše, kao i optimizacijom strukture putem sinteze derivata poznatih biomolekula.

## **6 LITERATURA**

1. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8(4): 260-271.
2. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 2014; 6: 25-64.
3. Soares GMS, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte, PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science*. 2012; 20(3): 295-309.
4. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57(10): 1451-1470.
5. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57(10): 1486-1513.
6. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2014; 12(1): 35-48.
7. Lew W, Pai M, Oxlade O, Martin D, Menzies D. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. 2008; 149: 123–134.
8. Guay DR. Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs*. 2008; 68: 1169–1205.
9. Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, Mohr JF. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2017; 37(1): 71-84.
10. Gandra S, Barter DM, Laxminarayan R. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20(10): 973-980.
11. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. *European Agency for Disease Control and Prevention*. 2018; 1: 1-110.
12. Radić N, Štrukelj B. Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*. 2012; 19(14): 1270-1284.
13. Martinez-Klimova E, Rodriguez-Pena K, Sanchez S. Endophytes as source of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*. 2017; 134: 1-17.

14. Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial meabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. 2010; 165: 437-449.
15. Simpkin VL, Renwick MJ, Kelly R, Mossialos E. Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps. *The Journal of Antibiotics*. 2017; 70(12): 1087-1096.
16. Pal PP, Shaik AB, Begum AS. Prospective Leads from Endophytic Fungi for Anti-Inflammatory Drug Discovery. *Planta Medica*. 2020; 86: 941–959.
17. Udayanga D, Liu X, McKenzie EH, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*. 2011; 50(1): 189-225.
18. Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(26): 15649-15654.
19. Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*. 2003; 5(6): 535-544.
20. Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*. 2008; 278(1): 1-9.
21. Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. 2001; 18(4): 448-459.
22. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 2016; 529(7586): 336-343.
23. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. *Natural Product Reports*. 2000; 17: 215-234.
24. Saha P, Talukdar AD, Choudhury MD, Nath D. Bioprospecting for fungal-endophyte-derived natural products for drug discovery. In *Advances in Endophytic Fungal Research*. Springer, Cham. 2019; 3: 35-49.
25. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 1993; 260(5105): 214-216.
26. Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LP. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers Microbiology*. 2016; 7(906): 1-14.

27. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003; 64(1): 3-19.
28. Nisa H, Kamili AN, Nawchoo IA, Shafi S, Shameem N, Bandh SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. *Microbial Pathogenesis*. 2015; 82: 50-59.
29. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological research*. 2002; 106(9): 996-1004.
30. Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*. 2012; 19(7): 792-798.
31. Kusari S, Spiteller M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*. 2012; 1: 241-266.
32. Bacon CW, White J. *Microbial endophytes*. CRC press. 2000.
33. Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions*. 2008; 3(2): 75-93.
34. Deng Z, Cao L. Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review. *Chemosphere*. 2017; 168: 1100-1106.
35. Doty SL. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*. 2008; 179(2): 318-333.
36. Hussain H, Tchimine MK, Ahmed I, Meier K, Steinert M, Draeger S, Schulz B, Krohn K. Antimicrobial chemical constituents from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Notobasis syriaca*. *Natural product communications*. 2011; 6(12): 1905-1906.
37. Isaka M, Jaturapat A, Rukseree K, Danwisetkanjana K, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of Natural Products*. 2001; 64(8): 1015-1018.
38. Rakshith D, Santosh P, Satish S. Isolation and characterization of antimicrobial metabolite producing endophytic *Phomopsis* sp. from *Ficus pumila* Linn. (Moraceae). *International Journal of Chemical and Analytical Science*. 2013; 4(3): 156-160.

39. Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka EA. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71(4): 1685-1693.
40. Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate pathology*. 2008; 98(3): 267-270.
41. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-microbe Interactions*. 2006; 19(8): 827-837.
42. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*. 2011; 14(4): 435-443.
43. Venugopalan A, Srivastava S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2015; 33(6): 873-887.
44. Kusari S, Pandey SP, Spiteller M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry*. 2013; 91: 81-87.
45. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*. 2010; 41(1): 1-16.
46. Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports*. 2010; 28(7): 1208-1228.
47. Eyberger AL, Dondapati R, Porter JR. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*. 2006; 69(8): 1121-1124.
48. Kusari S, Lamshöft M, Spiteller M. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 107(3): 1019-1030.
49. Puri SC, Verma V, Amna T, Qazi GN, Spiteller M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. *Journal of Natural Products*. 2005; 68(12): 1717-1719.
50. Kusari S, Lamshöft M, Zühlke S, Spiteller M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products*. 2008; 71(2): 159-162.

51. Mostert L, Crous PW, Kang JC, Phillips AJ. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia*. 2001; 93(1): 146-167.
52. Diogo EL, Santos JM, Phillips AJ. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity*. 2010; 44(1): 107-115.
53. Farr DF, Castlebury LA, Rossman AY. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia*. 2002; 94(3): 494-504.
54. Rukachaisirikul V, Sommart U, Phongpaichit S, Sakayaroj J, Kirtikara K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*. 2008; 69(3): 783-787.
55. Huang Z, Cai X, Shao C, She Z, Xia X, Chen Y, Yang J, Zhou S, Lin Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry*. 2008; 69(7): 1604-1608.
56. Corrado M, Rodrigues KF. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. 2004; 44(2): 157-160.
57. Jayanthi G, Kamalraj S, Karthikeyan K, Muthumary J. Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. GJJM07 isolated from *Mesua ferrea*. *International Journal of Current Science*. 2011; 1: 85-90.
58. Ravnkar M, Terceļ M, Janeš D, Štrukelj B, Kreft S. Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifer needles. *African Journal of Biotechnology*. 2015; 14(10): 867-871.
59. Mousa WK, Raizada MN. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2013; 4(65): 1-18.
60. Kusari S, Spiteller M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Natural Product Reports*. 2011; 28(7): 1203-1207.
61. Ludwig-Müller J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters*. 2015; 37(7): 1325-1334.

62. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2017; 3(4): 651-657.
63. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 162(6): 1239-1249.
64. Kiriiri GK, Njogu PM, Mwangi AN. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020; 6(1): 1-12.
65. Sinha S, Vohora D. Drug discovery and development: An overview. *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research*. 2018; 1: 19-32.
66. Radan M, Bošković J, Dobričić V, Čudina O, Nikolić K. Current computer-aided drug design methodologies in discovery of novel drug candidates for neuropsychiatric and inflammatory diseases. *Archives of Pharmacy*. 2021; 71(4): 225-256.
67. Baldi, A. Computational approaches for drug design and discovery: An overview. *Systematic reviews in Pharmacy*. 2010; 1(1): 99-105.
68. Lo YC, Rensi SE, Torng W, Altman RB. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2018; 23(8): 1538-1546.
69. Zhang L, Tan J, Han D, Zhu H. From machine learning to deep learning: progress in machine intelligence for rational drug discovery. *Drug discovery today*. 2017; 22(11): 1680-1685.
70. Wale N. Machine learning in drug discovery and development. *Drug Development Research*. 2011; 72(1): 112-119.
71. Pantelev J, Gao H, Jia L. Recent applications of machine learning in medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018; 28(17): 2807-2815.
72. Sato T, Honma T, Yokoyama S. Combining machine learning and pharmacophore-based interaction fingerprint for in silico screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2010; 50(1): 170-185.
73. Ekins S, Puhl AC, Zorn KM, Lan TR, Russo DP, Klein JJ, Hickey AJ, Clark AM. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development. *Nature Materials*. 2019; 18(5): 435-441.



74. Das S, Dey R, Nayak AK. Artificial Intelligence in Pharmacy. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2021; 55(2): 304-318.
75. Wesolowski M, Suchacz B. Artificial neural networks: theoretical background and pharmaceutical applications: a review. *Journal of AOAC International*. 2012; 95(3): 652-668.
76. Hussain AS, Yu X, Johnson RD. Application of neural computing in pharmaceutical product development. *Pharmaceutical Research*. 1991; 8(10): 1248-1252.
77. Afan HA, El-Shafie A, Yaseen ZM, Hameed MM, Mohtar WHMW, Hussain A. ANN based sediment prediction model utilizing different input scenarios. *Water Resources Management*. 2015; 29(4): 1231-1245.
78. Hartnell N, MacKinnon NJ. Neural networks: from science fiction to pharmacy. *American Journal of Health-system Pharmacy*. 2003; 60(18): 1908-1909.
79. Zurada JM. *Introduction to artificial neural systems (Vol. 8)*. St. Paul: West Publishing Company. 1992.
80. Mendyk A, Jachowicz R. Neural network as a decision support system in the development of pharmaceutical formulation—focus on solid dispersions. *Expert Systems with Applications*. 2005; 28(2): 285-294.
81. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000; 22(5): 717-727.
82. Takayama K, Fujikawa M, Nagai T. Artificial neural network as a novel method to optimize pharmaceutical formulations. *Pharmaceutical Research*. 1999; 16(1): 1-6.
83. Ripley BD. *Pattern recognition and neural networks*. Cambridge University Press. 2007.
84. Galata DL, Farkas A, Könyves Z, Mészáros LA, Szabó E, Csontos I, Pálos A, Marosi G, Nagy ZK, Nagy B. Fast, spectroscopy-based prediction of in vitro dissolution profile of extended release tablets using artificial neural networks. *Pharmaceutics*. 2019; 11(8) 400: 1-18.
85. Parikh KJ, Sawant KK. Comparative study for optimization of pharmaceutical self-emulsifying pre-concentrate by design of experiment and artificial neural network. *AAPS PharmSciTech An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2018; 19(7): 3311-3321.

86. Yang Y, Ye Z, Su Y, Zhao Q, Li X, Ouyang D. Deep learning for in vitro prediction of pharmaceutical formulations. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2019; 9(1): 177-185.
87. Korotcov A, Tkachenko V, Russo DP, Ekins S. Comparison of deep learning with multiple machine learning methods and metrics using diverse drug discovery data sets. *Molecular Pharmaceutics*. 2017; 14(12): 4462-4475.
88. Colombo S. Applications of artificial intelligence in drug delivery and pharmaceutical development. *Artificial Intelligence in Healthcare*. Academic Press. 2020; 1: 85-116.
89. Wong WC, Chee E, Li J, Wang X. Recurrent neural network-based model predictive control for continuous pharmaceutical manufacturing. *Mathematics*. 2018; 6(11) 242: 1-20.
90. Kolisnyk TY. Application of an Artificial Neural Network for Design of Sustained-Release Matrix Tablets Containing Vaccinium Myrtillus Leaf Powder Extract. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018; 12(02): 137-145.
91. Manda A, Walker RB, Khamanga SM. An artificial neural network approach to predict the effects of formulation and process variables on prednisone release from a multipartite system. *Pharmaceutics*. 2019; 11(3) 109: 1-18.
92. Đuriš J, Kurćubić I, Ibrić S. Review of machine learning algorithms application in pharmaceutical technology. *Archives of Pharmacy*. 2021; 71(4): 302-317.
93. Mutihac L, Mutihac R. Review, Mining in chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. 2008; 612: 1–18.
94. Romero C, Ventura S. Educational data mining: a review of the state of the art. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part C (Applications and Reviews)*. 2010; 40(6): 601-618.
95. Shin EC, Craft B, Pegg R, Dixon Phillips R, Eitenmiller R. Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). *Food Chemistry*. 2010; 119: 1262-1270.
96. Joliffe T. *Principal Components Analysis*. New York: Springer; 1986.
97. Wold S. *Principal Components Analysis*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1987; 2(1-3): 37-52.
98. Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2003; 32(1): 335-373.

99. Huang N, Shoichet BK, Irwin JJ. Benchmarking sets for molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006; 49(23): 6789-6801.
100. Shoichet BK, McGovern SL, Wei B, Irwin JJ. Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002; 6(4): 439-446.
101. Kapetanovic IM. Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chemico-biological Interactions*. 2008; 171(2): 165-176.
102. Augen, J. The evolving role of information technology in the drug discovery process. *Drug Discovery Today*. 2002; 7(5): 315-323.
103. Kumar N, Hendriks BS, Janes KA, deGraaf D, Lauffenburger DA. Applying computational modeling to drug discovery and development. *Drug Discovery Today*. 2006; 11(17-18): 806-811.
104. Ivanov SM, Lagunin AA, Poroikov VV. In silico assessment of adverse drug reactions and associated mechanisms. *Drug Discovery Today*. 2016; 21(1): 58-71.
105. Loging W, Harland L, Williams-Jones B. High-throughput electronic biology: mining information for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007; 6(3): 220-230.
106. Sadek PC, Carr PW, Doherty RM, Kamlet MJ, Taft RW, Abraham MH. Study of retention processes in reversed-phase high-performance liquid chromatography by the use of the solvatochromic comparison method. *Analytical Chemistry*. 1985; 57(14): 2971-2978.
107. Carlucci GD, Archivio AA, Maggi MA, Mazzeo P, Ruggieri F. Investigation of retention behaviour of non-steroidal anti-inflammatory drugs in high-performance liquid chromatography by using quantitative structure–retention relationships. *Analytica Chimica Acta*. 2007; 601(1): 68-76.
108. Willett P. Genetic algorithms in molecular recognition and design. *Trends in Biotechnology*. 1995; 13(12): 516-521.
109. So SS, Karplus M. Three-dimensional quantitative structure– activity relationships from molecular similarity matrices and genetic neural networks. 1. Method and validations. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997; 40(26): 4347-4359.
110. Verma J, Khedkar VM, Coutinho EC. 3D-QSAR in drug design - a review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2010; 10(1): 95-115.

111. Roy K, Kar S, Das RN. Statistical methods in QSAR/QSPR. A primer on QSAR/QSPR modeling. Springer, Cham. 2015; 1: 37-59.
112. Golbraikh A, Tropsha A. Beware of q<sup>2</sup>! Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2002; 20(4): 269-276.
113. Golubović J, Protić A, Zečević M, Otašević B, Mikić M, Živanović L. Quantitative structure–retention relationships of azole antifungal agents in reversed-phase high performance liquid chromatography. Talanta. 2012; 100: 329-337.
114. Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW. Computational methods in drug discovery. Pharmacological Reviews. 2014; 66(1): 334–395.
115. Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, Cronin M, Dearden J, Gramatica P, Martin YC, Todeschini R, Consonni V, Kuzmin VE, Cramer R, Benigni R, Yang C, Rathman J, Terfloth L, Gasteiger J, Richard A, Tropsh A. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? Journal of Medicinal Chemistry. 2014; 57(12): 4977-5010.
116. Aguayo-Ortiz R, Fernández-de Gortari E. Overview of computer-aided drug design for epigenetic targets. Epi-Informatics. 2016; 1: 21–52.
117. Dobričić V, Jačević V, Vučićević J, Nikolic K, Vladimirov S, Čudina O. Evaluation of Biological Activity and Computer-Aided Design of New Soft Glucocorticoids. Archiv der Pharmazie. 2017; 350(5): 1-12.
118. Baig MH, Ahmad K, Rabbani G, Danishuddin M, Choi I. Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. Current Neuropharmacology. 2018; 16(6): 740-748.
119. Leelananda SP, Lindert S. Computational methods in drug discovery. Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2016; 12: 2694–2718.
120. Durrant JD, Amaro RE. Machine-learning techniques applied to antibacterial drug discovery. Chemical Biology & Drug Design. 2015; 85(1):14-21.
121. Hemant A, Selvajar Coumar M. Lead identification and optimization. The Design & Development of Novel Drugs and Vaccines. 2020; 4: 31-63.
122. Krmar J, Protić A, Đajić N, Zečević M, Otašević B. Chromatographic and computational lipophilicity assessment of novel antibiofilm agents. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2020; 43:15-16: 615-623.

123. Butina D, Segall MD, Frankcombe K. Predicting ADME properties in silico: methods and models. *Drug Discovery Today*. 2002; 7(11): 83-88.
124. Rifaioğlu AS, Atas H, Martin MJ, Cetin-Atalay R, Atalay V, Doğan T. Recent applications of deep learning and machine intelligence on in silico drug discovery: methods, tools and databases. *Briefings in Bioinformatics*. 2019; 20(5): 1878-1912.
125. Terstappen GC, Reggiani A. In silico research in drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001; 22(1): 23-26.
126. Nasal A, Siluk D, Kaliszán R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Current Medicinal Chemistry*. 2003; 10(5): 381-426.
127. Van de Waterbeemd H, Testa B. The parametrization of lipophilicity and other structural properties in drug design. *Advances in Drug Research*. 1987; 16: 85-225.
128. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *British Journal of Pharmacology*. 2007; 152(1): 21-37.
129. Yu H, Adedoyin A. ADME-Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. *Drug Discovery Today*. 2003; 8(18): 852-861.
130. Wang Y, Xing J, Xu Y, Zhou N, Peng J, Xiong Z, Liu X, Luo X, Luo C, Chen K, Zheng M, Jiang H. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2015; 48(4): 488-515.
131. Alqahtani S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2017; 13(11): 1147-1158.
132. Andrić F, Héberger K. Towards better understanding of lipophilicity: Assessment of in silico and chromatographic logP measures for pharmaceutically important compounds by nonparametric rankings. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015; 115: 183-191.
133. Young RJ, Green DV, Luscombe CN, Hill AP. Getting physical in drug discovery II: the impact of chromatographic hydrophobicity measurements and aromaticity. *Drug Discovery Today*. 2011; 16(17-18): 822-830.
134. Elder D, Holm R. Aqueous solubility: simple predictive methods (in silico, in vitro and bio-relevant approaches). *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 453(1): 3-11.

135. Balogh GT, Tarcsay Á, Keserű GM. Comparative evaluation of pKa prediction tools on a drug discovery dataset. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012; 67: 63-70.
136. Dardonville C. Automated techniques in pKa determination: low, medium and high-throughput screening methods. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2018; 27: 49-58.
137. Manallack DT, Prankerd RJ, Yuriev E, Oprea TI, Chalmers DK. The significance of acid/base properties in drug discovery. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(2): 485-496.
138. Arnott JA, Planey SL. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012; 7(10): 863-875.
139. Hansch C, Leo A. *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*. Wiley. 1979.
140. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997; 23(1-3): 3-25.
141. 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. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 1999; 1(1): 55-68.
142. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45(12): 2615-2623.
143. Otašević B, Krmar J, Đajić N, Ignjatović J, Protić A. Chemometric window to antimicrobial activity of biomolecules isolated from endophytic fungi. *Archives of Pharmacy*. 2020; 70(3): 142-156.
144. Leo AJ. Calculating log Poct from structures. *Chemical Reviews*. 1993; 93(4): 1281-1306.
145. McCrary PD, Beasley PA, Gurau G, Narita A, Barber PS, Cojocaru OA, Rogers RD. Drug specific, tuning of an ionic liquid's hydrophilic–lipophilic balance to improve water solubility of poorly soluble active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry*. 2013; 37(7): 2196-2202.

146. Pliska V, Mannhold R, Kubinyi H, Timmerman H. Lipophilicity in drug action and toxicology. Weinheim: VCH. 1996; 1: 311-337.
147. Mukerjee P, Ghosh AK. " Isoextraction" method and the study of the self-association of methylene blue in aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*. 1970; 92(22): 6403-6407.
148. Rabel F, Sherma J. New TLC/HPTLC commercially prepared and laboratory prepared plates: A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2016; 39(8): 385-393.
149. Gocan S, Cimpan G. Review of the analysis of medicinal plants by TLC: modern approaches. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2004; 27(7-9): 1377-1411.
150. Favre-Godal Q, Queiroz EF, Wolfender JL. Latest developments in assessing antifungal activity using TLC-bioautography: a review. *Journal of AOAC International*. 2013; 96(6): 1175-1188.
151. Kujawski J, Popielarska H, Myka A, Drabińska B, Bernard MK. The log P parameter as a molecular descriptor in the computer-aided drug design—an overview. *Computational Methods in Science and Technology*. 2012; 18(2): 81-88.
152. Waring MJ. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2010; 5(3): 235-248.
153. Odovic J, Markovic B, Vladimirov S, Karljickovic Rajic K. Evaluation of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor's Absorption with Retention Data of Micellar Thin-Layer Chromatography and Suitable Molecular Descriptor. *Journal of Chromatographic Science*. 2015; 10: 1780-1785.
154. Guo W, Lu Y, Zheng XM. The predicting study for chromatographic retention index of saturated alcohols by MLR and ANN. *Talanta*. 2000; 51(3): 479-488.
155. Kaliszan R. Retention data from affinity high-performance liquid chromatography in view of chemometrics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998; 715(1): 229-244.
156. Kaliszan R, van Straten MA, Markuszewski M, Cramers CA, Claessens HA. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and

- classification of modern stationary phases by using quantitative structure–retention relationships. *Journal of Chromatography A*. 1999; 855(2): 455-486.
- 157.** Duff DG, Horobin RW, Proctor GB. Estimating the hydrophobic character of dyestuffs: a comparison of partition, reverse-phase thin-layer chromatography, and calculation. *Dyes and Pigments*. 1985; 6(1): 61-73.
- 158.** Medić-Šarić M, Jasprica I, Smolčić-Bubalo A, Mornar A. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica Chemica Acta*. 2004; 77(1-2): 361-366.
- 159.** Kaliszan R. QSRR: quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chemical Reviews*, 2007; 107(7): 3212-3246.
- 160.** Bate-Smith EC, Westall RG. Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1950; 4: 427-440.
- 161.** Baošić R, Radojević A, Radulović M, Miletić S, Natić M, Tešić Ž. Relationships between structure, retention and biological activity of some Schiff base ligands and their complexes. *Biomedical Chromatography*. 2008; 22: 379-386.
- 162.** Biagi GL, Barbaro AM, Sapone A, Recanatini F. Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography: I. Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations. *Journal of Chromatography A*. 1994; 662(2): 341-361.
- 163.** Soczewiński E, Wachtmeister CA. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and RM values. *Journal of Chromatography A*. 1962; 7: 311-320.
- 164.** Horvath C, Melander W, Molnar I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 1976; 125(1): 129-156.
- 165.** Oljačić S, Arsić A, Obradović D, Nikolić K, Agbaba D. Analysis of the Retention Behavior of Selected Antipsychotics and Their Impurities by Thin-Layer Chromatography. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. 2017; 30(5): 340-349.
- 166.** Jamshidi-Aidji M, Morlock G. From bioprofiling and characterization to bioquantification of natural antibiotics by direct bioautography linked to high-resolution



- mass spectrometry: exemplarily shown for *Salvia miltiorrhiza* root. *Analytical chemistry*. 2016; 88: 10979-10986.
167. Horvath G, Acs K. TLC-Direct Bioautography for determination of antibacterial activity of *Artemisia adamsii* essential oil. *Journal of AOAC international*. 2013; 96(3): 1209-1213.
168. Perišić-Janjić N, Kaliszan R, Wiczling P, Milosevic N, Uscumlic G, Banjac N. Reversed-phase TLC and HPLC retention data in correlation studies with in silico molecular descriptors and druglikeness properties of newly synthesized anticonvulsant succinimide derivatives. *Molecular Pharmaceutics*. 2011; 8(2): 555–583.
169. Sztanke M, Tuzimski T, Janicka M, Sztanke K. Structure–retention behaviour of biologically active fused 1, 2, 4-triazinones–Correlation with in silico molecular properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 68: 114-126.
170. Juranić IO, Drakulić BJ, Petrović SD, Mijin DŽ, Stanković MV. A QSAR study of acute toxicity of N-substituted fluoroacetamides to rats. *Chemosphere*. 2006; 62(4): 641-649.
171. Piñero J, Furlong LI, Sanz, F. In silico models in drug development: where we are. *Current Opinion in Pharmacology*. 2018; 42: 111-121.
172. Rekker RF, Mannhold R, Bijloo G, De Vries G, Dross K. The lipophilic behaviour of organic compounds: 2. The development of an aliphatic hydrocarbon/water fragmental system via interconnection with octanol-water partitioning data. *Quantitative Structure-Activity Relationships*. 1998; 17(6): 537-548.
173. Kellogg GE, Joshi GS, Abraham DJ. New tools for modeling and understanding hydrophobicity and hydrophobic interactions. *Medicinal Chemistry Research*. 1992; 1: 444-453.
174. Van De Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?. *Nature Reviews Drug discovery*. 2003; 2(3): 192-204.
175. Koyanagi T, Yano K, Kim S, Murayama N, Yamazaki H, Tamai I. In vivo hepatic clearance of lipophilic drugs predicted by in vitro uptake data into cryopreserved hepatocytes suspended in sera of rats, Guinea pigs, monkeys and humans. *Xenobiotica*. 2019; 49(8): 887-894.
176. Van den Anker J, Reed MD, Allegaert K, Kearns GL. Developmental changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2018; 58: 10-25.

177. Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 64: 1355-1374.
178. Luis G, Valerio J. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 241(3): 356-370.
179. Gulia SK, Kumar A, Khatoon S, Bhure S, Ahmad SJ, Qayyum MA, Tiwari RVC. Role of Safety Evaluation in the Process of Drug Development: A Review. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*. 2020; 8(3): 75-77.
180. Ahuja S. Overview of modern pharmaceutical analysis. *Separation Science and Technology*. Academic Press. 2011; 10: 1-9.
181. Watson D. *Pharmaceutical Analysis 5th Ed: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2020; p. 480.
182. Lobrutto R, Patel T. Method validation in Kazakevich Y, Lobrutto R,(ed). *HPLC for pharmaceutical scientists*. 1st edition. John Wiley & Sons, Inc. 2007; p. 455-502.
183. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008; 76: 965-977.
184. Gad HA, El-Ahmady SH, Abou-Shoer MI, Al-Azizi MM. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. *Phytochemical Analysis*. 2013; 24(1): 1-24.
185. Deming SN. Chemometrics: an overview. *Clinical chemistry*. 1986; 32(9): 1702-1706.
186. Leardi R. Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: a review. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*. 2001; 15(7): 559-569.
187. Brereton RG. *Chemometrics—data analysis for the laboratory and chemical Plant*. Chichester: Wiley. 2003; p. 489.
188. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. *Chemometrics: a practical guide*. New York: Wiley. 1998.
189. Massart DL, Vandeginste BG, Buydens LM, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J, Jong SD. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier Science. 1998.
190. Hanrahan G, Gomez FA. *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons. 2009.

191. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of Chromatography B*. 2012; 910: 2-13.
192. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; 147: 590-611.
193. Leardi R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 652(1-2): 161-172.
194. Stojanović J, Krmar J, Protić A, Svrkota B, Đajić N, Otašević B. Experimental design in HPLC separation of pharmaceuticals. *Archives of Pharmacy*. 2021; 71(4): 279-301.
195. Leardi R. Experimental design. In: *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier. 2013. p. 9-53.
196. Ganorkar SB, Shirkhedkar AA. Design of experiments in liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmaceuticals: Analytics, applications, implications and future prospects. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2017; 36(3): 1-43.
197. Dejaegher B, Vander-Heyden Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011; 56(2): 141-158.
198. Debrus B, Lebrun P, Ceccato A, Caliaro G, Rozet E, Nistor I, Oprean R, Ruperez FJ, Barbas C, Boulanger B, Hubert P. Application of new methodologies based on design of experiments, independent component analysis and design space for robust optimization in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2011; 691(1-2): 33-42.
199. Ferreira SLC, Bruns RE, Da Silva EGP, Dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, De Andrade JB, Breitzkreitz MC, Jardim ICSF, Neto BB. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1158(1-2): 2-14.
200. Vogt FG, Kord AS. Development of quality-by-design analytical methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 100(3): 797-812.
201. Mattrey FT, Makarov AA, Regalado EL, Bernardoni F, Figus M, Hicks MB, Zheng J, Wang L, Schafer W, Antonicci V, Hamilton SE, Zwatzky K, Welch CJ. Current challenges and future prospects in chromatographic method development for pharmaceutical research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017; 95: 36-46.

- 202.** Baczek T. Computer-assisted optimization of liquid chromatography separations of drugs and related substances. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2008; 4(3): 151-161.
- 203.** Attimarad M, Venugopala KN, SreeHarsha N, Aldhubiab BE, Nair AB. Validation of rapid RP-HPLC method for concurrent quantification of amlodipine and celecoxib in pure and formulation using an experimental design. *Microchemical Journal*. 2020; 152: 104365.
- 204.** Ignjatović J, Maljurić N, Golubović J, Ravnikar M, Petković M, Savodnik N, Štrukelj B, Otašević B. Characterization of biomolecules with antibiotic activity from endophytic fungi *Phomopsis* species. *Acta Chimica Slovenica*. 2020; 67(2): 445-461.
- 205.** Kollar Hunek K, Heberberger K. Method and model comparison by sum of ranking differences in cases of repeated observations (ties). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2013; 127: 139-146.
- 206.** Kjer J, Debbab A, Aly AH, Proksch P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols*. 2010; 5(3): 479-490.
- 207.** Kumar S, Kaushik N, Edrada-Ebel R, Ebel R, Proksch P. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 27(3): 571-577.
- 208.** Zhao JH, Zhang YL, Wang LW, Wang JY, Zhang CL. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. *World Journal of Microbiological Biotechnology*. 2012; 28(5): 2107-2112.
- 209.** Pavithra N, Sathish L, Ananda K. Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)*. 2012; 16(16): 2014-2020.
- 210.** Sharma D, Pramanik A, Agrawal PK. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. *3 Biotech*. 2016; 6(2): 210.
- 211.** Hormazabal E, Piontelli E. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009; 25(5): 813-819.

212. Drage S, Engelmeier D, Bachmann G, Sessitsch A, Mitter B, Hadacek F. Combining microdilution with MicroResp™: Microbial substrate utilization, antimicrobial susceptibility and respiration. *Journal of Microbiological Methods*. 2012; 88(3): 399-412.
213. Buatong J, Phongpaichit S, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011; 27(12): 3005-3008.
214. Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(19): 6042-6048.
215. Godoy-Gallardo M, Mas-Moruno C, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Manero JM, Albericio F, Gil FJ, Rodríguez D. Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10(8): 3522-3534.
216. Sathish L, Pavithra N, Ananda K. Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from eucalyptus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012; 3(8): 2574-2583.
217. Ibrahim D, Lee CC, Sheh-Hong L. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Swietenia macrophylla* leaves. *Natural Product Communications*. 2014; 9(2): 247-250.
218. Prihanto AA, Firdaus M, Nurdiani R. Endophytic fungi isolated from mangrove (*Rhizophora mucronata*) and its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Science and Engineering*. 2011; 1(5): 386-389.
219. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28: 235-242.
220. Simmons KJ, Chopra I, Fishwick CW. Structure-based discovery of antibacterial drugs. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8(7): 501-510.
221. Jagusztyn-Krynicka EK, Wyszynska A. The decline of antibiotic era—new approaches for antibacterial drug discovery. *Polish Journal of Microbiology*. 2008; 57(2): 91-98.
222. Okimoto N, Futatsugi N, Fuji H, Suenaga A, Morimoto G, Yanai R, Ohno Y, Narumi T, Taiji M. High-performance drug discovery: computational screening by combining

- docking and molecular dynamics simulations. *PLoS Computational Biology*. 2009; 5(10): 1-13.
- 223.** Liu X, Shi D, Zhou S, Liu H, Liu H, Yao X. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2018; 13(1): 23-37.
- 224.** Emran TB, Rahman MA, Uddin MMN, Dash R, Hossen MF, Mohiuddin M, Alam MR. Molecular docking and inhibition studies on the interactions of *Bacopa monnieri*'s potent phytochemicals against pathogenic *Staphylococcus aureus*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 23(1):1-8.
- 225.** Gullapelli K, Brahmeshwari G, Ravichander M, Kusuma U. Synthesis, antibacterial and molecular docking studies of new benzimidazole derivatives. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2017; 4(4): 303-309.
- 226.** Ashtalakshmi G, Prabakaran P. Molecular docking studies of natural antimicrobial compound from *Sargassum wightii* against selected targets of pathogens. *European Journal of Pharmaceutical And Medical Research*. 2016; 3(3): 458-462.
- 227.** Wang W, Chen R, Luo Z, Wang W, Chen J. Antimicrobial activity and molecular docking studies of a novel anthraquinone from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *Natural Product Research*. 2018; 32(5): 558-563.
- 228.** Chomcheon P, Wiyakrutta S, Aree T, Sriubolmas N, Ngamrojanavanich N, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Curvularides A–E: antifungal hybrid peptide–polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. *Chemistry–A European Journal*. 2010; 16(36): 11178-11185.
- 229.** Weber D, Sterner O, Anke T, Gorzalczancy S, Martino V, Acevedo C. Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *The Journal of Antibiotics*. 2004; 57(9): 559-563.
- 230.** Abdalla MA, Matasyoh JC. Endophytes as producers of peptides: an overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes. *Natural Products and Bioprospecting*. 2014; 4(5): 257-270.
- 231.** Penchovsky R, Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2015; 10(8): 1-20.

232. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 2009; 30(16): 2785-2791.
233. Fuhrmann J, Rurainski A, Lenhof HP, Neumann D. A new Lamarckian genetic algorithm for flexible ligand-receptor docking. *Journal of Computational Chemistry*. 2010; 31(9): 1911-1918.
234. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase—role and significance in cancer. *International Journal of Medical Sciences*. 2004; 1(2): 101-115.
235. Cheng K, Zheng QZ, Qian Y, Shi L, Zhao J, Zhu HL. Synthesis, antibacterial activities and molecular docking studies of peptide and Schiff bases as targeted antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009; 17(23): 7861-7871.
236. Dolgih E, Bryant C, Renslo AR, Jacobson MP. Predicting binding to p-glycoprotein by flexible receptor docking. *PLoS Computational Biology*. 2011; 7(6): 1-11.
237. Alves MJ, Froufe HJ, Costa AF, Santos AF, Oliveira LG, Osório SR, Abreu RMV, Pintado M, Ferreira ICFR. Docking studies in target proteins involved in antibacterial action mechanisms: Extending the knowledge on standard antibiotics to antimicrobial mushroom compounds. *Molecules*. 2014; 19(2): 1672-1684.
238. Yang X, Liu H, Yang Q, Liu J, Chen J, Shi L, Predicting anti-androgenic activity of bisphenols using molecular docking and quantitative structure-activity relationships. *Chemosphere*. 2016; 163: 373-381.
239. Yen TW, Lee CC, Ibrahim D, Zakaria L. Enhancement of anti-candidal activity of endophytic fungus *Phomopsis* sp ED2, isolated from *Orthosiphon stamineus* Benth, by incorporation of host plant extract in culture medium. *Journal of Microbiology*. 2012; 50(4): 581-585.
240. Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*. 2007; 28(6): 1145-1152.
241. Simić MR, Damjanović A, Kalinić M, Tasić G, Erić S, Antić-Stanković J, Savić V. Synthesis, cytotoxicity and computational study of novel protoberberine derivatives. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2016; 81(2): 103-123.

## **7 PRILOZI**



## DODATNI MATERIJAL

Tabela 7-1 sadrži koordinate centralnih tačaka mreže u *docking* simulacijama za sve testirane ligande, dok tabele 7-2 do 7-9 obuhvataju sve detaljne rezultate *docking* interakcija 12 antimikrobnih struktura i kontrolnog liganda za 8 receptora koji su dostupni u bazi podataka za proteine: RCSB Brookhaven Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) [219]

**Tabela 7-1**      *Koordinate centralnih tačaka mreže za sve testirane ligande*

<b>Ligand</b>	<b>Koordinate centralnih tačaka mreže</b>
<b>Ampicilin*</b>	(0,513, -0,399, -0,312)
<b>Jedinjenje 325-3</b>	(-1,149, -2,782, -0,461)
<b>Jedinjenje 325-5</b>	(0,414, 0,777, -0,359)
<b>Kurvularid A</b>	(-0,120, -0,566, 0,896)
<b>Kurvularid B</b>	(1,870, -0,311, -0,856)
<b>Kurvularid C</b>	(-0,681, -1,452, 1,843)
<b>Kurvularid D</b>	(0,506, -0,026, -0,060)
<b>Kurvularid E</b>	(0,220, -0,204, -0,242)
<b>Fomoenamid</b>	(-0,674, 1,630, -0,317)
<b>Jedinjenje 6</b>	(-0,474, -0,043, -0,067)
<b>Jedinjenje 7</b>	(-0,019, -0,046, 0,042)
<b>Fomol</b>	(-0,691, 0,230, 0,910)
<b>Fomonitroestar</b>	(-0,340, 0,015, -1,646)

\* *Kontrolni ligand*

**Tabela 7-2**      **Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1F0K receptorom**

<b>Ligand</b>	<b>Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)</b>	<b>Efikasnost liganda (kcal/mol)</b>	<b>Konstanta inhibicije Ki (μM)</b>	<b>Intermolarna energija (kcal/mol)</b>	<b>VdW HB desolvaciona energija (kcal/mol)</b>	<b>Elektrostatička energija (kcal/mol)</b>	<b>Ukupna interna energija (kcal/mol)</b>	<b>Torziona energija (kcal/mol)</b>	<b>Nevezana energija (kcal/mol)</b>	<b>RMSD (Å)</b>	<b>Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)</b>	<b>Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru</b>
<b>Ampicilin*</b>	-6,47	-0,27	18,08	-8,26	-6,50	-1,76	-2,95	1,79	-2,95	5,08	-6,09	Ampicilin:0:1:H Ampicilin:0:1:H
<b>Jedinjenje 325-3</b>	-5,14	-0,23	172,04	-8,42	-7,94	-0,48	-2,30	3,28	-2,30	3,72	-3,85	325-3:0:1:H 325-3:0:1:H 1F0K:A:GLN289:HE22
<b>Jedinjenje 325-5</b>	-4,78	-0,22	313,49	-7,76	-7,35	-0,41	-1,14	2,98	-1,14	3,72	-3,99	325-5:0:1:H 1F0K:A:THR266:HN 1F0K:A:THR266:HG1 1F0K:A:GLN289:HE22
<b>Kurvularid A</b>	-4,76	-0,20	324,52	-9,23	-9,02	-0,21	-2,48	4,47	-2,48	6,17	-4,37	1F0K:A:LEU265:HN: Kurvularid -A:0:1:O Kurvularid-A:0:1H: 1F0K:A:SER192:OG 1F0K:A:GLN193:HN: Kurvularid-A:0:1:O 1F0K:A:GLN289:HE22 Kurvularid-A:0:1:O
<b>Kurvularid B</b>	-4,10	-0,18	994,76	-7,68	-7,54	-0,14	-1,85	3,58	-1,85	6,79	-2,85	1F0K:A:GLN289:HE22
<b>Kurvularid C</b>	-4,70	-0,20	361,64	-8,87	-8,52	-0,35	-2,97	4,18	-2,97	4,74	-3,55	Kurvularid-C:0 1:H Kurvularid-C:0 1:H
<b>Kurvularid D</b>	-4,74	-0,21	334,92	-8,02	-8,08	0,06	-0,81	3,28	-0,81	6,42	-3,81	1F0K:A:LEU265:HN
<b>Kurvularid E</b>	-4,73	-0,21	343,80	-7,71	-7,52	-0,19	-1,79	2,98	-1,79	4,90	-3,91	Kurvularid-E: 0: 1:H Kurvularid-E: 0: 1:H

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvataciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodikovih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Fomoenamid</b>	-4,97	-0,25	227,74	-7,65	-7,38	-0,27	-2,25	2,68	-2,25	4,46	-3,66	Fomoenamid:0: 1:H 1F0K:A:THR266:HN 1F0K:A:THR266:HG1
<b>Jedinjenje 6</b>	-3,88	-0,35	1430	-4,48	-4,37	-0,11	-0,27	0,60	-0,27	7,35	-3,73	1f0h:A:LEU265:HN: Jedinjenje_6:0: 1:O 1F0K:A:THR266:HN: Jedinjenje_6:0: 1:O
<b>Jedinjenje 7</b>	-4,56	-0,33	454,39	-5,45	-4,97	-0,48	-0,18	0,89	-0,18	5,83	-4,32	1F0K:A:ARG164:HH11: Jedinjenje_7:0: 1:O 1F0K:A:THR266:HN: Jedinjenje_7:0: 1:O
<b>Fomol</b>	-5,75	-0,20	60,52	-9,33	-9,14	-0,19	-4,48	3,58	-4,48	3,26	-4,95	Fomol:0: 1:H: 1F0K:A:GLY190:O Fomol:0: 1:H: 1F0K:A:GLY190:O 1F0K:A:GLN193:HN: Fomol:0: 1:O
<b>Fomonitroestar</b>	-4,81	-0,28	296,63	-7,20	-5,96	-1,24	-0,33	2,39	-0,33	5,89	-4,37	Fomonitroestar:0: 1:H: 1F0K:A:GLU269:OE2 1F0K:A:GLN289:HE22: Fomonitroestar:0: 1:O,O

\* *Kontrolni ligand*

Tabela 7-3 Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3G7B receptorom

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki ( $\mu$ M)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvaciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
Ampicilin*	-6,10	-0,25	33,93	-7,89	-5,25	-2,63	-1,71	1,79	1,71	5,77	-5,63	Ampicilin:0: 1:H: 3G7B:B:ASP53:OD1 Ampicilin:0: 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE1 Ampicilin:0: 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE1
Jedinjenje 325-3	-5,27	-0,24	135,56	-8,55	-7,83	-0,72	-2,26	3,28	-2,26	5,04	-4,50	325-3:0: 1:H: 3G7B:N:ASP57:OD2 325-3:0: 1:H: 3G7B:N:ASP57:OD2 3G7B:B:ASN54:HD21: 325-3:0 1:O 3G7B:B:VAL131:HN: 325-3:0 1:O
Jedinjenje 325-5	-4,60	-0,21	425,42	-7,58	-7,42	-0,16	-1,58	2,98	-1,58	3,92	-3,74	325-5:0 :1:H: 3G7B:B:ASP57:OD2 3G7B:B:VAL131:HN: 325-5:0 1:O 3G7B:B:ASN54:HD21: 325-5:0: 1:O
Kurvularid A	-2,58	-0,11	12930	-7,05	-6,30	-0,75	-3,36	4,47	-3,36	4,21	-0,86	Kurvularid-A:0: 1:H: 3G7B:B:ASP53:OD1 Kurvularid-A:0: 1:H: 3G7B:B:ASP53:OD1 Kurvularid-A:0: 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE2 Kurvularid-A:0: 1:H: 3G7B:B:ASN54:OD1
Kurvularid B	-4,36	-0,19	632,03	-7,94	-7,31	-0,64	-1,85	3,58	-1,85	3,98	-3,34	Kurvularid-B:0 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE1 Kurvularid-B:0 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE1 3G7B:B:HIS46:HE2: Kurvularid-B:0 1:O
Kurvularid C	-3,21	-0,13	4440	-7,39	-6,72	-0,67	-0,62	4,18	-0,62	4,50	-1,79	Kurvularid-C:0: 1:H: 3G7B:B:ASP57:OD2 Kurvularid-C:0: 1:H: 3G7B:B:ASP57:OD1 Kurvularid-C:0: 1:H: 3G7B:B:ASP57:OD2
Kurvularid D	-4,51	-0,20	495,24	-7,79	-7,63	-0,16	-1,24	3,28	-1,24	4,19	-3,34	Kurvularid-D:0: 1:H: 3G7B:ASP53:O 3G7B:B:ASN54:HD21: Kurvularid-D:0: 1:O 3G7B:B:VAL131:HN: Kurvularid-D:0: 1:O

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvataciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Kurvularid E</b>	-4,47	-0,19	532,45	-7,45	-7,36	-0,09	-1,01	2,98	-1,01	4,15	-3,54	Kurvularid-E:0: 1:H: 3G7B:B:ASP52:OD1 3G7B:B:ASN54:HD21: Kurvularid-E:0: 1:O
<b>Fomoenamid</b>	-4,64	-0,23	397,98	-7,32	-6,76	-0,56	-2,44	2,68	-2,44	3,27	-3,40	3G7B:B:ASN54:HD21: Fomoenamid:0: 1:O Fomoenamid:0: 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE2 Fomoenamid:0: 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE1 Fomoenamid:0: 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE1
<b>Jedinjenje 6</b>	-3,75	-0,34	1790	-4,35	-4,08	-0,27	0,05	0,60	0,05	6,72	-3,37	3G7B:B:VAL131:HN: Jedinjenje_6:0 1:O 3G7B:B:ASN54:HD21: Jedinjenje_6:0 1:O Jedinjenje_6:0 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE2
<b>Jedinjenje 7</b>	-4,20	-0,30	838,08	-5,09	-4,83	-0,26	0,15	0,89	0,15	4,80	-3,79	3G7B:B:ASN54:HD21: Jedinjenje_7:0 1:O 3G7B:B:VAL131:HN: Jedinjenje_7:0: 1:O
<b>Fomol</b>	-3,74	-0,13	1800	-7,32	-7,14	-0,19	-3,51	3,58	-3,51	4,89	-2,43	Fomol:0 1:H: 3G7B:B:ASP53:OD2 3G7B:B:ASN206:HD22: Fomol:0 1:O
<b>Fomonitroestar</b>	-3,88	-0,23	1440	-6,26	-6,25	-0,01	-0,41	2,39	-0,41	6,80	-3,05	3G7B:B:VAL130:HN: Fomonitroestar:0: 1:O Fomonitroestar:0: 1:H: 3G7B:B:GLU50:OE1 3G7B:B:HIS46:HE2: Fomonitroestar:0: 1:O 3G7B:B:VAL131:HN: Fomonitroestar:0: 1:O,O

\* *Kontrolni ligand*

Tabela 7-4 Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1SHV receptorom

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvaciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
Ampicilin*	-1,90	0,08	40320	-3,69	-2,40	-1,29	-3,09	1,79	-3,09	5,08	-1,82	1SHV:A:ARG205:HH21
Jedinjenje 325-3	0,33	0,02	N.A.	-2,95	-2,86	-0,09	-4,75	3,28	-4,75	7,26	1,09	1SHV:A:ARG205:HH21
Jedinjenje 325-5	-1,79	-0,08	48870	-4,77	-4,40	-0,37	-2,19	2,98	-2,19	5,65	-1,30	1SHV:A:ARG202:HE 1SHV:A:ARG202:HH21 1SHV:A:ARG205:HH21
Kurvularid A	-0,41	-0,02	497240	-4,89	-4,68	-0,21	-5,60	4,47	-5,60	5,07	0,91	1SHV:A:ARG202:HE
Kurvularid B	-0,92	-0,04	210410	-4,50	-4,21	-0,29	-1,96	3,58	-1,96	7,41	-0,17	1SHV:A:ARG202:HE 1SHV:A:ARG205:HE 1SHV:A:ARG205:HH21
Kurvularid C	0,75	0,03	N.A.	-3,43	-3,29	-0,14	-5,10	4,18	-5,10	4,74	1,45	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
Kurvularid D	-1,57	-0,07	70350	-4,85	-4,47	-0,38	-2,01	3,28	-2,01	6,97	-0,79	1SHV:A_ARG202:HE 1SHV:A_ARG205:HH21
Kurvularid E	-1,27	-0,06	116590	-4,26	-3,90	-0,36	-2,87	2,98	-2,87	5,05	-0,53	1SHV:A:ARG202:HE 1SHV:A:ARG205:HE 1SHV:A:ARG205:HH21
Fomoenamid	-1,78	-0,09	49500	-4,47	-4,13	-0,33	-4,23	2,68	-4,23	6,51	-0,91	Fomoenamid:0: 1:H
Jedinjenje 6	-2,48	-0,23	15230	-3,08	-2,75	-0,33	-0,41	0,60	-0,41	7,48	-2,32	1SHV:A:ARG202:HE: Jedinjenje_6:0: 1:O 1SHV:A:ARG205:HE: Jedinjenje_6:0: 1:O
Jedinjenje 7	-2,85	-0,20	8100	-3,75	-3,43	-0,32	-0,21	0,89	-0,21	5,97	-2,67	1SHV:A:ARG202:HH21: Jedinjenje_7:0: 1:O 1SHV:A:ARG205:HE: Jedinjenje_7:0: 1:O 1SHV:A:ARG205:HH21: Jedinjenje_7:0: 1:O 1SHV:A:ARG202:HE: Jedinjenje_7:0: 1:O

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (µM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvaciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Fomol</b>	-0,55	0,02	395820	-4,13	-3,89	-4,13	-4,47	3,58	-4,47	5,28	-0,17	1SHV:A:ARG202:HH21: Fomol:0: 1:O 1SHV:A:ARG205:HH21: Fomol:0: 1:O
<b>Fomonitroestar</b>	-2,67	-0,16	11060	-5,06	-3,70	-1,35	-0,57	2,39	-0,57	7,46	-2,13	1SHV:A:ARG202:HH21: Fomonitroestar:0: 1:O 1SHV:A:ARG205:HH21: Fomonitroestar:0: 1:O 1SHV:A:ARG205:HE: Fomonitroestar:0: 1:O 1SHV:A:ARG202:HE: Fomonitroestar:0: 1:O,O

\* *Kontrolni ligand*

Tabela 7-5 Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3VSL receptorom

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvaciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Ampicilin*</b>	1,72	0,07	N.A.	-0,06	0,00	-0,06	-3,19	1,79	-3,19	5,36	1,73	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-3</b>	3,27	0,15	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-6,12	3,28	-6,12	4,94	3,27	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-5</b>	2,98	0,14	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-3,85	2,98	-3,85	5,16	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid A</b>	4,47	0,19	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-6,97	4,47	-6,97	3,74	4,47	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid B</b>	3,57	0,16	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-2,94	3,58	-2,94	6,16	3,57	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid C</b>	4,17	0,17	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-5,73	4,18	-5,73	4,50	4,17	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid D</b>	3,27	0,14	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-2,47	3,28	-2,47	4,85	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid E</b>	2,98	0,13	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-3,32	2,98	-3,32	4,60	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomoenamid</b>	2,68	0,13	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-5,61	2,68	-5,61	6,41	2,68	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 6</b>	0,59	0,05	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,57	0,60	-0,57	7,59	0,59	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 7</b>	0,89	0,06	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-0,46	0,89	-0,46	6,34	0,89	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomol</b>	3,57	0,12	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-5,51	3,58	-5,51	4,84	3,57	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomonitroestar</b>	2,05	0,12	N.A.	-0,34	0,00	-0,34	-2,37	2,39	-2,37	8,34	2,06	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza

\* Kontrolni ligand



Tabela 7-6 Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 4EMV receptorom

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvaciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Ampicilin*</b>	1,75	0,07	N.A.	-0,04	0,00	-0,04	-3,19	1,79	-3,19	5,34	1,76	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-3</b>	3,28	0,15	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,89	3,28	-5,89	5,31	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-5</b>	2,98	0,14	N.A.	0,00	0,00	0,00	-3,80	2,98	-3,80	6,54	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid A</b>	4,47	0,19	N.A.	0,00	0,00	0,00	-6,94	4,47	-6,94	4,37	4,47	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid B</b>	3,58	0,16	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,93	3,58	-2,93	6,32	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid C</b>	4,17	0,17	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,70	4,18	-5,70	3,93	4,17	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid D</b>	3,28	0,14	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,48	3,28	-2,48	5,63	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid E</b>	2,98	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-3,31	2,98	-3,31	5,38	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomoenamid</b>	2,68	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,60	2,68	-5,60	3,50	2,68	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 6</b>	0,59	0,05	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,57	0,60	-0,57	8,42	0,59	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 7</b>	0,89	0,06	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,46	0,89	-0,46	6,24	0,89	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomol</b>	3,58	0,12	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,49	0,00	-5,49	4,50	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomonitroestar</b>	2,43	0,14	N.A.	0,04	0,00	0,04	-2,39	2,39	-2,39	8,77	2,43	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza

\* Kontrolni ligand

Tabela 7-7 Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1JJJ receptorom

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvaciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Ampicilin*</b>	1,78	0,07	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-3,20	1,79	-3,20	4,28	1,78	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-3</b>	3,28	0,15	N.A.	0,00	0,00	0,00	-6,15	3,28	-6,15	3,10	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-5</b>	2,98	0,14	N.A.	0,00	0,00	0,00	-3,73	2,98	-3,73	2,92	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid A</b>	4,47	0,19	N.A.	0,00	0,00	0,00	-6,88	4,47	-6,88	3,88	4,47	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid B</b>	3,58	0,16	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,94	3,58	-2,94	3,94	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid C</b>	4,18	0,17	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,74	4,18	-5,74	2,67	4,18	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid D</b>	3,28	0,14	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,47	3,28	-2,47	6,52	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid E</b>	2,98	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-3,31	2,98	-3,31	3,84	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomoenamid</b>	2,68	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,61	2,68	-5,61	3,68	2,68	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 6</b>	0,60	0,05	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,57	0,60	-0,57	6,10	0,60	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 7</b>	0,89	0,06	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,46	0,89	-0,46	2,45	0,89	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomol</b>	3,58	0,12	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,51	3,58	-5,51	2,61	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomonitroestar</b>	2,46	0,14	N.A.	0,08	0,00	0,08	-2,38	2,39	-2,38	8,62	2,47	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza

\* Kontrolni ligand

Tabela 7-8 Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 1KZN receptorom

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvataciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Ampicilin*</b>	1,78	0,07	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-3,20	1,79	-3,20	7,86	1,78	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-3</b>	3,28	0,15	N.A.	0,00	0,00	0,00	-6,16	3,28	-6,16	4,60	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-5</b>	2,98	0,14	N.A.	0,00	0,00	0,00	-3,65	2,98	-3,65	5,58	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid A</b>	4,47	0,19	N.A.	0,00	0,00	0,00	-6,83	4,47	-6,83	6,28	4,47	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid B</b>	3,58	0,16	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,94	3,58	-2,94	3,13	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid C</b>	4,18	0,17	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,76	4,18	-5,76	2,45	4,18	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid D</b>	3,28	0,14	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,48	3,28	-2,48	5,24	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid E</b>	2,99	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-3,32	2,98	-3,32	4,29	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomoenamid</b>	2,68	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,61	2,68	-5,61	6,11	2,68	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 6</b>	0,60	0,05	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,57	0,60	-0,57	7,32	0,60	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 7</b>	0,89	0,06	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,46	0,89	-0,46	7,31	0,89	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomol</b>	3,58	0,12	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,49	3,58	-5,49	2,86	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomonitroestar</b>	2,43	0,14	N.A.	0,05	0,00	0,05	-2,38	2,39	-2,38	8,21	2,43	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza

\* Kontrolni ligand

Tabela 7-9 Eksperimentalni podaci za molekularne komplekse sa 3K3P receptorom

Ligand	Slobodna energija vezivanja (kcal/mol)	Efikasnost liganda (kcal/mol)	Konstanta inhibicije Ki (μM)	Intermolarna energija (kcal/mol)	VdW HB desolvataciona energija (kcal/mol)	Elektrostatička energija (kcal/mol)	Ukupna interna energija (kcal/mol)	Torziona energija (kcal/mol)	Nevezana energija (kcal/mol)	RMSD (Å)	Prosečna energija vezivanja (kcal/mol)	Potencijal za formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinama na receptoru
<b>Ampicilin*</b>	1,75	0,07	N.A.	-0,04	0,00	-0,04	-3,20	1,79	-3,20	5,97	1,76	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-3</b>	3,28	0,15	N.A.	0,00	0,00	0,00	-6,11	3,28	-6,11	4,12	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 325-5</b>	2,98	0,14	N.A.	-0,01	0,00	-0,01	-3,70	2,98	-3,70	3,80	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid A</b>	4,47	0,19	N.A.	0,00	0,00	0,00	-6,87	4,47	-6,87	5,19	4,47	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid B</b>	3,58	0,16	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,93	3,58	-2,93	5,82	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid C</b>	4,17	0,17	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,67	4,18	-5,67	2,98	4,17	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid D</b>	3,28	0,14	N.A.	0,00	0,00	0,00	-2,47	3,28	-2,47	5,11	3,28	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Kurvularid E</b>	2,98	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-3,30	2,98	-3,30	3,58	2,98	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomoenamid</b>	2,68	0,13	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,62	2,68	-5,62	5,59	2,68	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 6</b>	0,60	0,05	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,57	0,60	-0,57	6,15	0,60	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Jedinjenje 7</b>	0,89	0,06	N.A.	0,00	0,00	0,00	-0,46	0,89	-0,46	5,47	0,89	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomol</b>	3,58	0,12	N.A.	0,00	0,00	0,00	-5,53	3,58	-5,53	3,16	3,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza
<b>Fomonitroestar</b>	2,58	0,15	N.A.	0,19	0,00	0,19	-2,37	-2,37	-2,37	9,17	2,58	Bez potencijala za ostvarivanje vodoničnih veza

\* Kontrolni ligand

## LISTA SKRAĆENICA I SIMBOLA

0	Nominalna vrednost u dizajnu eksperimenata
-1, +1	Niža i viša kodirana vrednost u dizajnu eksperimenata
I, II, III, ...	Redni brojevi
%	Procenat
% F	Oralna bioraspoloživost
&	I
'	Primarni atom u NMR tehnici
''	Sekundarni atom u NMR tehnici
<	Manje
>	Veće
=	Jednako
*	Operacija množenja
*	Napomena, dodatni komentar
/	Operacija deljenja
/	Bez vrednosti ili unosa
()	Zagrada, dodatno pojašnjenje
[ ]	Uglasta zagrada, referenca u literaturi
$\Sigma$	Suma, zbir
°	Stepen, stepeni
Å	Angstrom
Å <sup>2</sup>	Jedinica za površinu molekule
° C	Stepeni Celzijusa

- $\alpha$ , + $\alpha$	Donja i gornja kodirana vrednost u dizajnu eksperimenata
$\alpha$	Statistički nivo značajnosti
$\beta$	Tip domena unutar strukture receptora
$\delta$	Hemijska pomeranja prikazana u delovima na milion (eng. <i>Parts per milion</i> )
$\delta_H$	Hemijsko pomeranje u $^1\text{H}$ NMR spektru
$\delta_C$	Hemijsko pomeranje u $^{13}\text{C}$ NMR spektru
$\varepsilon$	Greška sistema, ostatak
$\lambda$	Talasna dužina
$\varphi$	Udeo, zapreminski udeo
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
$\mu$	Hemijski potencijal u QSAR studiji
$\eta$	Hemijska tvrdoća molekula u QSAR studiji
$\sigma$ / STD / Std. Dev.	Standardna devijacija
$\omega$	Indeks elektrofilnosti u QSAR studiji
1F0K	Struktura <i>Escherichia coli</i> transferaze veličine 1,9 Å
1KZN	Struktura 24 kDa domena izomeraze bakterije <i>Escherichia coli</i>
1JIJ	Struktura tirozil-tRNK sintetaze bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>
1SHV	Struktura SHV-1 $\beta$ -laktamaze <i>Klebsiella pneumoniae</i>
2D	Dvodimenzijalna orijentacija
325-3	Jedinjenje (Z)-(Z)-2-acetoksi-prop-1-en-1-il-3-(3-((E)-3,4-dihidroksipent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat
325-5	Jedinjenje (Z)-(Z)-2-acetoksi-prop-1-en-1-il-3-(3-((E)-4-hidroksi-3-oksopent-1-en-1-il)oksiran-2-il)akrilat
3D	Trodimenzijalna orijentacija
3G7B	Struktura <i>Staphylococcus aureus</i> giraze B

3K3P	Struktura receptora 3K3P iz bakterije <i>Streptococcus Mutans</i> (apoforna D-alanina: D-alanin ligaze)
3VSL	Struktura penicilin vezujućeg protein 3 iz meticilin rezistentne bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>
4EMV	Struktura ATP inhibitora topoizomeraze bakterije <i>Escherichia coli</i>
6CYF	Struktura sekrecijskog sistemskog proteina tipa III soja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A, B	Faktori u dizajnu eksperimenata
A, B, C	Podjedinice receptora ili proteina u <i>docking</i> simulacijama
ACN	Acetonitril
ADA	Savremene tehnike za naprednu analizu podataka
ADME	Apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija
ADMET	Apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost
AI	Veštačka inteligencija
AlogP	<i>In silico</i> parametar lipofilnosti
AClogP	<i>In silico</i> parametar lipofilnosti
ACTC 10788	Soj bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>
AK	Amino-kiselina:
- ALA	- Alanin
- ARG	- Arginin
- ASN	- Asparagin
- ASP	- Asparaginska kiselina
- CYS	- Cistein
- GLU	- Glutaminska kiselina
- GLN	- Glutamin
- GLY	- Glicin
- HIS	- Histidin
- ILE	- Izoleucin

- LEU	- Leucin
- LYS	- Lizin
- MET	- Metionin
- PHE	- Fenilalanin
- PRO	- Prolin
- SER	- Serin
- THR	- Treonin
- TRP	- Triptofan
- TYR	- Tirozin
- VAL	- Valin
AM1	Tip teorije za algoritam za energetska minimalizaciju strukture
ANN	Veštačke neuronske mreže
ANN-QSAR	QSAR modeli građeni pomoću algoritma mašinskog učenja baziranog na veštačkim neuronskim mrežama
ANOVA	Analiza varijanse
API	Aktivni farmaceutski sastojak
ATP	Adenozin-trifosfat
AU, mAU	Arbitrarne jedinice za apsorpciju
$b_0$	Odsečak
$b_{1,\dots,N}$	Koeficijent
bar	Jedinica za pritisak
bs	Široki singlet u NMR analizi
C	Koncentracija
C	Ugljenik
$^{13}\text{C}$	Izomer ugljenika
clogP	Izračunati parametar lipofilnosti
$C_o$	Parametar hidrofobnosti



C <sub>p</sub>	Centralna tačka eksperimentalnog domena
C <sub>PP</sub>	Koncentracija leka vezanog za proteine
C <sub>UK</sub>	Ukupna koncentracija leka u plazmi
Caco-2	Ćelijska linija Caco-2
CADD	Kompjuterski potpomognut dizajn lekova
cca.	Približno (lat. <i>Circa</i> )
CCD	Centralni kompozicioni dizajn eksperimenata
CDCl <sub>3</sub>	Deuterisani hloroform
CH <sub>3</sub>	Metil grupa
cm	Centimetar
COSY	Korelaciona spektroskopija u NMR analizi
CYP450	Enzimi jetre CYP450
d	Dublet u NMR analizi
D-	Tip prostorne orijentacije molekule
Da, kDa	Dalton, kilodalton
DAD	<i>Diode array</i> detektor
dd	Dublet dubleta u NMR analizi
DH5- $\alpha$	Soj bakterije <i>Escherichia coli</i>
DMSO	Dimetil sulfoksid
DoE	Dizajn eksperimenata
e, E	Eksponent
E	Energija
E-	Tip konfiguracije dvostruke veze jedinjenja, <i>trans</i>
e.g.	Na primer (lat. <i>Exempli gratia</i> )

EHOMO	Energija najviše okupirane molekulske orbitale
ELUMO	Energija najniže neokupirane molekulske orbitale
eng.	Na Engleskom jeziku
ESKAPE	Bakterijski patogeni: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter species</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
et al. / in sod.	I ostali (autori)
EU	Evropska Unija
eV	Elektron volt
F	Faktor, varijabla
f(x)	Matematička funkcija
fu	Nevezana frakcija
g	Gram
G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup>	Gram-pozitivan ili gram-negativan bakterijski soj
GC	Tehnika gasne hromatografije
h	Sat, čas
H	Vodonik, vodonična veza
<sup>1</sup> H	Izomer vodonika
H <sub>2</sub> O, HOH	Molekula vode
HB	Vodonična veza (eng. <i>Hydrogen bond</i> )
HD, HE, HG, HH, HN	Tipovi povezivanja vodoničnim vezama preko vodonika u <i>docking</i> simulacijama
HIA	Apsorpcija iz tankog creva
HMBC	Heteronuklearna multipla korelacija veza u NMR analizi
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi

HSQC	Heteronuklearna jednostruka kvantna koherencija u NMR analizi
Hz, MHz	Herc, megaherc, jedinica za frekvenciju
i.e.	To je (lat. <i>id est</i> )
i sl.	I slično
i.p.	Interperitonealna primena
IC50	Inhibiciona koncentracija koja uništava 50% bakterija
ilogP	<i>In silico</i> parametar lipofilnosti
itd.	I tako dalje
$J_{x,y}$	Konstanta sprezanja protona X sa protonom Y (u Hz)
k	Broj varijabli
kcal	Kalorija, jedinica za energiju
Ki	Konstanta inhibicije
Kg	kilogram
L / l	Litar
lat.	Na Latinskom jeziku
LB	Luria-Bertani bujon
LC	Tehnika tačne hromatografije
LD <sub>50</sub>	Srednja letalna doza leka koja ubija 50% tretiranih životinja
LOF	Greška modela
log	Logaritamska funkcija
logBB	Koeficijent krvno-moždane barijere
logD	Parametar distribucije
logKp	Koeficijent permeacije kroz kožu (cm/s)
logP	Parametar lipofilnosti, particioni koeficijent između oktanol i vode

logS	Parametar rastvorljivosti
LSER	Teorija odnosa linearne solvatacione energije
m	Mili ( $10^{-3}$ )
m	Metar
m	Specifična hidrofobnost površine supstance u kontaktu sa stacionarnom fazom u tankoslojnoj hromatografiji / nagib kalibracione krive
M <sup>+</sup>	Jon
m/z	Odnos mase i naelektrisanja
Max	Maksimalno, maksimalni
mbar	Milibar
MeOH	Metanol
mg	Miligram
milogP	<i>In silico</i> parametar lipofilnosti
min	Minuta
Min	Minimalno, minimalni
mL / $\mu$ L	Mililitar / mikrolitar
mm / $\mu$ m	Milimetar / mikrometar
mM	Jedinica za koncentraciju rastvora, mili molarni rastvor
ML	Mašinsko učenje
MlogP	Parametar lipofilnosti
MLR	Višestruka linearna regresija
mol	Mol, molovi
MOPAC/AM1	Tip algoritma za energetska minimalizaciju strukture
Mr	Molekularna masa jedinjenja u g/mol

MR	Molarna refraktivnost
MS	Tehnika masene spektrometrije
MS/MS	Tehnika tandem masene spektrometrije
MW	Molekulska masa jedinjenja u g/mol
n	Nano ( $10^{-9}$ )
N	Azot
N <sup>o</sup>	Broj / Redni broj
N.A.	Nije primenljivo (eng. <i>Not applicable</i> )
NH	Amino grupa
NH <sub>3</sub>	Amonijak, amonijum-hidroksid
NHA	Broj teških atoma (koji nisu vodonik H) koji figurišu u Ghose-ovom pravilu
NHBA	Broj akceptora vodonika koji figurišu u pravilu Lipinskog
NHBD	Broj donora vodonika koji figurišu u pravilu Lipinskog
nm / mm	Nano metar / mili metar
NMR	Tehnika nuklearno-magnetno-rezonantne spektroskopije
NOESY	Spektroskopija za nuklearni overhauser efekat u NMR analizi
NRB	Broj rotirajućih veza
O	Kiseonik
OD, OE, O,O	Tipovi povezivanja vodoničnim vezama preko kiseonika u <i>docking</i> simulacijama
OFAT	Ispitivanje uticaja pojedinačnih faktora na rezultate eksperimentalnih merenja
OH	Alkoholna grupa
p	Veličina razlomka

p	Statistički značajan uticaj posmatranih faktora na ispitivani odgovor, statistički nivo verovatnoće
PC	Glavna komponenta
PCA	Analiza glavnih komponenti
PDA	Krompir-dekstroza agar
p.o.	<i>Per os</i> primena
PDBbind-CN	Otvorena baza podataka sa strukturama proteina i receptora
PE	Eksperimentalna greška
Peff	Efektivna permeabilnost u jejunumu
pH	Jedinica kiselosti
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja
pKa	Konstanta disocijacije kiseline
PPB	Afinitet vezivanja za proteine plazme (%)
ppm	Deo na milion (eng. <i>Parts per million</i> )
psi	Jedinica za pritisak
PSU-D15	PSU-D15 soj endofitne gljive <i>Phomopsis species</i>
q	Kvartet u NMR analizi
QSAR	Kvantitativno iskazane hemijske ili biološke aktivnosti jedinjenja
QSPR	Kvantitativno iskazan odnos strukture i svojstava jedinjenja
QSRR	Kvantitativno iskazan odnos strukture i retencionog ponašanja jedinjenja
QSXR	Kvantitativno iskazan odnos strukture i određene promenljive za ispitivano jedinjenje
QTOF	Integrirani kvadruploni maseni analizator i analizator na bazi merenja vremena preleta jona proizvedenih tehnikom elektrosprej jonizacije uzorka

r	Koeficijent korelacije
R-	Tip prostorne orijentacije molekule
R <sub>1..N</sub>	Odgovor sistema
R <sup>2</sup>	Koeficijent korelacije kalibracione krive, koeficijent multiple determinacije
R <sub>f</sub>	Retencioni faktor u metodi tankoslojne hromatografije
r <sub>t</sub>	Retenciono vreme
R <sub>M</sub>	Parametar retencije u tankoslojnoj hromatografiji prema Bate-Smith-ovoj i Vestall-ovoj jednačini / Parametar lipofilnosti
R <sub>M</sub> <sup>0</sup>	Parametar retencije R <sub>M</sub> u tankoslojnoj hromatografiji dobijen ekstrapolacijom na 0% modifikatora organske mobilne faze u skladu sa jednačinom Soczevinskog-Vachmeistera
refRMS	Referentno srednje kvadratno odstupanje
RMS	Srednje kvadratno odstupanje
RMSE	Kvadrat srednje greške odstupanja, najniže moguće vrednosti greške
RMSD	Srednja vrednost kvadratnog odstupanja
RP	Reverzna faza, reverzno-fazni
RP-HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi na reverznoj-fazi
rpm	Broj obrtaja u minuti
RP-TLC	Reverzno-fazna tankoslojna hromatografija
RP-18 F254	Tip ploče u reverzno-faznoj tankoslojnoj hromatografiji
RSCB PDB	Baza podataka sa strukturama proteina i receptora
RSM	Metodologija površine odgovora
s	Sekunda, sekundi
s	Singlet u NMR analizi

S	Hemijska mekoća molekule u QSAR studiji
S-	Tip prostorne orijentacije molekule
SAD	Sjedinjene Američke Države
sp <sup>2</sup> , sp <sup>3</sup>	Tipovi atomskih orbitala
sp. / spp.	Vrsta (lat. <i>Species</i> ), vrste
Std.	Studija, eksperiment
tRNK	Transportna ribonukleinska kiselina
TLC	Tankoslojna tečna hromatografija
TLC-DB	Direktna TLC bioautografija
TPSA	Topološka polarna površina jedinjenja
tzv.	Takozvani
UCSF	Program UCSF Chimera
UHPLC	Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom
UK	Ujedinjeno Kraljevstvo
UPLC	Tečna hromatografija ultra visokih performansi
US-FDA	Agencija za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država
USP	Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država
UV	Ultra ljubičasta svetlost
UV/VIS	UV–vidljiva spektrofotometrija
v/v	Volumenski udeo
Vd	Volumen distribucije (L/kg)
VDV	Volumen Voronoi–Delaunay praznine
x	Operacija množenja, puta
X <sub>1..N</sub>	Ulazna informacija u veštačkim neuronskim mrežama



XlogP	<i>In silico</i> parametar lipofilnosti
XlogP3	<i>In silico</i> parametar lipofilnosti
x, y, z, w, ...	Promenljive u jednačinama
x, y, z	x, y, z-osa u koordinatnom sistemu
Y <sub>1..N</sub>	Izlazna informacija u veštačkim neuronskim mrežama
V, kV	Volt, kilovolt
VdW	Van der Waals-ove veze
VdW HB	Desolvatacijska energija Van der Waals-ove i vodonične veze
W <sub>1..N</sub>	Ponderi u veštačkim neuronskim mrežama
WlogP	<i>In silico</i> parametar lipofilnosti
Z-	Tip konfugracije dvostruke veze jedinjenja, <i>cis</i>

## PUBLIKACIJE OBUHVAĆENE DOKTORSKOM DISERTACIJOM

### Spisak objavljenih naučnih radova u časopisima sa *SCI* liste:

- 1) **Ignjatović J**, Đajić N, Krmar J, Protić A, Štrukelj B, Otašević B. Molecular docking study on biomolecules isolated from endophytic fungi. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2021; 86(2): 125-137.  
doi: <https://doi.org/10.2298/JSC200815002I> (časopis rangiran u kategoriji **M23**, u oblasti *Chemistry, Multidisciplinary* 141/178, IF=1,240 za 2020. godinu)
- 2) **Ignjatović J**, Maljurić N, Golubović J, Ravnikar M, Petković M, Savodnik N, Štrukelj B, Otašević B. Characterization of Biomolecules with Antibiotic Activity from Endophytic Fungi *Phomopsis species*. *Acta Chimica Slovenica*. 2020; 67(2): 445-461.  
doi: <http://dx.doi.org/10.17344/acsi.2019.5389> (časopis rangiran u kategoriji **M23**, u oblasti *Chemistry, Multidisciplinary* 127/178, IF = 1,735)

### Spisak objavljenih naučnih radova u naučnim časopisima od nacionalnog značaja:

- 1) Otašević B, Krmar J, Đajić N, **Ignjatović J**, Protić A. Chemometric window to antimicrobial activity of biomolecules isolated from endophytic fungi. *Archives of Pharmacy*. 2020; 70: 142-156.  
doi: <https://doi.org/10.5937/arch%20of%20pharm70-26297> (časopis rangiran u kategoriji **M52**)

### Spisak saopštenja sa međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova štampanih u izvodu:

- 1) Otašević B, **Ignjatović J**, Maljurić N, Krmar J, Zečević M. Chemometric Approach in Bioactivity Profiling – The Case of Biomolecules from Endophytic Fungi. *Proceedings (Book of abstracts) of the 7th annual conference of AnalytiX-2019*; 2019 Nov 13-15; Berlin, Germany. (kategorija **M32**)
- 2) **Ignjatović J**, Maljurić N, Golubović J, Petković M, Ravnikar M, Štrukelj B, Otašević B. Characterization of biomolecules with antibiotic activity from endophyte *Phomopsis species*. *Proceedings (Book of abstracts) of the VII international pharmacy congress*; 2018 Oct 10-14; Belgrade, Serbia. (kategorija **M64**)

- 3) Otašević B, Protić A, Golubović J, **Ignjatović J**, Zečević M. The Potential of Quantitative Structure-Retention-(Biological) Activity Relationship (QRAR) Investigations in Pharmaceutical Research. Proceedings (Book of abstracts) of the Euro chemistry International Conference; 2016 Jun 16-18; Rome, Italy. (kategorija **M34**)
- 4) **Ignjatović J**, Otašević B, Zečević M, Protić A, Golubović J. The use of green methodologies in drug analysis based on high performance liquid chromatographic methods. Proceedings (Book of abstracts) of the 21st International Symposium on Separation Sciences of the National Institute of Chemistry; 2015 Jun 30–Jul 3; Ljubljana, Slovenia. (kategorija **M34**)

**Spisak objavljenih naučnih radova u časopisima sa SCI liste za doktorsku disteraciju na drugom univerzitetu:**

- 1) **Ignjatović J**, Švajger U, Ravnikar M, Molek P, Zadavec D, Pariš A, Štrukelj B. Aggregation of Recombinant Monoclonal Antibodies and Its Role in Potential Immunogenicity. Bentham Science Publishers. 2018; 19(4): 343–356.  
doi: <https://doi.org/10.2174/1389201019666180605130252> (časopis rangiran u kategoriji **M22**)
- 2) Marković B, **Ignjatović J**, Vujadinović M, Savić V, Vladimirov S, Karljiković-Rajić K. Inter-laboratory verification of European pharmacopoeia monograph on derivative spectrophotometry method and its application for chitosan hydrochloride. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Elsevier BV. 2015; 150: 792-798.  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.06.022> (časopis rangiran u kategoriji **M21**)

**Odbranjena doktorska disteracija na drugom univerzitetu:**

- 1) **Ignjatović J**. Detection and immunogenicity evaluation of recombinant monoclonal antibodies' structural variants. Biotechnical faculty, University in Ljubljana, Slovenia. 2019. (kategorija **M70**)

## DODATNO OBRAZLOŽENJE

Ovo naučno istraživanje finansiralo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (ugovor 451-03-68/2020-14/200161, projekat br. 172033) i Slovenačka agencija za istraživanje (broj sredstava za projekat P4-0127) u okviru bilateralnih projekata između Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u Republici Srbiji i Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani, u Republici Sloveniji, EU (projekat br. BI-RS/16-17-022).

Kandidat nije prijavljivao predloženu temu na drugoj visokoškolskoj ustanovi u zemlji ili inostranstvu.

Glavni istraživači na bilateralnom projektu naučne saradnje između Republike Srbije i Republike Slovenije pod nazivom *Novi antibiotici iz endofitnih gljiva*, prof. dr Borut Štrukelj i vanr. prof. dr Biljana Otašević, saglasni su da se deo projektnih aktivnosti može koristiti u izradi predložene disertacije.

## ZAHVALNICA

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorci vanr. prof. dr Biljani Otašević, koja me je uključila u svoju istraživačku grupu i tako mi omogućila rad u ispitivanoj oblasti doktorske teze. Posebno bih se zahvalio na prilici da istraživački rad obavljam u odličnim uslovima u izuzetnom timu i na poverenju, savetima i pomoći u pripremi doktorskog rada.*

*Takođe, se ovom prilikom zahvaljujem prof. dr Borutu Štruklju sa Katedre za farmaceutsku biologiju Univerziteta u Ljubljani i njegovom timu, koji su takođe podržali ovo istraživanje. Posebno se zahvaljujem prof. dr Biljani Otašević, prof. dr Borutu Štruklju, dr Matjažu Ravnikaru, vanr. prof. dr Ani Protić, dr Neveni Đajić, dr Jeleni Golubović, dr Milošu Petkoviću i mr. ph. Jovani Krmar za svu podršku i diskusijama tokom istraživačkog dela doktorske disertacije. Takođe, se zahvaljujem i svom bratu Mladenu Pešiću koji mi je pomogao u pripremi figura i vizuelnih prezentacija u uvodnom delu doktorske disertacije.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici koja me je uvek podržavala, motivisala i inspirisala.*

## **8 BIOGRAFIJA**

Janko Ignjatović je rođen 09.07.1989. u Leskovcu u Republici Srbiji, gde je završio osnovnu i srednju školu. Tokom srednjoškolskog obrazovanja, pohađao je seminare istraživačke stanice Petnica na modulima hemije i molekularne biomedicine, bio je član centra za talente u Vranju u oblasti hemije i takođe je učestvovao na republičkim takmičenjima u oblasti hemije. Bio je autor eksperimentalnih radova kao što su „Ispitivanje adsorpcijskog potencijala različitih vrsta zeolita za soli teških metala“, koji je realizovao tokom letnjih seminara istraživačke stanice Petnica, i „Ispitivanja interakcije hlorofila sa solima teških metala“ realizovanog na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu.

Integrisane akademske studije, studijski program magistar farmacije, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisuje 2008. i završava 2013. odbranom eksperimentalnog rada iz oblasti farmaceutske hemije sa naslovom: „Međulaboratorijska verifikacija monografije Evropske farmakopeje za metodu derivativne UV/VIS spektrofotometrije“. Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu na modulu Analitika lekova upisuje 2013. godine. Kao doktorand-stipendista, bio je saradnik na projektu koji je finansijski podržalo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom: „Razvoj mikro i nano sistema kao nosilaca antiinflamatornih lekova i metoda za njihovu karakterizaciju“.

Nakon završene apotekarske prakse i poslovne edukacije u predstavnštvu farmaceutske kompanije *Glaxo Smith Kline* u Beogradu, Janko Ignjatović je 2014. godine proglašen kao individualni pobednik regionalnog samita *BioCamp* za lidere u oblasti nauke koji je održan u Ljubljani u Sloveniji u okviru kompanije *Lek*, član grupe *Sandoz*. Predstavljao je region istočne Evrope na globalnom *BioCamp* samitu za lidere u oblasti farmacije u sedištu kompanije *Novartis* u Bazelu u Švajcarskoj. Nakon proglašenja za pobednika globalnog samita, Janko Ignjatović je nagrađen naučnom praksom u *Novartis*-ovom institutu za biomedicinska istraživanja u Pekingu i Šangaju u Narodnoj Republici Kini 2015. godine.

Svoju profesionalnu karijeru Janko Ignjatović započinje 2014. godine na poziciji istraživača u *Novartis*-ovom centru za razvoj biofarmaceutskih preparata u Mengešu u Republici Sloveniji. Iste, 2014. godine Janko upisuje Interdisciplinarne doktorske studije Biotehnološkog fakulteta u Ljubljani u Sloveniji i završava ih 2019. godine odbranom doktorske disertacije sa temom: „Detekcija i evaluacija imunogenosti strukturalnih varijanti rekombinantnih monoklonskih

antitela“. U periodu od 2016. do 2017. Janko je bio učesnik na projektu bilateralne naučne saradnje između Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani.

Janko Ignjatović 2020. godine završava magisterijum poslovne administracije (eng. *Master of Business Administration*) u okviru Škole za Ekonomiju i Biznis, Ekonomskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, a naredne 2021. godine završava studije za IT menadžera u okviru IT akademije u Beogradu. Janko Ignjatović je trenutno zaposlen na poziciji projektnog menadžera za razvoj lekova u okviru kompanije *Sandoz*, deo grupe *Novartis*, gde vodi timove za razvoj i lansiranje lekova na globalnom nivou.



## **9 IZJAVE AUTORA DOKTORSKE DISERTACIJE**

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јанко Игњатовић

Број индекса: 3/2013

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Истраживање антимикробне активности и хроматографског понашања састојака  
ендофитних гљива применом хеометријских метода

- 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, 13.05.2022.

Јанко Игњатовић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јанко Игњатовић

Број индекса: 3/2013

Студијски програм: Докторске академске студије, научна област: фармација,  
ужа научна област: аналитика лекова

Наслов рада: Истраживање антимикробне активности и хроматографског  
понашања састојака ендифитних гљива применом хемометријских метода

Ментор: Ванр. проф. др Биљана Оташевић

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, 13.05.2022.



## Изјава о коришћењу

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

Истраживање антимикробне активности и хроматографског понашања састојака ендофитних гљива применом хемометријских метода

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, 13.05.2022.



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.