

ANTIOKSIDATIVNA I INHIBITORSKA AKTIVNOST ALIZARIN-2-GLIKOZIDA

Edina Avdović¹, Svetlana Jeremić², Ana Amić³, Marijana Pirković⁴,
Dejan Milenković⁵, Jelena Đorović⁵, Zoran Marković²

Izvod: U ovom radu je ispitana antioksidativna aktivnost alizarin-2-glikozida. Svi rezultati dobijeni su primenom DFT metode. Za izračunavanja je korišćena M06-2X metoda u kombinaciji sa 6-311++G(d,p) bazisnim skupom. Kao rastvarač korišćena je voda. Vrednosti entalpija korišćene su kao termodinamički parametri na osnovu kojih je procenjen antioksidativni kapacitet alizarin-2-glikozida. Molecular Docking metodom procenjena je sposobnost alizarin-2-glikozida da inhibira negativan uticaj P-glikoproteina.

Gljučne reči: alizarin-2-glikozid, antioksidativna aktivnost, DFT, entalpija, P-glikoprotein

Uvod

Uloga antioksidanata koji se primenjuju u prehrambenoj tehnologiji jeste zaustavljanje lančanog procesa kvarenja hrane izazvanog prisustvom slobodnih radikala. Trenutno se sve više pažnje posvećuje testiranju i upotrebi prirodnih antioksidanata. Među jedinjenjima koja pokazuju antiradikalnu aktivnost mnogo je onih sa antrahinonskim jezgrom u svojoj strukturi. Većina prirodnih antrahinona izolovana je iz biljnih ekstrakata. Otuda primena ovih biljnih ekstrakata u tradicionalnoj medicini nekih naroda (Cai i sar., 2004). Jedan od prirodnih antrahinona sa već potvrđenom antiradikalnom aktivnošću jeste i alizarin (Jeremić i sar., 2014).

Alizarin (1,2-dihidroksiantrahinon) je crveni pigment, koji se može izolovati iz korena zelene višegodišnje vrste *Rubia tinctorum* L. (Slika 1). Alizarin se u svojim prirodnim izvorima najčešće nalazi u formi glikozida. Ranija istraživanja su pokazala da glikozidi alizarina, od kojih su najčešći ruberitrinska kiselina i alizarin-2-glikozid, imaju veći značaj pri bojenju vune nego sam alizarin (Ford i sar., 2017). Osim za bojenje tkanine, alizarin i njegovi glikozidi primenjuju se i kao boje za hranu i osvežavajuće bezalkoholne napitke (Kawasaki i sar., 1992).

Polihidroksilni antrahinoni svoju ulogu antioksidanta ostvaruju tako što, uklanjanjem atoma vodonika iz hidroksilne grupe, i sami formiraju radikal stabilizovan rezonancom unutar antrahinonskog jezgra. Ovako nastali radikal nema tendenciju da dalje učestvuje u radikalnoj reakciji. U ovom radu ispitani su mehanizmi nastanka radikala alizarin-2-glikozida (u daljem tekstu AG) (Slika 1).

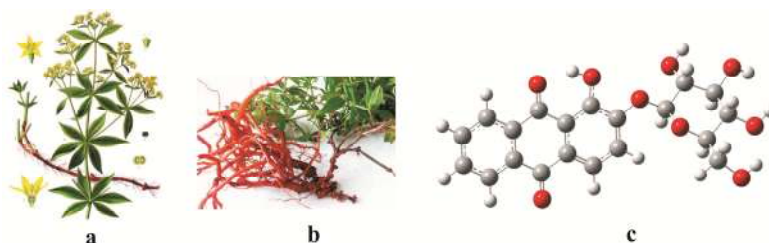
¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (edinanp@hotmail.com);

²Državni Univerzitet u Novom Pazaru, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Srbija;

³Josip Juraj Strossmayer Univerzitet u Osijeku, Departman za kemiju, Cara Hadrijana 8a, 31000 Osijek, Hrvatska

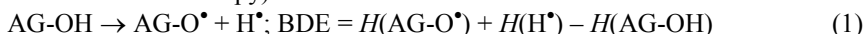
⁴Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Srbija

⁵Istraživačko razvojni centar za bioinženjering BioIRC, Prvoslava Stojanovića 6, 34000 Kragujevac, Srbija



Slika 1. a) Rizom biljke *Rubia tinctorum* L.; b) Fotografija korena biljke *Rubia tinctorum* L.; c) optimizovana struktura alizarin-2-glikozida
 Figure 1. a) Rhizome of the plant *Rubia tinctorum* L.; b) Photography of the root of *Rubia tinctorum* L.; c) Optimized structure of alizarin-2-glucoside

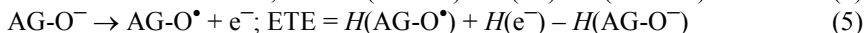
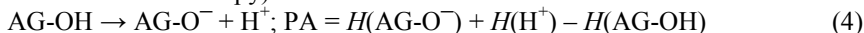
Postoje najmanje tri poznata mehanizma pomoću kojih AG može nagraditi radikal (Jeremić i sar., 2014). Prvi od njih, poznat je kao HAT mehanizam (Hydrogen Atom Transfer), i podrazumeva homolitičko raskidanje O-H veze. Termodinamička povoljnost ovog mehanizma određuje odgovarajuća entalpija raskidanja veze, BDE (Bond Dissociation Enthalpy):



Po drugom mehanizmu nazvanom SET-PT (Single-Electron Transfer followed by Proton Transfer), AG-radikal može nastati iz dva reakciona koraka. U prvom koraku dolazi do transfera elektrona, čime nastaje nestabilna vrsta radikal-katjon. Ovaj korak reakcije karakteriše termodinamička veličina IP (Ionisation Potential). Drugi korak reakcije podrazumeva stabilizaciju radikal-katjona odlaskom protona, a termodinamičku povoljnost ovog koraka reakcije procenjujemo na osnovu PDE vrednosti (Proton Dissociation Enthalpy):



Treći mehanizam nazvan je SPLET (Sequential Proton Loss Electron Transfer). U prvom koraku ovog mehanizma dolazi do odlaska protona i nastanka AG-anjona, dok u drugom koraku iz anjona nastaje AG-radikal odlaskom elektrona. Prvi korak reakcije karakteriše PA vrednost (Proton Affinity), dok drugi korak karakteriše ETE vrednost (Electron Transfer Enthalpy):



U prethodnim jednačinama (1-5) $H(\text{AG-OH})$, $H(\text{AG-O}^\bullet)$, $H(\text{AG-OH}^{+\bullet})$ i $H(\text{AG-O}^-)$, predstavljaju entalpije molekula, radikala, radikal-katjona i anjona alizarin-2-glikozida, dok $H(\text{H}^\bullet)$, $H(\text{e}^-)$ i $H(\text{H}^+)$ predstavljaju entalpije atoma vodonika, zatim entalpiju elektrona, i protona.

P-glikoprotein (Pgp) je važan protein ćelijske membrane koji ima ulogu u odstranjivanju ksenobiotika iz ćelije, čime štiti ćeliju. Ksenobiotici su supstance koje su prisutne u organizmu, ali se u njemu ne proizvode, nisu su deo uobičajene ishrane, pa se njihovo prisustvo u organizmu i ne očekuje. Na žalost, ovaj enzim ima i malu selektivnost, zbog čega i mnoge lekove prepoznaje kao ksenobiotike, pa ne dozvoljava njihov prolaz u intracelularni prostor. U tim slučajevima organizam pokazuje rezistentnost na neke lekove, prouzrokovanu malom selektivnošću Pgp (Sharom, 2008). Iz tog razloga postoje težnje da se nađe odgovarajući inhibitor ovog proteina. U ovom radu je ispitana mogućnost AG-anjona da inhibira negativno dejstvo Pgp na antikancer lek mitoksantron (na dalje MX). MX u svojoj osnovnoj strukturi sadrži antrahinonsko jezgro.

Materijal i metode rada

Termodinamički parametri koji ukazuju na povoljnost nastanka AG-radikala dobijeni su optimizacijom svih potrebnih neutralnih, jonskih i radikalskih vrsta primenom M06-2X/6-311++G(d,p) metode implementirane u Gaussian 09 programski paket (Zhao i Truhlar, 2008; Frisch i sar., 2009). U svim izračunavanjima efekat vode kao rastvarača simuliran je primenom PCM/SMD solvatacionog modela (Polarizable Continuum Model / Solvation Model based on Density). Solvatacione entalpije protona i elektrona uzete su iz literature (Marković i sar., 2016).

Za procenu inhibitorskog potencijala AG-anjona korišćena je Molecular Docking metoda. U tu svrhu korišćen je program AutoDock 4.2 (Morris i sar., 2009). Za analizu rezultata i vizuelizaciju mesta vezivanja korišćen je program BIOVIA Discovery Studio (BIOVIA, 2016). Struktura Pgp preuzeta je iz PDB baze (Protein Data Bank; PDB ID: 3G5U) (Aller i sar., 2009).

Rezultati istraživanja i diskusija

AG molekul ima samo jednu slobodnu hidroksilnu grupu čijim raskidanjem može nastati stabilan AG-radikal. BDE, IP, PDE, PA i ETE vrednosti izračunate primenom M06-2X/6-311++G(d,p) nivoa teorije u vodi kao rastvaraču date su u Tabeli 1.

Tabela 1. Parametri antioksidativnih mehanizama izračunati primenom DFT-metode (u kJ mol^{-1})

Table 1. DFT calculated parameters of antioxidant mechanisms (in kJ mol^{-1})

HAT	SET-PT		SPLET	
BDE	IP	PDE	PA	ETE
393	536	30	138	428

Upoređujući prikazane vrednosti entalpije, jasno se vidi da najnižu vrednost ima PA, koja karakteriše prvi korak SPLET mehanizma. To znači da se u vodenoj sredini lako odvija disocijacija uz nastanak anjona kao intermedijerne vrste, koji je stabilizovan solvatacijom. Sa druge strane, upoređujući ETE vrednosti sa BDE vrednostima, može se zaključiti da je nastanak AG-radikala otpuštanjem elektrona iz AG-anjona gotovo

jednako energetski zahtevno kao i direktan nastanak AG-radikala, homolitičkim raskidanjem O-H veze. Stoga se pretpostavlja da su ova dva mehanizma konkurentna, ali da se reakcije odvijaju različitim brzinama. Zbog vrlo visoke IP vrednosti, SET-PT mehanizam se isključuje kao moguć mehanizam nastanka AG-radikala.

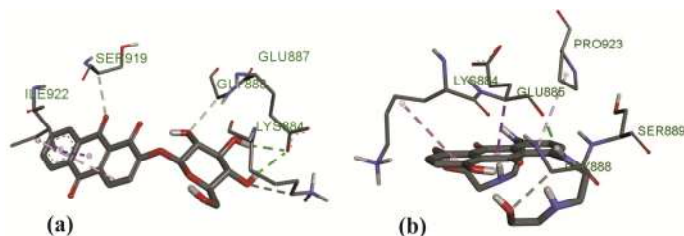
U vodi kao polarnom rastvaraču je termodinamički najpovoljniji proces nastanka AG-anjona. Primenom Molecular Docking analize ispitivana je mogućnost ovog anjona da se veže za P-glikoprotein i spreči njegov negativan uticaj na transport antikancer leka MX. MX je uzet kao parametar jer u svojoj strukturi ima antrahinonsko jezgro, pa je jačina njegovog vezivanja za ovaj protein uporediva sa jačinom vezivanja AG-anjona. Rezultati doking analize su dati u Tabeli 2.

Tabela 2. Rezultati doking-analize AG-anjona i MX sa P-glikoproteinom. E_b je energija vezivanja liganda sa proteinom, a K_i je konstanta inhibicije

Table 2. . Results of docking analysis of AG-anion and MX with P- glycoprotein. E_b is energy of binding and K_i is inhibition constant

Ligand <i>Ligand</i>	Aminokiselina <i>Amino acid</i>	Udaljenost atoma (Å) <i>Atom distance (Å)</i>	E_b (kcal mol ⁻¹)	K_i (μM)
AG ⁻	Lys 884	3.370	-4.68	372.34
	Glu 887	2.388		
	Glu 887	2.259		
	Gly 888	2.871		
	Ser 919	2.817		
	Ile 922	3.986		
	Ile 922	4.164		
MX	Lys 884	4.584	-0.01	$9.85 \cdot 10^5$
	Glu 885	1.996		
	Glu 885	3.223		
	Gly 888	2.322		
	Gly 888	3.223		
	Pro 923	4.535		

Kao što se iz prethodne tabele može videti, AG-anjon se vezuje sa Pgp na istim reakcionim mestima kao i lek MX. To su pre svega veze ostvarene preko aminokiselina lizin (Lys 884) i glicin (Gly 885), ali i međusobno susednih aminokiselina: glutaminska kiselina (Glu 887 i Glu 885), serin (Ser 919), izoleucin (Ile 922) i prolin (Pro 923) (Slika 2). Što energija vezivanja i konstanta inhibicije imaju nižu vrednost, to se dati ligand jače vezuje za protein. Obe ove veličine su nekoliko desetina puta niže za AG-anjon nego za ispitivani lek. To znači da će se na datim reakcionim mestima AG-anjon vezati lakše i brže za Pgp nego MX, pa će time inhibirati negativni uticaj Pgp na transport ovog leka, i time sprečiti pojavu rezistentnosti na lek.



Slika 2. a) AG^- – Pgp (a) i MX – Pgp (b) mesta vezivanja
 Figure 2. AG^- – Pgp (a) and MX – Pgp (b) docking positions.

Zaključak

U ovom radu je primenom DFT metode ispitana mogućnost AG da nagradi stabilan AG-radikal. Izračunavanja su vršena u vodi kao najčešćem rastvaraču. Termodinamički parametri ukazuju na to da u ovim uslovima AG u najvećoj meri gradi radikal prateći SPLET mehanizam. Po ovom mehanizmu, u prvom koraku reakcije se formira AG-anjon, koji zatim prelazi u radikal oslobađajući elektron. Molecular Docking metodom je utvrđeno da AG-anjon može biti vrlo efikasan inhibitor Pgp. Time bi se sprečio negativan efekat Pgp koji se ogleda u pojavi rezistentnosti na neke lekove kao što je MX. Zbog toga se pretpostavlja da bi primena ekstartkata koji u svom sastavu imaju AG, kao prehrambenih boja, imala višestruki pozitivan uticaj na zdravlje ljudi.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekata “Metode modeliranja na više skala sa primenama u biomedicini“ (broj: 174028), „Sinteza, modelovanje, fizičko-hemijske i biološke osobine organskih jedinjenja i odgovarajućih kompleksa metala“ (broj: 172016) i „Dinamika nelinearnih fizičko-hemijskih i biohemijskih sistema sa modeliranjem i predviđanjem njihovih ponašanja pod neravnotežnim uslovima“ (broj: 172015), koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Literatura

- Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. 323 (5922) 1718-1722.
- BIOVIA Discovery Studio, 2016, <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Science*. 74 (17) 2157-2184.
- Ford L., Rayner C.M., Blackburn R.S. (2017). Comparative sorption isotherms for colorants present in Dyers' madder (*Rubia tinctorum L.*) provide new insights into

- historical dyeing. *Coloration Technology*. 0 (0) 1-10. Dostupno: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cote.12327/epdf>
- Jeremić S., Filipović N., Peulić A., Marković Z. (2014). Thermodynamical aspect of radical scavenging activity of alizarin and alizarin red S. Theoretical comparative study. *Computational and Theoretical Chemistry*. 1047 (0) 15-21.
- Kawasaki Y., Goda Y., Maitani T., Yoshihira K., Takeda M. (1992). Determination of madder color in foods by high performance liquid chromatography. *Food Hygiene and Safety Science*. 33 (6) 563-568.
- Marković Z., Tošović J., Milenković D., Marković S. (2016) Revisiting the solvation enthalpies and free energies of the proton and electron in various solvents. *Computational and Theoretical Chemistry*. 1077(0):11-17.
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 30 (16) 2785-2791.
- Sharom F. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 9 (1) 105-127.

ANTIOXIDATIVE AND INHIBITOR ACTIVITY OF ALIZARIN-2-GLYCOSIDE

*Edina Avdović¹, Svetlana Jeremić², Ana Amić³, Marijana Pirković⁴,
Dejan Milenković⁵, Jelena Đorović⁵, Zoran Marković²*

Abstract

In this paper was investigated the antioxidative activity of alizarin-2-glycoside. All results were obtained using the DFT method. For calculations, the M06-2X method was used in combination with the 6-311++G(d,p) base set. Water was used as a solvent. The values of enthalpy were used as thermodynamic parameters on the basis of which the antioxidative capacity of alizarin-2-glycoside was evaluated. The Molecular Docking method was used for assessing the ability of alizarin-2-glycoside to inhibit the negative effect of P-glycoprotein.

Key words: alizarin-2-glycoside, antioxidant activity, DFT, enthalpy, P-glycoprotein

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (edinanp@hotmail.com);

²State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36 300 Novi Pazar, Serbia.

³Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University, Osijek, Croatia

⁴Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac, Serbia

⁵Bioengineering Research and Development Center – BioIRC, Prvoslava Stojanovića 6, Kragujevac, Serbia;