

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Nastavno-naučno veće

Predmet: Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Ilije Cvijetića, istraživača-saradnika Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu, d.o.o.

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 11. juna 2015. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Ilije Cvijetića, istraživača-saradnika Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu, d.o.o., prijavljene pod naslovom:

„Hemijska i biološka karakterizacija novosintetisanih derivata 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina i molekulsko modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti i fizičko-hemijskih osobina“

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo sledeći

IZVEŠTAJ

1. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija Ilije Cvijetića pod navedenim naslovom napisana je na 246 strana A4 formata (prored 1,5), sadrži 131 sliku (od toga 45 u Prilogu), 62 tabele (od toga 37 u Prilogu). Rad obuhvata sledeća poglavlja: 1. Uvod (3 strane), 2. Opšti deo (46 strana), 3. Naši radovi (72 strane), 4. Materijali i metode (24 strane), 5. Zaključak (5 strana), 6. Literatura (16 strana, 203 citata) i 7. Prilog (80 strana). Pored navedenog, rad sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj, listu skraćenica i biografiju kandidata.

U **Opštem delu** opisane su sintetičke metode za dobijanje 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina (ADK) i razmatran je mogući mehanizam njihovog antibakterijskog dejstva. Opisana je sposobnost dejstva ADK na mnoštvo različitih bioloških meta, koja uglavnom potiče od sklonosti ADK ka kompleksiranju divalentnih metalnih jona kao kofaktora proteina. Posebna pažnja posvećena je opisu mehanizma dejstva enzima karboanhidraze (KA) i mogućim strategijama za njegovu

inhibiciju. Ukratko su opisane i procedure za sintezu aril-pirazol karboksilnih kiselina (APK), metabolički stabilnijih derivata ADK. Pregledno su prikazani principi i metode za određivanje važnih fizičko-hemijskih karakteristika biološki aktivnih jedinjenja kao što su pK_a vrednosti, konstante stabilnosti kompleksa, redoks osobine molekula. Dat je kratak osvrt i na tautomeriju ADK i APK. Poslednji deo Opšteg dela ove disertacije posvećen je opisu metoda za analizu odnosa strukture i aktivnosti jedinjenja (QSAR), uz detaljan opis 3D-QSAR metoda i GRIND metodologije za izračunavanje molekulskih deskriptora izvedenih iz polja molekulskih interakcija (Molecular Interaction Fields, MIF).

Poglavlje **Naši radovi** sastoji se iz tri celine u kojima kandidat predstavlja rezultate svojih istraživanja. U okviru prve celine opisana je sinteza ADK *Claisen*-ovom kondenzacijom supstituisanih acetofenona i dietil-oksalata. Prikazano je ispitivanje antibakterijske aktivnosti ADK i strukturnih analoga prema sojevima bakterija otpornim na mnoge od poznatih antibiotika (Multidrug Resistant strains, MDR sojevi). U daljem tekstu ovog poglavlja opisani su rezultati ispitivanja protolitičkih ravnoteža, elektrohemijjskih osobina ADK, njihovog kompleksiranja sa Zn^{2+} jonom, kao i kvantno-hemijsko izračunavanje stabilnosti tautomernih oblika ADK u vodi kao rastvaraču.

U okviru druge celine opisana je sinteza APK kao i proučavanje protolitičkih ravnoteža i tautomerije ove serije jedinjenja. Prikazani su rezultati inhibicije nekoliko izoformi enzima KA pomoću APK.

Treća celina ove disertacije posvećena je primeni različitih tehnika molekulskog modelovanja u svrhu racionalizacije odnosa između strukture jedinjenja i njihove biološke aktivnosti. Kao model set jedinjenja za proveru mogućnosti 3D QSAR metode zasnovane na GRIND deskriptorima iskorišćena su već poznata konformaciono rigidna jedinjenja tetroksanskog tipa i njihove antiproliferativne aktivnosti prema dve ćelijske linije raka (HeLa i FemX). Potvrđena je korisnost GRIND metodologije za racionalizaciju odnosa struktura-aktivnost u slučajevima kada tačna biološka meta dejstva nije poznata (tzv. dizajn lekova na bazi struktura liganada, *Ligand based drug design*, LBDD). Istom metodologijom analiziran je odnos između strukture i antibakterijske aktivnosti ADK. Takođe je proučavana sličnost oblika i farmakofornih tačaka ADK i norfloksacina kao templatnog molekula. Selektivnost APK prema dve izoforme KA tumačena je uz pomoć tehnika molekulskog modelovanja, prevashodno

molekulskog dokinga. Sistematski su poređeni MIF-ovi aktivnih mesta četiri izoforme KA i izvedeni su zaključci o strukturnim promenama potrebnim da bi se poboljšala aktivnost i izoformska selektivnost.

U okviru poglavlja **Materijali i metode** kandidat daje detaljan opis eksperimentalnih i računarskih procedura korišćenih u okviru doktorske disertacije.

U poglavlju **Zaključak** sumirani su i prokomentarisani rezultati dobijeni u okviru doktorske disertacije.

Navedena **Literatura** (203 citata) obuhvata radove iz oblasti istraživanja i iscrpno pokriva sve delove disertacije.

U **Prilogu** su dati dodatni eksperimentalni podaci dobijeni u okviru proučavanja opisanih u poglavlju Naši radovi.

2. Kratak opis postignutih rezultata

U prvom delu doktorske disertacije opisana je sinteza, fizičko-hemijska karakterizacija i ispitivanje antibakterijske aktivnosti ADK prema MDR bakterijama. U drugom delu ove disertacije prikazana je sinteza APK, izvedenih iz ADK, i određivanje inhibitorne aktivnosti APK prema različitim izoformama enzima KA. Takođe su ispitane i protolitičke ravnoteže i tautomerne osobine APK u rastvoru. Treći deo teze opisuje primenu različitih tehnika molekulskog modelovanja u racionalizaciji biološke aktivnosti ADK i APK, sa posebnim naglaskom na 3D QSAR i GRIND metodologiju.

A. Arildiketo kiseline

Claisen-ovom kondenzacijom iz supstitisanih acetofenona sintetisana je serija od dvadeset i jedne različito supstituisane ADK i ispitana im je antibakterijska aktivnost prema MDR sojevima bakterija. Jedinjenja sa voluminoznim alkil supstituentima u *orto*-položaju fenilnog jezgra pokazala su se najaktivnijim prema norfloksacin-rezistentnom soju bakterije *Staphylococcus aureus*, a jedinjenje **12** (4-(2,5-di-cikloheksilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina) je pokazalo 10-11 puta veću aktivnost od najaktivnije ADK iz prethodno proučavanog seta, kao i 10 puta veću aktivnost od norfloksacina prema istom soju bakterija. Strukturnim modifikacijama molekula i ispitivanjem antibakterijske aktivnosti utvrđeno je da je diketo deo molekula

esencijalan za antibakterijsku aktivnost ADK. Kao pretpostavljene mete dejstva ADK na bakterijsku ćeliju predloženi su enzimi prenil-transferaze, koji u aktivnom mestu sadrže Mg^{2+} jon. Dalji enzimski testovi neophodni su radi potvrde ove hipoteze.

Određivanjem pK_a vrednosti ADK nađeno je da većina ispitivanih jedinjenja predstavlja diprotične kiseline čija se pK_{a1} vrednost nalazi u opsegu 1,96-2,34, a pK_{a2} u opsegu 6,50-7,61. Ovo znači da je u jako kiseljoj sredini dominantan molekulski oblik (na pH 1 više od 90% H_2A), dok su na pH vrednosti krvi (7,4) zastupljeni monoanjonski i dianjonski oblik (HA^- ~30% i A^{2-} ~70%). U literaturi opisana inhibitorna aktivnost ADK prema enzimima KA, koji u aktivnom mestu sadrže Zn^{2+} jon, dala je ideju da se detaljnije ispita reakcija kompleksiranja ADK sa Zn^{2+} jonom. Potenciometrijskim titracijama uz obradu podataka u programu HYPERQUAD, nađeno je da u rastvoru na pH = 7,4 dominira kompleksna čestica tipa 1:1 (ML), sa konstantom stabilnosti $\log \beta$ oko 5. Pored kompleksa tipa ML, na pH 7,4 moguće je postojanje i kompleksa tipa ML_2 , $M(OH)L$ i $M(OH)L_2$.

Kvantno-hemijskim izračunavanjima predviđena je stabilnost različitih tautomernih oblika ADK u vodenoj sredini. Pokazano je da korišćenjem PCM modela (Polarizable continuum model) vode nije moguće dobiti redosled stabilnosti tautomera koji odgovara eksperimentalnim rezultatima, usled zanemarivanja eksplicitnog vodoničnog vezivanja u ovakvom modelu. Dodatkom jednog molekula vode vodonično vezanog u energetski najpovoljniji položaj oko molekula ADK dobijen je redosled stabilnosti tautomera koji je odgovarao eksperimentalnim rezultatima.

U okviru ove disertacije ispitane su i redoks osobine metil-supstituisanih ADK upotrebom ciklične voltametrije i diferencijalne pulsne polarografije. ADK pokazuju ireverzibilne ciklovoltamograme pri svim ispitivanim brzinama skeniranja, što ukazuje na nedovoljnu stabilnost radikal-katjona nastalog jednoelektronskom oksidacijom ADK. Redukcioni potencijali ADK, određeni diferencijalno pulsnom polarografijom, bili su zavisni od stanja protonovanosti ADK. Energija LUMO orbitala, kao i indikatorska varijabla koja kvantifikuje sterne uticaje supstituenata, pokazale su statistički značajnu korelaciju sa redukcionim potencijalima ADK i mogu se iskoristiti za predviđanje redukcionih osobina strukturno sličnih jedinjenja.

B. Aril-pirazol karboksilne kiseline

Serijski od dvadeset i sedam APK sintetisani su polazeći od ADK, koristeći hidrazin-hidrat u glacialnoj sirćetnoj kiselini. Metabolički stabilnije APK su, za razliku od ADK, pokazale inhibitornu aktivnost prema enzimu KA, selektivno delujući na izoforme KA IX i XII. Ove izoforme su značajne za medicinsku hemiju jer predstavljaju nove mete za razvoj antitumorskih lekova. Jedinjenja sa voluminoznijim supstituentima u *para*-položaju fenilnog prstena inhibirala su dejstvo KA XII u niskim mikromolarnim koncentracijama, dok su jedinjenja sa alkil supstituentima u *orto*- i *meta*-položajima inhibirala KA IX u opsegu IC_{50} vrednosti od 5 do 25 μM .

Takođe su eksperimentalno određene pK_a vrednosti i glavni tautomerni oblici APK u rastvoru. NOESY NMR spektroskopijom određen je dominantan tautomerni oblik APK, kao i *N*-metil supstituisanih APK u DMSO-u. Pokazano je da se dominantni oblik nekoliko APK u rastvoru podudara sa oblikom nađenim u kristalnoj strukturi 5-fenil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline. Pošto su pK_{a1} vrednosti više za APK (4,03-4,67) u odnosu na ADK (1,96-2,34), na pH krvi (7,4) one će postojati dominantno kao monoanjon (HA^-).

C. Molekulsko modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti

Racionalizacija dobijenih bioloških podataka i dizajn novih, aktivnijih struktura, mogući su primenom različitih tehnika molekulskog modelovanja. Radi ispitivanja primenljivosti GRIND metodologije u LBDD, kao test set upotrebljene su strukture i antiproliferativne aktivnosti jedinjenja tetroksanskog tipa. S obzirom da je kritični korak u svakoj 3D QSAR analizi odabir odgovarajuće, *aktivne* konformacije molekula, konformaciono kruti molekuli kao što su tetroksani predstavljali su odličan model sistem za proučavanje 3D QSAR metode. GRIND metodologija se pokazala kao veoma korisna u slučajevima kada tačna meta biološkog dejstva nije poznata već su jedino poznati podaci o biološkoj aktivnosti prema celim ćelijama.

U cilju racionalizacije antibakterijske aktivnosti ADK prema MDR sojevima bakterija primenjene su različite tehnike molekulskog modelovanja. Preklapanjem struktura ADK sa strukturom norfloksacina po kriterijumima oblika i farmakoforne sličnosti, pokazano je da je preklapanje po kriterijumu oblika najbolje kod najaktivnijih

ADK, dok je istovremeno preklapanje farmakofornih tačaka najaktivnijih ADK i norfloksacina bilo najmanje. Ovo ukazuje na drugačiji mehanizam antibakterijskog delovanja ADK od mehanizma dejstva norfloksacina.

3D QSAR zasnovan na GRIND metodologiji pokazao se veoma korisnim u pronalaženju farmakofornih tačaka neophodnih za antibakterijsku aktivnost ADK. Dobijeni model može biti iskorišćen za dizajn aktivnijih struktura na bazi ADK, kao i za virtuelni skrining većih baza podataka radi nalaženja novih farmakofora sa sličnim biološkim dejstvom.

Doking studije APK i sistematsko poređenje MIF-ova aktivnih mesta izoformi KA I, II, IX i XII pokazale su da je deo aktivnog mesta KA sa nepolarnim aminokiselinim ostacima oko položaja 130 (130's segment) bitan za ostvarivanje izoformske selektivnosti inhibitora. Rezultati ove studije mogu se iskoristiti u svrhu dizajna novih, selektivnijih inhibitora KA IX i XII, povećavanjem broja i energije interakcija sa 130's segmentom a istovremeno zadržavajući polarnu „glavu“ molekula radi kompleksiranja sa Zn^{2+} jonom.

3. Upporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

Zbog raznovrsnosti ispoljenih bioloških dejstava, ADK predstavljaju važnu grupu organskih molekula za razvoj novih lekova. Ova jedinjenja koordinativno vezuju divalentne metalne jone (M^{2+}) pa mogu inhibirati dejstvo različitih metaloenzima. Povećana upotreba antibiotika dovela je do pojave superbakterija otpornih na dejstvo postojećih antibiotika. Radi prevazilaženja problema otpornosti bakterija, važno je pronalaženje novih tipova struktura sa alternativnim mehanizmima antibakterijskog dejstva. U literaturi se nalazi mali broj radova koji opisuje aktivnost ADK prema MDR bakterijama. Takođe, tačan mehanizam dejstva ADK kao antibakterijskih agenasa nije utvrđen. Kao moguća meta dejstva ADK na bakterijsku ćeliju, u literaturi se navode enzimi iz klase prenil-transferaza, koji su uključeni u biosintezu ćelijskog zida i u aktivnom mestu sadrže jedan ili dva Mg^{2+} jona. ADK i njihovi etil-estri takođe pokazuju i inhibitorno dejstvo na bakterijske metionin aminopeptidaze (MetAP), što je još jedan od mogućih mehanizama dejstva ADK na MDR bakterije. U okviru ove doktorske disertacije sintetisane su do sada najaktivnije ADK prema nekoliko MDR sojeva bakterija. Takođe je po prvi put napravljen 3D QSAR model antibakterijske aktivnosti

ADK, pomoću koga je moguće dizajnirati nove, aktivnije derivate kao i pronaći nove tipove struktura sa sličnim biološkim dejstvom.

U literaturi je opisana sposobnost ADK da inhibiraju dejstvo enzima KA, koji u aktivnom mestu sadrže Zn^{2+} jon. Inhibitori KA se u praksi koriste u terapiji glaukoma, epilepsije, kao diuretici itd. Izoforme KA IX i XII su posebno interesantne jer predstavljaju nove mete u terapiji čvrstih, invazivnih tumora. Dizajn i sinteza aktivnih i selektivnih inhibitora izoformi KA IX i XII predstavlja novi pristup u otkriću antitumorskih agenasa. U okviru ove doktorske disertacije ispitana je inhibitorna aktivnost ADK prema KA i izvršene su strukturne modifikacije u metabolički stabilnije APK što je dovelo do povećavanja aktivnosti prema KA. Do sada opisani inhibitori KA na bazi karboksilatnog jona nisu pokazali izoformsku selektivnost prema KA IX i XII koja je primećena u okviru ovog rada. Poređenjem aktivnih mesta četiri izoforme KA pomoću MIF-ova dobijen je do sada najbolje opisani model za razlikovanje veoma sličnih aktivnih mesta KA, što je u kombinaciji sa rezultatima doking studija dovelo do važnih zaključaka kako modifikovati strukture APK radi postizanja bolje aktivnosti i izoformske selektivnosti.

Velika većina fizičko-hemijskih parametara ADK i APK (pK_a , konstante stabilnosti, tautomerija u različitim rastvaračima, elektrohemijske osobine) prijavljenih u okviru ove teze do sada se nisu mogle pronaći u literaturi. Ovi fizičko-hemijski parametri mogu poslužiti kao polazna osnova za dalja proučavanja, kao i za „treniranje“ mnogih programa za predviđanje fizičko-hemijskih parametara čija tačnost najviše zavisi od pouzdanih eksperimentalnih podataka.

Tehnike molekuskog modelovanja su vrlo korisne za racionalizaciju i predviđanje fizičko-hemijskih osobina i biološke aktivnosti, čime se olakšava proces otkrića, dizajna i razvoja novih lekova. Što se tiče 3D QSAR modela, u literaturi je i dalje dominira upotreba tehnika CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) i CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Index Analysis) u poređenju sa GRIND metodologijom. Primena ovih tehnika je neizbežno ograničena na strukturno veoma slične molekule zbog kriterijuma prostornog svrstavanja struktura koji prethodi izračunavanju MIF-ova. GRIND metodologija korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji nezavisna je od međusobnog poravnavanja struktura, čime se domen primenljivosti

kreiranih modela značajno proširuje. Nadamo se da će rezultati ove doktorske disertacije doprineti većoj upotrebi GRIND metodologije u akademskim i industrijskim istraživanjima.

4. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. Ilija N. Cvijetić, Željko P. Žižak, Tatjana P. Stanojković, Zorica D. Juranić, Nataša Terzić, Igor M. Opsenica, Dejan M. Opsenica, Ivan O. Juranić, Branko J. Drakulić
An alignment independent 3D QSAR study of the antiproliferative activity of 1,2,4,5-tetraoxanes

European Journal of Medicinal Chemistry, 2010 (45) 4570-4577.

2. Ilija N. Cvijetić, Muhammet Tanc, Ivan O. Juranić, Tatjana Ž. Verbić, Claudiu T. Supuran, Branko J. Drakulić

5-Aryl-1H-pyrazole-3-carboxylic acids as selective inhibitors of human carbonic anhydrases IX and XII

Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2015 (23) 4649-4659.

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34):

1. Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić, Nina Đ. Jovanović, Ivan O. Juranić, Branko J. Drakulić

Stoichiometric ratio and formation constants of aryldiketo acid complexes with Zn^{2+}

ICOSECS 8, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, June 2013, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts p. 59, Poster BS-AS P17

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u celini (M63)

1. Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić, Ivan O. Juranić, Branko J. Drakulić

Aryldiketoacids. Synthesis, high resolution mass spectra, and pharmacophoric similarity with floxacins

50th Meeting of the Serbian Chemical Society, Jun 14-15, 2012, Belgrade, Serbia, Proceedings, 232-235, usmeno izlaganje

2. Ilija N. Cvijetić, Muhammet Tanç, Ivan O. Juranić, Tatjana Ž. Verbić, Claudiu T. Supuran, Branko J. Drakulić

Interactions of 5-aryl-1*H*-pyrazole-3-carboxylic acids with four human carbonic anhydrase isoforms - a molecular modelling perspective

52nd Meeting of the Serbian Chemical Society, May 29-30, 2015, Novi Sad, Serbia, Proceedings, p. 90-95

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

1. Nina Đ. Jovanović, Jelena S. Mišić, Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić, Gordana V. Popović, Ivan O. Juranić

Determination of stability constants of aryldiketo acid complexes with Zn(II)

51st Meeting of the Serbian Chemical Society, June 5-7, 2014, Niš, Serbia, Book of Abstracts, p. 22

2. Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić, Ivan O. Juranić, Branko J. Drakulić

Stability 4-phenyl-2,4-dioxobutanoic acid tautomeric forms in vacuum, implicit, and explicit solvent model

Third Conference of Young Chemists of Serbia, October 24, 2015, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts P96. ISBN 978-86-7132-059-7

3. Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić, Pedro Ernesto de Resende, Paul Stapleton, Simon Gibbons, Branko J. Drakulić, Mire Zloh

Antibacterial activity of aryldiketo acids toward multidrug resistant bacterial strains

53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, June 10-11, 2016, Kragujevac, Serbia, Book of Abstracts, p. 100

5. Zaključak

Komisija je na osnovu detaljnog pregleda doktorske teze **Ilije Cvijetića** pod naslovom: “**Hemijska i biološka karakterizacija novosintetisanih derivata 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina i molekulsko modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti i fizičko-hemijskih osobina**” zaključila da je kandidat detaljnim i sistematičnim proučavanjem fizičko-hemijskih i bioloških osobina arildiketo i aril-pirazol karboksilnih kiselina dao značajan doprinos razvoju oblasti medicinske hemije. Kao najvažnije rezultate ovog rada možemo izdvojiti dizajn i sintezu derivata ADK sa izuzetnom aktivnošću prema MDR sojevima bakterija, kao i nalaženje inhibitora KA na bazi karboksilata sa izraženom izoformskom selektivnošću prema KA IX i XII. Eksperimentalno određene fizičko-hemijske osobine (pK_a , rastvorljivost, sastav i stabilnost kompleksa sa Zn^{2+} jonom, tautomerija i redoks osobine) značajni su

podaci za dalja farmakološka ispitivanja ovih jedinjenja. Tehnike molekuskog modelovanja zasnovane na poljima molekulskih interakcija uspešno su primenjene za racionalizaciju odnosa strukture i biološke aktivnosti. Iz ove doktorske disertacije proistekla su dva rada u vrhunskim naučnim časopisima (M21) i šest saopštenja na skupovima od međunarodnog (1) i nacionalnog (5) značaja.

Na osnovu svega izloženog, Komisija smatra da su ispunjeni svi uslovi da se rad **Ilije Cvijetića** pod naslovom: **“Hemijska i biološka karakterizacija novosintetisanih derivata 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina i molekulsko modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti i fizičko-hemijskih osobina”** prihvati kao doktorska teza, čime kandidat ostvaruje uslove za sticanje akademskog stepena i zvanja doktora hemijskih nauka. Na osnovu toga, predlažemo Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta da se kandidatu **Iliji Cvijetiću** odobri odbrana doktorske disertacije pod navedenim naslovom.

U Beogradu, 14. juna 2016. godine

Komisija:

dr Tatjana Ž. Verbić, docent (mentor)

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Mario Zlatović, docent

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Mire Zloh, full professor

University of Hertfordshire, Hatfield, Hertfordshire, UK