



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLINIČKA MEDICINA

***IN SILICO* ODREĐIVANJE FIZIČKO-HEMIJSKIH,
FARMAKOKINETSKIH I TOKSIKOLOŠKIH
PARAMETARA I *IN VITRO* ISPITIVANJE
ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI
NOVOSINTETISANIH DERIVATA N-SUKCINIMIDA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:
Prof. dr Nataša Milošević
Dr sc Dimitar Jakimov

Kandidat:
Jelena Ćurčić

Novi Sad, 2019. godina

Zahvaljujem se mom mentoru prof. dr Nataši Milošević na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, na svim savetima, sugestijama, trudu i profesionalnom i ličnom zalaganju u izradi ove doktorske disertacija.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Dimitru Jakimov na stručnim savetima i sugestijama tokom rada na tezi.

Zahvaljujem na lepoj saradnji, pomoći u eksperimentalnom radu i savetima dr Vesni Kojić. Veliku zahvalnost za pomoć u izvođenju i tumačenju molekuskog dokinga dugujem dr Nebojši Pavlović i doc. dr Dejanu Ćirin, a za ustupljene supstance koje su bile predmet istraživanja zahvaljujem se prof. dr Nebojši Banjac sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i prof. dr Gordani Ušćumlić sa Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Doktorat je urađen u okviru projekta pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (OI 172013).

Želim da se zahvalim prof. dr Nataši Milić, dr Vesni Kojić, dr Ivani Borišev, doc. dr Strahinji Kovačević i doc. dr Dejanu Ćirin na recenziji doktorske disertacije i stručnim savetima i sugestijama.

Posebno sam zahvalna svojoj porodici, na neizmernoj ljubavi, razumevanju i podršci. Hvala što su verovali u mene, što nisu dozvolili da posustanem u teškim vremenima i što su moj oslonac oduvek i zauvek.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Ćurčić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Nataša Milošević, vanredni profesor Dr Dimitar Jakimov, naučni saradnik
Naslov rada: NR	<i>In silico</i> određivanje fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih i toksikoloških parametara i <i>in vitro</i> ispitivanje antiproliferativne aktivnosti novosintetisanih derivata N-sukcinimida
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srp. /eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 8 / stranica 137 / slika 24 / grafikona - / tabela 41 / referenci 192 / priloga -)
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Farmaceutska hemija; toksikološka hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	sukcinimidi; farmaceutski preparati; farmakokinetika; toksikokinetika; dizajniranje lekova; reverzno-fazna hromatografija; hromatografija na tankom sloju; proliferacija ćelija; kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti
UDK	615.2.015:547-327 547-327:543.544
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>UVOD: Sukcinimidi su jedinjenja koja pokazuju višestruke farmakološke efekte uključujući i antiproliferativnu aktivnost, zahvaljujući prisustvu farmakofore sa dva hidrofobna regiona i dva regiona bogata elektronima. Savremeni dizajn lekova ima za cilj da se modifikacijama u strukturi (promena vrste, položaja i orijentacije supstituenata) i <i>in silico</i> računarskim metodama predvide i optimizuju farmakokinetičke osobine i bezbednosni profil kandidata za lek. U ranoj fazi razvoja lekova se koriste postojeće baze podataka o molekulskim, farmakokinetičkim i toksikološkim parametrima već ispitanih jedinjenja i pomoću matematičkih modela i algoritama predviđaju se osobine novih molekula, eliminišu se neodgovarajući kandidati i postiže se ušteda u vremenu i materijalnim sredstvima.</p> <p>CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Da se ispituju fizičko-hemijske karakteristike 11 novosintetisanih metil-etil-N-aril-sukcinimida na osnovu strukture, primenom različitih softverskih paketa; da se na osnovu strukture odrede farmakokinetički i toksikološki parametri, primenom različitih softverskih paketa; da se ispita retenciono ponašanje, odnosno odrede retencione konstante za svako jedinjenje primenom</p>

visokoefikasne hromatografije na tankom sloju (HP-TLC) i ispita mogućnost primene retencionih konstanti kao mere lipofilnosti ispitivanih jedinjenja; da se ispita antiproliferativna aktivnost na odabranim kulturama ćelija karcinoma i na zdravim ćelijama fibroblasta pluća; da se analizom molekuskog dokinga ustanovi vezivanje za estrogene receptore.

MATERIJAL I METODE: Ispitano je retenciono ponašanje 11 novosintetisanih derivata sukcinimida primenom visokoefikasne hromatografije na tankom sloju (HP-TLC) obrnute faze uz primenu dvokomponentne smeše vode i organskog rastvarača (metanola, acetonitrila ili acetona), sa odgovarajućim zapreminskim udelom organskog rastvarača kao mobilne faze. Iz razvijenih hromatograma su izračunate retencione konstante R_M^0 i S . Logaritam podeonog koeficijenta ($\log P$) određen je *in silico*, korišćenjem različitih računarskih programa. *In silico* su određene fizičko-hemijske karakteristike, farmakokinetski parametri, toksikološki parametri, akvatična toksičnosti i afinitet vezivanja za estrogene receptore. Izračunate su vrednosti afiniteta za 4 vrste receptora (G-protein spregnuti receptori, jonski kanali, inhibitori kinaza, nuklearni receptori). Antiproliferativna aktivnost ispitivanih derivata sukcinimida određena je primenom kolorimetrijskog testa sa tetrazolijum solima (MTT testa) na komercijalnim kulturama ćelija (MRC-5, A549, HeLa, MDA-MB-231, MCF-7, HT-29) i izračunate su IC_{50} vrednosti. Urađena je i doking analiza sukcinimida prema ERA (estrogen receptor alfa) i ERB (estrogen receptor beta) i dobijene su vrednosti energije formiranja kompleksa sa posmatranim receptorima (MolDock Score).

REZULTATI: Statistički najznačajnije linearne korelacije dobijene su između eksperimentalno određenih hromatografskih parametara (R_M^0 i S) i *in silico* parametara lipofilnosti $M\log P$ i $C\log P$. Ispitivanjem uticaja promene R_M^0 i S na farmakokinetske karakteristike dobijeni su rezultati koji pokazuju paraboličnu zavisnost konstante apsorpcije (K_a) i procenta vezivanja za proteine plazme (PPB) od posmatranih retencionih konstanti, dok je zavisnost sa volumenom distribucije (V_d) i sposobnošću prolaska kroz krvno-moždanu barijeru ($\log BBB$) bila linearnog tipa. Toksičnost ispitivanih

	<p>jedinjenja, procenjena na osnovu <i>in silico</i> dobijenih LD₅₀ vrednosti, nije bila viša od toksičnosti već registrovanih lekova sa strukturom sukcinimida, i dala je parabolične zavisnosti u odnosu na R_M⁰ i S vrednosti. Eksperimentalno nijedno od ispitivanih jedinjenja nije pokazalo aktivnost u odnosu na zdrave fibroblaste pluća. Najznačajniju antiproliferativnu aktivnost (najniže IC₅₀) su pokazala jedinjenja 6 i 7 u odnosu na ćelije linije MCF-7 i jedinjenje 11 u odnosu na A549 ćelijsku liniju. Doking analiza je pokazala niže energije formiranja kompleksa sa ERA, u odnosu na ERB.</p> <p>ZAKLJUČAK: Eksperimentalno određeni parametri R_M⁰ i S se mogu koristiti kao alternativne i pouzdane mere lipofilnosti analiziranih sukcinimida. Ispitivana jedinjenja pokazuju povoljne fizičko-hemijske karakteristike, predviđene <i>in silico</i> metodama i povoljne farmakokinetičke karakteristike: male vrednosti konstante apsorpcije, umeren volumen distribucije, povoljan afinitet vezivanja za proteine plazme, favorizovan prolazak kroz krvno-moždanu barijeru za lipofilnija jedinjenja. Procenjuje se da sva ispitivana jedinjenja, izuzev derivata sa –CN supstituentom, imaju zahtevani nizak stepen toksičnosti. Po antiproliferativnoj aktivnosti u odnosu na ćelije ER-zavisnog karcinoma dojke (MCF-7) izdvajaju se jedinjenja sa metil i nitro supstituentom u para položaju. Na osnovu malih energija formiranja kompleksa sa ERA, koji su eksprimirani na ćelijama MCF-7 linije, pretpostavlja se da bi mehanizam njihovog delovanja delimično mogao biti objašnjen uticajem na ERA, ali su potrebna dodatna istraživanja na tom polju.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	30.05.2019.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: Dr Nataša Milić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Dr Vesna Kojić, naučni saradnik, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Dr Ivana Borišev, naučni saradnik, Prirodno- matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Dr Strahinja Kovačević, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Dr Dejan Ćirin, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p>
---	--

University of Novi Sad

Faculty of Medicine

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Jelena Ćurčić
Mentor: MN	PhD Nataša Milošević, associate professor PhD Dimitar Jakimov, research associate
Title: TI	<i>In silico</i> physico-chemical, pharmacokinetic and toxicologic parameters determination and <i>in vitro</i> antiproliferative activity evaluation of newly synthesized succinimide derivatives
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2020.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters: 8; Pages: 137; Pictures: 24; Tables:41; References: 192; Annex:-
Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Pharmaceutical chemistry; Toxicological chemistry
Subject, Key words SKW	Succinimides; Pharmaceutical Preparations; Pharmacokinetics; Toxicokinetics; Drug Design; Chromatography, Reverse-Phase; Chromatography, Thin Layer; Cell Proliferation; Quantitative Structure- Activity Relationship
UC	615.2.015:547-327 547-327:543.544
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>INTRODUCTION: Succinimides have exhibited various pharmaceutical effects including antiproliferative activity due to an important structural fragment (a pharmacophore) presented in form of two hydrophobic regions and two electron-rich centers. Current development of new drugs involves modifications in structure (type, position and orientation of substituents) and usage of <i>in silico</i> computational programs to predict and optimize pharmacokinetic and safety profile of drug candidates. In early phase of drug development, databases regarding the molecular, pharmacokinetic and toxicological parameters of already tested compounds are used, mathematical models and algorithms are applied for predicting the properties of new molecules and inadequate candidates are eliminated saving time and resources.</p> <p>OBJECTIVES: Determination of physico-chemical properties of the analyzed methyl-ethyl-N-phenylsuccinimide derivatives by software packages; virtual pharmacokinetic and toxicology screening; investigation of retention behavior of the compounds by the reversed-phase HPTLC analysis and calculation of retention constants and their correlation with lipophilicity; in vitro evaluation of antiproliferative activity toward five carcinoma cell lines and normal</p>

fetal lung cell line; molecular behavior study on target estrogen receptors by molecular docking and correlation of antiproliferative activity toward ER+ breast carcinoma cell lines and *in silico* estrogen receptor affinity binding.

MATERIAL AND METHODS: Retention behavior of 11 newly synthesized succinimide derivatives was determined by reversed phase high performance thin layer chromatography (RP HPTLC) with the application of two-component mixtures water - organic solvent (methanol, acetonitrile or acetone) with adequate volume fractions of the organic modifier. After chromatographic development R_M^0 and S parameters were calculated. The logarithm of partition coefficient, logP for the analyzed compounds were calculated by different softwares. Physico-chemical properties, pharmacokinetic and toxicological parameters, aquatic toxicity and relative affinity to estrogen receptors were predicted *in silico*. The affinity toward 4 types of receptors (G-protein coupled receptors, ion channels, kinase inhibitors, nuclear receptors) were calculated as well. Standard MTT assay was applied to evaluate cytotoxic activities of the analyzed succinimides after cells were exposed. Antiproliferative activity were investigated toward commercial MRC-5, A549, HeLa, MDA-MB-231, MCF-7, HT-29 cell lines and IC_{50} values were calculated for each compound. MolDock Score that represents energy of binding to estrogen alfa and estrogen beta receptors was determined by molecular docking.

RESULTS: Statistically significant linear correlations were determined between the chromatographic retention constants (R_M^0 and S) and calculated logP, and the best two were obtained in correlation of retention constants with MlogP and ClogP. The examination of R_M^0 and S influence on pharmacokinetics indicated parabolic dependence of the absorption constant (K_a) and plasma protein binding predictor (PPB) from the observed constants while the volume of distribution (V_d) and the ability to cross the brain blood barrier (logBBB) had linear association with the retention parameters. The toxicity of the analysed compounds evaluated *in silico* as LD_{50} on rodents was lower in comparison with the drugs with succinimide structure that are on the market and had

	<p>parabolic correlation with the R_M^0 and S values. The experiments indicated that none of the compounds examined had cytotoxic activity toward the healthy lung fibroblast cells. The results of the <i>in vitro</i> assay shown that none of the investigated compounds demonstrated antiproliferative activity toward fetal lung cells. The most potent antiproliferative agents were compounds 6 and 7 toward MCF-7 cell line, and compound 11 toward A549 cell line. Molecular docking shown lower energy for binding to ERA in comparison to ERB.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>30.05.2019.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: PhD Nataša Milić, full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: PhD Vesna Kojić, research associate, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: PhD Ivana Borišev, research associate, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>member: PhD Strahinja Kovačević, assistant professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad</p> <p>member: PhD Dejan Ćirin, assistant professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Sukcinimidi kao biološki aktivni molekuli i potreba za novim jedinjenjima	3
2.2. Savremeni pristup u dizajniranju lekova	5
2.3. Molekulski deskriptori	9
2.3.1. Hidrofobnost (lipofilnost)	10
2.3.2. Rastvorljivost	14
2.3.3. Sposobnost stvaranja vodonične veze	15
2.3.4. Veličina molekula	15
2.3.5. Kiselost i baznost molekula	16
2.3.6. Šarža molekula	17
2.3.7. Oblik i fleksibilnost molekula	17
2.4. Farmakokinetički deskriptori	18
2.4.1. Deskriptori intestinalne apsorpcije	18
2.4.2. Deskriptori distribucije	19
2.4.3. Koeficijent raspodele između krvi i mozga	21
2.5. Deskriptori toksičnosti	22
2.6. Molekulski receptori	23
2.7. Empirijska pravila	25
2.8. Antiproliferativna aktivnost	27
2.9. Molekulski doking	29
3. CILJEVI I HIPOTEZE	30
3.1. Ciljevi rada	30
3.2. Hipoteze rada	31
4. MATERIJAL I METODE	32
4.1. Analizirana jedinjenja	32

4.2. Reverzno fazna hromatografija na tankom sloju (RP-TLC)	33
4.3. <i>In silico</i> deskriptori fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih, toksikoloških karakteristika i biološke aktivnosti ..	34
4.4. Antiproliferativna aktivnost	35
4.5. Doking analiza sukcinimida prema estrogenom receptoru alfa (ERA) i estrogenom receptoru beta (ERB)	37
4.5.1. Priprema proteina i liganda	37
4.5.2. Analiza molekuskog dokinga.....	37
4.6. Statističke metode	38
5. REZULTATI	39
5.1 Rezultati <i>in silico</i> ispitivanja	39
5.2. Farmakokinetički deskriptori	41
5.3. Toksikološki deskriptori	42
5.4. Deskriptori biološke aktivnosti	44
5.5. Hromatografski parametri-retencione konstante ispitivanih jedinjenja	45
5.6. Međusobna zavisnost R_M^0 parametara i S parametara za različite mobilne faze	49
5.7. Korelacija retencionih konstanti R_M^0 i S sa logP, logD i logS deskriptorima	54
5.8. Korelacije <i>in silico</i> dobijenih farmakokinetičkih deskriptora i retencionih parametara R_M^0 i S	65
5.9. Empirijska pravila.....	73
5.10. <i>In silico</i> toksičnost	74
5.11. Vezivanje za molekulske receptore	81
5.12. Antiproliferativna aktivnost	83
5.13. Korelacija <i>in silico</i> afiniteta vezivanja na estrogenim receptorima sa <i>in vitro</i> antiproliferativnom aktivnošću na estrogen pozitivnim ćelijama karcinoma dojke	89
6. DISKUSIJA	102
6.1. <i>In silico</i> parametri	102
6.2. Retencione konstante ispitivanih jedinjenja i korelacija sa softverski dobijenim rezultatima za logP, logD i logS.....	104

6.3. Retencione konstante ispitivanih jedinjenja u korelaciji sa <i>in silico</i> dobijenim farmakokinetским deskriptorima	108
6.4. Empirijska pravila.....	110
6.5. Korelacija retencionih konstanti sa <i>in silico</i> dobijenim toksikološkim deskriptorima	112
6.6. Korelacije retencionih parametara sa afinitetom za vezivanje za različite vrste receptora	114
6.7. Antiproliferativna aktivnost	114
6.8. Analiza molekuskog dokinga	117
7. ZAKLJUČAK	120
8. LITERATURA	122

1. Uvod

Proces razvoja novih lekova neprekidno se unapređuje uvođenjem novih fundamentalnih znanja, metoda, tehnika i strategija. Otkriće novog leka počinje identifikacijom kandidata za potencijalne lekove koji su skriningom pokazali aktivnost prema biološkom cilju od interesa, nakon čega se vrši selekcija vodećeg jedinjenja među velikim brojem kandidata. Istraživanja se usmeravaju u pravcu poboljšanja karakteristika vodećeg molekula, odnosno vrši se sinteza analoga vodećeg molekula. Veoma je značajno da se precizno shvati koji strukturni deo u molekulu je odgovoran za njegovu biološku aktivnost, odnosno da se identifikuje farmakofora. Na osnovu strukture vodećeg jedinjenja pristupa se proučavanju veze između strukture i aktivnosti leka, čime se bavi SAR analiza (*eng. Structure Activity Relationship*). Hemijska struktura vodećeg jedinjenja se koristi kao osnova za hemijske modifikacije kako bi se poboljšala efikasnost i selektivnost. Nakon odabira kandidata obavljaju se rana farmakokinetička ispitivanja, jer potencijalni lek osim zadovoljavajuće biološke aktivnosti treba da poseduje optimalna farmakokinetička svojstva, koja će mu omogućiti da sa mesta aplikacije dospe do mesta delovanja u koncentraciji potrebnoj da se ostvari terapijski efekat (1, 2). Savremeno dizajniranje lekova pokazuje da se veliki broj sintetisanih lekova odbaci zbog neefikasnosti ili iz bezbednosnih razloga. Razvoj računarskih (*in silico*) modela omogućava procenu farmakokinetičkih parametara i toksičnosti novosintetisanih jedinjenja u ranoj fazi razvoja potencijalnih lekova i izdvajanje onih jedinjenja iz serije strukturno sličnih jedinjenja koja će dalje biti ispitivana u pretkliničkim istraživanjima. Tako se postiže ušteda vremena i materijalnih sredstava i izbegava se prekomerno testiranje na životinjama (3, 4). Lekovi kao i njihovi metaboliti se izlučuju iz organizma i dospevaju u životnu sredinu kao potencijalni zagađivači i zato se sa aspekta ekotoksikologije vrši *in silico* evaluacija akvatične toksičnosti novosintetisanih jedinjenja.

Sukcinimidi su jedinjenja koja godinama privlače pažnju istraživača kao kandidati za lek zbog specifične farmakofore: petočlani heterociklični sistem, sa azotom kao heteroatomom, najmanje jednom karbonilnom grupom i lipofilnim alkil ili fenil supstituentom vezanim za heterociklični prsten (dva hidrofobna i dva regiona bogata elektronima) (5). Dosadašnja

istraživanja su pokazala da derivati sukcinimida ispoljavaju antikonvulzivni (6), antimuskarinski, analgetski (7, 8), antitumorski, citostatski (9-11), antipsihotični (12), antibakterijski (13, 14) efekat. Postoji posebno interesovanje naučnika za izučavanje antitumorskih i antiproliferativnih efekata njihovih derivata, koji su nedovoljno ispitani.

Maligne bolesti su jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta, kako u razvijenim, tako i u industrijski nerazvijenim zemljama sveta. Zbog toga je pronalaženje novih terapijskih pristupa i hemioterapeutika od velikog značaja za društvo (15, 16). Postoji veliki broj različitih antitumorskih lekova - citostatika, koji u terapijskim dozama mogu zaustaviti rast malignih ćelija, ali i značajno oštetiti zdrave ćelije u organizmu (17, 18). Nedostatak selektivnosti antitumorskih lekova, uz razvoj rezistencije ćelija karcinoma predstavlja ozbiljan terapijski problem. Potreba za razvojem novih, efikasnijih, selektivnih i manje toksičnih antitumorskih lekova podstakla je istraživanja u pravcu novih farmakološki aktivnih supstanci. U fokusu savremenih istraživanja su jedinjenja koja bi indukovala ćelijsku smrt karcinoma, uz minimalan uticaj na normalnu deobu i proliferaciju zdravih ćelija. Posebno su značajna istraživanja koja ukazuju na mehanizam delovanja potentnih jedinjenja na ćelije karcinoma.

Dosadašnja ispitivanja derivata sukcinimida su pokazala da jedinjenja iz grupe N-fenilsukcinimida pokazuju antiproliferativnu aktivnost na ćelijskim linijama humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i estrogen pozitivnog humanog karcinoma dojke (MCF-7), a da su bezbedni za zdrave fetalne fibroblaste pluća (MRC-5) (19). Rezultati testiranja antiproliferativne aktivnosti na malignim ćelijama koje na svojoj površini eksprimiraju estrogene receptore i *in silico* podaci o afinitetu za estrogene receptore predstavljaju osnov za sprovođenje ispitivanja molekuskog dokinga (*eng. Molecular docking*). U okviru studija molekuskog dokinga koriste se softverski paketi za pretraživanje različitih orijentacija liganada, a zatim i njihovo rangiranje na osnovu skorova energije vezivanja za određeni protein (receptor) koji postoji u bazi proteina poznate strukture – PDB (*eng. Protein Data Bank*). Konformacija liganda sa najmanjom energijom vezivanja se koristi za dalju analizu interakcija ispitivanih jedinjenja sa aktivnim mestom ispitivanog receptora (20).

Predmet istraživanja ovog rada bila je serija derivata metil-etil-N-aril-sukcinimida, za koje se predviđa antiproliferativno delovanje, uz poboljšana farmakokinetska svojstva i povoljan bezbednosni profil.

2. Opšti deo

2.1. Sukcinimidi kao biološki aktivni molekuli i potreba za novim jedinjenjima

Imidi su jedinjenja koja sadrže dve karbonilne grupe vezane za azotov atom. Iako strukturno slični anhidridima karboksilnih kiselina, imidi su manje reaktivna jedinjenja od anhidrida, odnosno od amida. Sukcinimid (pirolidin-2,5-dion) je cikličan imid ćilibarne (sukcinske) kiseline i amonijaka. Prvi ga je sintetisao Arket 1835. godine (21). Od tada ne prestaje interesovanje za izučavanje jedinjenja sa strukturom sukcinimida i potreba da se sintetišu novi derivati sukcinimida.

Kristalografskim ispitivanjem strukture sukcinimida ustanovljeno je da njegov molekul nije planaran. Utvrđeno je da su metilenske grupe (-CH₂-) za oko 0,5 Å iznad glavne ravni molekula. Prostorno uređenje molekula u kristalnoj rešetci ukazuje da dva molekula sukcinimida formiraju dimernu strukturu uspostavljajući intermolekulske vodonične veze dužine 2,85 Å (22).

Analiza vibracionih spektara molekula sukcinimida je pokazala da molekul sukcinimida poseduje C_{2v} osu simetrije. Dalja analiza je utvrdila da se javljaju dve vrste pomeranja iznad ravni molekula: savijanje i uvrtnje prstena (23).

Proučavanjem strukture tri izomera N-(2-, 3- i 4-nitrofenil) sukcinimida ustanovljeno je da se kod *orto* i *meta* supstituisanih derivata prsten sukcinimida nalazi u jednoj ravni, dok kod *para* supstituisanog derivata prsten sukcinimida zauzima konformaciju polu-stolice.

Sukcinimid je bela ili bezbojna kristalna supstanca temperature topljenja 125-126 °C. Prisustvo supstituenata na atomu azota, po pravilu dovodi do sniženja tačke topljenja, što se objašnjava nemogućnošću stvaranja intermolekulskih vodoničnih veza (24).

Sukcinimid se dobro rastvara u vodi i etanolu. Uvođenjem alkil, odnosno aril grupa u prsten hidrofilni karakter sukcinimida opada, a povećava se lipofilnost molekula.

Kiseli karakter sukcinimida je posledica prisustva atoma vodonika koji je vezan za elektronegativniji atom azota. Navedena N-H veza se nalazi između dve elektron-akceptorske

grupe koje dodatno povećavaju kiselost (25). Izračunata pK_a vrednost sukcinimida iznosi 9,62 (24), dok se pK_a vrednost derivata sukcinimida nalazi u opsegu od 7 do 10 u 4% etanolu.

Hidroliza derivata sukcinimida se odvija pomoću jakih baza, u vodi kao rastvaraču i na povišenoj temperaturi. Baznom hidrolizom se dobijaju odgovarajuće soli metala poluamida sukcininske kiseline. Ako se nastavi reakcija sa bazama, kod većine sukcinimida hidroliza otvorenog niza poluamida može da se produži do nastanka odgovarajuće soli dvobazne sukcininske kiseline (26). Supstitucijom vodonikovog atoma fenilnom grupom na atomu azota sukcinimida nastaje N-fenilsukcinimid. Time se ubrzava otvaranje prstena u reakciji bazne hidrolize, što se objašnjava elektron akceptorskim efektom fenilne grupe koja smanjuje stabilnost prstena imida. N-fenil derivat je reaktivniji u reakcijama bazne hidrolize, jer je intermedijerni anjon stabilizovan delokalizacijom elektrona u kojoj učestvuje i fenil supstituent.

Studije koje su poslednjih dvadeset godina sprovedene na sukcinimima su dovele do saznanja o različitim biološkim aktivnostima ovih jedinjenja: antimuskarinsko, analgetsko, antibakterijsko, antikonvulzivno, citostatsko itd. Rezultati ispitivanja u oblasti agronomije su doveli do razvoja nanočestica sa polisukcinimidima, koji poboljšavaju isporuku pesticida u žitaricama i pospešuju biološke aktivnosti pesticida (27). Zbog toga se javilo interesovanje da se proučava mogućnost primene sukcinimida kao pesticide u poljoprivredi. Posebno se ističu rezultati ispitivanja derivata sukcinimida kao antiepileptika, koja su dovela do toga da danas postoje registrovani lekovi iz grupe antikonvulziva sa strukturom sukcinimida (etosukcimid, metsukcimid, fensukcimid i dr.). Antikonvulzivni lekovi sa strukturom sukcinimida imaju isti mehanizam delovanja, ali se razlikuju po efikasnosti, kao i po brzini resorpcije, distribuciji u organizmu, metabolizmu, eliminaciji, interakcijama sa drugim ksenobioticima, a pokazuju izvesne razlike i u pogledu ispoljavanja neželjenih efekata. Razvoj velikog broja derivata sukcinimida proistekao je iz potrebe za bezbednijim i efikasnijim lekovima u terapiji epilepsije od do sada upotrebljvanih. Pogodan farmakokinetički profil i metabolička stabilnost jedinjenja su neophodni, mada ne i dovoljni, za obezbeđivanje netoksičnosti potencijalnog leka (28). Promene u strukturi sukcinimida dovele su do sinteze 3-fenil-2,3-dimetilsukcinimida i njegovog N-metil derivata koji imaju slabiji sedativni efekat u odnosu na druge predstavnike strukturno sličnih lekova; 2-etil-3-metil-3-fenilsukcinimida koji osim antikonvulzivnog pokazuje i anestetičko delovanje; N-metil-2-fenil-2-etilsukcinimida i N-metil-2-fenil-3-metilsukcinimida koji su primer netoksičnih antikonvulziva za terapiju lakših oblika epilepsije (29).

Izučavanje antiproliferativnog potencijala jedinjenja sa strukturom sukcinimida je od posebnog značaja. Tamoksifen je selektivni modulator estrogenih receptora i zbog takvog delovanja se danas često koristi u terapijske svrhe. Sve veći broj pacijenata brzo postaje rezistentan na tamoksifen, zbog čega postoji interes za pronalaženje novih lekova sa antiestrogenim delovanjem čiji će efekat biti postojan (20).

Efikasnost antihormonske terapije u lečenju karcinoma dojke se objašnjava činjenicom da estrogen receptori alfa nisu prisutni u velikom broju u zdravom tkivu dojke, ali se njihov broj značajno povećava u ćelijama karcinoma dojke i oni postaju meta delovanja hemioterapeutika (30). Pretpostavlja se da sukcinimidi citotoksično delovanje ostvaruju istim mehanizmom, preko estrogenih receptora, i u prilog čemu govore *in silico* podaci o afinitetu vezivanja za estrogene receptore.

2.2. Savremeni pristup u dizajniranju lekova

Bezbedan i efikasan lek mora da poseduje optimalne farmakokinetičke osobine, zahvaljujući kojima će sa mesta aplikacije moći da dospe na mesto delovanja u efektivnoj koncentraciji i da kroz interakciju sa odgovarajućim receptorom ostvari farmakološki efekat (1, 2). Raniji pristup u razvoju novih lekova je podrazumevao sintezu velikog broja jedinjenja koja su potom prolazila kroz ispitivanja biološke aktivnosti i toksičnosti. Ovaj složen proces je iziskivao mnogo vremena i materijalnih sredstava, a rezultati su u najvećem broju slučajeva bili nezadovoljavajući (31). Studije su pokazale da je skoro 50% sintetisanih lekova odbačeno zbog neefikasnosti usled male bioraspoloživosti (slaba intestinalna apsorpcija ili nepoželjna metabolička stabilnost). Procenjuje se da je oko 40% lekova odbačeno iz bezbednosnih razloga i potencijalne toksičnosti (32).

Racionalni pristup u dizajnu novih farmakološki aktivnih molekula podrazumeva identifikaciju farmakofore odgovorne za biološku aktivnost, modifikacije na nivou farmakofore, u smislu promene vrste i položaja supstituenata, i izdvajanje onih struktura koje imaju zadovoljavajuća fizičko-hemijska, farmakokinetička i toksikološka svojstva predviđena *in silico* metodama (33). Metode zasnovane na računarima (*in silico*) koriste bazu eksperimentalno dobijenih podataka za već poznate i ispitane molekule i kvantifikuju veze između njihovih

bioloških osobina i strukturnih karakteristika, vrste i prostornog rasporeda atoma od kojih su načinjeni. Tako se dobijaju značajne informacije već tokom rane faze istraživanja, čak i bez potrebe za sintezom jedinjenja. Pored toga, ova saznanja omogućavaju izdvajanje vodećeg molekula iz serije strukturno sličnih jedinjenja, kao i predviđanje kvalitativnih i kvantitativnih promena u farmakološkom odgovoru u zavisnosti od modifikacija strukture (promene vrste, položaja supstituenata i konformacije) (34). Rezultat ovakvog pristupa jeste skraćenje vremena pronalaska novog leka, uz istovremenu eliminaciju prekomernih testova bioraspoloživosti na životinjama (3, 4).

Klasifikacija metoda koje se koriste za racionalan dizajn novih lekova izvršena je na osnovu osobina molekula dovedenih u korelaciju sa njihovom strukturom:

- **QSAR** (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) – metode koje kroz matematičke modele kvantifikuju odnos strukture molekula i njihove biološke aktivnosti, ispoljene *in vivo* ili *in vitro*
- **QSPR** (*Quantitative Structure-Property Relationships*) – metode u kojima je uspostavljena kvantitativna zavisnost fizičko-hemijskih osobina i strukture molekula
- **QSTR** (*Quantitative Structure-Toxicity Relationships*) – metode modelovanja koje na osnovu strukture predviđaju toksikološke osobine molekula (35, 36).

Prvi korak u razvoju modela u svim ovim metodama jeste prikupljanje dovoljnog broja kvalitetnih podataka, da bi metode mogle biti efikasno primenjene na velikom broju novih molekula (37). Da bi se dobile zadovoljavajuće korelacije, veoma je važan izbor parametara molekula koji će se primenjivati. Korišćeni parametri predstavljaju numeričku vrednost odgovarajuće karakteristike nekog jedinjenja i nazivaju se molekulskim deskriptorima (38-41). Najveći problem u dobijanju zadovoljavajućih korelacija je izbor odgovarajućih deskriptora. Mnogi od njih su linearno zavisni, što znači da nose praktično iste informacije (npr. molekulska masa, površina molekula i molarna refraktivnost često pokazuju statistički značajnu korelaciju), zbog čega se treba opredeliti za jedan, najprikladniji deskriptor (31). Molekulski deskriptori se povezuju sa svojstvima molekula pomoću različitih metoda regresije sa ciljem da se ustanove funkcije, u kojima su deskriptori nezavisno promenljive, a biološka aktivnost ili hromatografska retencija zavisno promenljive (31). U te svrhe se koriste višestruka linearna regresija, jedna od osnovnih i najjednostavnijih metoda regresije, i neuronske mreže, primerenije za interpretaciju

složenih modela (42-46). Finalni model sa optimalno izabranim parametrima mora biti podvrgnut validaciji, da bi se utvrdilo u kojoj meri može da predvidi osobine jedinjenja *test set-a*, odnosno novih molekula koji nisu korišćeni za formiranje samog modela (31).

Da bi se mogli primeniti u QSAR ispitivanjima, parametri moraju da zadovolje sledeće kriterijume:

- Da adekvatno opisuju odnose između liganda i biološke okoline;
- Da se mogu eksperimentalno odrediti u reproducibilnim sistemima ili da se matematički izvode;
- Da se eksperimentalno određeni parametri mogu primeniti i za slična jedinjenja;
- Da međusobno ne koreliraju (47).

Prednosti upotrebe QSAR metoda su:

- Kvantifikacija odnosa između strukture i aktivnosti omogućava lakše razumevanje uticaja strukture na biološku aktivnost ispitivanog jedinjenja
- Mogućnost predviđanja i sinteze novih analoga
- Rezultati mogu da objasne interakcije između funkcionalnih grupa u molekulima sa najvećom aktivnošću (34).

Ograničenja QSAR i QSPR metoda proizilaze iz činjenice da često nisu dostupni eksperimentalni podaci odgovarajućeg kvaliteta. Razlog tome je što se podaci za model koriste iz literature ili se posebno generišu za QSAR analizu (48). Kvalitet ulaznih podataka posebno je diskutabilan ako su dobijeni iz ispitivanja na ljudima ili ako su u pitanju procesi koji su rezultat mnogobrojnih fizioloških mehanizama, koje je teško modelovati (npr. oralna bioraspoloživost, apsorpcija iz tankog creva, metabolička stabilnost) (49). Izraženo variranje eksperimentalnih podataka stvara poteškoće za dobijanje pouzdanog matematičkog modela (37). Rešenje za prevazilaženje ovog problema jeste kombinovanje dva ili više modela za istu karakteristiku ispitivanih molekula, zasnovanih na različitim principima. Tako se dolazi do validnijih podataka, jer se dobijaju polja sigurnosti za rezultate koji se poklapaju i polja nesigurnosti za rezultate koji se razlikuju (37).

Oko 40% lekova je odbačeno u toku procesa razvoja novih lekova zbog loših farmakokinetičkih svojstava i nezadovoljavajuće bioraspoloživosti. Imajući u vidu materijalne troškove i uloženo vreme, ovakav neuspeh predstavlja veliki ekonomski gubitak za farmaceutske

kompanije. Odabir jedinjenja sa zadovoljavajućim karakteristikama u ranoj fazi dizajniranja novih lekova ne zahteva složene metode kakve se primenjuju u daljem toku procesa razvoja potencijalnog novog leka. Metode su prilagođene da koriste manji broj izvora podataka o ispitanim molekulima i da daju više izlaznih informacija o ispitivanom molekulu, pri čemu se ne postavljaju rigorozni zahtevi za tačnost i preciznost metoda, niti postoji potreba za detaljnim informacijama i podacima za donošenje odluka o odabiru molekula koji ima potencijal da bude novi lek. Procena farmakokinetike implementira se u kasniju fazu razvoja. Ovakvim redosledom testiranja se postiže da se nezadovoljavajući kandidati za lek isključe iz daljeg procesa razvoja novog leka na vreme, pre nego što se ulože značajna sredstva. Na ovaj način se takođe izbegava rizik od nepovoljnih farmakokinetičkih svojstava, koja se najviše odražavaju na pacijenta kome je lek namenjen. Ukoliko lek pokazuje nizak stepen apsorpcije, biće potrebno povećati dozu radi postizanja terapijskih koncentracija. Zbog tog razloga se razmatra promena načina administracije, sa oralnog na intravenski, što za pojedine populacije pacijenata nije prihvatljivo. Ukoliko lek ima kratko poluvreme života *in vivo* zbog metaboličke nestabilnosti, biće neophodna korekcija režima doziranja. Češće uzimanje lekova u toku dana utiče na adherencu i komplijansu pacijenata i samim tim na ishod terapije. Imajući sve pomenuto u vidu, može se reći da farmaceutske kompanije imaju misiju ne samo da produže život pacijenta, već i da unaprede njegov kvalitet, sa fokusom na potrebe, očekivanja i koristi.

Jedna od strategija farmaceutskih kompanija, kada je reč o razvoju novog leka, jeste egzaktno merenje određenih farmakokinetičkih parametara *in vivo*, u animalnim modelima, što je prilično zahtevan postupak, čiji rezultati zavise od većeg broja promenljivih u dinamičkom sistemu. U tom slučaju je teško doneti odluku o konkretnoj modifikaciji strukture u cilju poboljšanja farmakokinetičkog profila. Drugi pristup podrazumeva primenu *in vitro* testova, kojima se mere osnovne fizičko-hemijske i biohemijske karakteristike, kao što su rastvorljivost, permeabilnost, metabolička stabilnost, a koje direktno utiču na farmakokinetičke osobine. *In vitro* studijama se daje prioritet, jer su jednostavnije od *in vivo* ispitivanja i pružaju mogućnost testiranja većeg broja jedinjenja. Osim toga, fizičko-hemijska i biohemijska svojstva određena *in vitro* metodama su u korelaciji sa strukturnim karakteristikama, što omogućuje lakše predviđanje uticaja promene strukture na pomenuta svojstva nego na farmakokinetiku.

Kao rezultat ovih unapređenja u procesu dizajniranja novih lekova smanjen je neuspeh u ranoj fazi razvoja, uzrokovan nezadovoljavajućim svojstvima ispitivanih molekula, sa 39% na

10%. Iako se često kombinuju ova dva pristupa, u većini slučajeva, u procesu razvoja lekova, prednost se daje poboljšanju fizičko-hemijskih svojstava (rastvorljivost, stabilnost, permeabilnost) u odnosu na sintezu potpuno novih jedinjenja, što se postiže modifikacijama u strukturi, koje se vrše na onom delu molekula koji nije odgovoran za biološku aktivnost (50-53).

2.3. Molekulski deskriptori

Poznavanje farmakofore, odnosno funkcionalne grupe odgovorne za biološku aktivnost molekula, omogućava da se modifikacijama u smislu promene supstituenata, njihovog položaja u molekulu i prostorne orijentacije postignu optimalna fizičko-hemijska svojstva i zadovoljavajuća farmakokinetika, uz očuvanu farmakološku aktivnost (49). Ustanovljeno je da određena svojstva molekula kao celine predstavljaju važne molekulske deskriptore, koji su uključeni u modelovanje kompleksnih farmakokinetičkih – ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija) svojstava.

Važne karakteristike u procesu otkrivanja novih lekova su:

1. Strukturne karakteristike:
 - sposobnost građenja vodonične veze
 - polarna površina molekula
 - lipofilnost
 - oblik molekula
 - molekulska masa
 - kiselost/baznost (pK_a)
2. Fizičko-hemijske karakteristike:
 - rastvorljivost
 - permeabilnost
 - hemijska stabilnost
3. Biohemijske karakteristike:
 - metabolizam
 - vezivanje za proteine i tkiva

- transport

4. Farmakokinetičke i toksikološke karakteristike:

- klirens
- poluživot
- bioraspoloživost
- lek-lek interakcije
- srednja letalna doza/koncentracija (LD₅₀, LC₅₀)

Karakteristike molekula su determinisane njegovom strukturom. Fizičko-hemijska svojstva molekula (npr. rastvorljivost i lipofilnost) definišu interakcije molekula sa biološkom sredinom. Biohemijske karakteristike (npr. metabolizam) posmatraju se kroz interakciju funkcionalnih grupa molekula sa proteinima. Farmakokinetička i toksikološka svojstva, koja su najkompleksnija, determinisana su kombinacijom fizičko-hemijskih i biohemijskih svojstava molekula u relaciji sa živim sistemom i moguće ih je podešavati modifikacijom strukture molekula (53, 54).

2.3.1. Hidrofobnost (lipofilnost)

Lipofilnost je definisana kao afinitet molekula prema nepolarnom, lipidnom matriksu (medijumu), u odnosu na hidrofilnu fazu. Ogleda se u sposobnosti supstance da pređe iz hidrofilne u lipofilnu fazu, a kvantifikuje se kao logaritam particionog koeficijenta – logP (55). Particioni koeficijent (P) predstavlja odnos ravnotežnih koncentracija rastvorka raspodeljenog između dva rastvarača koji se međusobno ne mešaju, a logaritamski oblik se primenjuje iz praktičnih razloga, zbog širine P skale:

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_v} \quad [1]$$

gde je C_o koncentracija u nepolarnoj (organskoj) fazi, a C_v koncentracija u polarnoj (vodenoj) fazi.

Veličina vrednosti logP ukazuje na lipofilni karakter ispitivanog jedinjenja. Sa porastom lipofilnosti, vrednost logP se kreće od negativne ka pozitivnoj. Supstance čije su vrednosti logP veće od 5 su izuzetno lipofilne, što implicira i veću toksičnost.

Referentni sistem rastvarača za određivanje vrednosti logP je sistem n-oktanol/voda, koji na najbolji način daje aproksimaciju biološke membrane. Sličnost n-oktanola sa lipidima organizma je posledica prisustva dugog ugljovodoničnog lanca i funkcionalne grupe sa osobinama proton-donora i proton-akceptora (56).

Lipofilnost predstavlja fizičko-hemijsku karakteristiku od koje zavisi biološka aktivnost jedinjenja, odnosno prolazak leka kroz biološke membrane pasivnom difuzijom, vezivanje za proteine krvne plazme, tj. distribucija leka u organizmu, i interakcija sa komplementarnim receptorom (57).

Vrednost logP zavisi od nekoliko fundamentalnih strukturnih karakteristika molekula:

- zapremine molekula
- sposobnosti stvaranja vodonične veze (akceptori i donori za formiranje vodonične veze).

Na lipofilnost utiče i priroda samih faza u sistemu:

- pH vrednost
- jonska jačina
- prisustvo puferskih sistema
- korastvarači (58, 59).

Najčešće korišćeni deskriptori lipofilnosti su ClogP (60) ili Volsurf hidrofobni deskriptori (61), koji u značajnoj meri određuju sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (*eng. Blood-Brain Barrier, BBB*) i brzinu apsorpcije iz intestinalnog trakta, odnosno pozitivno koreliraju sa farmakokinetским parametrima koji opisuju ove procese - logBBB i K_a deskriptorima (62). Međutim, Volsurf model (61) sugeriše da lipofilnost jedinjenja slabije utiče na njegovu sposobnost prolaska kroz biološke barijere u odnosu na polarnost jedinjenja (62). Razlike između izračunatih vrednosti logP parametara uglavnom potiču od različitih načina njihovog izračunavanja i algoritama koji se u te svrhe koriste (63):

- **AClogP** se računa pomoću aditivne metode, uzimajući u obzir uticaj pojedinačnih atoma; koristi 369 vrednosti atomskih doprinosa.
- **AlogP** se računa pomoću atomske metode, koja se primenjuje na neutralne organske molekule, sa atomima azota i halogena u strukturi.

- **XlogP2** je model aditivnog uticaja atoma/funkcionalnih grupa, koji koristi 90 osnovnih tipova atoma.
- **XlogP3** je parametar koji se zasniva na aditivnom uticaju atoma/grupa, a polazi od poznavanja vrednosti logP sličnih referentnih supstanci.
- **ACD/logP** je parametar koji se računa primenom fragmentacione metode, zasnovane na definiciji izolovanog ugljenika koji nije dvostrukom ili trostrukom vezom vezan za heteroatom (64).
- **MlogP** parametar su uveli Moriguchi i saradnici (65). Ovaj parametar uzima u obzir sumu lipofilnih (ugljenik i halogeni) i hidrofilnih atoma (azot i kiseonik), kao dva osnovna deskriptora. Pomoću njih je moguće objasniti 73% varijacija u eksperimentalnim vrednostima logP za 1.230 supstanci. Primena 11 korekcionih faktora objašnjava 91% varijacija. Zbog jednostavne implementacije MlogP metod se često koristi već godinama (66).
- Parametar **ClogP** razlikuje 368 atomskih modela, za čije kreiranje je korišćen training-set od 5.000 molekula za koje su eksperimentalno određene vrednosti logP. Modeli uzimaju u obzir uticaj svojstava samih atoma, kao i njihovog okruženja (tip veze, aromatični sistem, itd.).
- **ilogP** parametar uzima u obzir uticaj slobodne energije solvatacije u implicitnim rastvaračima i eksperimentalno određenu vrednost logP u sistemu n-oktanol/voda, koristeći ispitivani set od 17.500 molekula (67).
- **wlogP** se zasniva na atomskom pristupu i molarnoj refraktivnosti (68).

Neki od izračunatih logP deskriptora baziraju se na fragmentacionom, a drugi na atomskom pristupu. MlogP se zasniva na eksperimentalno određenim vrednostima logP (65).

Lipofilnost zavisi isključivo od strukture molekula, zbog čega ispitivanja na živim organizmima nisu potrebna (55). Lipofilnost kvantifikovana parametrom logP može se odrediti eksperimentalno na više načina:

- **Metoda mućkanja** (*eng. shake-flask*) sa HPLC UV detektorom predstavlja referentnu metodu za određivanje lipofilnosti (69), mada pokazuje brojne nedostatke - moguće je odrediti samo logP vrednost u intervalu od -2,5 do 4,5, a na izmerene vrednosti utiču nečistoće. Kod suviše malih i suviše velikih logP vrednosti koncentracija jedinjenja u određenoj fazi je blizu ili ispod limita detekcije mernog instrumenta (55). Metoda ima nisku reproduktivnost, a dužina trajanja je bitan ograničavajući faktor, imajući u vidu da je fazama potrebno 2-4 dana da se uravnoteže (70,

71). Osim toga, tokom mućkanja dolazi do stvaranja mikroemulzije između n-oktanola i vode. Za prevazilaženje ovog problema predlaže se korišćenje metode sporog mešanja (*eng. stirr-flask*).

- **Dvofazna potencimetrijska titracija** je metoda za određivanje logP ekstremno hidrofилnih ili ekstremno hidrofobnih supstanci. Uslov za primenu je da supstanca može da jonizuje u vodenom rastvoru (55), jer se metoda zasniva na prelasku jonizovane supstance iz vodenog titracionog medijuma u n-oktanol (72).
- **Hromatografske metode** je moguće primeniti bez obzira da li supstanca jonizuje ili ne (55). Razdvajanje analita između mobilne i stacionarne faze na tankoslojnoj hromatografiji (TLC) i visokoeffikasnoj tečnoj hromatografiji (HPLC) simulira dinamičke procese raspodele u organizmu između telesnih tečnosti (gastrointestinalni fluidi, krvna plazma, međućelijska tečnost, itd.) i lipidne faze (fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane, masno tkivo, itd.) (73). Komparativna studija Komste i saradnika potvrdila je da TLC daje dobre rezultate, u smislu da postoji statistički značajno slaganje eksperimentalno dobijenih i literaturnih podataka o lipofilnosti jedinjenja. Prednosti hromatografskih metoda su jednostavnost izvođenja, selektivnost, ekonomičnost, tačnost i širi opseg vrednosti logP u odnosu na metodu mućkanja. Osim toga moguća je istovremena analiza više uzoraka, koji ne zahtevaju posebnu prethodnu pripremu (49, 74).

Međutim, logP parametar ne prikazuje precizno particiju svih mogućih vrsta jona na fiziološkoj pH vrednosti. Većina lekova su po svojoj prirodi slabe kiseline, slabe baze ili njihove soli, koje na određenoj pH vrednosti jonizuju i daju više jonskih vrsta. Zbog toga je prikladnije korišćenje logaritma efektivnog koeficijenta raspodele za određeno jedinjenje, logD:

$$\log D = \log \frac{C_{i,o} + C_{ni,o}}{C_{i,v} + C_{ni,v}} \quad [2]$$

gde je $C_{i,o}$ koncentracija jonizovanog oblika u nepolarnoj (organskoj) fazi, $C_{ni,o}$ koncentracija nejonizovanog oblika u nepolarnoj (organskoj) fazi, $C_{i,v}$ koncentracija jonizovanog oblika u polarnoj (vodenoj) fazi, a $C_{ni,v}$ koncentracija nejonizovanog oblika u polarnoj (vodenoj) fazi.

Parametar logD predstavlja odnos zbira ravnotežnih koncentracija svih oblika (jonizovanih i nejonizovanih) u n-oktanolu i sume ravnotežnih koncentracija svih oblika (jonizovanih i nejonizovanih) u vodi. Za neutralna jedinjenja vrednost $\log P = \log D$ (62). Neke studije ukazuju na to da korišćenje logD umesto logP parametra značajno menja izbor jedinjenja prema pravilu Lipinskog (75).

- **In silico metode** za predviđanje logP i logD zasnovane su na formiranju modela iz baze podataka o već ispitivanim molekulima (76). Tipične greške mogu da nastanu ukoliko molekuli prema kojima je formiran model (*eng. training set*) nisu dovoljno slični molekulima potencijalnog leka koji je predmet ispitivanja. Računarske metode mogu biti zasnovane na podstrukturama (*eng. Substructure-Based Methods*), sa fragmentacionim ili atomskim pristupom u analizi. Fragmentacione konstante definišu doprinos pojedinih fragmenata u molekulu uzimajući u obzir korekcionni faktor usled intramolekulskih interakcija (77, 78). Atomske metode razmatraju doprinos pojedinih atoma u molekulu (79). Postoje i metode zasnovane na odgovarajućim osobinama molekula (*eng. Property-Based Methods*) u kojima se izračunavanje zasniva na empirijskim zavisnostima ili na osnovu 3D strukture molekula (80, 81).

Lipofilnost je osnovna strukturna karakteristika od koje zavise fizičko-hemijska i biohemijska svojstva supstance, pa je često meta modifikacija u cilju postizanja željenih svojstava molekula.

2.3.2. Rastvorljivost

Rastvorljivost je definisana kao maksimalna koncentracija rastvorka u datom rastvaraču, u stanju ravnoteže. Rastvorljivost leka u vodi je faktor koji ima značajan uticaj na bioraspoloživost peroralno primenjenog leka, ali i na njegovu distribuciju u organizmu. Model za rastvorljivost po Klopmanu je široko primenjivan, iako je formiran na osnovu podataka o jedinjenjima (*training set*) koja ne sadrže atome sa šaržom, odnosno atome koji ne jonizuju u vodenom rastvoru (82). Kako su mnogobrojni lekovi po svojoj prirodi soli slabih kiselina ili slabih baza (u strukturi sadrže atome kao što su bazni azot ili kisela karboksilna grupa), u organizmu dolazi do jonizacije, u zavisnosti od pH vrednosti sredine. Upravo je to činjenica koja ograničava upotrebu ovog modela. Fizičko-hemijske karakteristike koje utiču na rastvorljivost su lipofilnost, stepen jonizacije i mogućnost formiranja vodonične veze, odnosno polarna površina molekula (*eng. Polar Surface Area, PSA*). Rastvorljivost (S) određenog jedinjenja u vodi najčešće se izražava kao logaritamska vrednost (logS), i zavisi od lipofilnosti i energije kristalne rešetke datog jedinjenja. Rastvorljivost u vodi numerički se može izraziti empirijskom formulom Yalkowsky i Banerjee:

$$\log S = 0,8 - \log P_{\text{oktanol,voda}} - 0,01(TT - 25) \quad [3]$$

gde je S rastvorljivost, $\log P_{\text{oktanol,voda}}$ je podeoni koeficijent u sistemu n-oktanol/voda, kao mera lipofilnosti jedinjenja, a TT je temperatura topljenja, kao mera energije kristalne rešetke. Rastvorljivost se smanjuje 10 puta povećanjem $\log P$ vrednosti za jednu jedinicu ili povećanjem temperature topljenja za 100 °C (83).

Rastvorljivost je važno svojstvo molekula u procesu dizajniranja novih lekova. Slaba rastvorljivost je uzrok niskog stepena apsorpcije i loše bioraspoloživosti nakon oralne administracije leka, nedovoljne rastvorljivosti lekova namenjenih za intravensku aplikaciju, a predstavlja problem i u razvoju formulacija i određivanju režima doziranja (učestalo doziranje, visoke doze leka, itd.) (84, 85).

2.3.3. Sposobnost stvaranja vodonične veze

Sposobnost stvaranja vodonične veze se izražava kao broj donora ili akceptora za vodoničnu vezu (*eng. hydrogen-bond donors and acceptors*) (86), odnosno kao kiselost ili baznost atoma za formiranje vodonične veze (87). Broj donora ili akceptora vodonične veze pokazuju negativnu korelaciju sa permeacijom leka kroz biološke membrane. U prilog tome govori i činjenica da polarnija jedinjenja (ona koja jače stvaraju vodoničnu vezu) teže prolaze kroz biološke membrane (62).

2.3.4. Veličina molekula

Veličina molekula je jedno od najznačajnijih svojstava koje utiče na aktivnost molekula, ali je ujedno i svojstvo koje je teško odrediti. Determinisana je različitim parametrima, kao što su:

- molarna masa
- elektronska gustina

- polarna površina molekula (odnos površine polarnih grupa u molekulu u odnosu na površinu hidrofobnih grupa molekula)
- molarna refraktivnost (mera veličine i polarizabilnosti molekula)
- drugi parametri (zapremina molekula, Vandervalsova površina itd.).

Prema Stoks-Ajnštajnovoj jednačini, koeficijent difuzije nekog molekula je obrnuto proporcionalan njegovom poluprečniku. Suprotno tome, deskriptori veličine molekula pozitivno koreliraju sa sposobnošću prolaska potencijalnog leka kroz BBB i sa stepenom intestinalne apsorpcije. Objašnjenje ove protivrečnosti se nalazi u činjenici da zakon difuzije može da se primeni samo na homogene rastvore (62). Hidrofobna supstanca se u vodenoj sredini kreće samo ako su kohezione sile između molekula rastvarača raskinute. U tom slučaju se javlja pokretačka sila koja teži da istisne hidrofobni rastvorak u manje polarnu fazu i direktno je proporcionalna veličini molekula rastvorka (88), koja je definisana molekulskom masom ili zapreminom molekula.

2.3.5. Kiselost i baznost molekula

Većina lekova sadrži jonizujuće grupe, bazne i kisele. Samo 5% lekova su nejonizovani molekuli. Parametar pK_a pokazuje sposobnost jonizacije, a predstavlja funkciju kiselosti/baznosti grupa prisutnih u molekulu. U okviru savremenog pristupa u dizajnu lekova moguće je modifikovati kisele ili bazne podstrukture sa ciljem da se postigne željena pK_a vrednost, koja direktno utiče na rastvorljivost i permeabilnost (53).

Parametar pK_a ($-\log K_a$) definiše težnju molekula da otpusti proton, a izražava se kao konstanta jonizacije kiseline, K_a (62). Kisela supstanca sa pK_a vrednosti manjom od 4, odnosno bazna supstanca sa pK_a većom od 10, biće potpuno jonizovana na fiziološkoj pH vrednosti (7,4), čime je onemogućen njen prolazak pasivnom difuzijom kroz fosfolipidne barijere (npr. prelazak iz crevnih fluida kroz membranu enterocita u krvotok) (89). Jonizovani molekuli su, zbog veće polarnosti, više rastvorljivi u vodenom medijumu, u odnosu na neutralne molekule. Nasuprot tome, oni pokazuju manju permeabilnost kroz biološke membrane u poređenju sa neutralnim molekulima. Razlog tome je veća lipofilnost neutralnih molekula, koji predstavljaju dominantan oblik sposoban za pasivnu difuziju kroz fosfolipidni dvosloj. S obzirom da pK_a determiniše stepen

jonizacije, jasno je da ima veliki uticaj na rastvorljivost i permeabilnost, a posredno i na intestinalnu apsorpciju nakon oralne administracije. Molekuli koji pokazuju dobru permeabilnost obično su slabije rastvorljivi u vodenom medijumu i obrnuto (90, 91).

2.3.6. Šarža molekula

Nasuprot hipotezi da samo neutralne čestice mogu da prolaze kroz membrane, molekuli sa pozitivnom šaržom na pH vrednosti 7-8 lakše savladavaju biološke barijere (62). Molekuli sa strukturom tercijarnih amina, što je slučaj sa pojedinim lekovima koji deluju na CNS (centralni nervni sistem), lakše prodiru u mozak nego što bi se očekivalo na osnovu njihove pK_a vrednosti (~ 8) (62). Razlog tome je destabilizacija jonizovanog molekula koja se dešava u membrani, što dovodi do smanjenja pK_a vrednosti (92). Prisustvo negativne šarže molekula pri vrednosti $pH < 5$ uzrokuje lošiji prolazak kroz BBB, ali i kroz ostale biološke membrane. Generalno, bazne supstance imaju bolju sposobnost prolaska u mozak u poređenju sa kiselim supstancama (93).

2.3.7. Oblik i fleksibilnost molekula

Rotirajuća veza je jednostruka veza locirana van prstena, koju grade atomi koji nisu terminalni. Jednostruke veze ugljenika sa vodonikom se ne računaju. Amidne C-N veze se ne računaju zbog ograničene mogućnosti rotacije (53).

Neki modeli pokazuju da su za prolazak kroz BBB i apsorpciju u crevima poželjniji molekuli sfernog oblika u odnosu na izdužene (štapičaste) forme (61, 92), kao i da grananje molekula smanjuje njegovu sposobnost permeacije (62). Iako jedan model sugerise da veća fleksibilnost molekula pozitivno utiče na njegov prolazak kroz BBB i kroz membranu enterocita (60), studija sa veštačkim membranama potvrđuje porast sposobnosti permeacije sa smanjenjem broja rotirajućih veza u molekulu, tj. sa smanjenjem elastičnosti molekula (84). Molekul mora da ima tačno određenu konformaciju da bi mogao da se veže za protein/receptor i da prolazi kroz membranu. Ovo dovodi do gubitka entropije (stepena neuređenosti) zbog čega bi kod molekula koji su rigidniji i imaju manji broj rotirajućih veza gubitak entropije trebao da bude manji.

Međutim, što je veći broj rotirajućih veza, veći je broj konformacionih oblika koji su aktivni, tj. koji se mogu vezati za receptor/protein i koji mogu da prolaze kroz membranske strukture (53).

2.4. Farmakokinetički deskriptori

2.4.1. Deskriptori intestinalne apsorpcije

Dobra bioraspoloživost je važan parametar za razvoj novih terapijskih agenasa. Najčešći i za većinu pacijenata najprihvatljiviji način primene leka, koji obezbeđuje i najbolju komplijansu, jeste peroralni. Stepen i obim intestinalne apsorpcije nakon peroralne aplikacije zavise od rastvorljivosti leka u gastrointestinalnim fluidima i transporta kroz intestinalne membrane (34). Permeacija kroz intestinalne membrane se odvija na dva načina: transcelularno i paracelularno.

Pasivna transcelularna permeacija predstavlja difuziju kroz fosfolipidni dvosloj, vođenu koncentracionim gradijentom i uslovljenu lipofilnošću jedinjenja. Međutim, potreban je i minimalan stepen rastvorljivosti leka u vodi, odnosno u tankom sloju sluzi koji oblaže sluznicu, čime je obezbeđen neposredan kontakt supstance sa crevnim epitelom, odnosno apsorptivnom površinom (94). Lekovi koji jonizuju prolaze kroz membranu samo u nedisociranom obliku, tj. kao nepolarne liposolubilne supstance, tako da njihov prolazak kroz membranu zavisi od stepena disocijacije. Stepen disocijacije zavisi od prirode samog jedinjenja i pH vrednosti sredine u kojoj se lek nalazi. Slabe organske kiseline su u baznoj sredini pretežno jonizovane, a baze su u nejonizovanom obliku, zbog suzbijanja disocijacije, pa je njihova apsorpcija favorizovana (94). Lekovi koji u svojoj strukturi sadrže kvaterni azot su praktično potpuno jonizovani bez obzira na pH sredine („permanentni katjoni“) (94).

Paracelularna permeacija se odvija kroz negativno naelektrisane tesne veze između epitelnih ćelija creva, što omogućava apsorpciju malih katjona (95). Veličina pora se kreće od 8 do 20 Å, pa je veličina molekula, pored PSA, faktor koji ograničava ovaj vid prolaska kroz membranu (96).

Modelovanje intestinalne apsorpcije dodatno otežava činjenica da u aktivnom transportu nekih jedinjenja učestvuju specifični proteinski nosači u strukturi intestinalne membrane, kao i

efluksni proteini i pojedini enzimski sistemi. Obično je apsorpcija determinisana kombinacijom različitih fizičko-hemijskih karakteristika. Može se reći da je oralna apsorpcija funkcija logD na fiziološkoj pH vrednosti (7,4), veličine molekula i sposobnosti formiranja vodonične veze (97).

Stepen apsorpcije je determinisan pomoću konstante apsorpcije (K_a) definisane kao odnos prirodnog logaritma broja 2 i poluvremena apsorpcije datog jedinjenja (98):

$$K_a = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \text{ [min}^{-1}\text{]} \quad [4]$$

2.4.2. Deskriptori distribucije

2.4.2.1. Volumen distribucije

Distribucija predstavlja povratan ili nepovratan prelaz leka u jedan ili više farmakokinetičkih kompartmana. Obim distribucije je određen volumenom distribucije (V_d) kao ključnim farmakokinetičkim parametrom. To je konstanta proporcionalnosti koja povezuje količinu supstance u organizmu ili kompartmanima sa koncentracijom supstance u plazmi:

$$V_d = \frac{D(\text{količina leka u organizmu})}{C(\text{koncentracija leka u krvi})} \quad [5]$$

Za lekove čija se kinetika opisuje jednokompartmanskim modelom (lekovi koji imaju mono-eksponencijalnu kinetiku nakon intravenske aplikacije) V_d vrednost se smatra konstantnom. Ova veličina predstavlja meru relativne raspodele leka između plazme i tkiva, pa nema stvarno fizičko i anatomsko značenje (98). Najznačajniji faktor koji utiče na distribuciju leka u organizmu je njegova lipofilnost (34), iako je evidentan i uticaj veličine molekula, stepena jonizacije i hemijskog afiniteta (94).

Ako je vrednost V_d za lek do 5 L, znači da se taj lek raspoređuje samo u cirkulatornom sistemu. Ukoliko je V_d vrednost oko 10-20 L smatra se da je lek raspodeljen i u ekstracelularnoj

tečnosti. Vrednosti V_d oko 40 L ukazuju na raspodelu u ukupnoj tečnosti organizma. Vrednost V_d može biti i veća od zapremine telesne tečnosti, čak i od ukupne telesne mase pacijenta, što ukazuje da se lek selektivno nagomilava u nekom tkivu (94).

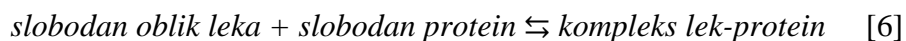
Nagomilavanje leka u određenom tkivu ne ukazuje nužno na mesto njegovog specifičnog dejstva. U nekim tkivima i organima lek se zadržava u farmakološki neaktivnom stanju, čime se postiže smanjenje koncentracije na mestu dejstva i usporava izlučivanje iz organizma. Time je dejstvo leka oslabljeno i produženo (94).

2.4.2.2. Vezivanje za proteine plazme

Sposobnost vezivanja leka za proteine plazme, pre svega za albumine i α -kisele glikoproteine, je jedan od faktora koji utiče na distribuciju leka (99), s obzirom da vezana frakcija ne može da prolazi kroz biološke membrane.

Albumin humanog seruma (*eng. Human Serum Albumin, HAS*) je protein krvne plazme zastupljen u najvećoj koncentraciji (čini 60% ukupnih proteina plazme) (100, 101). Na svojoj površini ima više hidrofobnih mesta vezivanja, pa pre svega vezuje neutralne, ali i negativno naelektrisane hidrofobne molekule (102). Bazni lekovi se vezuju za α -1-kisele glikoprotein, ali i za albumin (103). Lipoproteini mogu da vezuju i transportuju izrazito lipofilne lekove (104, 105). Lek nema jednak afinitet ka svim mestima vezivanja na HAS, ali sa porastom njegove koncentracije ta selektivnost se gubi, što se može odraziti na njegov farmakološki efekat (99). Smatra se da je lipofilnost dominantan faktor koji utiče na vezivanje leka za HAS (106), iako se pokazalo da raspored farmakofora u molekulu potencijalnog leka takođe igra značajnu ulogu u tom procesu (99).

Ukupna koncentracija leka u plazmi predstavlja zbir koncentracije slobodnog oblika leka i koncentracije leka u kompleksu sa proteinima plazme. Ova dva oblika se nalaze u dinamičkoj ravnoteži:



Samo slobodna frakcija leka je farmakološki aktivna, jer je to oblik koji može da prođe kroz biološke membrane do mesta interakcije sa specifičnim receptorom, dok lek u kompleksu sa

proteinima predstavlja depo, iz koga se lek postepeno oslobađa kada dođe do pada njegove koncentracije u plazmi (99, 107, 108). Visok stepen vezivanja za proteine plazme nije poželjan, jer male promene u procentu vezanog leka izazivaju drastične promene slobodne frakcije, čime se stvaraju uslovi za potenciranje farmakoloških, ali i neželjenih efekata leka (99). Takođe, vezivanje za proteine plazme predstavlja mesto klinički značajnih interakcija, kako sa drugim lekovima, tako i sa endogenim supstancama (94).

Afinitet vezivanja leka za proteine plazme (*eng. Protein Plasma Binding Predictor, PPB*) definisan je kao odnos koncentracije leka vezanog za proteine (C_{pp}) i ukupne koncentracije leka u plazmi (C_{uk}) (34), izražen u procentima:

$$PPB = \frac{C_{pp}}{C_{uk}} \times 100 \text{ [\%]} \quad [7]$$

S obzirom da ovaj parametar ima uticaj i na farmakokinetiku i na farmakodinamiku leka (99), jasno je zašto je važna njegova procena tokom razvoja novog leka. Na osnovu predviđenih PPB vrednosti moguće je izračunavanje koncentracije slobodnog oblika leka i određivanje bezbednog režima doziranja za ispitivanja na ljudima (99).

2.4.3. Koeficijent raspodele između krvi i mozga

Svi lekovi iz grupe neurofarmaceutika moraju da poseduju sposobnost prolaska kroz BBB. Lekovi koji svoj biološki efekat ostvaruju na periferiji dovode do manifestacije neželjenih efekata na nivou CNS-a, ukoliko prolaze kroz BBB.

BBB predstavlja jedinstvenu, selektivnu barijeru sačinjenu od endotelnih ćelija cerebralnih kapilara, perivaskularnih elemenata kao što su blisko povezani nastavci astrocita, perivaskularni neuroni i periciti, koji čine funkcionalnu jedinicu (109). Endotelne ćelije moždanih kapilara su specifične po tome što formiraju dodatne jake veze pomoću transmembranskih proteina, onemogućavajući tako paracelularni transport supstanci (109). Zbog prisustva velikog broja efluksnih transportnih proteina, kao što su P-glikoprotein i MRP (*eng. Multi-drug Resistance Protein*), endotel ograničava i transcelularnu permeaciju (110). Kao dinamička struktura, BBB

održava optimalne uslove za funkcionisanje neurona i ćelija glije, kroz regulaciju razmene supstanci između krvi i mozga (109). Tako, esencijalne hranljive materije, poput glukoze i pojedinih amino kiselina, prolaze kroz BBB posredstvom specifičnih transportnih proteina, a dinamičari barijere doprinose i intracelularni i ekstracelularni enzimi (monoaminooksidaze, γ -glutamil transpeptidaza, alkalna fosfataza, pojedine izoforme CYP450 i drugi) (111, 112). Mali, liposolubilni molekuli prolaze kroz BBB, dok mali i veliki hidrofilni molekuli zahtevaju aktivan transport (113). Permeacija u mozak je u dobroj korelaciji sa PSA i zapreminom, odnosno veličinom molekula (97), i to tako da polarnost i sposobnost formiranja vodonične veze smanjuju prolazak kroz BBB, dok ga veličina molekula favorizuje. Empirijska pravila po Klarku definišu molekulske deskriptore koji pozitivno koreliraju sa permeacijom kroz BBB.

2.5. Deskriptori toksičnosti

Otkrivanje ozbiljnih toksikoloških dejstava potencijalnog leka u ranoj fazi razvoja eliminiše kandidate sa nepoželjnim toksikološkim profilom, čime se izbegava nepotrebno ulaganje vremena i sredstava u dalje faze njegovog ispitivanja. *In silico* toksikologija podrazumeva primenu računarskih tehnologija za analizu postojećih podataka, uočavanje zavisnosti hemijske strukture i toksikoloških svojstava, te koreliranje deskriptora toksičnosti sa molekulskim deskriptorima nekom od metoda regresije, čime se kreiraju QSTR modeli. Kao deskriptori toksičnosti, najčešće se koriste srednja letalna doza (LD_{50}) ili srednja letalna koncentracija (LC_{50}) na glodarima (najčešće na miševima ili pacovima). Definišu se kao doza, odnosno koncentracija koja dovodi do smrti polovine tretirane populacije pod jasno definisanim uslovima (114). *In silico* toksikologija daje ključne informacije za odabir vodećih komponenata sa niskom toksičnošću u ranoj fazi razvoja novih lekova (115).

Zagađenje voda predstavlja ozbiljan globalni problem i pretnju opstanka akvatičnih organizama i vodenih ekosistema, ali kroz lanac ishrane ugrožava i organizme na višem stepenu razvoja, kao i humanu populaciju. Kao posebna grupa zagađivača izdvajaju se lekovi i njihovi metaboliti, koji na direktan ili indirektan način dospevaju u vodene sisteme i zato je procena rizika od ispoljavanja akvatične toksičnosti neophodna u toku procesa dizajniranja i razvoja novih lekova (116). U tom cilju su formirane baze podataka sa toksikološkim parametrima, eksperimentalno

dobijenim za već postojeće strukture, koji se regresionim metodama dovode u vezu sa određenim molekulskim deskriptorima. Tako se dobijaju *in silico* modeli (QSTR) za preliminarnu, brzu procenu akvatične toksičnosti (117). Kao biološki indikatori koriste se osetljivi akvatični organizmi, poput vodenih račića *Daphnia magna* i riba *Pimephales promelas*. Najčešće korišćeni deskriptor akutne toksičnosti je srednja letalna koncentracija, LC₅₀ (mg/l) (118). Smatra se da je toksičnost posledica interakcije sa određenim proteinskim strukturama, te da je lipofilnost ključna osobina koja određuje toksični potencijal ispitivane supstance (119).

Vezivanje za nespecifične receptore, koji nisu odgovorni za biološku aktivnost, predstavlja razlog ispoljavanja neželjenih dejstava ispitivane supstance. Lekovi vrlo često dovode do poremećaja hormonske homeostaze različitim mehanizmima. Ukoliko se radi o estrogenim receptorima (ER), koji predstavljaju tip nuklearnih receptora, ligandi mogu da deluju kao agonisti ili antagonisti. Vezivanjem za pomenute receptore dolazi do poremećaja razvoja polnih karakteristika, metaboličkih promena, narušavanja reproduktivne funkcije, razvoja karcinoma dojke, itd. (120). S druge strane, delovanje na ER može biti iskorišćeno u terapijske svrhe, kada je reč o estrogen zavisnom karcinomu dojke. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja potencijala ispoljavanja ovakvog delovanja su dugotrajna, finansijski zahtevna i etički nisu adekvatna za izvođenje. Kao alternativa se koriste *in silico* predviđanja posredstvom QSAR metoda, čime se fizičko-hemijske karakteristike dovode u korelaciju sa biološkom aktivnošću, predstavljenom u vidu relativnog afiniteta za vezivanje za ER (*eng. Relative Binding Affinity, RBA*) (121).

2.6. Molekulski receptori

Aktivna mesta na koja lekovi deluju, na ili u ćeliji, su najčešće proteinske strukture tipa receptora, jonskih kanala, enzima ili transportnih molekula (122).

Receptori predstavljaju strukturno specifična mesta, na površini ćelije ili u samoj ćeliji, za koje se vezuju molekuli leka, pod uslovom da je prostorni raspored atoma i funkcionalnih grupa komplementaran prostornoj strukturi receptora (122).

Vezivanje za receptore koji nisu odgovorni za terapijski efekat leka je razlog ispoljavanja toksičnosti i neželjenih dejstava.

G protein spregnuti receptori (*eng. G-Protein Coupled Receptors, GPCR*) su najčešća ciljna struktura za vezivanje lekova (122). Sistematizovani su u klase i dalje u porodice, na osnovu liganada koji mogu biti joni, neurotransmiteri, lipidi, ugljeni hidrati, peptidi, amino kiseline, proteini, nukleotidi (123, 124). Lek (ligand) se vezuje za receptor na površini ćelijske membrane, što predstavlja okidač za aktivaciju G-proteina lociranog na citoplazmatskoj strani membrane. Aktivirani G-protein menja aktivnost jednog efektornog elementa (obično enzima ili jonskog kanala) čime se povećava intracelularna koncentracija sekundarnog glasnika (npr. cikličnog adenozinmonofosfata). Osim stimulativnih, postoje i G-proteini sa inhibitornim delovanjem (122). Receptori u vezi sa G-proteinima su meta za čak jednu četvrtinu lekova u prometu, ali su većina još uvek neiskorišćeni u terapijske svrhe i za potrebe kliničkih ispitivanja (125, 126).

Voltažno-zavisni Na⁺, Ca²⁺, i K⁺ kanali (*eng. Voltage-Gated Ion Channels, Ion*) su proteinski kanali, kod kojih se prenošenje signala vrši povećanjem transmembranske provodljivosti za neki jon, čime se menja električni potencijal membrane (122), što kao krajnju posledicu ima konformacijske promene odgovorne za otvaranje i zatvaranje pora (127). Električni signali kontrolišu kontrakciju mišića, sekreciju hormona, obradu informacija prema mozgu i od mozga prema perifernim strukturama. Važna je njihova uloga u intracelularnom metabolizmu, prenosu signala, ekspresiji gena, sintezi i degradaciji proteina (128).

Nuklearni receptori (*eng. Nuclear Receptors-ligand regulated, NRL*) funkcionišu kao ligandom aktivisani transkripcioni faktori koji regulišu ekspresiju gena odgovornih za različite funkcije – reprodukciju, razvoj, metabolizam (129). Sačinjeni su od DNK vezujućeg domena i ligand vezujućeg domena. Lipofilni molekuli prolaze kroz lipidnu membranu i vezuju se za intracelularni receptor, a time stimulišu transkripciju gena u jedru ćelije (122).

Inhibitori kinaza (*eng. Kinase Inhibitors, Kin*) su membranski receptori koji se strukturno i funkcionalno razlikuju od GPCR i ligand-zavisnih kanala. Najveći broj ovih receptora su zapravo veliki proteini sačinjeni od oko 1.000 amino kiselinskih rezidua, spiralno uvijenih oko membrane, povezani sa velikim ekstracelularnim, ligand-vezujućim domenom i sa intracelularnim domenom, različite veličine i funkcije. Inhibicijom enzima, pojačava se dejstvo njihovih supstrata (122). Ovi membranski receptori imaju važnu ulogu u ćelijskoj deobi, rastu, inflamaciji, apoptozi i imunom odgovoru (130).

2.7. Empirijska pravila

Empirijska pravila predstavljaju opšta pravila za razlikovanje supstanci koje imaju veći potencijal da budu kandidati za lek. Analizom baza podataka o fizičko-hemijskim karakteristikama, moguća je brza, preliminarna selekcija kandidata za koje se teorijski pretpostavlja dobar prolazak kroz različite biološke membrane i koje treba uzeti u razmatranje za dalja ispitivanja.

Pravilo Lipinskog („Pravilo 5“) je formulisano sa ciljem da se definišu kriterijumi koje supstanca mora da zadovolji da bi permeacija kroz membrane gastrointestinalnog trakta bila zadovoljavajuća. S tim u vezi, supstanca mora da ispunjava najmanje tri od četiri zahteva, radi postizanja adekvatne apsorpcije:

1. Da ne sadrži više od 5 donora za stvaranje vodonične veze, NHBD (izraženo kao suma $-OH$ i $-NHx$ grupa), $x \geq 1$
2. Da nema više od 10 akceptora za stvaranje vodonične veze, NHBA (izraženo kao suma N i O atoma u molekulu)
3. Da ima molekulsku masu ispod 500 g/mol
4. Da je izračunata logP vrednost manja od 5, odnosno da je MlogP vrednost ispod 4,15 (131).

Supstance koje kroz biološke membrane prolaze aktivnim transportom posredstvom specifičnih proteinskih nosača (antigljivični lekovi, vitamini, kardiotonični glikozidi i dr.) odstupaju od ovih pravila.

Pravilo Vebera ukazuje da na resorpciju leka u većoj meri utiče broj rotirajućih veza (mera fleksibilnosti molekula) i PSA, u odnosu na kriterijume po Lipinskom. U tom smislu, poželjno je da:

1. U molekulu bude ≤ 10 rotirajućih veza
2. Polarna površina molekula bude $\leq 140A^2$ ili da je broj atoma koji mogu da grade vodoničnu vezu (izraženo kao zbir donora i akceptora vodonika) ≤ 12 (132).

Za empirijsku procenu apsorpcije jedinjenja primenjuju se, osim pravila Lipinskog i Vebera, i **Egan-ova pravila** (133). Dobra intestinalna apsorpcija se očekuje ako jedinjenje ima:

1. $wlogP \leq 5,88$
2. $PSA \leq 131,6$

Pravilo po Klarku (89) objedinjuje kriterijume u vezi sa fizičko-hemijskim svojstvima koja uslovljavaju prolazak kroz BBB:

1. Ako je zbir atoma azota i kiseonika (N+O) u molekulu potencijalnog leka ≤ 5 , molekul ima veći potencijal da prođe kroz BBB.
2. Ako je vrednost $\text{ClogP} - (\text{N}+\text{O}) > 0$, logBBB vrednost će biti pozitivna.
3. Da bi permeacija u mozak bila dobra, poželjno je da PSA bude u određenim, propisanim granicama. PSA izražava kapacitet molekula da veže vodonik i najčešće se izračunava sabiranjem uticaja koji na površinu imaju atomi kiseonika i azota, kao i vodonici vezani za njih. Predložene su dve gornje granice:
 - a) van de Waterbeemd i saradnici smatraju da je gornja granica 90Å^2 (134)
 - b) granica po Kelderu i saradnicima je nešto niža: $60\text{-}70\text{Å}^2$ (135).
4. Molekulska masa (MW) bi trebalo da bude ispod 450 g/mol.
5. Preporučljivo je da logD vrednost bude u opsegu 1-3.

Komparativna studija je pokazala da su lekovi koji deluju na CNS najčešće lipofilniji i manje fleksibilni, da imaju manje donora vodonične veze, manju šaržu i manju PSA vrednost ($< 80\text{Å}^2$) (136).

Oprea pravila obuhvataju skup pravila koja omogućavaju odabir vodećeg molekula (*eng. lead molecule*) iz serije ispitivanih jedinjenja za dalje faze ispitivanja i razvoja potencijalnog leka. Molekul se izdvaja ukoliko ima navedene vrednosti parametara:

1. Molekulska masa (MW) ≤ 300 g/mol
2. $\text{ClogP} \leq 3$
3. Broj rotirajućih veza (NRB) ≤ 3
4. Broj donora vodonika (NHBD) ≤ 3
5. Broj akceptora vodonika (NHBA) ≤ 3
6. $\text{PSA} \leq 60\text{Å}^2$ (137).

Muegge je, kao i Oprea, definisao skup pravila kojima se predviđa potencijal novih molekula da budu lekovi (138) Verovatnoća da je jedinjenje kandidat za lek je veća ukoliko zadovoljava sledeće kriterijume:

1. $200 \text{ g/mol} < \text{MW} < 600 \text{ g/mol}$

2. $-2 \leq XlogP \leq 5$
3. $PSA \leq 150$
4. broj cikličnih sistema ≤ 7
5. broj atoma ugljenika > 4
6. broj heteroatoma > 1
7. $NRB \leq 15$
8. $NHBA \leq 10$
9. $NHBD \leq 5$

Ghose-ova pravila, slično pravilima Oprea i Muegge-ovim pravilima, treba da pomognu u selekciji kandidata sa najvećim potencijalom da budu novi lekovi, i koji će ući u naredne faze ispitivanja (139). Kriterijumi za odabir molekula sa optimalnim karakteristikama su:

1. $160 \text{ g/mol} \leq MW \leq 480 \text{ g/mol}$
2. $-0,4 \leq wlogP \leq 5,6$
3. $40 \leq \text{molarna refraktivnost (MR)} \leq 130$
4. $20 \leq \text{broj atoma u molekulu} \leq 70$

2.8. Antiproliferativna aktivnost

Prvi korak na putu pronalaska novih jedinjenja sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću jeste *in vitro* ispitivanje citotoksičnog (antiproliferativnog) delovanja prema različitim tumorskim ćelijskim linijama. Ovim testovima se na različitim tipovima ćelija, pored ostalog, mogu meriti vijabilnost i određeni parametri ćelijskog metabolizma (140).

Za procenu bioloških efekata koriste se različite kvalitativne i kvantitativne metode:

- **Test odbacivanja boje Tripan plavo – DET** (eng. *Trypan Blue Dye Exclusion Test*) se koristi za određivanje vijabilnosti ćelija. Radi se o brzom i jednostavnom testu, koji ne zahteva mnogo opreme, pogodnom kako za normalne, tako i za tumorske ćelije. Zasniva se na činjenici da boja koja se koristi u testu ulazi samo u ćelije čija je ćelijska membrane oštećena, pa one bivaju obojene, dok neoštećene ćelije ne primaju i odbacuju boju (141). U mikroskopskoj komori za brojanje, neoštećene ćelije su bezbojne, dok su oštećene obojene plavo. Ovaj test služi kao prvi korak u ispitivanju potencijalnih antitumorskih lekova.

- **Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima - MTT test** se često primenjuje za ispitivanje citotoksičnog/antiproliferativnog efekta potencijalnih novih antitumorskih lekova (142, 143), ali nalazi primenu i u drugim tipovima ispitivanja (enzimskim, histohemijskim, bakteriološkim) (144-146). Tetrazolijumove soli mogu da primaju elektrone od oksidovanih supstrata ili odgovarajućih koenzima, poput NADH i NADPH, pri čemu se redukuju u obojeni produkt formazan (147-149). Jedna od najvažnijih funkcija mitohondrije jeste proizvodnja dovoljne količine ATP-a (adenozin trifosfata). U tom procesu se aktivno metabolišu piruvat, masne kiseline i aminokiseline i nastaje acetil CoA. On se u mitohondrijama uključuje u Krebsov ciklus, u kojem kao produkti nastaju redukovani koenzimi. Oslobođeni elektroni iz Krebsovog ciklusa se uključuju u proces respiracije, čiji je rezultat proizvodnja ATP-a. Sukcinat dehidrogenaza je jedan od enzima Krebsovog ciklusa, koji prevodi sukcinat u fumarat, pri čemu se nastali par elektrona koristi za proizvodnju novog molekula ATP-a. Jedinjenje 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT) je supstanca svetlo žute boje, koja može biti supstrat sukcinat dehidrogenaze. Proizvod ove reakcije je ružičasto-plavo obojeni formazan. Opisana konverzija se odvija samo u ćelijama koje su žive (metabolički aktivne), te je merenjem količine nastalog formazana moguće proceniti broj živih ćelija.

Gajenje ćelijskih linija u *in vitro* uslovima obuhvata održavanje i rast ćelija, uz očuvanje njihove građe i funkcije. Primena ćelijskih kultura u istraživačkim biomedicinskim laboratorijama je praksa duga više od jednog veka (150). Različite ćelijske linije imaju primenu u *in vitro* testovima citotoksičnosti, a odabir ćelijskog sistema zavisi od njihovih karakteristika i uslova neophodnih za rast. Ćelijske linije se dobijaju od primarnih ćelijskih kultura, direktno iz uzoraka tkiva pacijenata. Primarne kulture se teško mogu reprodukovati, jer mnogi faktori, poput uzrasta i hormonskog statusa, mogu uticati na vijabilnost i rast ćelija (140). To je razlog zbog koga se od primarnih kultura različitim postupcima dobijaju trajne ćelijske linije. Kontinuirane ćelijske linije tumora su trajne linije dobijene od tumorskih ćelija, direktno ili transformacijom primenom virusa, hemijskih mutagena ili zračenja, čime se dobija "besmrtna" ćelijska linija. Ove ćelije su slične tumorskim i pokazuju svojstvo nekontrolisane proliferacije u kulturi (140). Danas je za *in vitro* ispitivanje dostupan veliki broj kontinuiranih ćelijskih linija.

Koncentracija ćelija je parametar koji utiče na vijabilnost kulture. To je razlog zašto se ćelije moraju presađivati, da bi se smanjila gustina ćelija na optimalan nivo, uz dodavanje svežeg medijuma i seruma, čime se obezbeđuju neophodni nutrijenti. Za svaku ćelijsku liniju definisan je

optimalan medijum za gajenje, čiji je sastav u skladu sa njihovim specifičnostima proliferacije i nutritivnim potrebama. Promene u sastavu medijuma tokom kultivacije minimiziraju se puferovanjem i obezbeđivanjem atmosfere sa CO₂ u inkubatorima, a isparavanje medijuma i stvaranje hipertoničnih uslova se izbegava obezbeđivanjem visoke vlažnosti (140).

2.9. Molekulski doking

Molekulski doking je metoda koja se primenjuje u okviru savremenog pristupa u dizajniranju lekova, sa ciljem da se ispita sposobnost vezivanja molekula kandidata za lek za proteinske strukture od interesa za buduću potencijalnu terapijsku primenu. Primenom softverskih paketa vrši se pretraživanje različitih orijentacija liganada i njihovo rangiranje na osnovu skorova energije vezivanja za određeni protein (receptor) koji postoji u bazi proteina poznate strukture (*eng. Protein Data Bank, PDB*). Računanje energije vezivanja i dobijanje vrednosti MolDock skora, kao pokazatelja afiniteta liganda prema aktivnom mestu, vrše se primenom funkcije koja strukturu proteina prilagođava prikazu u koordinatnoj mreži sa odabranom rezolucijom rešetke. Mesto vezivanja na protein je definisano kao sfera koja obuhvata sve atome u definisanom radijusu od ko-kristalizovanog liganda. Doking svakog liganda prema proteinu vrši se sa velikim brojem ponavljanja kako bi se dobile što pouzdanije vrednosti energije vezivanja, izražene u kcal/mol. Uobičajeno se generiše nekoliko najpovoljnijih konformacija za svaki ligand, a zatim se konformacija liganda sa najmanjom energijom vezivanja za protein koristi za analizu interakcija ispitivanih jedinjenja sa aktivnim mestom ispitivanog receptora (20).

3. Ciljevi i hipoteze

3.1. Ciljevi rada

Ciljevi ovog istraživanja su sledeći:

1. Ispitati fizičko-hemijske karakteristike 11 novosintetisanih metil-etil-N-aril-sukcinimida, na osnovu strukture, primenom različitih softverskih paketa.
2. Odrediti, na osnovu strukture, farmakokinetičke i toksikološke parametre ispitivanih jedinjenja, primenom različitih softverskih paketa.
3. Ispitati retenciono ponašanje, odrediti retencione konstante za svako jedinjenje, primenom visokoefikasne hromatografije na tankom sloju (HP-TLC) i ispitati mogućnost primene retencionih konstanti kao mere lipofilnosti ispitivanih jedinjenja.
4. Ispitati antiproliferativnu aktivnost na odabranim kulturama ćelija karcinoma i na zdravim ćelijama fibroblasta pluća i odrediti IC₅₀ (koncentracija koja smanjuje vijabilnost ćelija za 50%) za svako jedinjenje.
5. Primenom molekuskog dokinga odrediti energije vezivanja ispitivanih jedinjenja za estrogene receptore i ispitati da li postoji korelacija između vezivanja ispitivanih sukcinimida za estrogene receptore i antiproliferativnog delovanja na ćelije karcinoma koje eksprimiraju ovu vrstu receptora

3.2. Hipoteze rada

Očekivani rezultati (hipoteze):

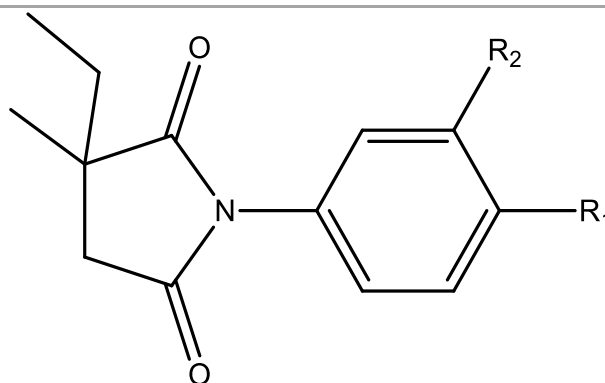
1. Ispitivani derivati metil-etil-N-aril-sukcinimida imaju potrebna fizičko-hemijska svojstva budućih kandidata za lek.
2. Ispitivana jedinjenja imaju na osnovu hemijske strukture predviđena potrebna farmakokinetiska svojstva i nisku predviđenu toksičnost.
3. Dobijene retencione konstante za svako jedinjenje mogu da se koriste kao mera lipofilnosti ispitivanih jedinjenja.
4. Određene vrednosti IC_{50} za svako ispitivano jedinjenje pokazuju statistički značajnu antiproliferativnu aktivnost na odabranim ćelijskim linijama karcinoma, a bezbedna su za primenu na zdravim fetalnim fibroblastima pluća.
5. Ispitivana jedinjenja imaju male vrednosti energije formiranja kompleksa sa estrogenim receptorom, određene molekulskim dokingom. *In silico* afinitet vezivanja za estrogene receptore je u korelaciji sa *in vitro* određenim antiproliferativnim efektom na ćelijske linije karcinoma koje eksprimiraju estrogene receptore.

4. Materijal i metode

4.1. Analizirana jedinjenja

U radu je ispitivano 11 jedinjenja metil-etil-N-arilsukcinimida, sintetisanih na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu (Tabela 1) (153).

Tabela 1. Strukture ispitivanih jedinjenja



supstanca	R ₁	R ₂	Naziv po IUPAC
1	-H	-H	1-fenil-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
2	-OH	-H	1-(4-hidroksifenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
3	-OCH ₃	-H	1-(4-metoksifenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
4	-COOH	-H	1-(4-karboksifenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
5	-CN	-H	1-(4-cijanofenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
6	-CH ₃	-H	1-(4-metilfenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
7	-NO ₂	-H	1-(4-nitrofenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
8	-Cl	-H	1-(4-hlorofenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
9	-Br	-H	1-(4-bromofenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
10	-H	-Cl	1-(3-hlorofenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion
11	-H	-Br	1-(3-bromofenil)-3-etil-3-metilpirolidin-2,5-dion

Hromatografska i *in silico* ispitivanja su urađena na Katedri za farmaciju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, a ispitivanje antiproliferativne aktivnosti na Institutu za onkologiju Vojvodine, u Sremskoj Kamenici.

4.2. Reverzno fazna hromatografija na tankom sloju (RP-TLC)

Kao stacionarna faza za hromatografiju na obrnutim fazama korišćene su komercijalne ploče RP-18 W/UV₂₅₄ (Marcherey-Nagel GmbH and Co., Düren, Germany).

Kao mobilna faza korišćena je dvokomponentna smeša vode i organskog rastvarača, sa različitim zapreminskim udelom (v/v) organskog modifikatora (inkrement 0,05) (Tabela 2.). Udeli organskog rastvarača su odabrani na osnovu prethodnih ispitivanja strukturno sličnih sukcinimida i njihove rastvorljivosti u odgovarajućim organskim rastvaračima (152).

Tabela 2. Mobilne faze sa zapreminskim udelima organskog rastvarača (φ)

mobilna faza	zapreminski udeo organskog rastvarača, φ
metanol – voda	0,50 – 0,70
acetonitril – voda	0,45 – 0,65
acetone – voda	0,45 – 0,75

Pripremljeni su etanolni rastvori 11 analiziranih supstanci, koncentracije 2 mg/ml. Na startnu liniju, 5 mm od ivice ploče, mikropipetom su naneti alikvoti od 0,2 μ l. Ploče su razvijane uzlaznom hromatografskom tehnikom, bez prethodnog zasićenja hromatografske komore parama mobilne faze. Rastojanje između starta i fronta rastvarača iznosilo je 5 cm. Mrlje na hromatogramu detektovane su pomoću UV lampe (Camag, Muttenz, Switzerland) na talasnoj dužini $\lambda=254$ nm. Merene su prosečne R_f vrednosti svake analizirane supstance, dobijene kao aritmetička sredina tri nezavisna merenja pod istim eksperimentalnim uslovima (temperatura i vlažnost). Ponovljivost je bila zadovoljavajuća. T-testom (stepen $p < 0,005$) je utvrđeno da se izračunate R_f vrednosti statistički značajno ne razlikuju.

Sve statističke analize i rezultati dobijeni su primenom kompjuterskog programa Origin verzija 8.0.

4.3. *In silico* deskriptori fizičko-hemijskih, farmakokinetičkih, toksikoloških karakteristika i biološke aktivnosti

Primenom računarskih programa <http://146.107.217.178/servlets/vsslab2action=alogps>, ACD/Labs, ChemBioOffice i SWISSADME određene su različite vrednosti logaritma podeonog koeficijenta.

Fizičko-hemijske karakteristike ispitivanih supstanci izračunate primenom i-lab 2.0 softverskog paketa su: logaritam particionog koeficijenta (logP), logaritam distribucionog koeficijenta (logD), logaritam rastvorljivosti u vodi (logS), broj donora za formiranje vodonične veze, odnosno broj vodonika vezanih za atome kiseonika ili azota (NHBD), broj akceptora za formiranje vodonične veze, odnosno broj atoma azota i kiseonika (NHBA), kao i molarna masa (MW), polarna površina (PSA) i broj rotirajućih veza (NRB).

Farmakokinetički deskriptori za sve ispitivane supstance (K_a – konstanta apsorpcije, V_d – volumen distribucije, PPB – procenat vezivanja za proteine plazme i logBBB – logaritam particije supstance između mozga i plazme) dobijeni su primenom softverskog paketa <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>.

Vrednosti srednje letalne doze LD₅₀ (mg/kg) na pacovima i miševima nakon intraperitonealne (i.p), peroralne (p.o), intravenske (i.v) i subkutane (s.c.) aplikacije izračunate su primenom i-lab 2.0 softverskog paketa.

Vrednosti srednje letalne koncentracije LC₅₀ (mg/L) na *Fathead minnow* (*Pimephales promelas*) i *Water flea* (*Daphnia magna*) kao mera akvatične toksičnosti, zatim logaritam relativnog afiniteta vezivanja za ERA (estrogen receptor alfa) – logRBA, kao mera endokrine aktivnosti, izračunate su primenom i-lab 2.0 softverskog paketa.

Primenom softverskog paketa Molinspiration (www.molinspiration.com) izračunate su vrednosti afiniteta za vezivanje za četiri vrste receptora: G-protein spregnuti receptori (GPCR), jonski kanali (Ion), inhibitori kinaza (Kin) i nuklearni receptori (NRL).

4.4. Antiproliferativna aktivnost

Antiproliferativna aktivnost 11 ispitivanih derivata sukcinimida (pet različitih koncentracija u opsegu od 10^{-4} do 10^{-8} M), određena je primenom MTT testa (153), na komercijalnim kulturama ćelija:

- MRC-5 (ATCC CCL 171) – ćelijska linija zdravog tkiva fibroblasta pluća,
- A549 (ATCC CCL 185) – ćelijska linija karcinoma pluća,
- HeLa (ATCC CCL 2) – ćelijska linija karcinoma grlića materice,
- MDA-MB-231 (ATCC HTB 26) – ćelijska linija estrogen i progesteron receptor negativnog (ER-negativnog, PR-negativnog) i HER2- adenokarcinoma dojke (eng. *Triple negative breast cancer*, TNBC),
- MCF-7 (ATCC HTB 22) – ćelijska linija estrogen receptor pozitivnog (ER-pozitivnog) adenokarcinoma dojke,
- HT-29 (ATCC HTB 38) - humani karcinom kolona.

Ispitivanje je ponovljeno u kvadrplikatu radi provere tačnosti i preciznosti dobijenih rezultata.

U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min/200 g), a broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim (154). Tripan plavo je boja koja ulazi u ćeliju ukoliko joj je narušen integritet ćelijske membrane. Pri tome se mrtve ćelije boje u plavo, pa ih je na ovaj način moguće razlikovati od živih ćelija. Ćelijska suspenzija (50 μ L) je razblažena sa 200 μ L 0,1 % rastvora tripan plavog i ćelije su odmah brojane u hemocitometru (Neubauer-ova komora) na invertnom mikroskopu.

Broj ćelija u 1 ml suspenzije izračunat je prema navedenoj formuli, uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5 \quad [8]$$

gde je: N = ukupan broj živih ćelija u 1 ml suspenzije; N_0 = broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra; 5 = faktor razblaženja; 10^4 = korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u ml). Vijabilnost ćelija je izračunata prema navedenoj formuli (155):

$$V(\%) = (N_0/(N_0+M_0)) \times 100 \quad [9]$$

gde je M_0 = broj mrtvih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%.

Vijabilne (žive) ćelije su posejane u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, ostavljene u termostatu na 37 °C sa 5% CO₂ naredna 24 sata. Zatim, u sve otvore, osim kontrolnih (ćelije u medijumu), dodato je 10 µl ispitivane supstance odgovarajuće koncentracije i inkubacija je nastavljena u toku 48 sati. Rastvor MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je dodat u sve otvore na ploči u zapremini 10 µl/otvor i inkubacija je nastavljena 3h u termostatu na 37 °C sa 5% CO₂. Po isteku 3h u svaki otvor je dodato 100 µl 0,04 mol/l HCl u izopropanolu, da bi se istaloženi kristali formazana rastvorili. Apsorbanca je očitana na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na odgovarajućim talasnim dužinama (test talasna dužina od 540 nm i referentna talasna dužina od 690 nm). Otvori na ploči bez ćelija (sadrže samo medijum i MTT) korišćeni su kao slepa proba.

Citotoksičnost u procentima (za svaku koncentraciju ispitivanog jedinjenja) izračunata je po formuli:

$$CI = \left(1 - \frac{A_s}{A_k}\right) \times 100 \quad [10]$$

gde je A_s – apsorbanca uzoraka sa ispitivanom supstancom; A_k – apsorbanca kontrolnih uzoraka (148). Koncentracija pri kojoj se postiže 50% inhibicije rasta, odnosno citotoksičnost (IC₅₀), određena je „Median effect“ analizom pomoću programa CalcuSyn.

Svaki test je ponovljen dva puta. Analiza dobijenih rezultata, statistička obrada podataka i sva izračunavanja urađena su pomoću kompjuterskog programa Microsoft Office Excel. Srednja vrednost (SD) i koeficijent varijacije (CV) izračunati su za replikate uzoraka u svakom ponavljanju. Koeficijent varijacije eksperimentalnih i kontrolnih uzoraka bio je manji od 15%, a za većinu uzoraka je bio ispod 10%.

4.5. Doking analiza sukcinimida prema estrogenom receptoru alfa (ERA) i estrogenom receptoru beta (ERB)

4.5.1. Priprema proteina i liganda

Trodimenzionalna (3D) kristalna struktura estrogenog receptora alfa (ERA) koji pripada grupi serin-proteaza, a u kompleksu sa tamoksifenom, utvrđena je metodom difrakcije X-zraka sa rezolucijom od 1,9 Å (156), dok je kristalna struktura estrogenog receptora beta (ERB) u kompleksu sa genisteinom utvrđena metodom difrakcije X-zraka sa rezolucijom od 2,3 Å (157). Proteinska struktura je preuzeta u *pdb* formatu iz RCSB Protein Data Bank baze bioloških makromolekula (PDB kod: 3ERT za estrogen receptor alfa i PDB kod: 2FSZ za estrogen receptor beta) (158).

Strukture 2D svih liganada su pripremljene pomoću programa ChemDraw Ultra 12.0, a njihove 3D strukture su dobijene, tako da imaju energetski najpovoljnije konformacije, pomoću programa Chem3D Pro 12.0.

4.5.2. Analiza molekuskog dokinga

Doking studije su rađene u Molegro Virtual Docker (MVD) softveru, verzija 7.0 (159). MVD je široko primenjivan doking program u procesu razvoja lekova zbog njegove visoke pouzdanosti, zasnovane na primeni algoritama diferencijalne evolucije, koji uzima u obzir i energiju intermolekularne interakcije između proteina i liganda i energiju intramolekularne interakcije samog liganda. Funkcija procene (*eng. scoring function*) energetski najpovoljnijih orijentacija ispitivanog liganda pri interakciji sa ciljnim makromolekulom je zasnovana na višestrukoj linearnoj funkciji (*eng. piecewise linear function*) koja uključuje i elektrostatičke interakcije i formiranje vodoničnih veza (160).

Ispitivani sukcinimidi u *mol2* formatu i ERA protein u *pdb* formatu su prebačeni u MVD softver. Svi molekuli rastvarača su uklonjeni iz proteinske strukture. Najpre je izvršena pretraga potencijalnih mesta vezivanja liganda na ERA i šupljina u okviru proteina površine 857,6 Å² i zapremine 334,336 Å³ sa ko-kristalizovanim 4-hidroksi-tamoksifenom je odabrana kao aktivno

mesto za dalje doking analize za ERA, dok je za ERB odabrana šupljina u okviru proteina (sa ko-kristalizovanim 4-hidroksi-tamoksifenom) površine $20,48 \text{ \AA}^2$ i zapremine $12,288 \text{ \AA}^3$. Urađena je pretraga različitih orijentacija liganada, a zatim i njihovo rangiranje na osnovu skorova energije vezivanja. Računanje energije vezivanja i dobijanje MolDock skora kao pokazatelja afiniteta liganda prema aktivnom mestu urađeno je primenom funkcije koja strukturu proteina prilagođava prikazu u koordinatnoj mreži (*eng. grid*) sa rezolucijom rešetke od $0,30 \text{ \AA}$. Mesto vezivanja na proteinu je definisano kao sfera koja obuhvata sve atome proteina u radijusu od 10 \AA od ko-kristalizovanog liganda. Doking svakog liganda prema proteinu je vršen 10 puta sa maksimalno 1.500 iteracija kako bi se dobile što pouzdanije vrednosti energija vezivanja izraženih u kcal/mol (MolDock skor). Generisano je 5 energetski najpovoljnijih konformacija za svaki ligand, a zatim je konformacija liganda sa najmanjom energijom vezivanja odabrana za dalju analizu interakcija ispitivanih sukcinimida sa aktivnim mestom ispitivanog estrogenog receptora.

Za prikazivanje interakcija između liganada i receptora upotrebljen je BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2019 (v19.1.0.18287).

4.6. Statističke metode

Za analizu dobijenih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode, metode za testiranje statističkih hipoteza i metode za ispitivanje zavisnosti. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere varijabiliteta (standardna devijacija, standardna greška). Za testiranje statističkih hipoteza primenjeni su: Studentov T-test, Mann-Whitney test i analiza varijanse (ANOVA). U svrhu analiziranja zavisnosti korišćen je koeficijent linearne korelacije i regresiona analiza. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 0,05. Statistička analiza podataka rađena je pomoću statističkog softvera Origin 8.0 i CalcuSyn, a rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

5. Rezultati

5.1 Rezultati *in silico* ispitivanja

Logaritam particionog koeficijenta određen je *in silico*, korišćenjem računarskih programa <http://146.107.217.178/servlets/vsslab2action=alogps>, ACD/Labs, ChemBioOffice i SWISSADME, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Vrednosti logP dobijene primenom različitih softverskih paketa za ispitivane derivate sukcinimida

Supstanca	AClogP	AlogP	XlogP2	XlogP3	MlogP	ACD/logP	ilogP	wlogP
1	1,97	2,33	1,80	1,99	2,18	1,55	2,44	1,99
2	1,67	2,06	1,40	1,64	1,64	0,82	2,10	1,64
3	1,86	2,31	1,72	1,96	1,91	1,47	2,66	1,99
4	1,49	1,93	1,42	1,52	1,85	1,23	1,75	1,68
5	1,78	2,20	1,52	1,71	1,83	0,99	2,37	1,86
6	2,29	2,81	2,24	2,36	2,45	2,01	2,66	2,29
7	1,98	2,22	1,69	1,82	2,18	1,28	2,10	1,89
8	2,58	2,99	2,42	2,62	2,72	2,63	2,65	2,64
9	2,67	3,07	2,60	2,68	2,85	2,33	2,79	2,75
10	2,58	2,99	2,42	2,62	2,72	2,48	2,65	2,64
11	2,67	3,07	2,60	2,68	2,85	2,33	2,78	2,75

Fizičko-hemijske karakteristike ispitivanih supstanci koje su izračunate primenom i-lab 2.0 softverskog paketa, kao što su logaritam particionog koeficijenta (logP), logaritam distribucionog koeficijenta (logD), logaritam rastvorljivosti u vodi (logS), broj donora za formiranje vodonične veze, odnosno broj vodonika vezanih za atome kiseonika ili azota (NHBD),

broj akceptora za formiranje vodonične veze, odnosno broj atoma azota i kiseonika (NHBA), kao i molarna masa (MW), polarna površina (PSA) i broj rotirajućih veza (NRB) dati su u Tabeli 4.

Tabela 4. Vrednosti fizičko-hemijskih deskriptora dobijeni pomoću softverskog paketa i-lab 2.0

Supstanca	ClogP	logD	MW	NHBD	NHBA	PSA	NRB	logS
1	1,53	1,11	271,26	0	3	37,38	2	-2,83
2	0,86	0,79	233,26	1	4	57,61	2	-2,43
3	1,62	1,21	247,29	0	4	46,61	3	-2,94
4	1,59	-2,25	261,27	1	5	74,68	3	0,1
5	1,61	0,97	242,27	0	4	61,17	3	-3,36
6	2,03	1,43	231,29	0	3	37,38	2	-3,12
7	1,87	1	262,26	0	6	86,21	3	-3,55
8	2,52	1,65	251,71	0	3	37,38	2	-3,56
9	2,67	1,81	296,16	0	3	37,38	2	-3,62
10	2,52	1,91	251,71	0	3	37,38	2	-3,58
11	2,67	1,99	296,16	0	3	37,38	2	-3,58

5.2. Farmakokinetički deskriptori

In silico, primenom softverskog paketa <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/> dobijeni su farmakokinetički deskriptori za sve ispitivane supstance (K_a – konstanta apsorpcije, V_d – volumen distribucije, PPB – procenat vezivanja za proteine plazme i logBBB – logaritam particije supstance između mozga i plazme). Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Vrednosti farmakokinetičkih deskriptora dobijenih pomoću softverskog paketa i-lab 2.0

Supstanca	K_a [min^{-1}]	V_d [L/kg]	PPB[%]	logBBB
1	0,058	1,43	47,67	0
2	0,054	1,27	35,58	0,09
3	0,056	1,38	41,17	0,09
4	0,003	0,28	64,72	-0,37
5	0,056	1,42	35,15	0,06
6	0,058	1,59	45,68	0,12
7	0,056	1,42	59,99	-0,14
8	0,058	1,59	58,25	0,09
9	0,058	1,62	57,73	0,16
10	0,059	1,6	63,24	0,1
11	0,058	1,87	64,47	0,17

5.3. Toksikološki deskriptori

Vrednosti srednje letalne doze LD₅₀ (mg/kg) na pacovima i miševima nakon intraperitonealne (i.p), peroralne (p.o), intravenske (i.v) i subkutane (s.c.) aplikacije izračunate su primenom i-lab 2.0 softverskog paketa i prikazane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Vrednosti LD₅₀ (mg/kg) na pacovima i miševima nakon intraperitonealne (i.p.), peroralne (p.o.), intravenske (i.v.) I subkutane (s.c.) aplikacije, dobijene pomoću softverskih paketa i-lab 2.0

Supstanca	Miš-i.p	Miš-p.o	Miš-i.v	Miš-s.c	Pacov-i.p	Pacov-p.o
1	880	1200	91	840	400	1500
2	1000	1600	100	1300	450	2000
3	990	1400	99	1000	380	1800
4	830	1400	200	2100	390	2200
5	720	710	73	660	960	900
6	800	1200	83	780	360	1500
7	790	1300	100	760	420	1100
8	1100	1400	97	1100	430	1500
9	1300	1200	110	1200	340	1200
10	990	1100	110	970	530	1700
11	1000	940	100	920	440	1400

Vrednosti srednje letalne koncentracije LC₅₀ (mg/L) na *Fathead minnow* (*Pimephales promelas*) i *Water flea* (*Daphnia magna*) kao mera akvatične toksičnosti, zatim logaritma relativnog afiniteta vezivanja za ERA – logRBA, kao mera endokrine aktivnosti, izračunate su primenom i-lab 2.0 softverskog paketa i prikazane su u Tabeli 7.

Tabela 7. Parametri akvatične toksičnosti (izraženi kao LC_{50} (mg/l)) u odnosu na vodene račiće *Daphnia magna* i ribe vrste *Pimephales promelas*; pokazatelj vezivanja za estrogene receptore- $\log RBA$; izračunati pomoći softverskog paketa *i-lab 2.0*

Supstanca	$\log RBA$	<i>Pimephales promelas</i> LC_{50} (mg/L)	<i>Daphnia magna</i> LC_{50} (mg/L)
1	0,07	150	82
2	0,04	91	62
3	0,08	120	56
4	0,07	380	930
5	0,09	130	31
6	0,15	130	87
7	0,09	42	49
8	0,18	45	41
9	0,21	27	49
10	0,19	55	47
11	0,27	43	53

5.4. Deskriptori biološke aktivnosti

Primenom softverskog paketa Molinspiration (www.molinspiration.com) izračunate su vrednosti afiniteta za vezivanje za četiri vrste receptora: G-protein spregnuti receptori (GPCR), jonski kanali (Ion), inhibitori kinaza (Kin) i nuklearni receptori (NRL) (Tabela 8.).

Tabela 8. . Vrednosti afiniteta za G-protein spregnute receptore (GPCR), vezivanje za jonske kanale (Ion), afinitet za nuklearne receptore (NRL) i mogućnosti inhibicije kinaze (Kin), dobijeni putem softverskog paketa molinspiration

Supstanca	GPCR	Ion	Kin	NRL
1	-0,43	-0,23	-1,02	-0,79
2	-0,29	-0,14	-0,84	-0,47
3	-0,34	-0,28	-0,84	-0,59
4	-0,19	-0,18	-0,75	-0,28
5	-0,25	-0,18	-0,66	-0,43
6	-0,41	-0,30	-0,97	-0,71
7	-0,41	-0,23	-0,90	-0,60
8	-0,36	-0,21	-0,93	-0,70
9	-0,50	-0,31	-0,97	-0,84
10	-0,37	-0,21	-0,92	-0,72
11	-0,53	-0,32	-0,92	-0,91

5.5. Hromatografski parametri-retencione konstante ispitivanih jedinjenja

Iz razvijenog hromatograma je za svaku ispitivanu supstancu izračunata R_f vrednost (retardacioni faktor), kao odnos pređenog puta rastvorka od startne linije (l_r) i fronta rastvarača (l_f) i uzete su srednje vrednosti tri nezavisna merenja.

$$R_f = \frac{l_r}{l_f} \quad [11]$$

Vrednosti retencione konstante R_M za svaku ispitivanu supstancu su izračunate na osnovu jednačine (161):

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad [12]$$

Ustanovljena je linearna korelacija između hromatografskog parametra R_M i udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi (φ) i dobijena je jednačina oblika (Bate-Smith i Westall jednačina) (162):

$$R_M = R_M^0 + S\varphi \quad [13]$$

R_M^0 vrednost (retencija u čistoj vodi) se dobija ekstrapolacijom prave na y-osu (odsečak na ordinati), što odgovara udelu organskog rastvarača 0%. Parametar S predstavlja specifičnu hidrofobnu površinu supstance, odnosno nagib krive (na osnovu jednačine). Svi parametri iz jednačina dobijeni pomoću programa Origin 8.0, za sva tri tipa organskog modifikator (metanol, acetonitril i aceton), dati su u Tabelama 9-11.

Tabela 9. Prikaz odsečaka na y-osi kada φ iznosi 0% (R_M^0), nagiba (S), prilagođenih koeficijenata korelacije (r^2) i vrednosti p parametra hromatografske jednačine $R_M=R_M^0+S\varphi$ za sistem rastvarača voda-metanol

Supstanca	R_M^0	S	r^2	p
1	2,23677	-3,41638	0,995	< 0,001
2	1,54164	-2,85626	0,998	< 0,001
3	2,38359	-3,601	0,998	< 0,001
4	-0,34554	-1,1907	0,997	< 0,001
5	2,1997	-3,41162	0,996	< 0,001
6	2,68028	-3,83016	0,993	< 0,001
7	2,56934	-3,65154	0,995	< 0,001
8	2,88198	-3,99114	0,994	< 0,001
9	3,0933	-4,21108	0,993	< 0,001
10	2,96894	-4,09948	0,996	< 0,001
11	2,96104	-4,01844	0,999	< 0,001

Tabela 10. Prikaz odsečaka na y-osi kada φ iznosi 0% (R_M^0), nagiba (S), prilagođenih koeficijena korelacije (r^2) i vrednosti p parametra hromatografske jednačine $R_M=R_M^0+S\varphi$ za sistem rastvarača voda-acetonitril

Supstanca	R_M^0	S	r^2	p
1	2,38573	-4,22354	0,998	< 0,001
2	1,99827	-3,90856	0,996	< 0,001
3	2,3122	-4,12116	0,993	< 0,001
4	-0,28024	-1,1716	0,992	< 0,001
5	2,28807	-4,16564	0,996	< 0,001
6	2,53392	-4,30128	0,985	< 0,001
7	2,68676	-4,57158	0,998	< 0,001
8	2,75466	-4,52008	0,989	< 0,001
9	2,89887	-4,69958	0,997	< 0,001
10	2,65099	-4,35902	0,997	< 0,001
11	2,56178	-4,32978	0,996	< 0,001

Tabela 11. Prikaz odsečaka na y-osi kada φ iznosi 0% (R_M^0), nagiba (S), prilagođenih koeficijena korelacije (r^2) i vrednosti p parametra hromatografske jednačine $R_M = R_M^0 + S\varphi$ za sistem rastvarača voda-aceton

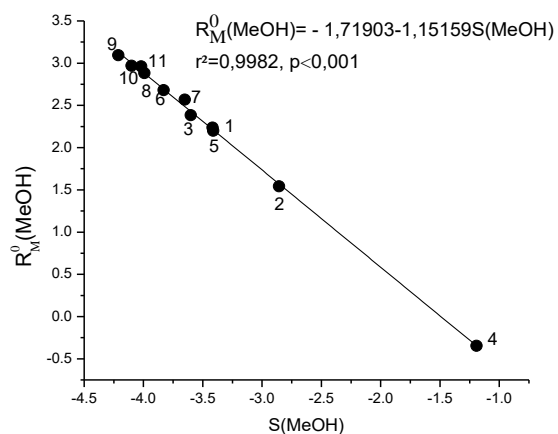
Supstanca	R_M^0	S	r^2	p
1	2,500	-4,349	0,999	< 0,001
2	1,832	-3,457	0,985	< 0,001
3	2,597	-4,565	0,999	< 0,001
4	-0,916	-0,418	0,971	< 0,001
5	2,628	-4,452	0,991	< 0,001
6	3,107	-5,167	0,992	< 0,001
7	3,104	-4,999	0,999	< 0,001
8	3,570	-5,748	0,995	< 0,001
9	3,514	-5,543	0,999	< 0,001
10	3,575	-5,765	0,996	< 0,001
11	3,674	-5,927	0,999	< 0,001

5.6. Međusobna zavisnost R_M^0 parametara i S parametara za različite mobilne faze

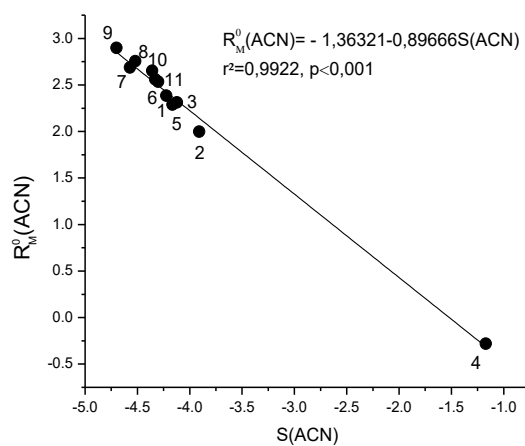
Razmatranjem međusobnog odnosa retencionih parametara R_M^0 i S dobijene su linearne korelacije prikazane u Tabelama 12 i 13. Na Slici 1 je grafički prikazana zavisnost R_M^0 parametra od parametra S, za sva tri hromatografska sistema.

Tabela 12. Zavisnost retencionog parametra R_M^0 (odsečak na y-osi) od parametra S (slope, nagib prave), u sva tri hromatografska sistema

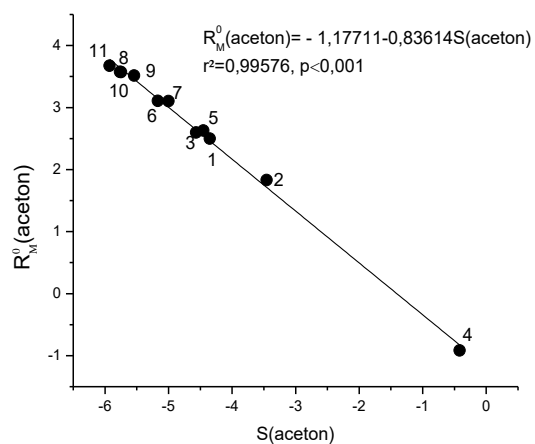
jednačina	r^2	p
metanol-voda		
$R_M^0 = - 1,71903 - 1,15159 S$	0,9982	$7,17204 \times 10^{-14}$
acetonitril-voda		
$R_M^0 = - 1,36321 - 0,89666 S$	0,9922	$5,26957 \times 10^{-11}$
aceton-voda		
$R_M^0 = - 1,17711 - 0,83614 S$	0,99576	$3,37852 \times 10^{-12}$



a)



b)



c)

Slika 1. Grafički prikaz zavisnosti retencionog parametra R_M^0 od hromatografskog parametra S u sistemu: a) metanol-voda, b) acetonitril-voda, c) aceton-voda.

Tabela 13. Zavisnost retencionog parametra S (slope, nagib prave) od parametra R_M^0 (odsečak na y-osi), u sva tri hromatografska sistema

jednačina	r^2	p
metanol-voda		
$S = -1,49596 - 0,86696 R_M^0$	0,9982	$7,17204 \times 10^{-14}$
acetonitril-voda		
$S = -1,53796 - 1,10743 R_M^0$	0,9922	$5,26957 \times 10^{-11}$
aceton-voda		
$S = -1,41988 - 1,19141 R_M^0$	0,99576	$3,37852 \times 10^{-12}$

U istraživanju je razmatrana međusobna korelacija R_M^0 vrednosti iste komponente izračunate za različite mobilne faze. Rezultati analiza su dati u vidu statistički značajnih linearnih zavisnosti u Tabeli 14. Linearne korelacije su postignute i za vrednosti S parametara (Tabela 15). Za statistički najznačajnije linearne korelacije dati su grafički prikazi na Slici 2.

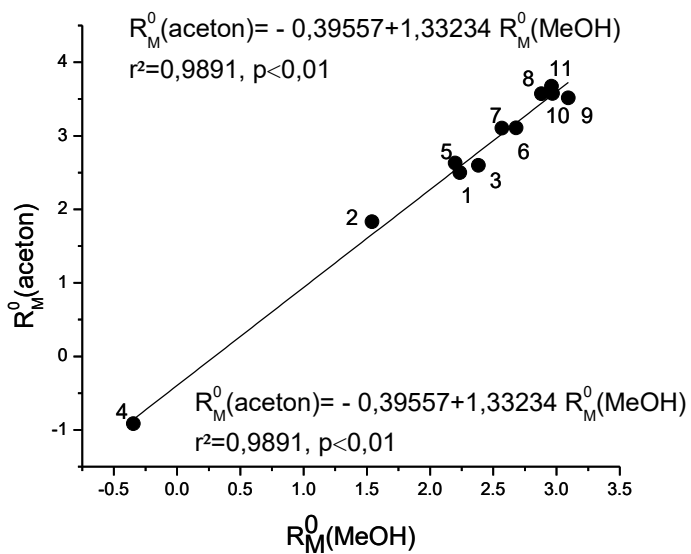
Tabela 14. Međusobna zavisnost retencionih parametara R_M^0 za različite tipove organskog modifikatora mobilne faze (metanol, aceton, acetonitril)

$R_M^0(A)$ vs. $R_M^0(B)$	jednačina	r^2	p
$R_M^0(ACN) - R_M^0(MeOH)$	$R_M^0(ACN) = 0,26779 + 0,86788 R_M^0(MeOH)$	0,93996	$5,2451 \times 10^{-7}$
$R_M^0(aceton) - R_M^0(MeOH)$	$R_M^0(aceton) = -0,39557 + 1,33234 R_M^0(MeOH)$	0,9891	$2,38336 \times 10^{-10}$
$R_M^0(aceton) - R_M^0(ACN)$	$R_M^0(aceton) = -0,6413 + 1,46179 R_M^0(ACN)$	0,94342	$4,0083 \times 10^{-7}$

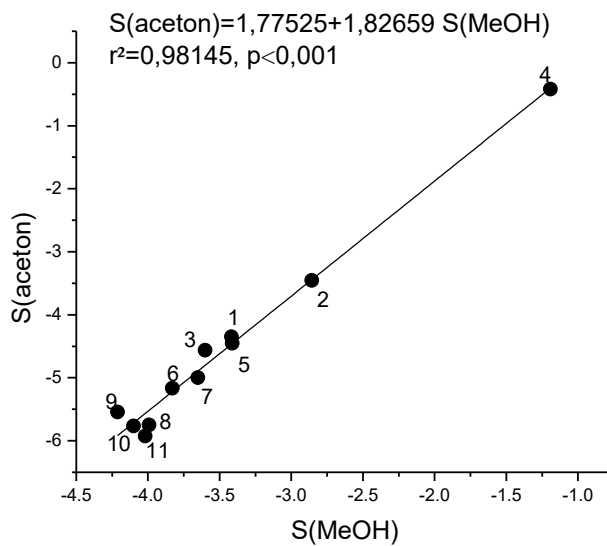
* u tabeli je istaknuta statistički najznačajnija korelacija

Tabela 15. Međusobna zavisnost parametara S za različite organske modifikatore (metanol, acetonitril i aceton)

$S(A)$ vs. $S(B)$	jednačina	r^2	p
$S(ACN) = f(S(MeOH))$	$S(ACN) = -0,25393 + 1,08623 S(MeOH)$	0,89252	$7,343 \times 10^{-6}$
$S(aceton) = f(S(MeOH))$	$S(aceton) = 1,77525 + 1,82659 S(MeOH)$	0,98145	$2,61285 \times 10^{-9}$
$S(aceton) = f(S(ACN))$	$S(aceton) = 1,51756 + 1,51184 S(ACN)$	0,8666	$1,9618 \times 10^{-5}$



a)



b)

Slika 2. Grafički prikaz statistički najznačajnijih korelacija: a) $R_M^0(\text{aceton}) = f(R_M^0(\text{MeOH}))$; b) $S(\text{aceton}) = f(S(\text{MeOH}))$

5.7. Korelacija retencionih konstanti R_M^0 i S sa logP, logD i logS deskriptorima

Za svaku analiziranu supstancu izračunata je vrednost logP (Tabela 3), kao i logD i logS na fiziološkoj pH vrednosti (7,4) (Tabela 4), primenom softverskih paketa. Ove vrednosti, kao mera lipofilnosti i rastvorljivosti, korelirane su sa hromatografskim parametrima R_M^0 i S, datim u Tabelama 9-11.

Koeficijenti korelacije R_M^0 i S sa različitim logP vrednostima dobijenim pomoću softverskih paketa su statistički značajni na nivou $p < 0,05$ za korelaciju podataka dobijenih uz metanol i aceton kao korastvarač, iako se očekivala statistički mnogo veća značajnost (Tabele 16 i 18). Jedinjenje 4 značajno odstupa od linearne zavisnosti (Slike 3 i 4). Kada se podaci za supstancu 4 eliminišu iz daljih proračuna, dobija se statistički veća značajnost linearnih regresija (Tabele 17 i 19).

Na osnovu koeficijenta korelacije najbolja zavisnost je postignuta u slučajevima kada su kao nezavisno promenljive posmatrani parametri lipofilnosti MlogP i ClogP, što je i grafički prikazano na Slikama 3 i 4.

Tabela 16. Zavisnost retencionih parametara R_M^0 od softverski izračunatih parametara lipofilnosti $\log P$, dobijenih pomoću različitih softverskih paketa, za sva tri organska modifikatora mobilne faze (jedinjenje 4 je uključeno u statistiku)

$R_M^0 = f(\log P)$	jednačina prave	r^2	p
metanol - voda			
$R_M^0 = f(\text{AClogP})$	$R_M^0 = - 1,62678 + 1,82946 \text{ AClogP}$	0,6114	0,00271
$R_M^0 = f(\text{AlogP})$	$R_M^0 = - 2,07441 + 1,71514 \text{ AlogP}$	0,55086	0,00538
$R_M^0 = f(\text{XlogP2})$	$R_M^0 = - 0,71213 + 1,51189 \text{ XlogP2}$	0,48527	0,01034
$R_M^0 = f(\text{XlogP3})$	$R_M^0 = - 1,28038 + 1,66336 \text{ XlogP3}$	0,547	0,00561
$R_M^0 = f(\text{MlogP})$	$R_M^0 = - 1,18322 + 1,51654 \text{ MlogP}$	0,42279	0,01802
$R_M^0 = f(\text{ACDlogP})$	$R_M^0 = 0,60828 + 0,96652 \text{ ACDlogP}$	0,32911	0,03797
$R_M^0 = f(\text{ClogP})$	$R_M^0 = 0,24106 + 1,0479 \text{ ClogP}$	0,32044	0,04051
$R_M^0 = f(\text{ilogP})$	$R_M^0 = - 3,9051 + 2,52791 \text{ ilogP}$	0,72228	$5,66391 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{wlogP})$	$R_M^0 = -1,35569 + 1,66184 \text{ wlogP}$	0,48704	0,01017
acetonitril - voda			
$R_M^0 = f(\text{AClogP})$	$R_M^0 = - 0,69753 + 1,37909 \text{ AClogP}$	0,40452	0,021
$R_M^0 = f(\text{AlogP})$	$R_M^0 = - 0,94614 + 1,25799 \text{ AlogP}$	0,33614	0,03602
$R_M^0 = f(\text{XlogP2})$	$R_M^0 = 0,11454 + 1,07792 \text{ XlogP2}$	0,26962	0,05849
$R_M^0 = f(\text{XlogP3})$	$R_M^0 = - 0,36253 + 1,21944 \text{ XlogP3}$	0,33312	0,03685
$R_M^0 = f(\text{MlogP})$	$R_M^0 = - 0,1791 + 1,06279 \text{ MlogP}$	0,2182	0,08336
$R_M^0 = f(\text{ACDlogP})$	$R_M^0 = 1,13433 + 0,644 \text{ ACDlogP}$	0,13435	0,14462
$R_M^0 = f(\text{ClogP})$	$R_M^0 = 0,94459 + 0,6701 \text{ ClogP}$	0,11052	0,16849
$R_M^0 = f(\text{ilogP})$	$R_M^0 = - 2,66987 + 2,00963 \text{ ilogP}$	0,55037	0,00541
$R_M^0 = f(\text{wlogP})$	$R_M^0 = - 0,32998 + 1,17831 \text{ wlogP}$	0,26655	0,05977
acetone - voda			
$R_M^0 = f(\text{AClogP})$	$R_M^0 = - 2,54347 + 2,42834 \text{ AClogP}$	0,59897	0,00315
$R_M^0 = f(\text{AlogP})$	$R_M^0 = - 3,10193 + 2,26255 \text{ AlogP}$	0,53147	0,00658
$R_M^0 = f(\text{XlogP2})$	$R_M^0 = - 1,27525 + 1,97951 \text{ XlogP2}$	0,45918	0,01313
$R_M^0 = f(\text{XlogP3})$	$R_M^0 = - 2,03625 + 2,18575 \text{ XlogP3}$	0,52279	0,00719
$R_M^0 = f(\text{MlogP})$	$R_M^0 = - 1,90636 + 1,99186 \text{ MlogP}$	0,40265	0,02132
$R_M^0 = f(\text{ACDlogP})$	$R_M^0 = 0,46374 + 1,25962 \text{ ACDlogP}$	0,30597	0,04507
$R_M^0 = f(\text{ClogP})$	$R_M^0 = - 0,01873 + 1,36766 \text{ ClogP}$	0,29894	0,04743
$R_M^0 = f(\text{ilogP})$	$R_M^0 = - 5,36598 + 3,27313 \text{ ilogP}$	0,66826	0,00129
$R_M^0 = f(\text{wlogP})$	$R_M^0 = - 2,13519 + 2,18375 \text{ wlogP}$	0,46503	0,01245

Tabela 17. Zavisnost retencionih parametara R_M^0 od softverski izračunatih parametara lipofilnosti $\log P$, dobijenih pomoću različitih softverskih paketa, za sva tri organska modifikatora mobilne faze (jedinjenje 4 nije uključeno u statistiku)

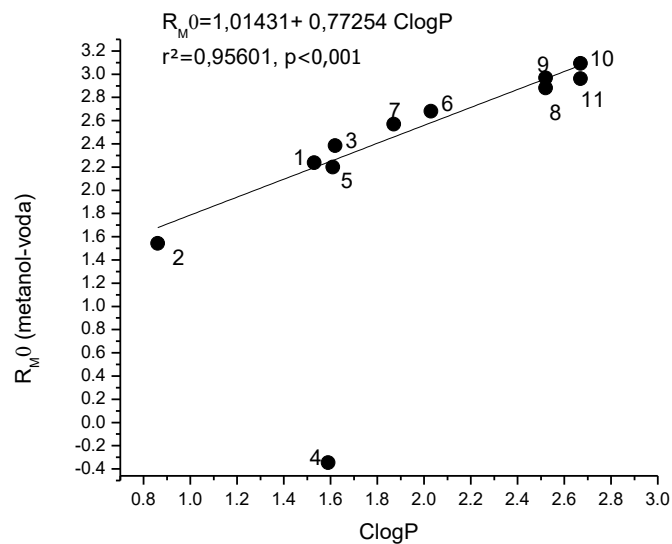
$R_M^0 = f(\log P)$	jednačina prave	r^2	p
metanol - voda			
$R_M^0 = f(\text{AClogP})$	$R_M^0 = 0,13 + 1,09826 \text{ AClogP}$	0,81813	$2,00221 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{AlogP})$	$R_M^0 = - 0,11403 + 1,0233 \text{ AlogP}$	0,76924	$5,29769 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{XlogP2})$	$R_M^0 = 0,64205 + 0,93562 \text{ XlogP2}$	0,80458	$2,6838 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{XlogP3})$	$R_M^0 = 0,35644 + 0,99421 \text{ XlogP3}$	0,77139	$5,09839 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{MlogP})$	$R_M^0 = 0,24089 + 0,99047 \text{ MlogP}$	0,85612	$7,72204 \times 10^{-5}$
$R_M^0 = f(\text{ACDlogP})$	$R_M^0 = 1,38432 + 0,65251 \text{ ACDlogP}$	0,77391	$4,87158 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{ClogP})$	$R_M^0 = 1,01431 + 0,77254 \text{ ClogP}$	0,95601	$6,49241 \times 10^{-7}$
$R_M^0 = f(\text{ilogP})$	$R_M^0 = - 1,00104 + 1,4098 \text{ ilogP}$	0,5298	0,01027
$R_M^0 = f(\text{wlogP})$	$R_M^0 = 0,23678 + 1,03158 \text{ wlogP}$	0,81417	$2,18583 \times 10^{-4}$
acetonitril - voda			
$R_M^0 = f(\text{AClogP})$	$R_M^0 = 1,2938 + 0,55026 \text{ AClogP}$	0,63752	0,00343
$R_M^0 = f(\text{AlogP})$	$R_M^0 = 1,23822 + 0,4871 \text{ AlogP}$	0,5276	0,01047
$R_M^0 = f(\text{XlogP2})$	$R_M^0 = 1,57913 + 0,45467 \text{ XlogP2}$	0,58204	0,00623
$R_M^0 = f(\text{XlogP3})$	$R_M^0 = 1,45693 + 0,47563 \text{ XlogP3}$	0,53574	0,00972
$R_M^0 = f(\text{MlogP})$	$R_M^0 = 1,31693 + 0,51016 \text{ MlogP}$	0,71331	0,00129
$R_M^0 = f(\text{ACDlogP})$	$R_M^0 = 1,93356 + 0,3206 \text{ ACDlogP}$	0,57393	0,00676
$R_M^0 = f(\text{ClogP})$	$R_M^0 = 1,73073 + 0,39015 \text{ ClogP}$	0,76299	$5,91118 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{ilogP})$	$R_M^0 = 1,11771 + 0,55136 \text{ ilogP}$	0,19756	0,11069
$R_M^0 = f(\text{wlogP})$	$R_M^0 = 1,39483 + 0,49568 \text{ wlogP}$	0,57337	0,00679
acetone - voda			
$R_M^0 = f(\text{AClogP})$	$R_M^0 = - 0,12263 + 1,42074 \text{ AClogP}$	0,84406	$1,07065 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{AlogP})$	$R_M^0 = - 0,39842 + 1,30845 \text{ AlogP}$	0,7727	$4,97963 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{XlogP2})$	$R_M^0 = 0,58961 + 1,18593 \text{ XlogP2}$	0,792	$3,46297 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{XlogP3})$	$R_M^0 = 0,22576 + 1,26102 \text{ XlogP3}$	0,76042	$6,17904 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{MlogP})$	$R_M^0 = 0,0436 + 1,27154 \text{ MlogP}$	0,8678	$5,47887 \times 10^{-5}$
$R_M^0 = f(\text{ACDlogP})$	$R_M^0 = 1052461 + 0,83035 \text{ ACDlogP}$	0,76877	$5,34188 \times 10^{-4}$
$R_M^0 = f(\text{ClogP})$	$R_M^0 = 1,03567 + 0,99218 \text{ ClogP}$	0,9698	$1,43524 \times 10^{-7}$
$R_M^0 = f(\text{ilogP})$	$R_M^0 = - 1,07182 + 1,61981 \text{ ilogP}$	0,40574	0,02823
$R_M^0 = f(\text{wlogP})$	$R_M^0 = 0,05411 + 1,31729 \text{ wlogP}$	0,81529	$2,13293 \times 10^{-4}$

Tabela 18. Zavisnost retencionih parametara S od softverski izračunatih parametara lipofilnosti $\log P$, dobijenih pomoću različitih softverskih paketa, za sva tri organska modifikatora mobilne faze (jedinjenje 4 je uključeno u statistiku)

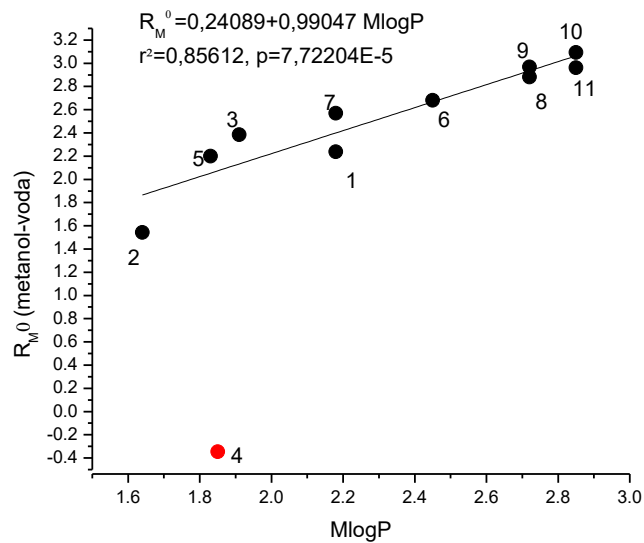
$S = f(\log P)$	jednačina prave	r^2	p
metanol - voda			
$S = f(\text{AClogP})$	$S = -0,08508 - 1,58632 \text{ AClogP}$	0,61045	0,00275
$S = f(\text{AlogP})$	$S = 0,32311 - 1,49507 \text{ AlogP}$	0,55702	0,00504
$S = f(\text{XlogP2})$	$S = -0,87251 - 1,3138 \text{ XlogP2}$	0,48709	0,01016
$S = f(\text{XlogP3})$	$S = -0,3697 - 1,44962 \text{ XlogP3}$	0,55285	0,00527
$S = f(\text{MlogP})$	$S = -0,4871 - 1,30738 \text{ MlogP}$	0,41594	0,01909
$S = f(\text{ACDlogP})$	$S = -2,01657 - 0,84182 \text{ ACDlogP}$	0,33248	0,03702
$S = f(\text{ClogP})$	$S = -1,71535 - 0,90316 \text{ ClogP}$	0,3147	0,04227
$S = f(\text{ilogP})$	$S = 1,95981 - 2,22025 \text{ ilogP}$	0,74284	$3,96904 \times 10^{-4}$
$S = f(\text{wlogP})$	$S = -0,30766 - 1,44666 \text{ wlogP}$	0,49099	0,00979
acetonitril - voda			
$S = f(\text{AClogP})$	$S = -1,02911 - 1,40406 \text{ AClogP}$	0,32164	0,04015
$S = f(\text{AlogP})$	$S = -0,81525 - 1,26534 \text{ AlogP}$	0,25526	0,06468
$S = f(\text{XlogP2})$	$S = -1,91297 - 1,06867 \text{ XlogP2}$	0,19189	0,09938
$S = f(\text{XlogP3})$	$S = -1,40789 - 1,22394 \text{ XlogP3}$	0,25123	0,06651
$S = f(\text{MlogP})$	$S = -1,65589 - 1,0388 \text{ MlogP}$	0,14362	0,13623
$S = f(\text{ACDlogP})$	$S = -2,98108 - 0,60565 \text{ ACDlogP}$	0,06466	0,22574
$S = f(\text{ClogP})$	$S = -2,80661 - 0,62816 \text{ ClogP}$	0,04658	0,25345
$S = f(\text{ilogP})$	$S = 1,1668 - 2,1227 \text{ ilogP}$	0,48644	0,01022
$S = f(\text{wlogP})$	$S = -1,47411 - 1,16736 \text{ wlogP}$	0,18902	0,10129
aceton - voda			
$S = f(\text{AClogP})$	$S = 1,80614 - 2,9846 \text{ AClogP}$	0,64168	0,00185
$S = f(\text{AlogP})$	$S = 2,54272 - 2,80057 \text{ AlogP}$	0,57983	0,00392
$S = f(\text{XlogP2})$	$S = 0,30377 - 2,46136 \text{ XlogP2}$	0,50768	0,00834
$S = f(\text{XlogP3})$	$S = 1,23335 - 2,71003 \text{ XlogP3}$	0,57278	0,00425
$S = f(\text{MlogP})$	$S = 1,09331 - 2,47881 \text{ MlogP}$	0,44729	0,01459
$S = f(\text{ACDlogP})$	$S = -1,80515 - 1,59693 \text{ ACDlogP}$	0,35936	0,03015
$S = f(\text{ClogP})$	$S = -1,21666 - 1,72204 \text{ ClogP}$	0,34512	0,03364
$S = f(\text{ilogP})$	$S = 5,2152 - 3,99841 \text{ ilogP}$	0,70512	$7,47917 \times 10^{-4}$
$S = f(\text{wlogP})$	$S = 1,37597 - 2,71665 \text{ wlogP}$	0,51465	0,00779

Tabela 19. Zavisnost retencionih parametara *S* od softverski izračunatih parametara lipofilnosti *logP*, dobijenih pomoću različitih softverskih paketa, za sva tri organska modifikatora mobilne faze (jedinjenje 4 nije uključeno u statistiku)

S = f(logP)	jednačina prave	r²	p
metanol - voda			
S = f(AClogP)	S = - 1,61485 - 0,94959 AClogP	0,82355	1,77004×10 ⁻⁴
S = f(AlogP)	S = - 1,37734 - 0,89496 AlogP	0,79519	3,25074×10 ⁻⁴
S = f(XlogP2)	S = - 2,04955 - 0,81292 XlogP2	0,81906	1,96068×10 ⁻⁴
S = f(XlogP3)	S = - 1,78974 - 0,8691 XlogP3	0,7965	3,16688×10 ⁻⁴
S = f(MlogP)	S = - 1,72821 - 0,84891 MlogP	0,84458	1,05648×10⁻⁴
S = f(ACDlogP)	S = - 2,69071 - 0,56903 ACDlogP	0,79468	3,28407×10 ⁻⁴
S = f(ClogP)	S = - 2,38835 - 0,6635 ClogP	0,94774	1,29763×10⁻⁶
S = f(ilogP)	S = - 0,5096 - 1,26949 ilogP	0,58928	0,00579
S = f(wlogP)	S = - 1,69064 - 0,89932 wlogP	0,83525	1,3389×10 ⁻⁴
acetonitril - voda			
S = f(AClogP)	S = - 3,39986 - 0,41731 AClogP	0,43829	0,02207
S = f(AlogP)	S = - 3,40093 - 0,35282 AlogP	0,31475	0,05324
S = f(XlogP2)	S = - 3,63121 - 0,33749 XlogP2	0,37534	0,03518
S = f(XlogP3)	S = - 3,56163 - 0,34348 XlogP3	0,31757	0,05225
S = f(MlogP)	S = - 3,39707 - 0,39561 MlogP	0,52248	0,01096
S = f(ACDlogP)	S = - 3,90625 - 0,23128 ACDlogP	0,34219	0,04429
S = f(ClogP)	S = - 3,71064 - 0,30622 ClogP	0,57762	0,00651
S = f(ilogP)	S = - 3,45773 - 0,34218 ilogP	0,03457	0,28339
S = f(wlogP)	S = - 3,4973 - 0,36663 wlogP	0,36573	0,03765
aceton - voda			
S = f(AClogP)	S = - 0,89705 - 1,85949 AClogP	0,85262	8,51426×10 ⁻⁵
S = f(AlogP)	S = - 0,48756 - 1,73115 AlogP	0,80042	2,92511×10 ⁻⁴
S = f(XlogP2)	S = - 1,8058 - 1,56365 XlogP2	0,81382	2,20273×10 ⁻⁴
S = f(XlogP3)	S = - 1,30171 - 1,67368 XlogP3	0,79355	3,35885×10 ⁻⁴
S = f(MlogP)	S = - 1,13157 - 1,65693 MlogP	0,86782	5,47581×10⁻⁵
S = f(ACDlogP)	S = - 3,01897 - 1,10577 ACDlogP	0,80845	2,47341×10 ⁻⁴
S = f(ClogP)	S = - 2,43063 - 1,28974 ClogP	0,96447	2,75608×10⁻⁷
S = f(ilogP)	S = 0,63199 - 2,2338 ilogP	0,46943	0,01723
S = f(wlogP)	S = - 1,09978 - 1,73682 wlogP	0,83764	1,26161×10 ⁻⁴

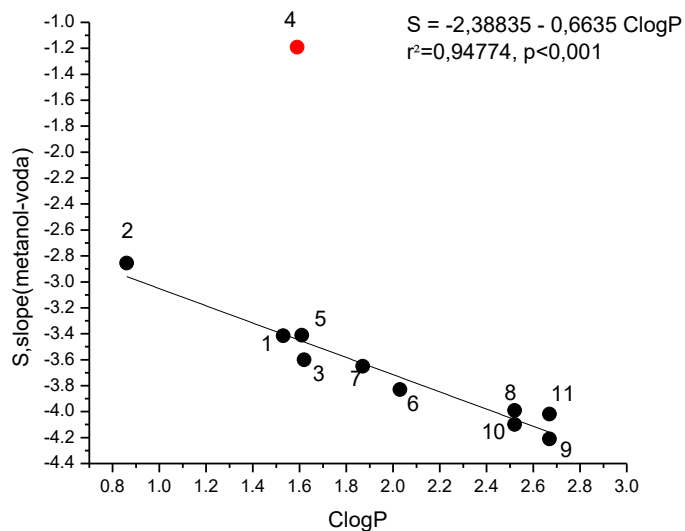


a)

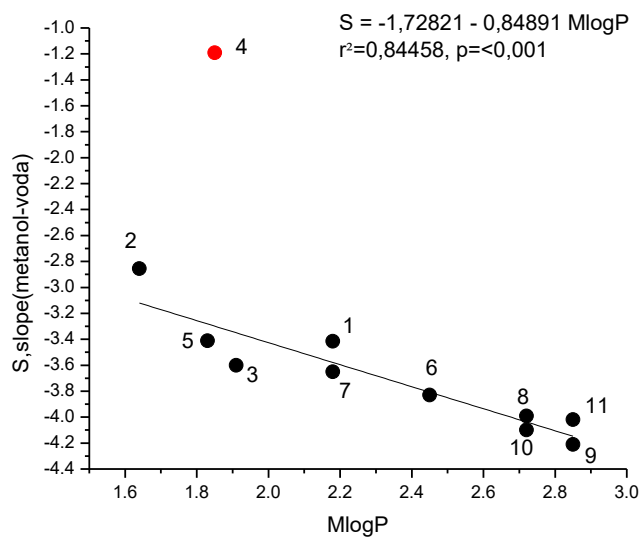


b)

Slika 3. Grafički prikaz linearne korelacije retencionog parametra R_M^0 , dobijenog u hromatografskom sistemu sa metanolom u sastavu mobilne faze, od softverski izračunatih parametara: a) ClogP; b) MlogP



a)



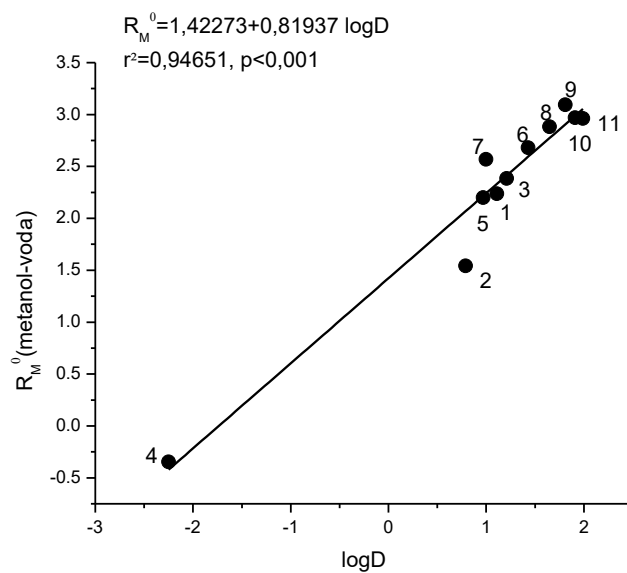
b)

Slika 4. Grafički prikaz linearne korelacije retencionog parametra S , dobijenog u hromatografskom sistemu sa metanolom u sastavu mobilne faze, od softverski izračunatih parametara: a) ClogP; b) MlogP

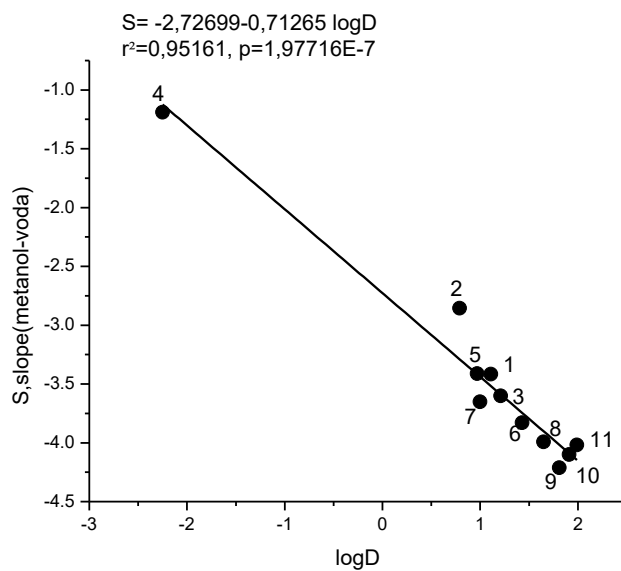
Imajući u vidu da logD parametar bolje opisuje lipofilnost, jer u obzir uzima i jonizovane i nejonizovane forme prisutne na fiziološkom pH, određena je korelacija parametra logD sa retencionim parametrima R_M^0 i S, a rezultati su prikazani u Tabeli 20. Postignuta je statistički veća značajnost linearnih zavisnosti ($p < 0,001$) u odnosu na korelacije koje postoje između logP parametara i hromatografskim parametara R_M^0 i S (Slika 5).

Tabela 20. Prikaz zavisnosti retencionih parametara R_M^0 i S (dobijenih u sva tri hromatografska sistema) od softverski izračunatog parametra lipofilnosti logD

logD vs. R_M^0 i S	Jednačina	r^2	p
metanol - voda			
$R_M^0 = f(\log D)$	$R_M^0 = 1,42273 + 0,81937 \log D$	0,94651	$3,11141 \times 10^{-7}$
$S = f(\log D)$	$S = -2,72699 - 0,71265 \log D$	0,95161	$1,97716 \times 10^{-7}$
acetonitril – voda			
$R_M^0 = f(\log D)$	$R_M^0 = 1,48654 + 0,72625 \log D$	0,93241	$8,96031 \times 10^{-7}$
$S = f(\log D)$	$S = -3,19159 - 0,79728 \log D$	0,90716	$3,77699 \times 10^{-6}$
aceton – voda			
$R_M^0 = f(\log D)$	$R_M^0 = 1,49028 + 1,10085 \log D$	0,95382	$1,60057 \times 10^{-7}$
$S = f(\log D)$	$S = -3,19761 - 1,30949 \log D$	0,9464	$3,13969 \times 10^{-7}$



a)



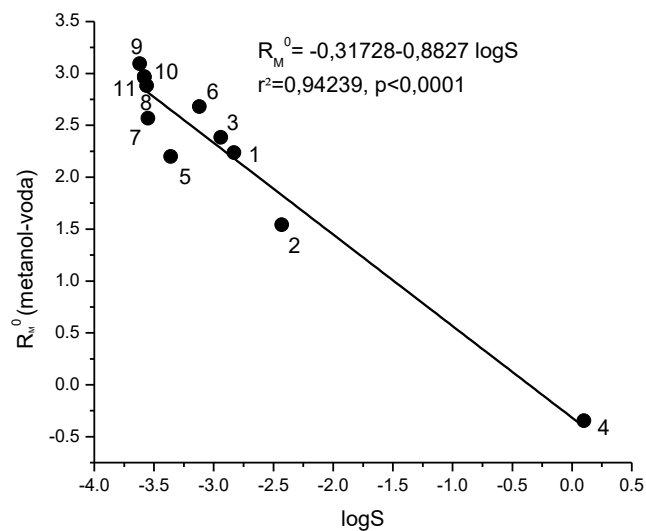
b)

Slika 5. Grafički prikaz linearne korelacije retencionih parametara: a) R_M^0 ; b) S (dobijenih u hromatografskom sistemu sa metanolom u sastavu mobilne faze) od softverski izračunatog parametra lipofilnosti $\log D$

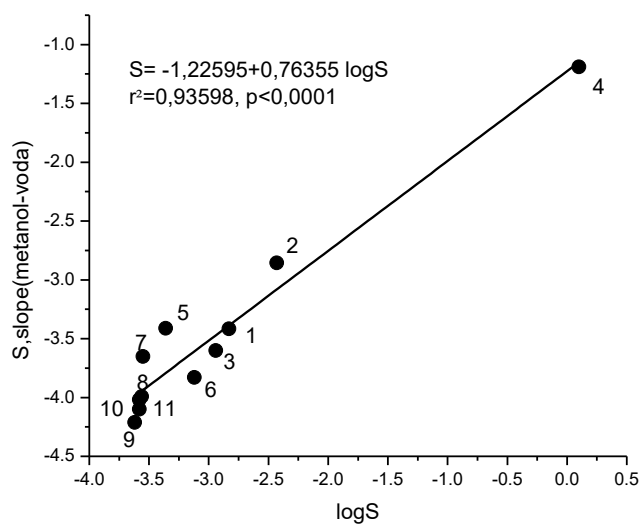
Na bioraspoloživost, pored lipofilnosti, utiče i rastvorljivost supstance, te je bilo od interesa ustanoviti vezu između $\log S$, kao parametra rastvorljivosti, i retencionih parametara (R_M^0 i S). Dobijene su statistički značajne linearne korelacije, prikazane u Tabeli 21. Na Slici 6 dat je grafički prikaz zavisnosti retencionih parametara od $\log S$ u slučaju kada je kao mobilna faza korišćena smeša metanola i vode.

Tabela 21. Prikaz zavisnosti retencionih parametara R_M^0 i S (dobijenih u sva tri hromatografska sistema) od softverski izračunatog parametra rastvorljivosti $\log S$

$\log S$ vs. R_M^0 i S	Jednačina	r^2	p
metanol-voda			
$R_M^0 = f(\log S)$	$R_M^0 = -0,31728 - 0,8827 \log S$	0,94239	$4,34894 \times 10^{-7}$
$S = f(\log S)$	$S = -1,22595 + 0,76355 \log S$	0,93598	$7,00999 \times 10^{-7}$
acetonitril –voda			
$R_M^0 = f(\log S)$	$R_M^0 = -0,09301 - 0,79501 \log S$	0,96219	$6,48624 \times 10^{-8}$
$S = f(\log S)$	$S = -1,44138 + 0,87825 \log S$	0,94941	$2,41855 \times 10^{-7}$
aceton –voda			
$R_M^0 = f(\log S)$	$R_M^0 = -0,86845 - 1,19304 \log S$	0,96242	$6,31318 \times 10^{-8}$
$S = f(\log S)$	$S = -0,42461 + 1,40805 \log S$	0,93833	$5,91883 \times 10^{-7}$



a)



b)

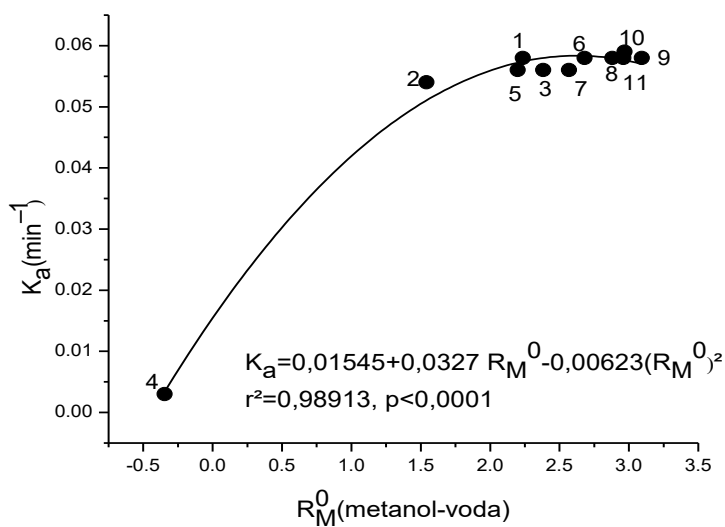
Slika 6. Grafički prikaz linearne korelacije retencionih parametara: a) R_M^0 ; b) S (dobijenih u hromatografskom sistemu sa metanolom u sastavu mobilne faze) od softverski izračunatog parametra rastvorljivosti $\log S$

5.8. Korelacije *in silico* dobijenih farmakokinetičkih deskriptora i retencionih parametara R_M^0 i S

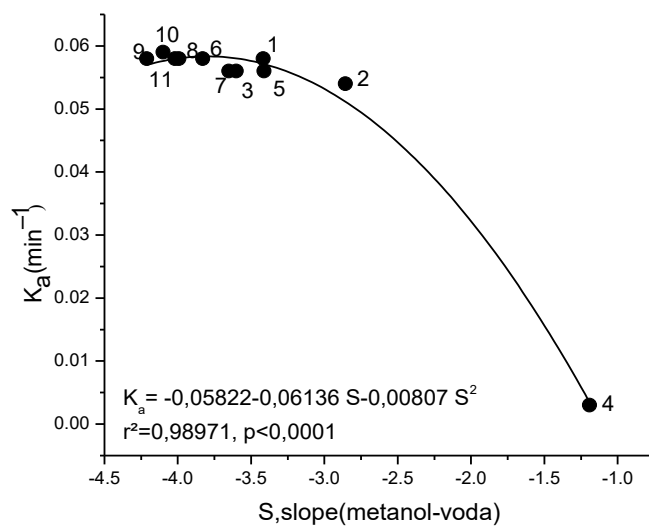
U radu su ispitane zavisnosti farmakokinetičkih deskriptora od retencionih parametara kao pokazatelja lipofilnosti analiziranih jedinjenja. Zavisnost konstante apsorpcije (K_a) od pomenutih parametara data je u Tabeli 22. U pitanju su polinomske jednačine, sa visokim stepenom korelacije, grafički predstavljene u vidu obrnute parabole (Slika 7).

Tabela 22. Korelacije konstante apsorpcije (K_a) i retencionih parametara R_M^0 i S (dobijenih u sva tri hromatografska sistema)

K_a vs. R_M^0 i S	Jednačina	r^2	p
metanol –voda			
$K_a = f(R_M^0)$	$K_a = 0,01545 + 0,0327 R_M^0 - 0,00623 (R_M^0)^2$	0,98913	$5,72886 \times 10^{-9}$
$K_a = f(S)$	$K_a = -0,05822 - 0,06136 S - 0,00807 S^2$	0,98971	$4,59437 \times 10^{-9}$
acetonitril –voda			
$K_a = f(R_M^0)$	$K_a = 0,0125 + 0,03234 R_M^0 - 0,00575 (R_M^0)^2$	0,99677	$4,43566 \times 10^{-11}$
$K_a = f(S)$	$K_a = -0,03923 - 0,0411 S - 0,00434 S^2$	0,99525	$2,07642 \times 10^{-10}$
aceton –voda			
$K_a = f(R_M^0)$	$K_a = 0,02505 + 0,02085 R_M^0 - 0,00327 (R_M^0)^2$	0,99328	$8,37745 \times 10^{-10}$
$K_a = f(S)$	$K_a = -0,00674 - 0,0252 S - 0,00243 S^2$	0,98993	$4,21227 \times 10^{-9}$



a)



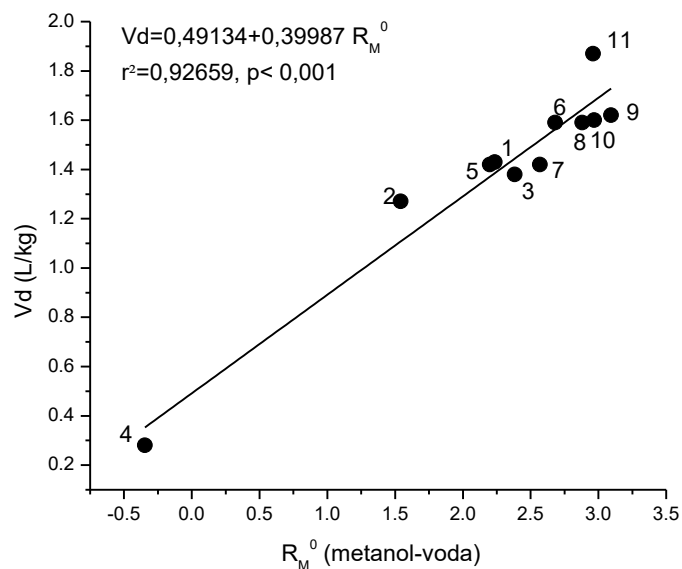
b)

Slika 7. Grafički prikaz zavisnosti konstante apsorpcije (K_a) od retencione konstante (kada je kao mobilna faza korišćena smeša metanola i vode): a) R_M^0 ; b) S

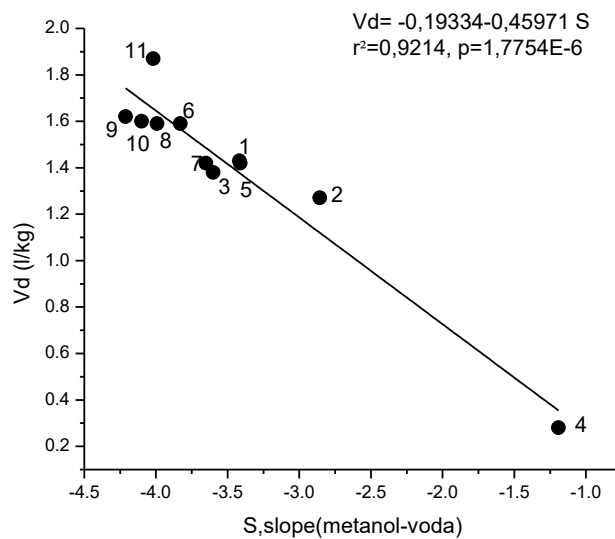
Dobijene su statistički značajne linearne zavisnosti (Tabela 23), u slučaju razmatranja veze između volumena distribucije (V_d) i hromatografskih retencionih parametara. Na Slici 8 dat je grafički prikaz korelacije V_d sa R_M^0 i S , u hromatografskom sistemu sa metanolom kao komponentom mobilne faze.

Tabela 23. Korelacije volumena distribucije (V_d) i retencionih parametara R_M^0 i S (dobijenih u sva tri hromatografska sistema)

V_d vs. R_M^0 i S	Jednačina	r^2	p
metanol –voda			
$V_d = f(R_M^0)$	$V_d = 0,49134 + 0,39987 R_M^0$	0,92659	$1,30311 \times 10^{-6}$
$V_d = f(S)$	$V_d = -0,19334 - 0,45971 S$	0,9214	$1,7754 \times 10^{-6}$
acetonitril –voda			
$V_d = f(R_M^0)$	$V_d = 0,41105 + 0,44163 R_M^0$	0,89671	$6,12949 \times 10^{-6}$
$V_d = f(S)$	$V_d = -0,1783 - 0,39285 S$	0,8738	$1,52347 \times 10^{-5}$
acetone –voda			
$V_d = f(R_M^0)$	$V_d = 0,60639 + 0,30152 R_M^0$	0,94656	$3,09667 \times 10^{-7}$
$V_d = f(S)$	$V_d = 0,25167 - 0,25207 S$	0,94218	$4,42427 \times 10^{-7}$



a)



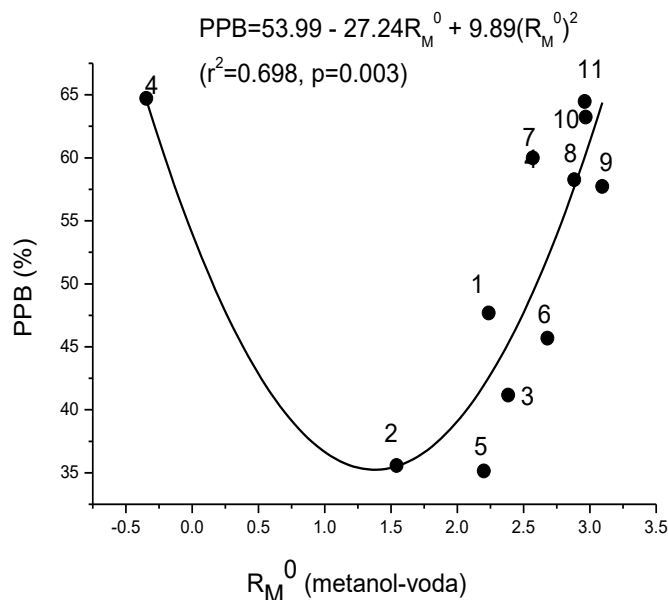
b)

Slika 8. Grafički prikaz zavisnosti volumena distribucije (V_d) od retencionih konstanti (kada je kao mobilna faza korišćena smeša metanola i vode): a) R_M^0 ; b) S

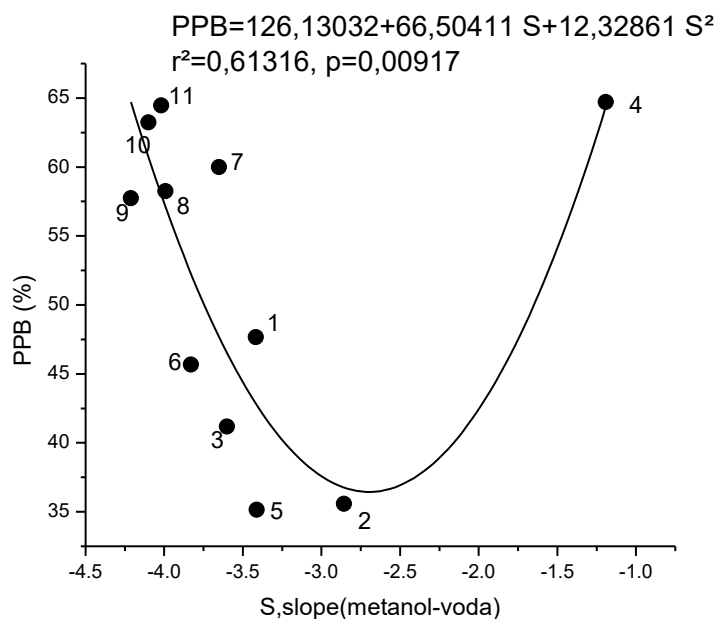
Procenat vezivanja za proteine plazme pokazuje parabolične zavisnosti u odnosu na retencione parametre (R_M^0 i S), date u vidu jednačina u Tabeli 24, a grafički predstavljene na Slici 9.

Tabela 24. Korelacije vezivanja za proteine plazme (PPB) i retencionih parametara R_M^0 i S (dobijenih u sva tri hromatografska sistema)

PPB vs R_M^0 i S	Jednačina	r^2	p
metanol –voda			
PPB = f(R_M^0)	$PPB=53,99421-27,23519R_M^0+9,89054(R_M^0)^2$	0,69789	0,00341
PPB = f(S)	$PPB=126,13032+66,50411 S+12,32861 S^2$	0,61316	0,00917
acetonitril –voda			
PPB = f(R_M^0)	$PPB=52,771-37,82335R_M^0+14,64372(R_M^0)^2$	0,62023	0,00852
PPB = f(S)	$PPB=134,40617+74,58175 S+12,75671 S^2$	0,50938	0,02373
aceton –voda			
PPB = f(R_M^0)	$PPB=45,53845-15,79761R_M^0+5,63319(R_M^0)^2$	0,77916	$9,74236 \times 10^{-4}$
PPB = f(S)	$PPB=73,80217+23,68077 S+3,73793 S^2$	0,74638	0,00169



a)



b)

Slika 9. Grafički prikaz zavisnosti vezivanja za proteine plazme izraženog kao PPB od retencionih konstanti (kada je kao mobilna faza korišćena smeša metanola i vode): a) R_M^0 ; b) S

Razmatrana je sposobnost prolaska ispitivanih supstanci kroz BBB, imajući u vidu da takvo ponašanje može biti uzrok ispoljavanja neželjenih efekata na nivou CNS-a. Iz tog razloga je posmatrana korelacija između parametra koji opisuje prolazak kroz BBB – $\log BBB$ i parametara

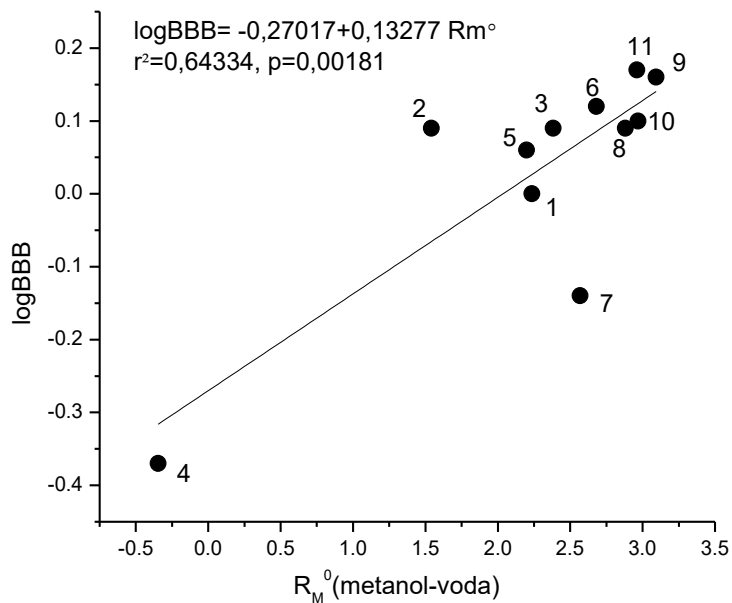
lipofilnosti, R_M^0 i S . Kao rezultat su dobijene linearne zavisnosti prikazane u Tabeli 25 i na Slici 10. Korelacije između parametra koji definiše sposobnost prolaska kroz BBB ($\log BBB$) i retencionih parametara (R_M^0 i S) za sva tri hromatografska sistema i PSA dati su u Tabeli 26.

Tabela 25. Korelacije između parametra koji definiše sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru ($\log BBB$) i retencionih parametara – R_M^0 i S (dobijenih u sva tri hromatografska sistema)

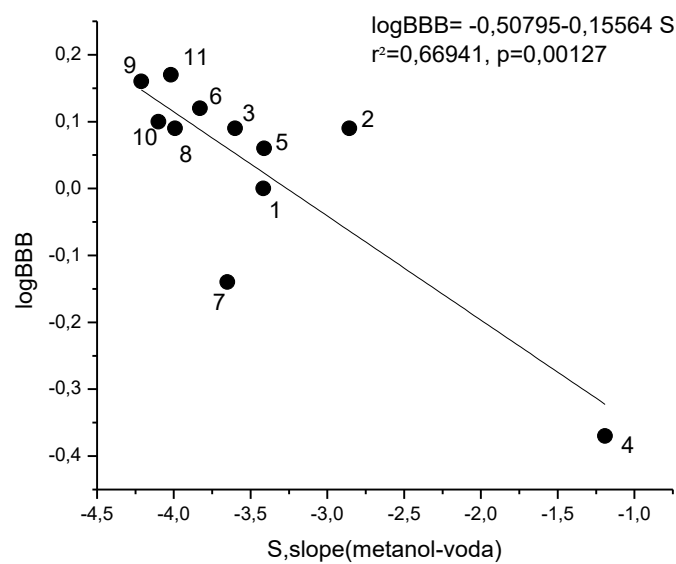
logBBB vs. R_M^0 i S	Jednačina	r^2	p
metanol – voda			
$\log BBB = f(R_M^0)$	$\log BBB = -0,27017 + 0,13277 R_M^0$	0,64334	0,00181
$\log BBB = f(S)$	$\log BBB = -0,50795 - 0,15564 S$	0,66941	0,00127
acetonitril – voda			
$\log BBB = f(R_M^0)$	$\log BBB = -0,29891 + 0,14755 R_M^0$	0,63088	0,00213
$\log BBB = f(S)$	$\log BBB = -0,49844 - 0,1319 S$	0,62121	0,00241
aceton – voda			
$\log BBB = f(R_M^0)$	$\log BBB = -0,2294 + 0,09914 R_M^0$	0,64305	0,00182
$\log BBB = f(S)$	$\log BBB = -0,34644 - 0,08297 S$	0,64151	0,00186

Tabela 26. Korelacije između parametra koji definiše sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru ($\log BBB$) i retencionih parametara (R_M^0 i S) za sva tri hromatografska sistema i polarne površine PSA

	jednačina	r^2	p
metanol – voda			
$\log BBB = f(R_M^0, PSA)$	$\log BBB = 0,01777 + 0,09212 R_M^0 - 0,00389 PSA$	0,75124	0,00157
$\log BBB = f(S, PSA)$	$\log BBB = -0,16363 - 0,10985 S - 0,0037 PSA$	0,76109	0,00133
acetonitril – voda			
$\log BBB = f(R_M^0, PSA)$	$\log BBB = 0,01309 + 0,10448 R_M^0 - 0,00429 PSA$	0,79567	$7,14047 \times 10^{-4}$
$\log BBB = f(S, PSA)$	$\log BBB = -0,12347 - 0,09458 S - 0,00448 PSA$	0,81549	$4,74733 \times 10^{-4}$
aceton – voda			
$\log BBB = f(R_M^0, PSA)$	$\log BBB = 0,0506 + 0,0693 R_M^0 - 0,00401 PSA$	0,76783	0,00119
$\log BBB = f(S, PSA)$	$\log BBB = -0,03416 - 0,05751 S - 0,00391 PSA$	0,75064	0,00158



a)



b)

Slika 10. Grafički prikaz zavisnosti parametra logBBB kao pokazatelja sposobnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru od retencionih konstanti (kada je kao mobilna faza korišćena smeša metanola i vode): a) R_M^0 ; b) S

5.9. Empirijska pravila

Nijedna od ispitivanih supstanci ne odstupa od pravila koja definišu kriterijume za pasivnu apsorpciju nakon oralne aplikacije (pravila Lipinskog, Vebera i Egana), na osnovu podataka o fizičko-hemijskim deskriptorima datim u Tabeli 4. Takođe, nijedno jedinjenje iz ispitivane serije ne narušava kriterijume koje propisuju pravila Mugge-a i Ghose-a, na osnovu analize podataka datih u Tabelama 3 i 4. Odstupanja od Klarkovih pravila prikazana su u Tabeli 27, a od Oprea pravila u Tabeli 28.

Tabela 27. Odstupanja ispitivanih supstanci od Klarkovih pravila

Supstanca	N+O	ClogP-(N+O)	PSA	MW	logD	Broj odstupanja od pravila
1	3	-1,47	37,38	271,26	1,11	1
2	4	-3,14	57,61	233,26	0,79	2
3	4	-2,38	46,61	247,29	1,21	1
4	5	-3,41	74,68	261,27	-2,25	3
5	4	-2,39	61,17	242,27	0,97	2
6	3	-0,97	37,38	231,29	1,43	1
7	6	-4,13	86,21	262,26	1	3
8	3	-0,48	37,38	251,71	1,65	1
9	3	-0,33	37,38	296,16	1,81	1
10	3	-0,48	37,38	251,71	1,91	1
11	3	-0,33	37,38	296,16	1,99	1

Tabela 28. Odstupanja ispitivanih supstanci od Oprea pravila

Supstanca	MW	ClogP	NRB	NHBD	NHBA	PSA	Broj odstupanja od pravila
1	271,26	1,53	2	0	3	37,38	0
2	233,26	0,86	2	1	4	57,61	1
3	247,29	1,62	3	0	4	46,61	1
4	261,27	1,59	3	1	5	74,68	2
5	242,27	1,61	3	0	4	61,17	2
6	231,29	2,03	2	0	3	37,38	0
7	262,26	1,87	3	0	6	86,21	2
8	251,71	2,52	2	0	3	37,38	0
9	296,16	2,67	2	0	3	37,38	0
10	251,71	2,52	2	0	3	37,38	0
11	296,16	2,67	2	0	3	37,38	0

5.10. In silico toksičnost

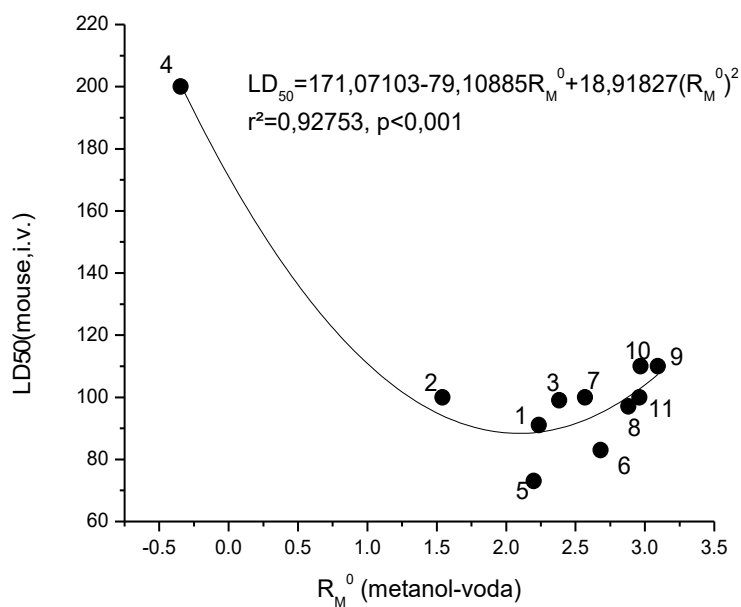
Prilikom dizajna novih lekova, izuzev efikasnosti, vrlo je važno razmotriti i bezbednosni aspekt primene. Rano otkrivanje ozbiljnog toksikološkog potencijala kandidata za lek smanjuje gubitke tokom kasnijih faza razvoja. U ovom ispitivanju su korelirane vrednosti LD₅₀ nakon različitih načina aplikacije na dve vrste eksperimentalnih životinja (miševi i pacovi), dobijene pomoću softverskih paketa (Tabela 6) sa lipofilnim parametrima R_M⁰ i S. Dobijena je parabolična zavisnost tih parametara u slučaju intravenske i subkutane primene kod miševa. Jednačine su date u Tabelama 29 i 30, a grafički prikaz pomenutih zavisnosti u slučaju kada se kao mobilna faza koristi smeša metanola i vode dat je na Slikama 11 i 12.

Tabela 29. Zavisnost toksikoloških parametara – $LD_{50}(\text{miš-i.v.})$ i $LD_{50}(\text{miš-s.c.})$ dobijenih pomoću softverskih paketa i retencionog parametra R_M^0 , za različite organske modifikatore mobilne faze

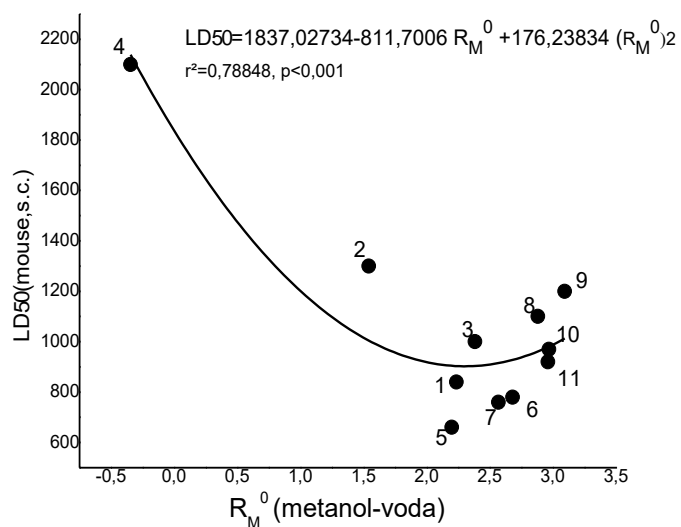
$LD_{50} = f(R_M^0)$	jednačina	r^2	p
	metanol-voda		
$LD_{50}(\text{miš-i.v.}) = f(R_M^0)$	$LD_{50} = 171,07103 - 79,10885 R_M^0 + 18,91827(R_M^0)^2$	0,92753	$1,13006 \times 10^{-5}$
$LD_{50}(\text{miš-s.c.}) = f(R_M^0)$	$LD_{50} = 1837,02734 - 811,7006 R_M^0 + 176,23834(R_M^0)^2$	0,78848	$8,19983 \times 10^{-4}$
	acetonitril-voda		
$LD_{50}(\text{miš-i.v.}) = f(R_M^0)$	$LD_{50} = 174,71827 - 85,42558 R_M^0 + 21,37743(R_M^0)^2$	0,90429	$3,4374 \times 10^{-5}$
$LD_{50}(\text{miš-s.c.}) = f(R_M^0)$	$LD_{50} = 1874,93159 - 805,84141 R_M^0 + 172,78599(R_M^0)^2$	0,73173	0,00212
	aceton-voda		
$LD_{50}(\text{miš-i.v.}) = f(R_M^0)$	$LD_{50} = 148,64355 - 47,78502 R_M^0 + 9,73578(R_M^0)^2$	0,91271	$2,37823 \times 10^{-5}$
$LD_{50}(\text{miš-s.c.}) = f(R_M^0)$	$LD_{50} = 1607,73587 - 488,99977 R_M^0 + 86,71044(R_M^0)^2$	0,76207	0,00131

Tabela 30. Zavisnost toksikoloških parametara – $LD_{50}(\text{miš-i.v.})$ i $LD_{50}(\text{miš-s.c.})$ dobijenih pomoću softverskih paketa i retencionog parametra S , za različite organske modifikatore mobilne faze

$LD_{50} = f(S)$	jednačina	r^2	p
	metanol-voda		
$LD_{50}(\text{miš-i.v.}) = f(S)$	$LD_{50} = 360,81388 + 163,92023 S + 24,69181 S^2$	0,92749	$1,13251 \times 10^{-5}$
$LD_{50}(\text{miš-s.c.}) = f(S)$	$LD_{50} = 3768,38448 + 1652,40995 S + 237,96876 S^2$	0,7901	$7,95072 \times 10^{-4}$
	acetonitril-voda		
$LD_{50}(\text{miš-i.v.}) = f(S)$	$LD_{50} = 324,717 + 126,08946 S + 16,9024 S^2$	0,89386	$5,19936 \times 10^{-5}$
$LD_{50}(\text{miš-s.c.}) = f(S)$	$LD_{50} = 3157,72306 + 1039,02063 S + 122,01336 S^2$	0,71814	0,00259
	aceton-voda		
$LD_{50}(\text{miš-i.v.}) = f(S)$	$LD_{50} = 224,58378 + 61,13317 S + 6,93922 S^2$	0,90853	$2,86762 \times 10^{-5}$
$LD_{50}(\text{miš-s.c.}) = f(S)$	$LD_{50} = 2376,28316 + 614,82181 S + 64,46475 S^2$	0,77087	0,00113

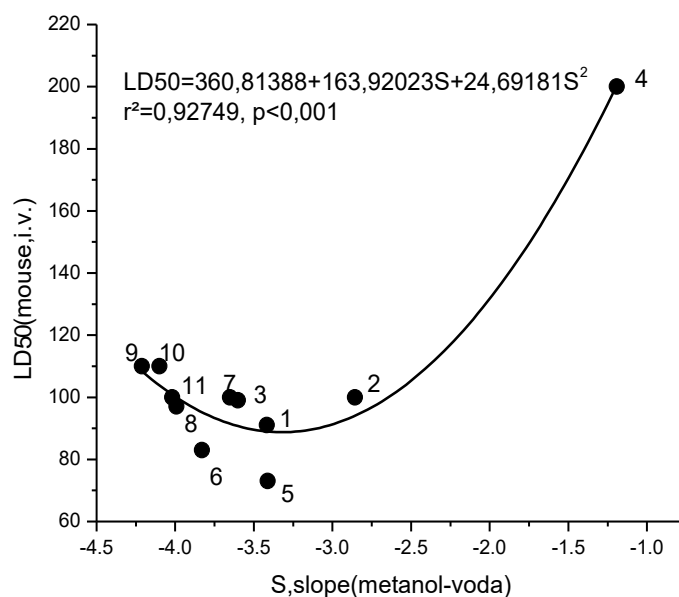


a)

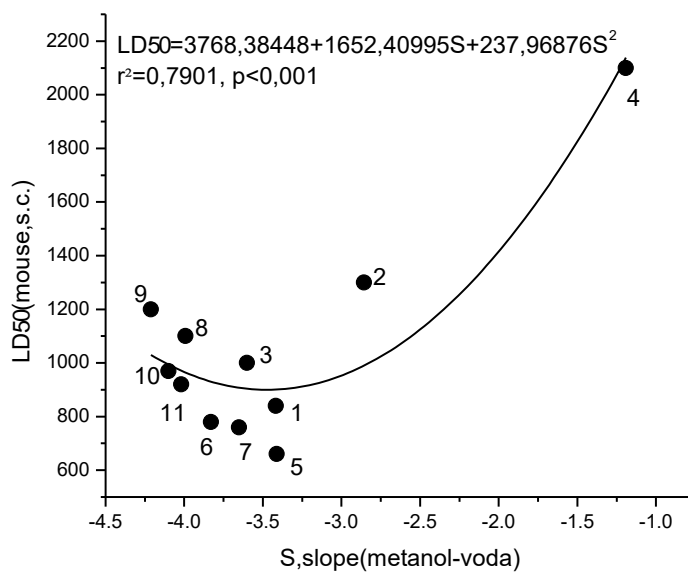


b)

Slika 11. Grafički prikaz zavisnosti parametara toksičnosti: a) LD₅₀ nakon i.v. i b) LD₅₀ nakon s.c. primene na miševima od retencione konstante R_M⁰ (mobilna faza je smeša metanola i vode)



a)



b)

Slika 12. Grafički prikaz zavisnosti parametara toksičnosti: a) LD₅₀ nakon i.v. i b) LD₅₀ nakon s.c. primene na miševima, od retencione konstante S (mobilna faza je smeša metanola i vode)

U cilju procene akvatične toksičnosti, u korelaciju su dovedeni parametri lipofilnosti R_M^0 i S i softverski dobijene vrednosti LC_{50} , za dve vrste akvatičnih organizama, posebno osetljivih na zagađenje – *Pimephales promelas* i *Daphnia magna* (Tabela 7). Kao što se i pretpostavljalo, zavisnosti su u vidu linearnih funkcija, prikazanih u Tabelama 31-33. Na Slici 13 grafički su prikazane zavisnosti akvatične toksičnosti od parametra lipofilnosti R_M^0 , za statistički najznačajnije korelacije.

Tabela 31. Zavisnost akvatične toksičnosti, izražene kroz LC_{50} vrednosti na dve vodene vrste (*Pimephales promelas* i *Daphnia magna*) od retencionih parametara R_M^0 i S , u sistemu sa metanolom u sastavu mobilne faze

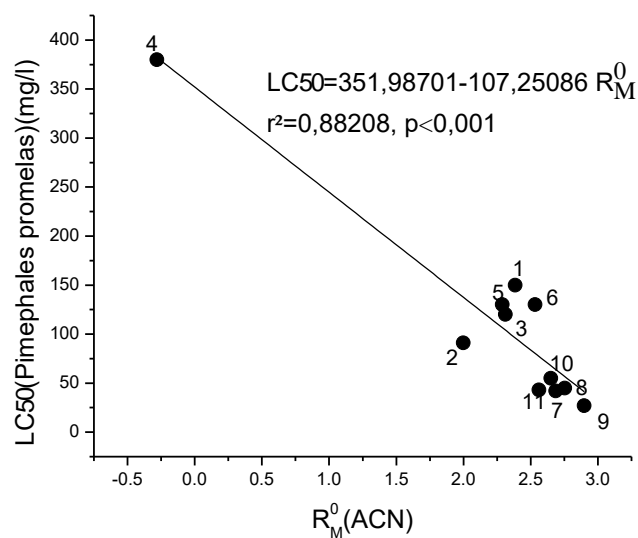
LC_{50} vs R_M^0 i S	jednačina	r^2	p
	<i>Pimephales promelas</i>		
$LC_{50} = f(R_M^0)$	$LC_{50} = 323,16306 - 96,03524 R_M^0$	0,82749	$6,34017 \times 10^{-5}$
$LC_{50} = f(S)$	$LC_{50} = 482,26416 + 106,90023 S$	0,82181	$7,35378 \times 10^{-5}$
	<i>Daphnia magna</i>		
$LC_{50} = f(R_M^0)$	$LC_{50} = 684,10799 - 239,88631 R_M^0$	0,77455	$2,16374 \times 10^{-4}$
$LC_{50} = f(S)$	$LC_{50} = 1098,88207 + 276,94128 S$	0,77754	$2,03483 \times 10^{-4}$

Tabela 32. Zavisnost akvatične toksičnosti, izražene kroz LC_{50} vrednosti na dve vodene vrste (*Pimephales promelas* i *Daphnia magna*) od retencionih parametara R_M^0 i S , u sistemu sa acetonitrilom u sastavu mobilne faze

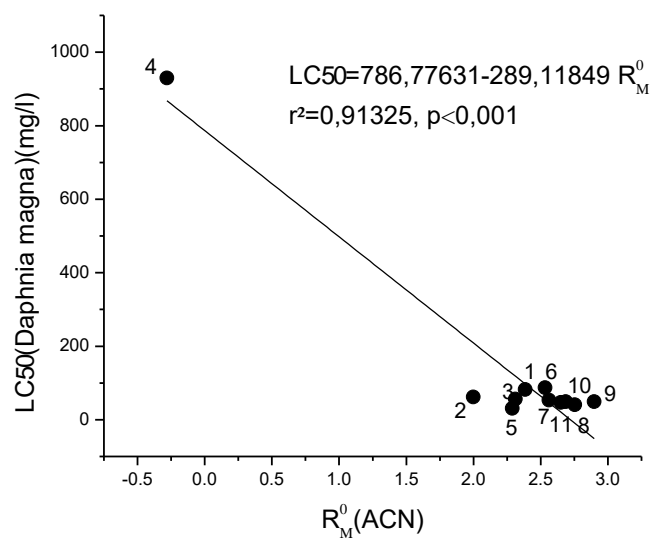
LC_{50} vs R_M^0 i S	jednačina	r^2	p
	<i>Pimephales promelas</i>		
$LC_{50} = f(R_M^0)$	$LC_{50} = 351,98701 - 107,25086 R_M^0$	0,88208	$1,11905 \times 10^{-5}$
$LC_{50} = f(S)$	$LC_{50} = 498,73007 + 96,30055 S$	0,87784	$1,31386 \times 10^{-5}$
	<i>Daphnia magna</i>		
$LC_{50} = f(R_M^0)$	$LC_{50} = 786,77631 - 289,11849 R_M^0$	0,91325	$2,77673 \times 10^{-6}$
$LC_{50} = f(S)$	$LC_{50} = 1201,46218 + 264,33633 S$	0,94644	$3,12882 \times 10^{-7}$

Tabela 33. Zavisnost akvatične toksičnosti, izražene kroz LC_{50} vrednosti na dve vodene vrste (*Pimephales promelas* i *Daphnia magna*) od retencionih parametara R_M^0 i S , u sistemu sa acetonom u sastavu mobilne faze

LC_{50} vs R_M^0 i S	jednačina	r^2	p
	<i>Pimephales promelas</i>		
$LC_{50} = f(R_M^0)$	$LC_{50} = 298,19463 - 70,82888 R_M^0$	0,86414	$2,13146 \times 10^{-5}$
$LC_{50} = f(S)$	$LC_{50} = 377,95615 + 58,43456 S$	0,83473	$5,21214 \times 10^{-5}$
	<i>Daphnia magna</i>		
$LC_{50} = f(R_M^0)$	$LC_{50} = 617,31697 - 181,71961 R_M^0$	0,8	$1,24815 \times 10^{-4}$
$LC_{50} = f(S)$	$LC_{50} = 816,57865 + 148,74707 S$	0,75874	$2,95641 \times 10^{-4}$



a)



b)

Slika 13. Grafički prikaz akvatične toksičnosti izražene kao LC_{50} u zavisnosti od lipofilnosti, predstavljene R_M^0 parametrima u hromatografskom sistemu sa acetonitrilom u sastavu mobilne faze na dve vrste vodenih organizama: a) *Pimephales promelas* i b) *Daphnia magna*

5.11. Vezivanje za molekulske receptore

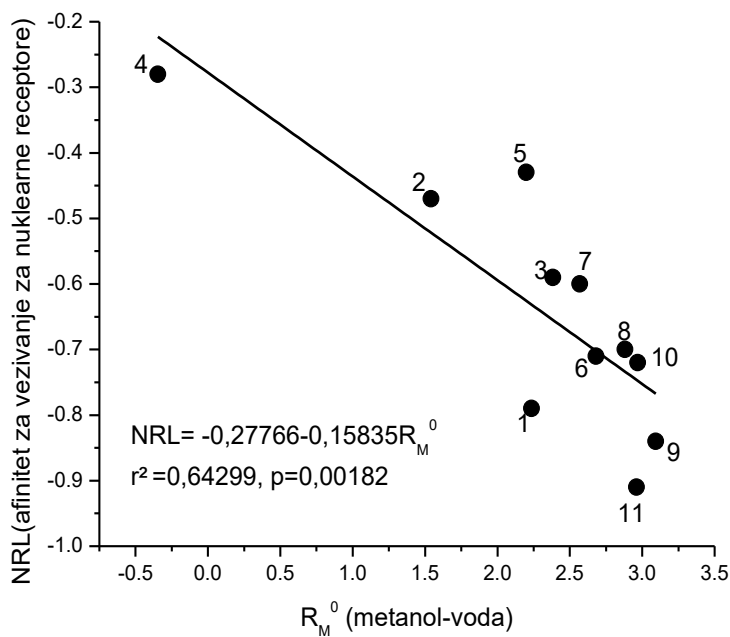
U Tabeli 8 prikazani su podaci o afinitetu za vezivanje za različite receptore, dobijeni primenom softverskog paketa Molinspiration. Afinitet za vezivanje za receptore koreliran je sa lipofilnim parametrima R_M^0 i S i dobijene jednačine su date u Tabelama 34 i 35. Najbolje zavisnosti dobijene su pri korelaciji R_M^0 vrednosti u odnosu na nuklearne receptore (Slika 14).

Tabela 34. Linearne korelacije afiniteta za vezivanje za različite tipove molekulskih receptora (GPCR-receptori vezani za G-protein; Ion-jonski kanali; Kin-inhibitori kinaza; NRL-nuklearni receptori) i retencionog parametra R_M^0 (u hromatografskom sistemu sa metanolom u sastavu mobilne faze)

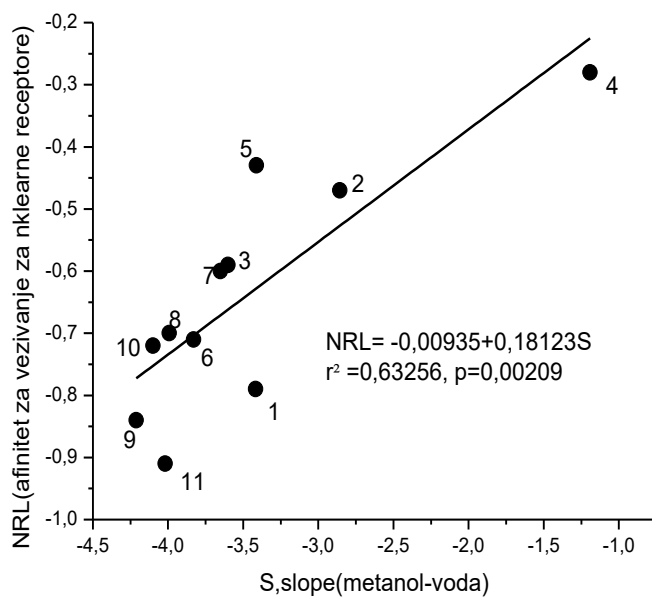
afinitet = $f(R_M^0)$	jednačina	r^2	p
GPCR = $f(R_M^0)$	GPCR = $-0,18815 - 0,07987 R_M^0$	0,55068	0,00539
Ion = $f(R_M^0)$	Ion = $-0,15613 - 0,03467 R_M^0$	0,25263	0,06587
Kin = $f(R_M^0)$	Kin = $-0,74679 - 0,0598 R_M^0$	0,23718	0,07327
NRL = $f(R_M^0)$	NRL = $-0,27766 - 0,15835 R_M^0$	0,64299	0,00182

Tabela 35. Linearne korelacije afiniteta za vezivanje za različite tipove molekulskih receptora (GPCR-receptori vezani za G-protein; Ion-jonski kanali; Kin-inhibitori kinaza; NRL-nuklearni receptori) i retencionog parametra S (u hromatografskom sistemu sa metanolom u sastavu mobilne faze)

afinitet = $f(S)$	jednačina	r^2	p
GPCR = $f(S)$	GPCR = $-0,05536 + 0,09068 S$	0,53114	0,00661
Ion = $f(S)$	Ion = $-0,09725 + 0,03972 S$	0,24832	0,06787
Kin = $f(S)$	Kin = $-0,64615 + 0,06825 S$	0,23035	0,07677
NRL = $f(S)$	NRL = $-0,00935 + 0,18123 S$	0,63256	0,00209



a)



b)

Slika 14. Grafički prikaz zavisnosti afiniteta za vezivanje za nuklearne receptore (NRL) od retencione konstante (kada je kao mobilna faza korišćena smeša metanola i vode): a) R_M^0 ; b) S

5.12. Antiproliferativna aktivnost

Antiproliferativna aktivnost ispitivanih supstanci određena je MTT testom i izražena kao IC_{50} , odnosno koncentracija koja izaziva smrt 50% tretiranih ćelija (Tabela 36). Za potrebe ovog testa korišćeno je pet ćelijskih linija humanih karcinoma i jedna ćelijska linija zdravih fibroblasta pluća. Rezultati citotoksičnosti pojedinačnih jedinjenja prikazani su kao srednja vrednost dva eksperimenta urađena u kvadriplikatu za svaku koncentraciju jedinjenja, na svim ispitivanim ćelijskim linijama. Za one supstance za koje je ustanovljen nelinearan odgovor (citotoksičnost prema različitim ćelijskim linijama) u odnosu na koncentraciju, IC_{50} vrednost ne može da se odredi i to je u Tabeli 36 naznačeno (N/A).

Tabela 36. IC_{50} vrednosti (50% inhibitorna koncentracija) [μM] testiranih sukcinimida 1 – 11, određene „median effect“ analizom iz rezultata citotoksičnosti dobijenih *in vitro* MTT testom nakon tretiranja humanih ćelijskih linija tokom 48 h. Naznačene su IC_{50} vrednosti manje od 10 μM , odnosno one koje determinišu značajnu citotoksičnu aktivnost.

supstanca	MCF-7	MDA-MB-231	HeLa	A549	HT-29	MRC-5
1	87,129	20,760	60,498	71,297	14,464	>100
2	42,247	28,274	>100	>100	>100	N/A
3	>100	20,675	44,225	30,318	87,687	>100
4	>100	22,640	40,653	>100	>100	>100
5	17,502	25,166	>100	>100	15,031	>100
6	3,709	83,028	>100	59,943	21,860	>100
7	6,611	>100	N/A	>100	33,920	N/A
8	>100	24,397	N/A	>100	>100	>100
9	>100	>100	>100	52,083	>100	>100
10	>100	>100	>100	21,661	>100	>100
11	>100	18,582	>100	8,278	>100	>100

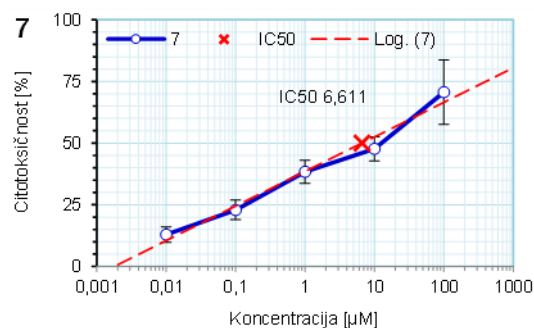
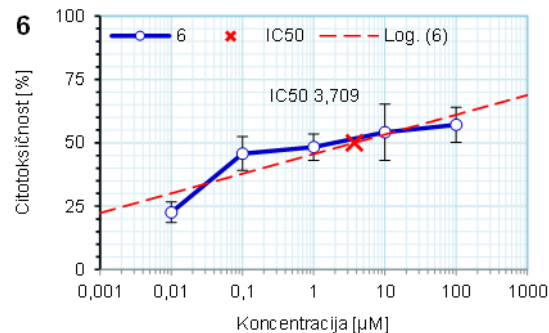
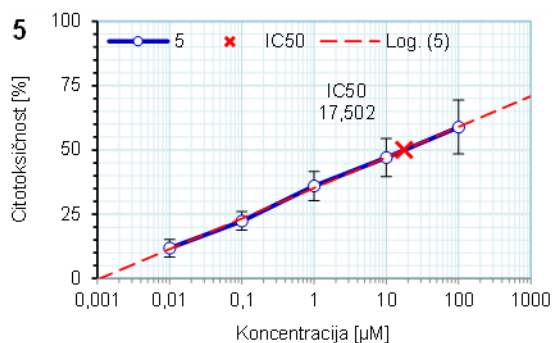
N/A – IC_{50} vrednost se ne može odrediti (IC_{50} vrednost irelevantna zbog nelinearnog odgovora ili hormetičkog efekta)

Na ćelijskoj liniji ER-pozitivnog adenocarcinoma dojke (MCF-7) najveću aktivnost pokazale su supstance 6 i 7, ali se i supstanca 5 može smatrati citotoksičnom. Na Slici 15 dati su grafički prikazi zavisnosti citotoksičnog efekta od koncentracije ove tri supstance.

Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
5	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	12,531	22,035	35,458	47,595	58,678
Test 2	11,049	22,745	36,497	46,547	59,095
Sred. vr.	11,79	22,39	35,98	47,07	58,89
St. dev.	0,03	0,02	0,03	0,03	0,04
CV	3,391	3,622	5,687	7,367	10,432

Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
6	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	22,065	47,975	50,461	52,391	57,479
Test 2	23,068	43,550	46,165	55,980	56,744
Sred. vr.	22,57	45,76	48,31	54,19	57,11
St. dev.	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03
CV	4,071	6,673	5,199	11,069	6,889

Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
7	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	14,549	20,807	37,184	47,507	72,160
Test 2	11,314	25,007	39,495	47,870	69,115
Sred. vr.	12,93	22,91	38,34	47,69	70,64
St. dev.	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03
CV	3,176	3,948	4,647	4,848	13,077

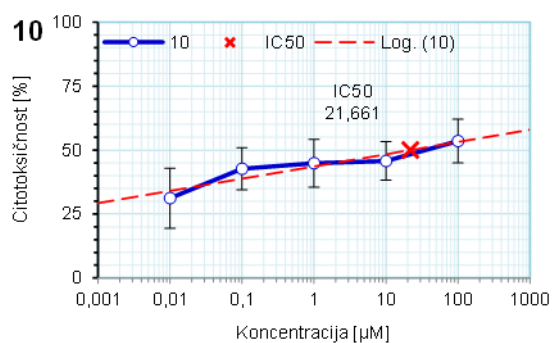


*CV – koeficijent varijacije

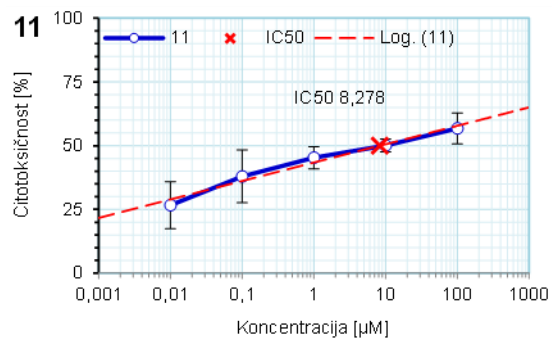
Slika 15. Zavisnost veličine citotoksičnog efekta (IC_{50}) na ćelijskoj liniji MCF-7 od koncentracije supstanci 5, 6 i 7, nakon 48 h inkubacije

Na ćelijskoj liniji karcinoma pluća (A549) najaktivnijom se pokazala supstanca 11, dok supstanca 10 takođe pokazuje značajan citotoksičan efekat (Slika 16).

Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
10	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	35,536	43,476	46,363	49,139	55,636
Test 2	26,816	41,899	43,408	42,402	51,453
Sred. vr.	31,18	42,69	44,89	45,77	53,54
St. dev.	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02
CV	11,761	8,206	9,327	7,554	8,575



Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
11	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	33,759	42,254	52,915	53,748	58,134
Test 2	19,665	33,687	37,598	46,480	55,419
Sred. vr.	26,71	37,97	45,26	50,11	56,78
St. dev.	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01
CV	9,201	10,321	4,373	2,544	6,036

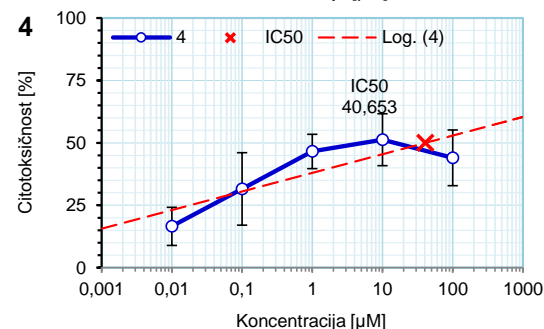
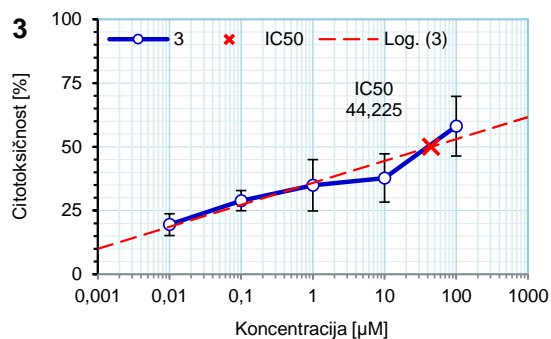


Slika 16. Zavisnost veličine citotoksičnog efekta (IC_{50}) na ćelijskoj liniji A549 od koncentracije supstanci 10 i 11 nakon 48 h inkubacije.

Na ćelijama karcinoma grlića materice (HeLa) postignuto je samo umereno citotoksično delovanje, i to supstancama 3 i 4 (Slika 17).

Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
3	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	20,110	28,702	34,369	39,732	59,598
Test 2	18,854	29,050	35,385	35,807	56,621
Sred. vr.	19,48	28,88	34,88	37,77	58,11
St. dev.	0,01	0,01	0,03	0,02	0,02
CV	4,267	3,954	10,088	9,509	11,688

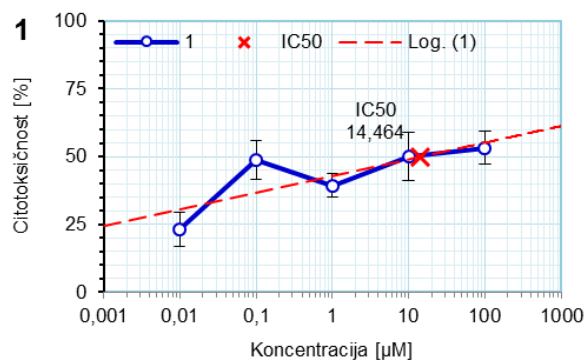
Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
4	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	17,855	30,469	46,862	50,213	44,912
Test 2	15,294	32,549	46,305	52,338	43,107
Sred. vr.	16,57	31,51	46,58	51,28	44,01
St. dev.	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03
CV	7,627	14,529	6,883	10,431	11,154



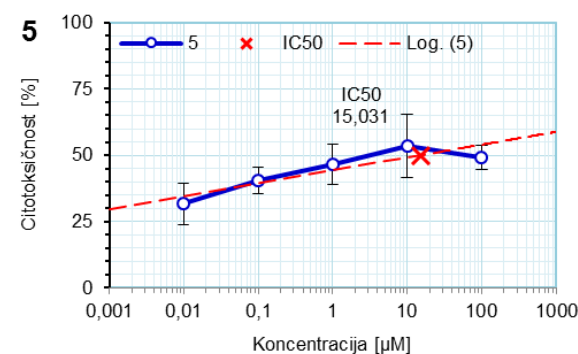
Slika 17. Zavisnost veličine citotoksičnog efekta (IC_{50}) na ćelijskoj liniji HeLa od koncentracije supstanci 3 i 4 nakon 48 h inkubacije.

HT-29 ćelijska linija (ćelije humanog karcinoma kolona) je poznata po izuzetnoj rezistentnosti na hemioterapeutike. Po citotoksičnoj aktivnosti izdvajaju se jedinjenja 1, 5 i 6, a jedinjenje 7 ispoljava umerenu citotoksičnost u odnosu na posmatrane ćelije (Slika 18).

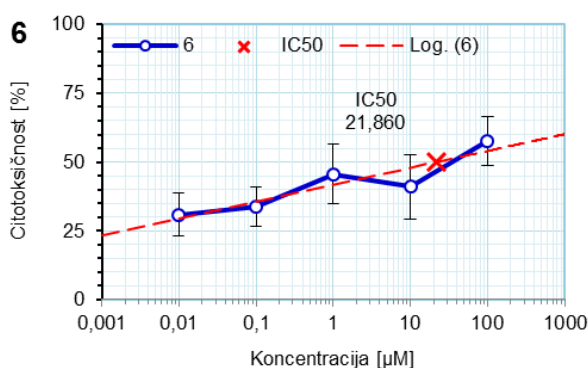
Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
1	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	20,408	47,920	43,900	51,486	55,166
Test 2	26,099	49,716	34,888	48,341	51,271
Sred. vr.	23,25	48,82	39,39	49,91	53,22
St. dev.	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
CV	6,404	7,092	4,398	8,831	6,113



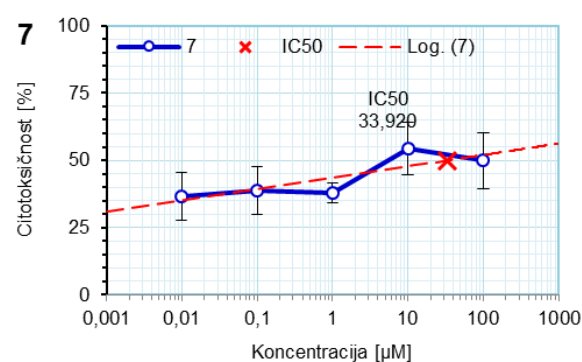
Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
5	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	31,477	40,066	46,767	50,731	47,428
Test 2	31,897	40,880	46,288	56,324	51,237
Sred. vr.	31,69	40,47	46,53	53,53	49,33
St. dev.	0,03	0,02	0,02	0,03	0,01
CV	7,795	5,125	7,708	12,074	4,556



Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
6	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	29,778	31,996	43,794	42,662	57,433
Test 2	32,081	35,701	47,434	39,505	58,066
Sred. vr.	30,93	33,85	45,61	41,08	57,75
St. dev.	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02
CV	7,751	7,026	10,888	11,706	8,811



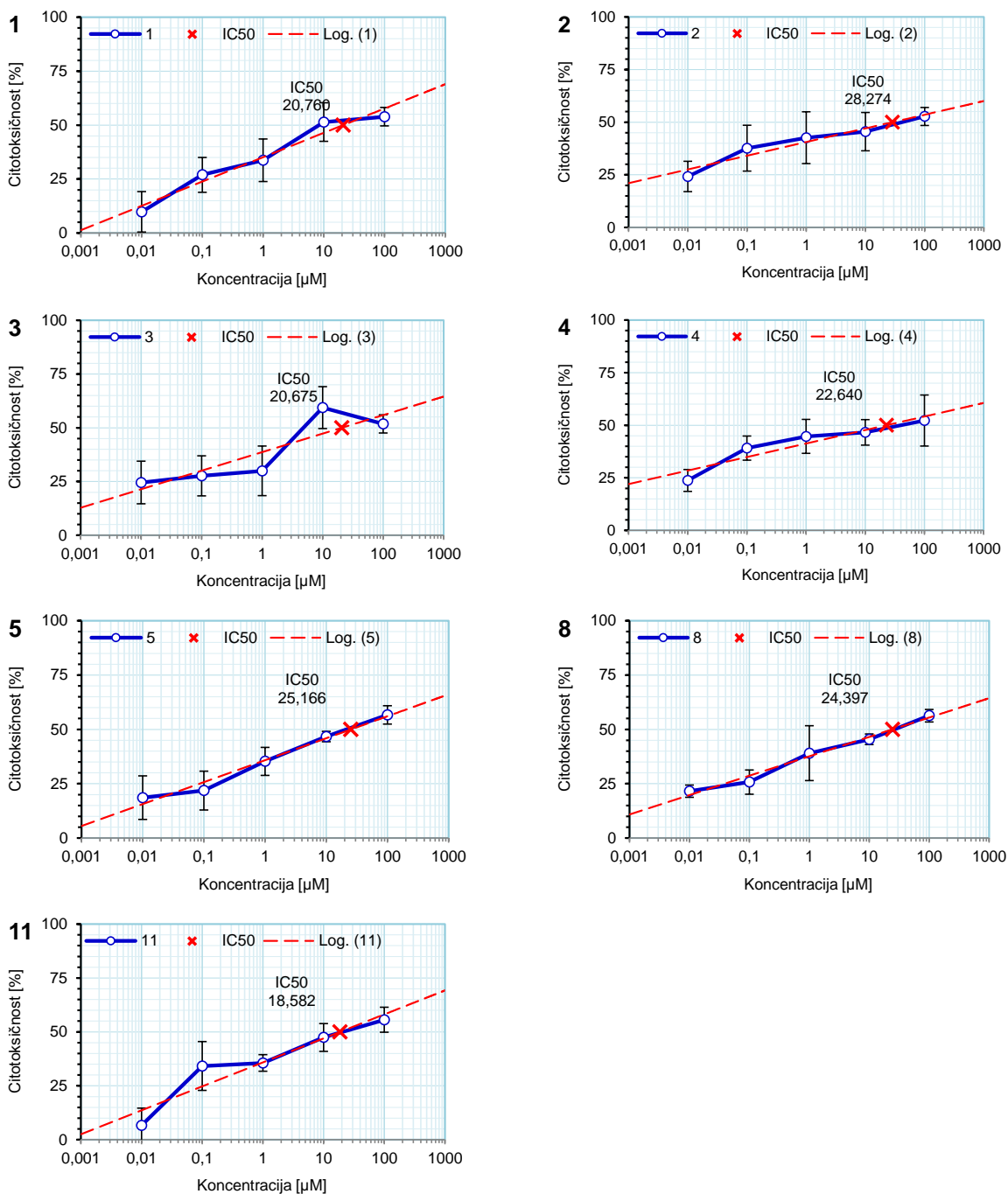
Jedinjenje	Koncentracija [μM]				
7	0,01	0,1	1	10	100
Test 1	33,837	39,830	36,904	54,979	49,457
Test 2	39,276	37,718	38,955	53,987	50,275
Sred. vr.	36,56	38,77	37,93	54,48	49,87
St. dev.	0,03	0,03	0,01	0,02	0,03
CV	8,938	8,830	3,844	9,788	10,513



Slika 18. Zavisnost veličine citotoksičnog efekta (IC_{50}) na ćelijskoj liniji HT-29 od koncentracije supstanci 1, 5, 6 i 7 nakon 48 h inkubacije

Najveći broj ispitivanih jedinjenja deluje citotoksično na ćelije linije MDA-MB-231 (estrogen i progesterone receptor negativan karcinom dojke), sa izuzetkom jedinjenja 6, 7, 9 i 10,

na osnovu IC_{50} vrednosti iz Tabele 36. Grafički prikaz promene citotoksičnog efekta sa povećanjem koncentracije aktivnih jedinjenja dat je za ona jedinjenja koja su eksperimentalno pokazala antiproliferativnu aktivnost (Slika 19).



Slika 19. Grafički prikaz zavisnosti citotoksične aktivnosti ispitivanih supstanci (1, 2, 3, 4, 5, 8 i 11) na ćelije MDA-MB-231 linije od koncentracije supstanci, nakon izlaganja od 48 h

5.13. Korelacija *in silico* afiniteta vezivanja na estrogenim receptorima sa *in vitro* antiproliferativnom aktivnošću na estrogen pozitivnim ćelijama karcinoma dojke

Rezultati doking analize daju energiju formiranja kompleksa ispitivanih jedinjenja sa estrogenim receptrom alfa, 3ERT (Tabela 37) u šupljini koja je definisana dimenzijama zapremine 334,336 Å³ i površine 857,6 Å², i sa estrogenim receptorom beta, 2FSZ (Tabela 38) u šupljini dimenzija zapremine 12,288 Å³ i površine 20,48 Å².

Tabela 37. Rezultati analize vezivanja ispitivanih jedinjenja za mesto vezivanja liganda OHT_600 [A] (4-hidroksi-tamoksifena) Cavity 1 [Vol=334,336 (857,6)], Cavity 1 [Vol=332,8 (862,72)] i Cavity 1 [Vol=318,464 (817,92)], (vezivanje liganada za estrogeni receptor alfa (3ERT))

1.Šupljina 1; Zapremina:334,336; Površina:857,6			
Name	Plants Score	MolDock Score	Rerank Score
OHT_600 [A]	-86,1099	-103,094	-80,3412
Supstanca1	-62,0774	-66,925	-62,1318
Supstanca2	-60,5463	-75,4776	-67,574
Supstanca3	-65,0126	-76,1863	-70,9767
Supstanca4	-65,7891	-86,9493	-81,0727
Supstanca5	-67,9946	-83,6398	-75,9694
Supstanca6	-65,5524	-72,6845	-67,3195
Supstanca7	-65,4154	-79,4529	-75,1702
Supstanca8	-65,8665	-73,9796	-66,7745
Supstanca9	-62,5277	-76,0131	-66,0499
Supstanca10	-63,4283	-71,4434	-64,3204
Supstanca11	-60,7574	-69,8767	-62,1726

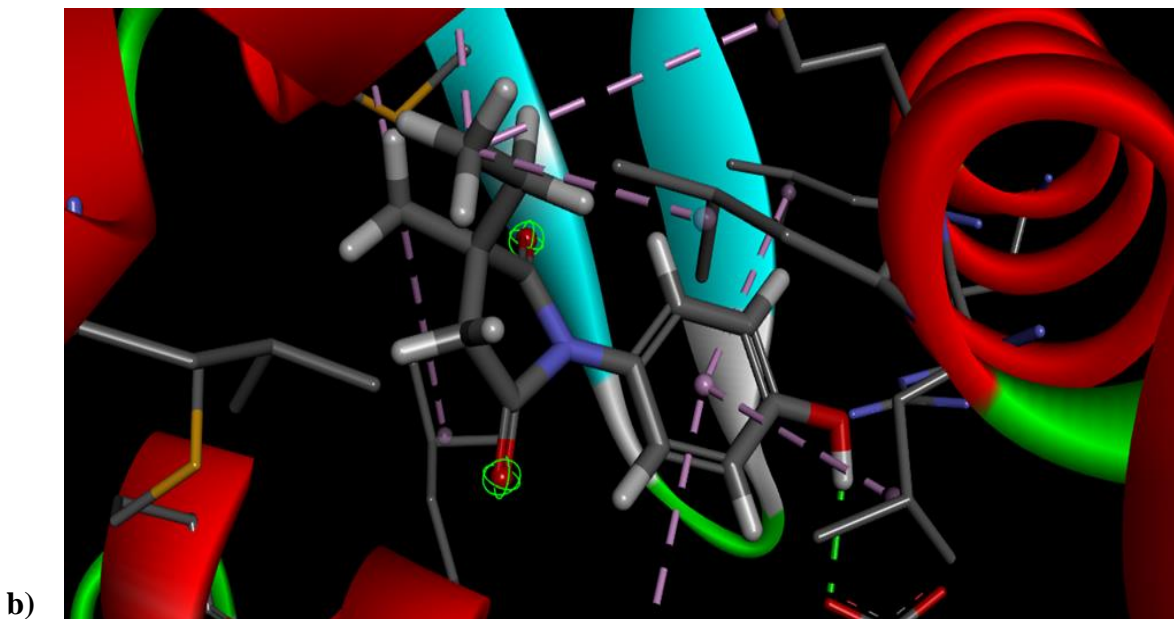
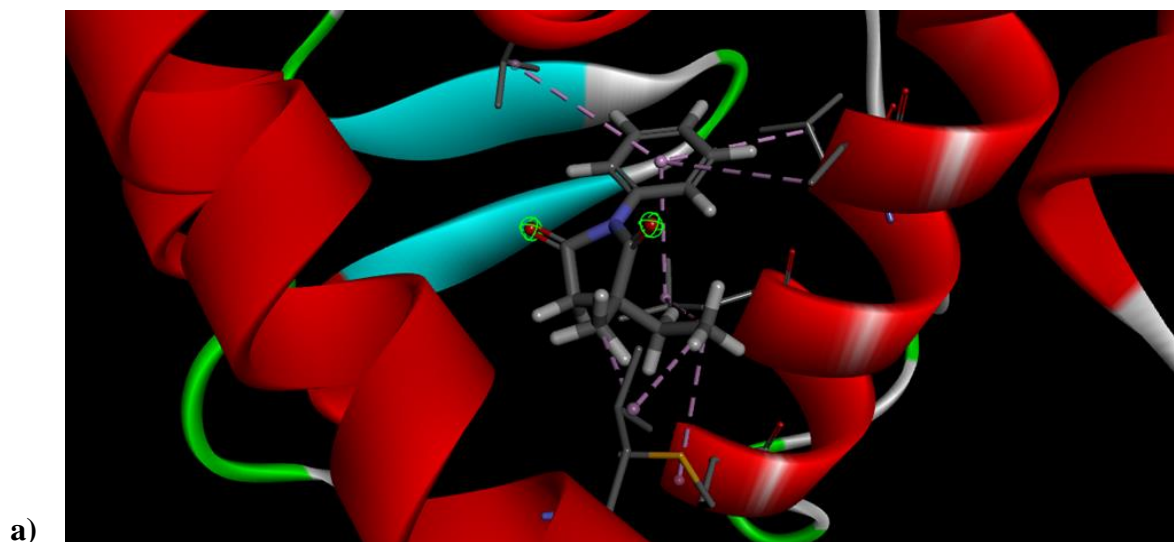
2.Šupljina 1; Zapremina:332,8; Površina:862,72			
OHT_600 [A]	-100,311	-131,122	-107,504
Supstanca1	-64,0461	-65,2913	-61,5853
Supstanca2	-64,8998	-73,521	-67,8118
Supstanca3	-62,5682	-74,3165	-68,2338
Supstanca4	-67,7024	-82,975	-78,4377
Supstanca5	-64,6391	-80,5858	-73,3495
Supstanca6	-65,45	-71,7969	-67,2787
Supstanca7	-64,9848	-79,4793	-75,5632
Supstanca8	-65,732	-72,3272	-65,9862
Supstanca9	-63,2427	-70,8432	-63,554
Supstanca10	-62,0682	-70,2926	-63,5981
Supstanca11	-62,2926	-70,2665	-63,4803
3.Šupljina 1; Zapremina:318,464; Površina:817,92			
OHT_600 [A]	-94,9283	-136,916	-110,127
Supstanca1	-61,6264	-64,9825	-61,6921
Supstanca2	-60,4378	-75,8353	-67,9566
Supstanca3	-64,9507	-77,9483	-71,9088
Supstanca4	-67,4115	-82,9865	-78,3517
Supstanca5	-68,2238	-82,9881	-75,9075
Supstanca6	-65,9124	-71,9543	-67,3791
Supstanca7	-65,3689	-79,7939	-75,466
Supstanca8	-62,3631	-76,7583	-66,3793
Supstanca9	-65,9734	-73,0024	-66,6702
Supstanca10	-63,1291	-72,478	-65,0735
Supstanca11	-60,822	-70,6126	-63,0083

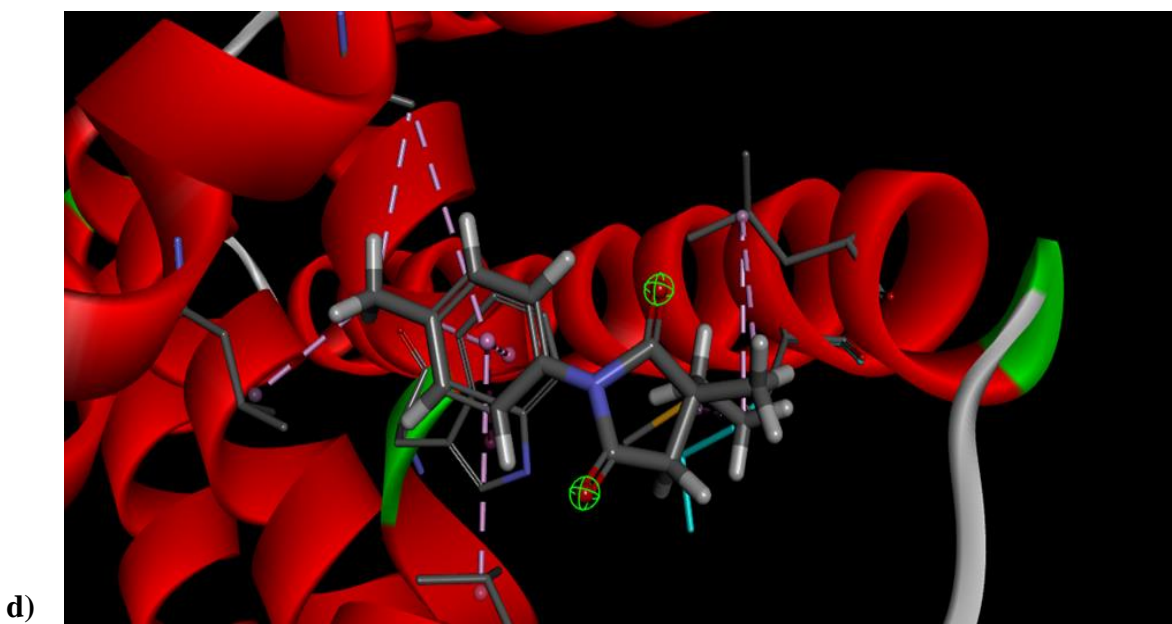
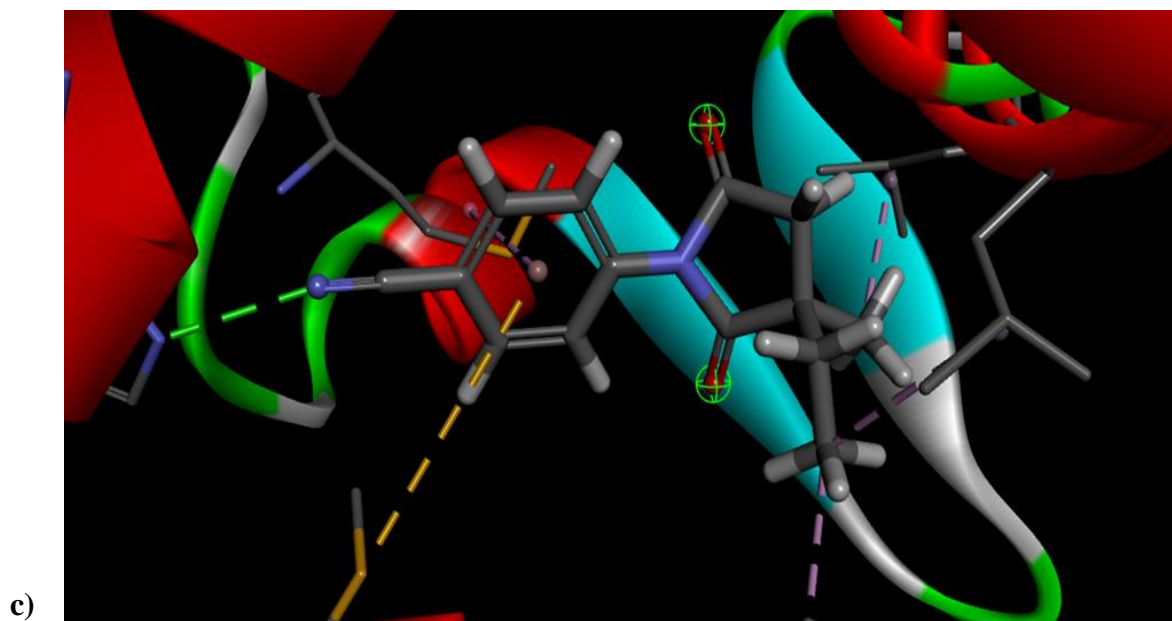
*u tabeli su označene najniže energije formiranja kompleksa sa definisanim mestima vezivanja na estrogenom receptoru

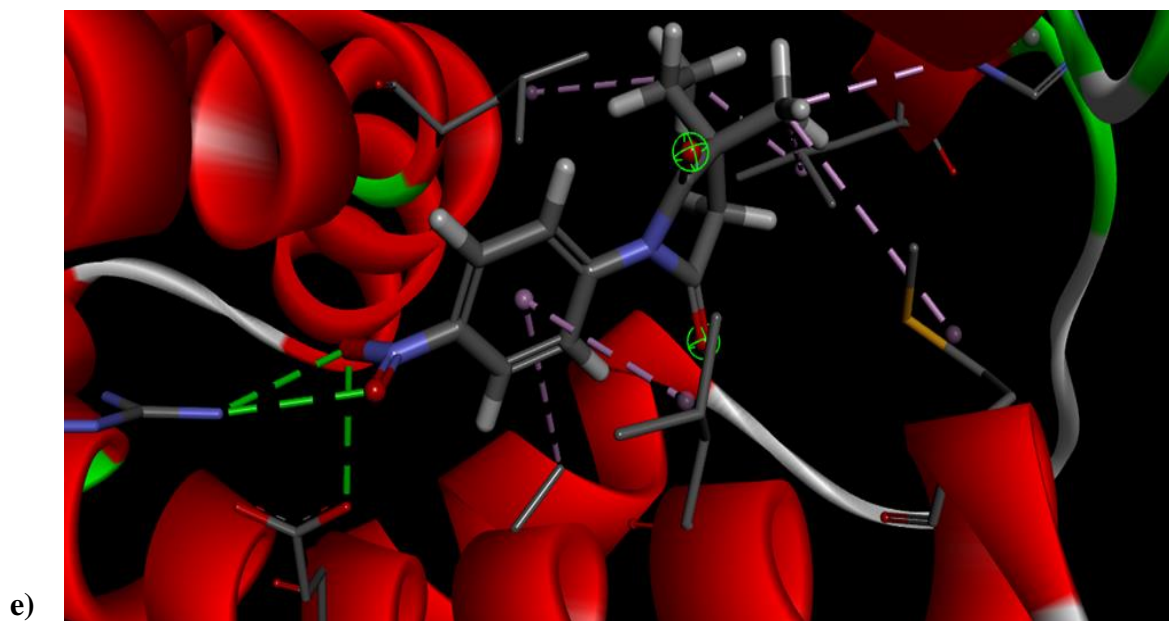
Tabela 38. Rezultati za mesto vezivanja liganda OHT_104 [B] (4-hidroksi-tamoksifena) Cavity 14 [Vol=12,288 (20,48)] („drugo mesto“ vezivanja liganada na estrogenom receptoru beta (2FSZ)):

Ligand	Plants Score	MolDock Score	Rerank Score
OHT_104 [B]	-83,7995	-113,012	-93,8413
Supstanca1	-59,4538	-58,8535	-53,0506
Supstanca2	-60,9603	-56,1556	-50,369
Supstanca3	-61,5284	-70,3638	-60,9731
Supstanca4	-64,0979	-63,8275	-58,2535
Supstanca5	-62,6247	-65,0456	-56,7484
Supstanca6	-63,0851	-70,7623	-61,4049
Supstanca7	-62,5651	-59,5934	-54,9609
Supstanca8	-63,1077	-70,7936	-60,6466
Supstanca9	-62,424	-59,0244	-51,7079
Supstanca10	-62,3862	-58,2512	-50,3345
Supstanca11	-62,041	-55,5722	-49,3242

Za izdvojena jedinjenja (1, 2, 5, 6 i 7) su pomoću softverskog paketa BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2019 (v19.1.0.18287) predviđena mesta i način vezivanja za estrogene receptore alfa (Slika 20).







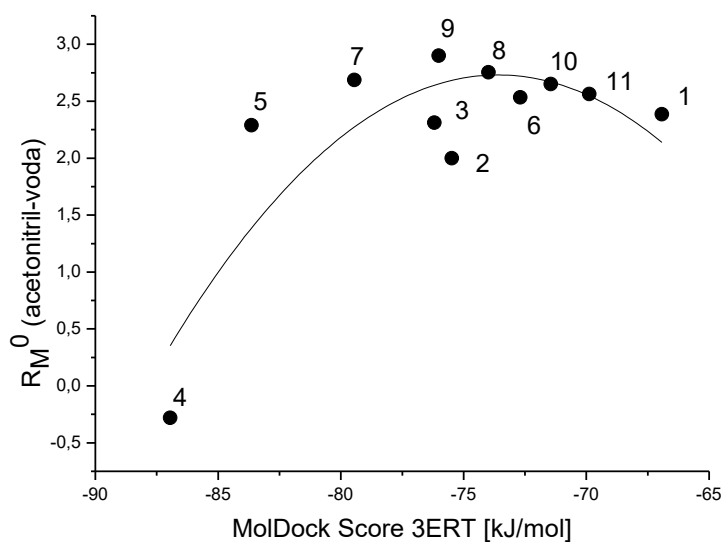
Slika 20. Prikaz mesta i načina vezivanja jedinjenja: a) 1, b) 2, c) 5, d) 6 i e) 7, za estrogene receptore alfa

Korelacija lipofilnosti kvantifikovana pomoću hromatografskih retencionih konstanti i MolDock Score-a, koji predstavlja energiju potrebnu za formiranje kompleksa ispitivanih sukcinimida sa estrogenim receptorima alfa (3ERT), daje inverznu funkciju koja ukazuje na statistički značajnu korelaciju (Tabela 39, Slika 21). Korelacija retencionih konstanti i MolDock Score-a, koji predstavlja energiju potrebnu za formiranje kompleksa ispitivanih sukcinimida sa estrogenim receptorima beta (2FSZ) nije pokazala statistički značajnu korelaciju sa lipofilnošću, izraženom pomoću retencionih konstanti.

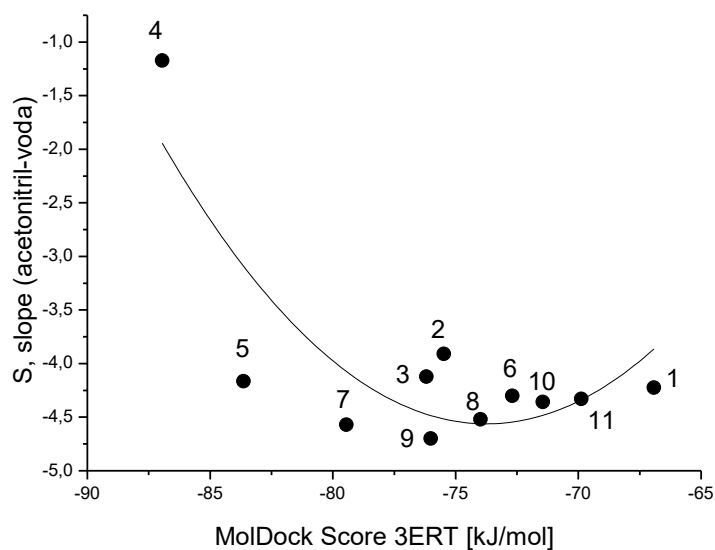
Tabela 39. Korelacija retencionih konstanti (R_M^0 i S) i energije formiranja kompleksa sa estrogenim receptorom alfa (MolDock Score)

MolDock Score vs R_M^0 i S (1. Šupljina 1; Zapremina:334,336; Površina:857,6)			
	jednačina	r^2	p
metanol-voda			
MolDock Score = $f(R_M^0)$	$R_M^0 = -70,12943 - 1,99353 \text{ MDS} - 0,01362(\text{MDS})^2$	0,60925	0,00955
MolDock Score = $f(S)$	$S = 60,83543 + 1,76817 \text{ MDS} + 0,01207(\text{MDS})^2$	0,62164	0,00839
acetonitril-voda			
MolDock Score = $f(R_M^0)$	$R_M^0 = -69,39142 - 1,96011 \text{ MDS} - 0,00436(\text{MDS})^2$	0,65521	0,00579
MolDock Score = $f(S)$	$S = 77,1256 + 2,2155 \text{ MDS} + 0,01502(\text{MDS})^2$	0,63905	0,00695
aceton-voda			
MolDock Score = $f(R_M^0)$	$R_M^0 = -95,24103 - 2,69253 \text{ MDS} - 0,01838(\text{MDS})^2$	0,60749	0,00973
MolDock Score = $f(S)$	$S = 107,781 + 3,09981 \text{ MDS} + 0,02122(\text{MDS})^2$	0,60347	0,01013
MolDock Score vs R_M^0 i S (2. Šupljina 1; Zapremina:332,8; Površina:862,72)			
	jednačina	r^2	p
metanol-voda			
MolDock Score = $f(R_M^0)$	$R_M^0 = -82,17014 - 2,3817 \text{ MDS} - 0,01669(\text{MDS})^2$	0,49848	0,02591
MolDock Score = $f(S)$	$S = 71,79031 + 2,12092 \text{ MDS} + 0,01485(\text{MDS})^2$	0,52255	0,00839
acetonitril-voda			
MolDock Score = $f(R_M^0)$	$R_M^0 = -73,22664 - 2,12607 \text{ MDS} - 0,01488(\text{MDS})^2$	0,4771	0,03062
MolDock Score = $f(S)$	$S = 79,72903 + 2,35577 \text{ MDS} + 0,01647(\text{MDS})^2$	0,44468	0,03895

aceton-voda			
	jednačina	r ²	p
MolDock Score = f(R_M⁰)	$R_M^0 = -114,95874 - 3,30569 \text{ MDS} - 0,02309(\text{MDS})^2$	0,48823	0,0281
MolDock Score = f(S)	$S = 135,60621 + 3,94303 \text{ MDS} + 0,02756(\text{MDS})^2$	0,5011	0,02538
MolDock Score vs R_M⁰ i S (3.Šupljina 1; Zapremina:318,464; Površina:817,92)			
	jednačina	r ²	p
metanol-voda			
MolDock Score = f(R_M⁰)	$R_M^0 = -69,55987 - 2,02062 \text{ MDS} - 0,01409(\text{MDS})^2$	0,33815	0,07859
MolDock Score = f(S)	$S = 60,55838 + 1,79871 \text{ MDS} + 0,01253(\text{MDS})^2$	0,35141	0,07249
acetonitril-voda			
MolDock Score = f(R_M⁰)	$R_M^0 = -57,05438 - 1,67091 \text{ MDS} - 0,01167(\text{MDS})^2$	0,276	0,11254
MolDock Score = f(S)	$S = 58,66862 + 1,76726 \text{ MDS} + 0,01235(\text{MDS})^2$	0,23083	0,14336
aceton-voda			
MolDock Score = f(R_M⁰)	$R_M^0 = -95,5691 - 2,7546 \text{ MDS} - 0,01034(\text{MDS})^2$	0,32149	0,08681
MolDock Score = f(S)	$S = 114,66398 + 3,34422 \text{ MDS} + 0,02327(\text{MDS})^2$	0,34138	0,07707



a)



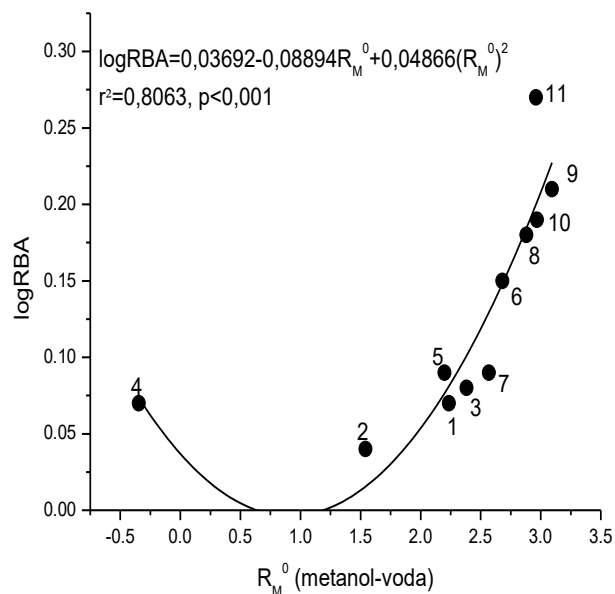
b)

Slika 21. Grafički prikaz korelacije energije formiranja kompleksa sa vezivnim mestom (MolDock Score) na estrogenom receptoru ispitivanih sukcinimida sa estrogenim receptorima alfa (3ERT) sa lipofilnošću ispitivanih jedinjenja, izražene kao a) R_M^0 i b) S parametra, dobijenih u hromatografskom sistemu sa acetonitrilom kao komponentom mobilne faze

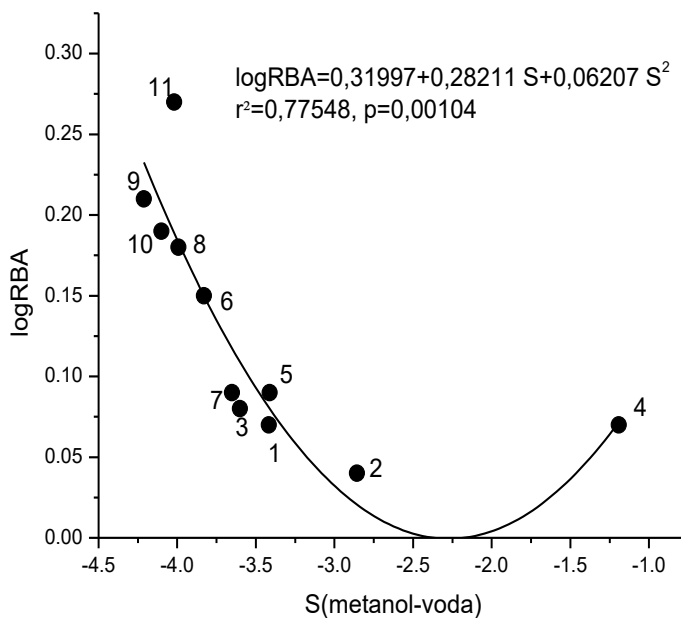
Afinitet za vezivanje za estrogene receptore, izražen kao logRBA je pokazao polinomsku (paraboličnu) zavisnost sa parametrima lipofilnosti R_M^0 i S (Tabela 40). Statistički značajne korelacije su postignute u slučajevima kada su kao organski modifikatori mobilne faze korišćeni metanol i aceton. Grafički prikaz na Slici 22 pokazuje zavisnost afiniteta za estrogene receptore od parametara lipofilnosti R_M^0 i S, dobijenih hromatografskom analizom.

Tabela 40. Korelacije između afiniteta vezivanja za estrogene receptore (logRBA) i parametara lipofilnosti R_M^0 i S (dobijenih u sva tri hromatografska sistema)

logRBA vs R_M^0 i S	jednačina	r^2	p
	metanol-voda		
logRBA = f(R_M^0)	logRBA = 0,03692-0,08894 R_M^0 +0,04866(R_M^0) ²	0,8063	5,76562×10 ⁻⁴
logRBA = f(S)	logRBA = 0,31997+0,28211 S+0,06207 S ²	0,77548	0,00104
	acetonitril-voda		
logRBA = f(R_M^0)	logRBA = 0,0307-0,11909 R_M^0 +0,06379(R_M^0) ²	0,40801	0,0503
logRBA = f(S)	logRBA = 0,30145+0,25814 S+0,05081 S ²	0,22551	0,14738
	aceton-voda		
logRBA = f(R_M^0)	logRBA = 0,00896-0,04393 R_M^0 +0,02769(R_M^0) ²	0,85143	1,99572×10 ⁻⁴
logRBA = f(S)	logRBA = 0,10582+0,08709 S+0,01826 S ²	0,87618	9,6268×10 ⁻⁵



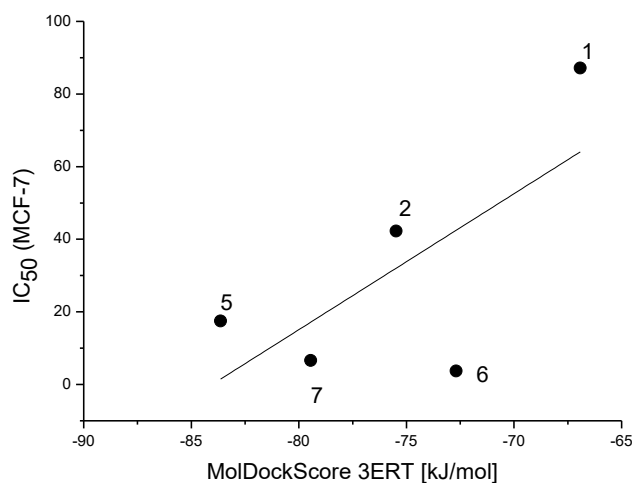
a)



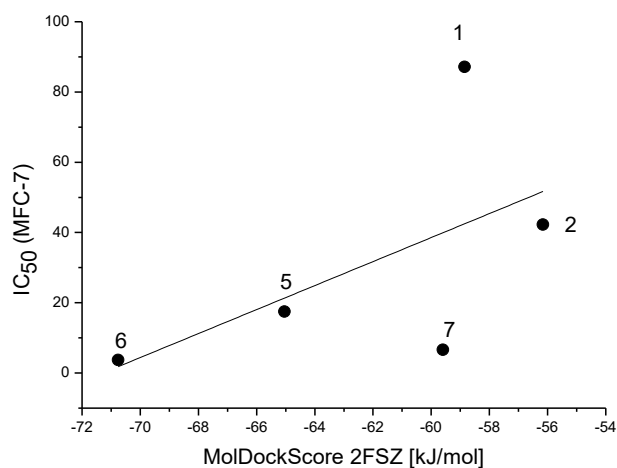
b)

Slika 22. Grafički prikaz zavisnosti afiniteta za estrogene receptore - $\log RBA$ od lipofilnosti ispitivanih jedinjenja, izražene kao a) R_M^0 i b) S parametri, dobijeni u hromatografskom sistemu sa metanolom kao komponentom mobilne faze

Kada je posmatrana zavisnost veličine antiproliferativnog efekta, izraženog kao IC_{50} na ćelijama MCF-7 linije (Tabela 36) od sposobnosti formiranja kompleksa posmatranih jedinjenja sa estrogenim receptorom alfa i estrogenim receptorom beta, izraženog kao MolDock Score (energija formiranja kompleksa) dobijena je linearna korelacija (Slika 23). Korelacija između antiproliferativnog potencijala posmatranih jedinjenja (IC_{50}) i afiniteta za estrogene receptore (logRBA) prikazana je na Slici 24.

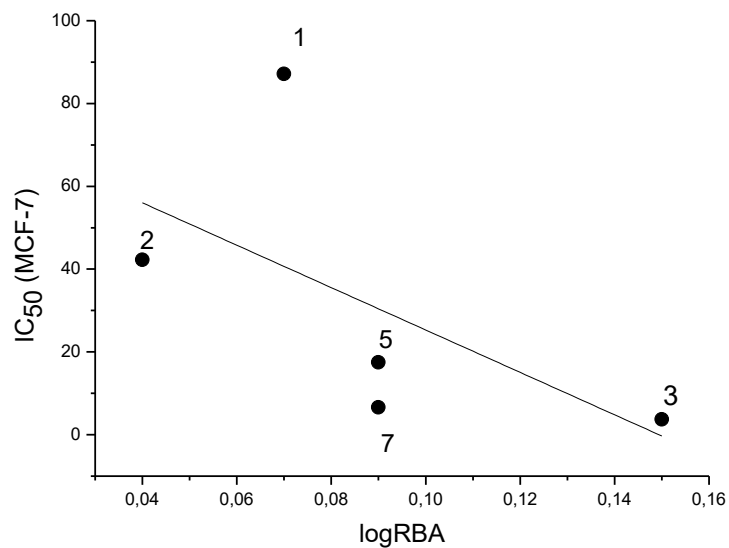


a)



b)

Slika 23. Grafički prikaz zavisnosti citotoksičnog efekta izraženog kao IC_{50} vrednost, najpotentnijih jedinjenja (1, 2, 5, 6 i 7) u odnosu na ćelijsku liniju MCF-7, od energije formiranja kompleksa sa vezivnim mestom (MolDock Score) na estrogenom receptoru: a) alfa i b) beta



Slika 24. Grafički prikaz zavisnosti citotoksičnog efekta, izraženog kao IC_{50} vrednost, najpotentnijih jedinjenja (1, 2, 5, 6 i 7) u odnosu na ćelijsku liniju MCF-7, od afiniteta posmatranih jedinjenja za estrogene receptore, logRBA.

6. Diskusija

6.1. *In silico* parametri

Primenom različitih softverskih paketa dobijene su različite vrednosti logP za ispitivana jedinjenja. Razlike između izračunatih vrednosti logP parametara uglavnom potiču od različitih načina njihovog izračunavanja i algoritama koji se u te svrhe koriste. Neki od izračunatih logP deskriptora baziraju se na fragmentacionom (XlogP2, XlogP3, ACDlogP) a drugi na atomskom pristupu (AClogP, AlogP, MlogP, WlogP). Parametar ilogP uzima u obzir uticaj slobodne energije solvatacije u implicitnim rastvaračima i eksperimentalno određenu vrednost logP u sistemu n-oktanol/voda, koristeći ispitivani set od 17.500 molekula (163). Vrednosti logP svih ispitivanih jedinjenja primenom različitih softverskih paketa variraju od 0,82 do 3,07 (Tabela 3) što ukazuje da sve analizirane supstance pokazuju zadovoljavajuću lipofilnost kao kandidati za lek, pošto većina registrovanih lekova ima ClogP vrednost u opsegu od -1 do 6 (164) (Tabela 4). Jedinjenje **4** kao supstituent ima karboksilnu grupu koja jonizuje zbog čega je vrednost logD, koja uzima u obzir i jonizovane oblike, negativna i iznosi -2,25 (Tabela 4), a jedinjenje **2** koje ima hidroksilnu funkcionalnu grupu koja pod određenim uslovima može da jonizuje ima logD 0,79. Sva ostala jedinjenja imaju logD u opsegu od 0,97 do 1,99 što je u skladu sa zahtevima za buduće kandidate za lek koji imaju logD od 1 do 3 (164). Vrednosti logS ispitivanih jedinjenja variraju od -2,43 do -3,62, a oko 85% lekova na tržištu ima logS vrednost između -1 i -5 (165), i može se reći da ispitivane supstance imaju poželjnu rastvorljivost (Tabela 4). Izuzetak je supstance **4** (logS izvan datog opsega) jer sadrži karboksilnu grupu koja može da jonizuje čime sa molekulima vode formira jon-dipol interakcije i značajno utiče na povećanje rastvorljivosti celog molekula. Molarna masa ispitivanih jedinjenja je između 231 i 296 g/mol što je u skladu sa molarnom masom većine lekova na tržištu iz grupe takozvanih "malih molekula". Broj donora za formiranje vodonične veze i broj akceptora za formiranje vodonične veze u zbiru ne prelazi 6, što garantuje mogućnost interakcije sa molekulima vode, a ne kompromituje lipofilnost molekula. Polarna površina molekula je između 37,38 i 86,21 Å² što je u skladu sa polarnom površinom većine lekova na tržištu iz grupe takozvanih "malih molekula". Broj rotirajućih veza je 2 ili 3 za sva ispitivana jedinjenja. Osim jedinjenja **4** i jedinjenja **2** koja imaju grupu koja može da jonizuje sva ostala

jedinjenja su strukturno konherentna i veoma slična odnosno razlikuju se minimalno u pogledu strukturnih karakteristika.

Dve keto grupe i prisustvo azota kao heteroatoma u strukturi sukcinimida garantuje interakcije sa molekulima vode i poželjnu rastvorljivost. Uvođenje aril grupe u položaju 1 i metil i etil grupe u položaju 3 obezbedilo je hidrofobne delove u ispitivanim molekulima. Aril, etil i metil grupe dovele su i do povećanja lipofilnosti i smanjenja polarne površine ispitivanih molekula što olakšava prolazak kroz biološke membrane. Male strukturne promene načinjene uvođenjem halogena kao što su hlor i brom, zatim metil ili metoksi grupa, kao i cijano i nitro grupa nisu značajno uticale na promenu svojstava molekula, tako da ispitivana jedinjenja imaju veoma slične vrednosti molarne mase, polarne površine i očekivane lipofilnosti. Uvođenjem polarne hidroksilne grupe u strukturi jedinjenja **2**, koja pod određenim uslovima može da jonizuje, a posebno uvođenjem karboksilne grupe u strukturi jedinjenja **4**, koja je u fiziološkim uslovima u potpunosti jonizovana, dolazi do povećanja polarne površine, smanjenja lipofilnog karaktera molekula i povećanja hidrofilnosti, odnosno interakcija sa molekulima vode. Ukoliko se hidroksilna grupa prevede u metoksi grupu, kao kod jedinjenja **3**, dolazi do smanjenja polarnosti molekula, tako da jedinjenje **3** pokazuje karakteristike koje su slične jedinjenju sa metil grupom ili jedinjenjima koja imaju halogene kao supstituente. Uvođenje nitro grupe, koja ima šaržu, u strukturi jedinjenja **7** uticalo je na povećanje polarnosti molekula u poređenju sa strukturnim analogima. Dobijene *in silico* vrednosti fizičko-hemijskih deskriptora odražavaju u potpunosti strukturne promene ispitivanih jedinjenja.

Farmakokinetike i toksikološke karakteristike ispitivanih molekula su rezultat kompleksne interakcije fizičko-hemijskih i biohemijskih svojstava molekula sa biološkom sredinom zbog čega su preostali *in silico* farmakokinetički, toksikološki i parametri biološke aktivnosti prikazani u odgovarajućem poglavju u nastavku.

6.2. Retencione konstante ispitivanih jedinjenja i korelacija sa softverski dobijenim rezultatima za logP, logD i logS

Za 11 novosintetisanih derivata sukcinimida (Tabela1) eksperimentalno su dobijene R_f vrednosti uz pomoć visokoeffikasne hromatografije na tankom sloju (HPTLC), a zatim su izračunate i R_M vrednosti, primenom jednačine 12. Između parametra R_M i udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi postoji linearna zavisnost – jednačina Soczewinskog (jednačina 13). Ekstrapolacijom ove linearne funkcije dobija se R_M^0 (odsečak na y-osi), koji odgovara retenciji rastvorka u čistoj vodi (0% organskog rastvarača) i S (nagib prave), koji reflektuje retenciju rastvorka u organskom rastvaraču pri datim hromatografskim uslovima (166). Dobijeni rezultati za sva ispitivana jedinjenja i za različite kompozicije mobilne faze prikazani su u Tabelama 9-11.

U hromatografskim metodama retencija je posledica interakcija analita sa mobilnom i stacionarnom fazom, ali se moraju uzeti u obzir i interakcije koje postoje između mobilne i stacionarne faze. U ovom ispitivanju korišćena su tri organska modifikatora koji se razlikuju po polarnosti – najpolarniji je metanol, a najmanje polaran aceton. Mehanizam retencije se u adsorpcionoj hromatografiji može objasniti pomoću dva modela. U Snyderovom modelu (167, 168) retencija se objašnjava kompeticijom za aktivna mesta na površini adsorbensa između rastvorka i rastvarača. Tokom prolaska kroz sloj nepokretne faze, jedan deo pokretne faze se adsorbuje na njegovu površinu. Do retencije rastvorka dolazi onda kada njegovi molekuli, nošeni mobilnom fazom, istisnu adsorbovane molekule rastvarača sa površine adsorbensa i zauzmu njihova mesta. Scott i Kucer (169-172) predlažu interakcioni mehanizam retencije u hromatografskim analizama, u kojem se u prvi plan stavljaju interakcije između rastvorka i rastvarača. Prema ovom modelu, ako pokretna faza sadrži malu količinu polarnog rastvarača (oko 0,5%) taj polarni rastvarač se vezuje u monomolekularnom sloju za površinu stacionarne faze. Tada se retencija svodi na kompeticioni - Snyderov model, i posledica je istiskivanja molekula rastvarača molekulima rastvorka. Ako je koncentracija organske komponente polarne faze veća, dolazi do nepotpunog formiranja drugog sloja rastvarača. U tom slučaju, retencija se javlja kao posledica asocijacije molekula rastvorka sa kompletno formiranim monoslojem rastvarača, bez potrebe istiskivanja molekula rastvarača drugog sloja.

Rezultati izloženi u Tabelama 9-11 pokazuju da su R_M^0 vrednosti iste komponente, izračunate za različite mobilne faze, različite. Razlog tome je zavisnost parametra R_M^0 od prirode organskog modifikatora. Ako se uporede vrednosti R_M^0 dobijene kada se primene metanol i acetonitril, može se videti da većina analiziranih jedinjenja ima nešto veće R_M^0 vrednosti u metanolu. Slabija eluciona moć metanola u odnosu na acetonitril i veći afinitet analita prema stacionarnoj fazi (u kojoj se duže zadržavaju), odnosno istiskivanje metanola sa aktivnih mesta na nepokretnoj fazi (kompeticioni mehanizam) uzrok su većih R_M^0 vrednosti dobijenih u acetonitrilu u odnosu na one dobijene u metanolu. Kada se aceton nađe u sastavu mobilne faze, zbog jače adsorpcije za stacionarnu fazu, u odnosu na adsorpciju koju pokazuju polarniji modifikatori - acetonitril i metanol, analiti pokazuju veći afinitet za aceton-solvatisani ugljovodonični deo stacionarne faze, retencija je jača, a R_M^0 vrednosti veće. Iz rezultata u Tabelama 9-11 se takođe uočavaju razlike u vrednostima S (nagiba prave). Pretpostavlja se da je S vrednost povezana sa hidrofobnom površinom molekula koja interaguje sa nepolarnom stacionarnom fazom (173). Niže S vrednosti (manji nagib prave) u slučaju primene acetona i acetonitrila u mobilnoj fazi se objašnjavaju interakcionim mehanizmom, kao što je prethodno objašnjeno. Mobilne faze aceton-voda i acetonitril-voda manje su osetljive na promene u strukturi komponenata u odnosu na metanol-voda pokretnu fazu.

Odstupanje od uočenih i opisanih zavisnosti (Tabele 9-11) je povezano sa činjenicom da osim sastava mobilne faze, na retenciju utiče i sama priroda analita. U RP-HPTLC primenjenoj metodi retencija je pretežno posledica hidrofobnih interakcija između analita i nepolarne stacionarne faze (174). U skladu sa tim, očekuje se da veću retenciju pokazuju lipofilnija jedinjenja. Najjaču retenciju imaju jedinjenja **8-11** (Tabele 9-11) sa halogenom (Br ili Cl) u svojoj strukturi (najveće R_M^0 vrednosti). Na osnovu malih razlika u R_M^0 vrednostima među njima, može se zaključiti da položaj halogenog supstituenta ima mali uticaj na lipofilnost. Na osnovu R_M^0 vrednosti iz Tabela 9-11 supstituenti koji povećavaju retenciju, odnosno imaju lipofilni karakter su -Br, -Cl, -CH₃. Supstituenti koji značajno smanjuju retenciju su -OH i -COOH grupe.

Supstanca 1 je nesupstituisani derivat i logično je da uvođenje polarnih supstituenata (-OH, -COOH, -OCH₃, -CN, -NO₂) smanjuje retenciju, odnosno smanjuje lipofilnost, i obrnuto, na šta ukazuje promena R_M^0 sa pomenutim strukturnim modifikacijama (Tabele 9-11).

Linearne korelacije dobijene između R_M^0 i S parametra (Tabele 12 i 13) su očekivane, s obzirom da se radi o seriji jedinjenja koja se razlikuju samo po jednom supstituentu u svojoj

strukturi. Parametar S, koji se dobija egzaktno, može se smatrati alternativnim parametrom lipofilnosti. Retencione konstante R_M^0 i S su obrnuto srazmerne zbog čega će sve njihove korelacije sa različitim parametrima izgledati kao likovi u ogledalu, odnosno ako je korelacija sa parametrom R_M^0 upravo srazmerna, sa parametrom S će biti obrnuto srazmerna.

Na osnovu rezultata datih u Tabelama 9-11 može se primetiti da su R_M^0 vrednosti (kao i S vrednosti) iste komponente različite za različite mobilne faze, kao što je prethodno već konstatovano. Međusobne korelacije R_M^0 vrednosti za istu komponentu, ali za različite mobilne faze pokazuju linearnu zavisnost, sa visokim vrednostima koeficijenata korelacije (Tabela 14). Isto važi i u slučaju kada se razmatra zavisnost S vrednosti iste komponente u različitim hromatografskim sistemima (Tabela 15). Na osnovu toga se može zaključiti da su R_M^0 i S vrednosti dobijene u bilo kom od analiziranih hromatografskih sistema relevantne i mogu se ravnopravno koristiti.

Retencione konstante R_M^0 i S korelirane su sa različitim vrednostima za logP (Tabela 3), a njihove zavisnosti su date u Tabelama 16 i 18.

Najrelevantniji parametar za opisivanje lipofilnosti je eksperimentalno određena vrednost logP. Kako je ovaj postupak zahtevan i slabo reproducibilan, za deklarisanje lipofilnosti se koriste alternativni deskriptori R_M^0 i S, dobijeni hromatografskim metodama.

Najbolje linearne korelacije su postignute između retencionog parametra R_M^0 i ClogP, odnosno MlogP, kao *in silico* dobijenih parametara lipofilnosti. ClogP je standardni parametar lipofilnosti, koji se odnosi na sistem n-oktanol/voda, a MlogP (Moriguchi parametar) uzima u obzir sumu ugljenika i halogena, kao atoma koji doprinose lipofilnom karakteru jedinjenja, i sumu atoma azota i kiseonika, kao hidrofilnih atoma (65). Od svih *in silico* izračunatih vrednosti logP, MlogP koji uzima u obzir sumu ugljenika i halogena, najbolje korelira sa retencionim parametrima analiziranih sukcinimida. *In silico* izračunati logaritmi particionog koeficijenta se slaže sa eksperimentalno dobijenim retencionim hromatografskim parametrima.

Odstupanje koje pokazuje jedinjenje **4** sa karboksilnom grupom u strukturi (Slika 3 i 4) se objašnjava njenom kiselom prirodom, zbog čega disocira i stupa u interakciju sa mobilnom (polarnijom) fazom, a slabije se zadržava na stacionarnoj fazi koja je manje polarna. Time se narušava statistička značajnost dobijenih regresionih jednačina (Tabela 17 i 19). Karboksilna funkcionalna grupa (-COOH) smanjuje lipofilni karakter jedinjenja. Isti efekat je slabije izražen

kada su u pitanju supstanca **2** (sadrži -OH grupu kao supstituent) i supstanca **3** (sa -OCH₃ supstituentom).

Za supstance **2** i **4** (slabe kiseline), koje pokazuju određeni stepen disocijacije u zavisnosti od pH sredine, distribucija između dve faze u hromatografskom sistemu zavisi upravo od pH vrednosti. U kiseloj sredini će, zbog suzbijanja disocijacije, dominantno biti prisutan molekulski, nejonizovani oblik, koji ima lipofilni karakter, pa prema tome i veći afinitet za stacionarnu fazu, u odnosu na jonizovanu, hidrofilnu formu. U baznoj sredini je situacija obrnuta. Distribucionni koeficijent, logD je parametar koji uzima u obzir obe forme - neutralnu i jonizovanu. Zavisnost R_M^0 i S od logD je linearna i ima statistički veću značajnost, bez potrebe za eliminacijom bilo koje od razmatranih supstanci (supstanca 4 se dobro uklapa u statistiku) (Tabela 20, Slika 5). Kao stacionarna faza za analizu korišćene su RP-18 W nano silika ploče sa modifikovanim oktadecilom koje su kvašljive u vodi (W-wettable). Može se pretpostaviti da zbog moguće interakcije jedinjenja **2** i naročito jedinjenja **4**, koja imaju proton donorsku grupu i mogućnost da grade vodoničnu vezu sa kvašljivom stacionarnom fazom, dolazi do značajnog odstupanja R_M^0 vrednosti jedinjenja **4** od izračunatih logP vrednosti i boljeg slaganja sa vrednostima logD. Čelijska membrana osim fosfolipidnog dvosloja takođe sadrži i holesterol i proteine koji su kvašljivi i dobijene hromatografske konstante primenom RP-18 W stacionarne faze možda čak i bolje reflektuju raspodelu jedinjenja u biološkim sistemima od logP. Iako ne postoji konsenzus koje stacionarne faze najbolje prikazuju particiju jedinjenja u živim organizmima, hromatografska merenja nisu samo surogat za sistem n-oktanol/voda već se smatraju i boljim modelom za procese particije u biološkim sistemima (175, 176).

Korelacija rastvorljivosti supstanci u vodi *in silico* modelima izračunata kao logS sa retencionim parametrima R_M^0 i S daje statistički značajne linerane zavisnosti (Tabela 21, Slika 6) koje pokazuju da rastvorljivost linearno opada sa porastom lipofilnosti. Dobijeni podaci su očekivani i u skladu sa empirijskim pravilom Yalkowsky i Banerjee (jednačina 3).

Statistički značajne upravo proporcionalne zavisnosti parametra S sa *in silico* dobijenim logP i logD i statistički značajne obrnuto proporcionalne zavisnosti sa *in silico* dobijenim logS vrednostima (Tabele 16-21) su takođe očekivanje jer se nagib S može posmatrati kao alternativna mera lipofilnosti jedinjenja.

6.3. Retencione konstante ispitivanih jedinjenja u korelaciji sa *in silico* dobijenim farmakokinetičkim deskriptorima

U radu je analizirana potencijalna korelacija farmakokinetičkih parametara sa lipofilnošću jedinjenja. U tom cilju su konstanta apsorpcije (K_a), volumen distribucije (V_d), procenat vezivanja za proteine plazme (PPB) i logaritam podeonog koeficijenta između krvi i mozga ($\log BBB$), kao farmakokinetički deskriptori, korelirani sa parametrima lipofilnosti R_M^0 i S , eksperimentalno određenim hromatografskom metodom.

Konstanta apsorpcije (K_a) ukazuje na brzinu apsorpcije leka kroz fosfolipidni dvosloj enterocita (177). Za sva ispitivana jedinjenja određene su vrednosti konstante apsorpcije primenom softverskih paketa (Tabela 5) i dobijene su očekivano niske vrednosti (između $0,054$ i $0,059 \text{ min}^{-1}$). To znači da jedinjenja imaju kratko poluvreme apsorpcije, što garantuje nesmetani prolazak kroz apsorptivnu površinu intestinalnog trakta. Izuzetak je jedinjenje **4** ($K_a = 0,003$), koje zbog karboksilne grupe u strukturi i jonizacije u crevnim fluidima, kao i mogućnosti građenja vodoničnih veza sa vodom ima smanjen lipofilni karakter i sporije se apsorbuje kroz lipidnu barijeru u intestinalnom traktu. Na osnovu malih razlika između konstanti apsorpcije ispitivanih derivata sukcinimida (položajni izomeri imaju iste K_a vrednosti), pretpostavlja se da na apsorpciju u najvećoj meri utiče hidrofobno jezgro, a ne vrsta supstituenata. Procenjuje se da se oko 95% lekova na tržištu apsorbuje procesom pasivne difuzije (178), vođenim hidrofobnim interakcijama između molekula leka i fosfolipidnog dvosloja epitelnih ćelija različitih delova gastrointestinalnog trakta (179), jer proces apsorpcije zavisi od lipofilnosti molekula. Zavisnost konstante apsorpcije (K_a) od parametara lipofilnosti, determinisanih retencionim konstantama R_M^0 i S , opisana je paraboličnom funkcijom – obrnuta parabola (Slika 7, Tabela 22). Može se zaključiti da stepen apsorpcije, do određene granice, raste sa porastom lipofilnosti, tj. sa porastom R_M^0 , a zatim pokazuje tendenciju opadanja. Razlog tome je pad rastvorljivosti supstanci sa daljim porastom lipofilnosti. Ovakav rezultat potvrđuje da je za apsorpciju kroz membranu enterocita neophodno postići odgovarajuću rastvorljivost, ali i lipofilnost jedinjenja kandidata za lek.

Volumen distribucije (V_d) predstavlja stepen particije supstance između plazme i tkiva. Za lekove koji ne napuštaju cirkulaciju, kao i za lekove koji se snažno vezuju za proteine plazme, V_d se kreće od $0,05$ do $0,2 \text{ L/kg}$ telesne mase (TM), a visok volumen distribucije (veći od 5 L/kg

TM) znači da je supstanca izrazito lipofilna i da postoji opasnost od akumulacije u lipidnom depou, što produžava njenu ekskreciju (177, 180). U Tabeli 5 su date V_d vrednosti za ispitivane supstance izračunate primenom i-lab 2.0 softverskog paketa. Ispitivani sukcinimidi imaju umeren volumen distribucije ($V_d < 2$ L/kg TM), što se objašnjava neutralnošću molekula leka koji u svojoj strukturi ne sadrže kiselu ($pK_a < 7,5$), kao ni baznu ($pK_a > 7$) grupu (181). S druge strane, vrednost V_d supstance **4** je mala (0,28 L/kg), jer je reč o kiselini, koja u plazmi jonizuje i kao takva se ne akumulira u masnom tkivu, a samo nejonizovana forma može da prolazi kroz biološke membrane. Prilikom dovođenja u korelaciju V_d sa R_M^0 (Slika 8, Tabela 23) dobijena je statistički značajna zavisnost koja pokazuje da volumen distribucije linearno raste sa porastom lipofilnosti jedinjenja.

Ispitivani sukcinimidi pokazuju relativno slab afinitet vezivanja za proteine plazme (Tabela 5). Sa povećanjem lipofilnosti i kiselosti ispitivanih jedinjenja povećava se njihov afinitet za vezivanje za proteine plazme (Slika 9). Supstanca **4** koja ima karboksilnu grupu pokazuje najveći afinitet vezivanja za proteine plazme, kao i supstance **8-11**, koje predstavljaju jedinjenja sa najvećom lipofilnošću. Albumini koji su dominantna proteinska frakcija u plazmi, vezuju pre svega neutralne i kisele supstance. Osim toga, proces vezivanja za proteine plazme može se posmatrati kao raspodela između polarne mobilne faze (krvne plazme u kojoj 90% čini voda) i manje polarne stacionarne faze (proteina), zbog čega je upravo lipofilnost ograničavajući faktor. Zavisnost stepena vezivanja za proteine plazme od lipofilnosti, tj. retencionih parametara R_M^0 i S prikazana je grafički na Slici 9 i u Tabeli 24 u vidu parabolične funkcije, gde sa smanjenjem kiselosti opada afinitet vezivanja za proteine plazme, a zatim sa povećanjem lipofilnosti, taj afinitet iznova raste. Dobijene regresije nemaju idealne koeficijente korelacije ($r^2 < 0,9$), što se tumači činjenicom da na vezivanje za proteine plazme utiču i drugi faktori, poput polarnosti, fleksibilnosti, veličine molekula itd. Jedinjenje sa nitro grupom (jedinjenje **7**), iako se dominantno vezuje za lipoproteine, ne odstupa od prikazne tendencije (Slika 9, Tabela 24).

Sposobnost prolaska supstance iz cirkulacije u moždano tkivo može se proceniti na osnovu krvno-moždanog podeonog koeficijenta ($\log BBB$). S obzirom da se radi o raspodeli između krvi i mozga, pretpostavlja se da je permeacija favorizovana za lipofilnija jedinjenja (182). Za supstance čija je $\log BBB$ od 1 do 0 se smatra da imaju dobru prolaznost kroz ovu barijeru. Za sve ispitivane supstance može se očekivati permeacija u moždano tkivo, osim za supstance **2**, **4** i **7** (Tabela 5). Supstanca **4**, zbog postojanja kisele karboksilne grupe, jonizuje u plazmi i u tom obliku ne može pasivnom difuzijom da prođe kroz hematoencefalnu barijeru. Supstanca **2** zbog

postojanja hidroksilne grupe, kao dodatne hidrogen donorske grupe, može da gradi vodonične veze sa vodom, čime se objašnjava odstupanje. Supstanca **7** ima nitro grupu kao supstituent na benzenovom prstenu u položaju 4 što ukazuje na postojanje jonizovane forme u plazmi. Raspodela supstance između plazme i mozga, izražena kroz parametar logBBB zavisi od lipofilnosti ispitivanog jedinjenja, tj. R_M^0 i S parametara, kao što je prikazano na Slici 10 i sumirano u Tabeli 25. S obzirom da su dobijene linearne regresije sa ne tako idealnim koeficijentima korelacije ($r^2 = 0,6-0,7$) (Tabela 25), može se pretpostaviti da se ne može zamemariti uticaj drugih parametara, poput veličine molekula, polarne površine, rastvorljivosti. Koreliranjem parametra logBBB sa parametrima R_M^0 i PSA, dobija se višestruka linearna regresija, koja je statistički značajna, ali ne donosi očekivano povećanje u odnosu na linearnu korelaciju (Tabela 26).

Uvođenje dodatnih promenljivih kao što je molarna masa koja određuje veličinu molekula takođe daje statistički značajne višestruke korelacije, ali se opet ne uočava veliko poboljšanje statističkih parametara u odnosu na korelaciju samo sa lipofilnošću molekula. I veličina molekula (izražena kao molarna masa) i polarnost molekula (izražena kao polarna površina) imaju uticaj na prolaznost kroz krvno-moždanu barijeru ali je za ovaj set strukturno sličnih jedinjenja, lipofilnost dominantan faktor.

6.4. Empirijska pravila

Pravilo Lipinskog se koristi za predviđanje resorpcije lekova nakon oralne primene. Potrebno je da supstanca ispunjava najmanje tri od četiri navedena kriterijuma, da bi se pretpostavilo da će imati dobru apsorpciju. Sve ispitivane supstance, na osnovu molekulskih deskriptora datih u Tabeli 4, ispunjavaju sve postavljene kriterijume, što znači da se očekuje dobra apsorpcija nakon oralne aplikacije (151).

Pravilo Vebera ističe značaj drugih kriterijuma, poput polarne površine i fleksibilnosti molekula, kao ključnih faktora koji određuju sposobnost prolaska kroz fosfolipidnu barijeru intestinalnog trakta. Resorpcija je bolja za nepolarne molekule jer velika polarna površina čini interakciju sa lipidnim dvoslojem otežanom. Supstance sa manjim brojem rotirajućih veza se bolje apsorbuju. Uvidom u molekulske deskriptore izložene u Tabeli 4, može se zaključiti da sve

ispitivane supstance zadovoljavaju oba kriterijuma po Veberu, što potvrđuje njihovu dobru oralnu bioraspoloživost. Sva jedinjenja iz ispitivane serije sukcinimida zadovoljavaju sve kriterijume pravila po Eganu (133), pa je i prema SWISSADME takođe predviđena dobra gastrointestinalna apsorpcija i visoka bioraspoloživost.

Sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru se može predvideti na osnovu Klarkovih pravila. Analizom rezultata iz Tabele 27, vidi se da većina supstanci ne odstupa od Klarkovih pravila 1 i 4, ali sve supstance odstupaju od pravila 2, koje povezuje ClogP i ukupan broj atoma N i O u molekulu, što znači da dominira hidrofilni u odnosu na lipofilni doprinos. Supstanca **2** u položaju 4 na benzenovom prstenu kao supstituent ima –OH grupu, koja na fiziološkoj pH vrednosti delimično disocira, a supstanca **5** u istom položaju ima –CN grupu, koja je jonizovana na pH 7,4. Zbog toga obe supstance odstupaju od pravila 5 (pokazuju logD vrednost izvan propisanog intervala), čime je smanjen njihov lipofilni karakter i otežan prolazak kroz membranu u strukturi BBB. Supstance **4** i **7** ne ispunjavaju po tri zahteva. Supstanca **4**, kao što je ranije opisano, sadrži –COOH grupu (slaba kiselina), zbog čega je disocirana na fiziološkom pH, čime je smanjena njena rastvorljivost u lipidima i prolazak kroz biološke membrane. Osim toga, ovo jedinjenje ima i nešto veću PSA, što takođe govori u prilog prethodnoj konstataciji. U slučaju supstance **7** sa –NO₂ supstituentom u položaju 4 na benzenovom prstenu, dominantni su faktori veće PSA i sposobnosti građenja vodonične veze.

Za većinu supstanci iz ove serije ne može se isključiti sposobnost prolaska kroz BBB, samo na osnovu empirijskih pravila. Manja verovatnoća prolaska u mozak pretpostavlja se za supstance **2**, **4**, **5** i **7**.

Sva ispitivana jedinjenja zadovoljavaju Muegge-ova (138) i Ghose-ova (139) pravila za odabir najboljih kandidata za dalja ispitivanja.

Oprea pravila treba da usmere odabir jedinjenja sa najvećim izgledom, tj. potencijalom da bude novi lek. Ispitivane supstance zadovoljavaju skoro sve zadate kriterijume i sve supstance zadovoljavaju kriterijume 1-4. Od pravila 5 odstupaju supstance **2**, **3**, **4**, **5**, **7**, jer poseduju polarne supstituente što im daje sposobnost građenja vodonične veze, a time se narušava prolaz kroz biološke membrane (Tabela 28). Supstance **4**, **5** i **7** zbog veće polarne površine jače interaguju sa polarnom fazom. Nesupstituisano jedinjenje **1** i derivati sa halogenim supstituentima (**8-11**) se, kao jedinjenja najveće lipofilnosti, izdvajaju kao vodeći potencijalni kandidati za lekove.

6.5. Korelacija retencionih konstanti sa *in silico* dobijenim toksikološkim deskriptorima

Svi kandidati za lekove moraju da poseduju zadovoljavajući bezbednosni profil, koji je teško predvideti, jer toksičnost može biti specifična za vrstu ili organ, zavisna od više faktora u organizmu ili pak uslovljena hroničnom primenom (183). U Tabeli 6 su date *in silico* vrednosti toksikoloških parametara LD₅₀ ispitivanih derivata sukcinimida. Ukoliko date vrednosti uporedimo sa pokazateljima toksičnosti strukturno sličnih jedinjenja, već registrovanih lekova: etosukcimid (184), i metsukcimid (185) (Tabela 41), može se zaključiti da su dobijene LD₅₀ vrednosti prihvatljive, jer nisu značajno veće od toksičnosti lekova u prometu. Supstanca **2** čak ima manju toksičnost pri peroralnoj aplikaciji na miševima i pacovima u odnosu na etosukcimid, a supstanca **4** pokazuje manju toksičnost nakon oralne aplikacije pacovima u odnosu na isti lek. Obe supstance (**2** i **4**), zbog hidrofilnih supstituenata i slabije izraženog lipofilnog karaktera teže prolaze kroz lipidne barijere u organizmu. Kada se poređenje izvrši sa metsukcimidom, supstanca **5** poseduje nešto veći toksični potencijal na miševima i pacovima pri peroralnoj aplikaciji, dok svi ostali derivati imaju manju toksičnost. Dobijene LD₅₀ vrednosti nisu značajno veće od toksičnosti već odobrenih lekova i može se pretpostaviti prihvatljiva toksičnost ispitivanih jedinjenja. Prodor leka do mesta ispoljavanja toksičnog efekta zavisi od prelaska leka iz jednog kompartmana u drugi kroz biološke membrane, zbog čega se može pretpostaviti da LD₅₀ zavisi od lipofilnosti jedinjenja. Kada su parametri lipofilnosti (R_M^0 i S) korelirani sa LD₅₀ vrednostima dobijena je parabolična funkcija u slučaju intravenske i subkutane aplikacije kod miševa (Slike 11 i 12, Tabele 29 i 30). Sa povećanjem lipofilnosti povećava se i toksičnost, odnosno manje su vrednosti LD₅₀, što je u skladu sa činjenicom da lipofilnija jedinjenja lakše prolaze kroz membranu i dospevaju do mesta ispoljavanja toksičnih efekata.

Tabela 41. Deskriptori toksičnosti (LD₅₀) za neke registrovane lekove

lek	LD ₅₀ (mouse,p.o.) (mg/kg)	LD ₅₀ (mouse,i.v.) (mg/kg)	LD ₅₀ (mouse,s.c.) (mg/kg)	LD ₅₀ (mouse,i.p.) (mg/kg)	LD ₅₀ (rat,p.o.) (mg/kg)
etosukcimid	1530	780	1810	1752	1950
metsukcimid	900-1450	-	-	-	960

Sa aspekta zaštite životne sredine u radu je bilo interesantno da se analizira akvatična toksičnost ispitivanih jedinjenja primenom *in silico* parametara, odnosno podataka o srednjoj letalnoj koncentraciji (LC_{50}) na vrstama vodenih račića (*Daphnia magna*) i riba (*Pimephales promelas*) (Tabela 7). U procesu razvoja novih lekova neophodno je imati na umu činjenicu da lekovi i njihovi metaboliti dospevaju u životnu sredinu i mogu delovati kao polutanti, te se u razvojnom procesu teži da se takav njihov potencijal svede na minimum. Na osnovu vrednosti pomenutih parametara iz tabele, može se zaključiti da je najmanje toksična po biom vodenih ekosistema supstanca **4** (najveće vrednosti LC_{50}). Zavisnost pokazatelja LC_{50} sa parametrima lipofilnosti (retencionim konstantama R_M^0 i S) daje statistički značajnu linearnu korelaciju, ali obrnuto proporcionalnu (Tabele 31-33). Sa grafičkog prikaza na Slici 13 se vidi da supstance **2** i **4** odstupaju u većoj meri od ove linearne zavisnosti, što se objašnjava hidrofilnim karakterom njihovih supstituenata (-OH i -COOH). Pretpostavlja se da akvatična toksičnost obrnuto proporcionalno zavisi od lipofilnosti, jer se sa porastom lipofilnosti jedinjenja smanjuje njihova rastvorljivost u vodenoj sredini, i time postaju manje dostupne. Poređenjem LC_{50} vrednosti za ove dve vrste, primećuje se da su ispitivane supstance većinom bezbednije po organizme na višem stupnju razvoja (*Pimephales promelas*) (veće vrednosti LC_{50}), sa izuzetkom supstanci **4**, **7**, **9** i **11**. Može se pretpostaviti da u organizmu vrsta na višem stupnju razvoja dolazi do transformacija u manje toksične metabolite. Za supstance **9** i **11**, koje predstavljaju položajne izomere, pretpostavlja se da je Br, prisutan kao supstituent, uz najveću lipofilnost ovih derivata, verovatan razlog za ispoljavanje veće toksičnosti. Supstanca **7** sadrži -NO₂ grupu u svojoj strukturi. Nitrati u organizmu mogu delovati na dva načina: akutno (izazivaju methemoglobinemiju, tako što se redukuju u digestivnom traktu u nitrite koji potom dovode do oksidacije gvožđa u hemoglobinu, onemogućujući prenos kiseonika) i hronično (pojava karcinoma, kao rezultat izloženosti nitrozaminima, nastalim u reakciji nitrata sa aminima prisutnim u organizmu) (186).

Supstance sa najvećom akvatičnom toksičnošću su derivati **2**, **7-11**.

6.6. Korelacije retencionih parametara sa afinitetom za vezivanje za različite vrste receptora

Imajući u vidu da lek ostvaruje svoje biološko dejstvo vezujući se za specifične receptore, može se reći da je vezivanje za ostale vrste receptora razlog ispoljavanja nepoželjnih efekata. Iz tog razloga se za ispitivanu seriju jedinjenja ne očekuje vezivanje za GCPR, Ion, Kin, NRL, što potvrđuju negativne vrednosti ovih parametara dobijene *in silico* istraživanjem (Tabela 8). Afinitet za vezivanje za određene proteinske strukture najčešće ne zavisi samo od lipofilnosti. U slučaju ispitivanih jedinjenja nije utvrđena statistički značajna korelacija između promene lipofilnosti i afiniteta za vezivanje za GCPR, Ion i Kin (Tabele 34 i 35). Iako je za vezivanje za nuklearne receptore potrebno da supstanca prođe kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane i uđe u citoplazmu, kako bi se reverzibilno vezala za receptore na jezgru, za posmatrane derivate sukcinimida sa povećanjem lipofilnosti jedinjenja afinitet vezivanja za nuklearne receptore opada (Slika 14). Nuklearni receptori su izrazito polarni proteini koji sadrže N-terminalni domen, domen za vezivanje DNK bogat cinkom, domen za vezivanje za ligande i C-terminalni region. Najverovatnije zbog naglašene polarnosti ovih receptora, afinitet vezivanja ispitivanih jedinjenja za iste proporcionalno opada sa povećanjem njihove lipofilnosti.

6.7. Antiproliferativna aktivnost

Jedinjenja koja pri niskim koncentracijama značajno smanjuju proliferaciju tumorskih ćelija predstavljaju neophodan preduslov za uspešan razvoj novih, efikasnijih terapeutika za lečenje obolelih od malignih bolesti. Antiproliferativna aktivnost, odnosno sposobnost nekog jedinjenja da smanji broj ćelija u kulturi u odnosu na kontrolu kvantitativno se izražava u procentima za određenu koncentraciju. Na osnovu dozne zavisnosti citotoksičnog efekta mogu se izvesti zaključci o antiproliferativnoj aktivnosti ispitivanog jedinjenja. Efikasnost inhibicije proliferacije tumorskih ćelija ispitivanih jedinjenja tokom određenog perioda izražava se IC_{50} vrednošću (*eng. Inhibitory Concentration*), a definisana je kao koncentracija ispitivane supstance koja broj tretiranih ćelija u datom vremenu smanjuje za 50% u odnosu na netretiranu kontrolu. Vrednosti IC_{50} su određene Median effect analizom (186). Na osnovu IC_{50} vrednosti moguće je

uporediti efikasnost različitih jedinjenja na istoj ćelijskoj liniji. Iako ne postoji strogo definisana klasifikacija jedinjenja na osnovu veličine citotoksičnog odgovora, među naučnom populacijom su prihvaćeni određeni stavovi u vezi kvantifikacije antiproliferativnog (citotoksičnog) efekta. Po tim smernicama, ukoliko je IC_{50} vrednost niža od $10 \mu M$, smatra se da to jedinjenje pokazuje dobru citotoksičnost. Ako je IC_{50} u intervalu $10-100 \mu M$, supstanca pokazuje umeren do slab citotoksični efekat, dok su jedinjenja sa $IC_{50} > 100 \mu M$ praktično neaktivna u smislu citotoksičnosti.

U ovom radu antiproliferativna aktivnost derivata sukcinimida ispitana je *in vitro* kolorimetrijskim testom u kome se koristi tetrazolijumova so MTT (148, 153, 188). Kulture pet humanih ćelijskih linija karcinoma i jedne ćelijske linije zdravih fibroblasta pluća u mikrotitar pločama izložene su delovanju ispitivanih 11 jedinjenja tokom 48 sati, u rasponu koncentracija od $0,01$ do $100 \mu M$. Izmereni citotoksični efekti jedinjenja poređeni su sa kontrolnim uzorcima netretiranih ćelija.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 36 zaključuje se da pojedini derivati sukcinimida pokazuju snažnu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama MCF-7 i A549, i delimično prema ćelijskim linijama MDA-MB-231 i HT-29.

Prema MCF-7 ćelijskoj liniji estrogen receptor pozitivnog (ER-pozitivnog) adenocarcinoma dojke jedinjenja **1**, **2** i **5-7**, su pokazala snažniji ili umeren antiproliferativni efekat nakon 48h inkubacije, dok su ostala jedinjenja praktično bila neaktivna. Najsnažnija citotoksičnost na ovoj liniji registrovana je za jedinjenja **6** i **7**, sa IC_{50} vrednostima manjim od $10 \mu M$ (Slika 15).

Ćelijska linija estrogen- i progesteron-receptor negativnog (ER-negativan, PR-negativan) adenocarcinoma dojke (MDA-MB-231) se pokazala kao linija na kojoj najveći broj ispitivanih derivata sukcinimida pokazuje umeren citotoksični efekat. Jedinjenja **1**, **3**, **4**, **8** i **11**, sa vrednostima IC_{50} manjim od $25 \mu M$ se mogu smatrati citotoksičnim, dok jedinjenje **2** prema ovim tumorskim ćelijama pokazuje umerenu citotoksičnost (Slika 19).

Uticao na ćelije HeLa je bio slabiji – samo jedinjenja **3** i **4** ispoljavaju umereno citotoksično dejstvo, dok je jedinjenje **1** slabije citotoksično (Slika 17).

Kada je reč o ćelijama linije HT-29 (ćelije humanog karcinoma kolona) može se smatrati da značajno citotoksično dejstvo imaju supstance **1**, **5** i **6**, umerena citotoksična aktivnost je zabeležena u slučaju jedinjenja **7**, dok je jedinjenje **3** slabije citotoksično (Tabela 36, Slika 18).

U odnosu na ćelijsku liniju A549 jedinjenje **11** je ispoljilo snažan citotoksičan efekat, dok se umereno citotoksičnim mogu smatrati jedinjenja **3** i **10** (Slika 16). Supstanca **9**, koja je položajni izomer jedinjenja **11** pokazuje slabu citotoksičnu aktivnost na ovoj ćelijskoj liniji.

Treba naglasiti da nijedno od ispitivanih jedinjenja nije bilo aktivno prema zdravoj ćelijskoj liniji fibroblasta pluća (MRC-5) (Tabela 36). Osim veoma slabog citotoksičnog efekta svih ispitivanih jedinjenja, uticaj na ove ćelije se u slučaju jedinjenja **2** i **7** karakterisao nelinearnim odgovorom. Ovakav rezultat vodi pretpostavci da su ispitivana jedinjenja bezbedna.

Jačina antiproliferativnog efekta na različitim ćelijskim linijama zavisi od ispitivanih jedinjenja i od njihove koncentracije. Najveći efekti citotoksičnosti ostvareni su pri najvišim koncentracijama, od 100 μM . Najsnažnija citotoksičnost od 70,64% postignuta je na MCF-7 ćelijskoj liniji sa jedinjenjem **7** posle tretmana od 48h u koncentraciji od 100 μM (Slika 15). Citotoksičnost manja od 60% za isto vreme izlaganja zabeležena je za supstancu **6** na MCF-7 ćelijama i supstancu **11** na A549 ćelijama.

Ćelijske linije oba tipa karcinoma dojke, MCF-7 i MDA-MB-231, tretirane su tokom 48h ispitivanim derivatima sukcinimida, u rasponu koncentracija od 0,01 do 100 μM . Ispitivana jedinjenja su imala različit efekat na ćelijske linije ova dva tipa karcinoma dojke, različita po prisustvu steroidnih-estrogenih receptora. Na MCF-7 ćelijama estrogen receptor pozitivnog karcinoma dojke čak dva derivata (jedinjenje **6** i **7**) su pokazala snažnu aktivnost nakon 48h. Jedinjenja **2** i **5** su takođe bila aktivna, a jedinjenje **1** je pokazalo slabu citotoksičnost. Ostala ispitivana jedinjenja nisu delovala na MCF-7 ćelije. Antiproliferativna aktivnost sedam jedinjenja iz ispitivane serije je zabeležena na MDA-MB-231 ćelijama estrogen- i progesteron-receptor negativnog karcinoma dojke, nakon 48h tretmana. Jedinjenja **1**, **3**, **4**, **8** i **11** su ispoljila najjaču aktivnost (IC_{50} manje od 25 μM), dok su jedinjenja **2** i **5** delovala umereno citotoksično. Jedinjenje **11** sa IC_{50} vrednošću 18,582 μM je najefikasnije na ovoj ćelijskoj liniji. Step en inhibicije rasta zavisio je od koncentracije jedinjenja, a antiproliferativni efekti prema ovoj ćelijskoj liniji su većinom bili linearni (Slika 19).

Jedinjenje **6** sa IC_{50} vrednošću od 3,709 na ćelijskoj liniji MCF-7 je najefikasnije antiproliferativno jedinjenje ispitano u ovom radu. Supstanca **3** je ispoljila značajno do umereno citotoksično delovanje na najvećem broju ispitivanih kultura ćelija (MDA-MB-231, HeLa, A549), kao i supstanca **5** (MCF-7, MDA-MB-231, HT-29).

Na osnovu citotoksičnog potencijala izdvajaju se supstance **6**, **7** i **11**, ali ne treba izostaviti ni supstance **3** i **5**.

6.8. Analiza molekuskog dokinga

Zbog značaja antiproliferativne aktivnosti većeg broja jedinjenja ispitivanih u ovoj disertaciji i utvrđenog postojanja afiniteta vezivanja za ER na osnovu *in silico* parametara (logRBA) bilo je interesantno sprovesti analizu molekuskog dokinga.

Estrogeni receptori predstavljaju vrstu nuklearnih receptora odgovornih za neke od fizioloških procesa, kao što su rast ćelija i njihova diferencijacija. U organizmu sisara ćelijski odgovor na estrogene se dešava preko dve vrste estrogenih receptora: estrogen receptora alfa (ERA) i estrogen receptora beta (ERB) (30).

ERA su uglavnom eksprimirani na tkivima poput mlečnih žlezda, uterusa, jetre, hipofize, dok su ERB dominantni u tkivima mozga, kostiju i mokraćne bešike, kao i u strukturama kardiovaskularnog i imunog sistema (30,189).

Uloga ER u patogenezi karcinoma dojke, prostate i kolorektalnog karcinoma intenzivno se proučava. Supresija produkcije estrogena u organizmu predstavlja terapijsku opciju za karcinom dojke. Smatra se da je aktivacija ERA okidač za proliferaciju tumorskog tkiva, nasuprot ERB kome se pripisuje antiproliferativni efekat (190). Većina slučajeva karcinoma dojke koji se danas dijagnostikuju su ER-pozitivni, gde se estrogen vezuje za receptor na površini tumorskih ćelija. Po izveštajima *American Cancer Society* dva od tri slučaja karcinoma dojke eksprimiraju receptore za hormone, a u određenim slučajevima se progesteron (PR) smatra odgovornim za kancerogenezu. Tumori koji su ER/PR pozitivni pre će reagovati na hormonsku terapiju nego ER/PR negativni. ER-pozitivni karcinom dojke je rezistentniji na hemioterapiju u odnosu na ER-negativni karcinom. ER igraju važnu ulogu u *in vitro* testiranju osetljivosti ćelija karcinoma na hemioterapeutike (191).

Primenom softverskih paketa dobijene su vrednosti za afinitet vezivanja posmatranih derivata sukcinimida za estrogene receptore (logRBA) (Tabela 7). S obzirom da su ispitivana jedinjenja razmatrana i kao potencijalni antiproliferativni agensi u odnosu na ćelijsku liniju MCF-

7, koja eksplicira receptore za estrogen, bilo je interesantno ustanoviti da li je delovanje preko estrogenih receptora mogući mehanizam citotoksične aktivnosti ispitivanih derivata sukcinimida.

Doking metode uglavnom koriste energetske skor radi identifikacije energetski najpovoljnije konformacije liganda za vezivanje za ciljno mesto na proteinu (receptoru). Opšta pretpostavka je da niže vrednosti energetskog skora znače bolje vezivanje liganda za protein. Najbolji kandidati među razmatranim ligandima se pronalaze primenom doking algoritama za identifikaciju optimalnog načina vezivanja malih molekula za aktivna mesta na ciljanim makromolekulima. Doking skor funkcija MolDock je produžetak parcijalnog linearnog potencijala (PLP), uključujući vodonične i elektrostatičke veze (192).

Rezultati doking analize prikazani u Tabelama 37 i 38 ukazuju na to da ispitivana jedinjenja u odnosu na 3ERT kompleksirano sa 4-hidroksitamoksifenom (-136,916 kcal/mol) poseduju manju mogućnost vezivanja, odnosno veće energije neophodne za formiranje kompleksa. Ispitivana jedinjenja nešto lakše formiraju komplekse sa aktivnim mestima na ERA (niže energije formiranja kompleksa, MolDock Score) u odnosu na ERB, što je od interesa za delovanje na ćelije estrogen zavisnog humanog karcinoma dojke.

Ukoliko se razmatra povezanost između afiniteta vezivanja za estrogene receptore ($\log RBA$) i lipofilnosti ispitivanih jedinjenja, izražene kao R_M^0 i S parametri, uočava se da postoji statistički značajna parabolična zavisnost (Tabela 40). Iz grafičkog prikaza na Slici 22 se može videti da sa porastom lipofilnosti jedinjenja raste i afinitet za estrogene receptore, na osnovu čega se pretpostavlja da je upravo lipofilnost karakteristika analiziranih sukcinimida koja ima uticaja na sposobnost da se vežu za estrogene receptore. Do sličnog zaključka se dolazi i kada se analizira zavisnost između lipofilnosti i energije formiranja kompleksa sa estrogenim receptorima (MolDock Score) (Tabela 39). Na Slici 21 je grafički prikazana inverzna funkcija između prethodno pomenutih parametara lipofilnosti i MolDock Score vrednosti, u vidu obrnute parabole. Sa porastom lipofilnosti jedinjenja smanjuje se energija građenja kompleksa sa aktivnim mestima na estrogenim receptorima i lakše se ostvaruje veza sa tim receptorima. Međutim, pošto se ne radi o linearnoj zavisnosti, ne treba zanemariti i druge faktore (veličina molekula, šarža, sposobnost formiranja vodonične veze, fleksibilnost molekula i dr.) koji mogu imati uticaja na ovu osobinu i čiji je doprinos potrebno dodatno ispitati.

Iz serije ispitivanih jedinjenja izdvojena su ona koja su na osnovu IC_{50} vrednosti (Tabela 36) bila najpotentnija prema ćelijskoj liniji MCF-7 (jedinjenja **1**, **2**, **5**, **6** i **7**). U cilju da se ustanovi

da li je delovanje preko estrogenih receptora mogući mehanizam citotoksičnog efekta na ove ćelije, razmatrano je da li postoji korelacija između veličine citotoksičnog efekta (IC_{50}) i energije formiranja kompleksa sa estrogenim receptorima (MolDock Score) (Slika 23). S obzirom da je u razmatranje uzeto samo 5 tačaka, nije se moglo očekivati da se dobije statistički značajna korelacija. Ipak, sa grafika se vidi da postoji tendencija da citotoksična aktivnost raste (niže su IC_{50} vrednosti) sa smanjenjem energije formiranja kompleksa sa estrogenim receptorima, odnosno – jedinjenja koja imaju veći citotoksični potencijal lakše se vezuju za estrogene receptore.

Zavisnost jačine citotoksičnog efekta od afiniteta za vezivanje za estrogene receptore, prikazana na Slici 24, vodi istoj pretpostavci – veći afinitet za receptore pokazuju upravo ona jedinjenja koja su u nižim koncentracijama ostvarila citotoksičnu aktivnost (niže IC_{50}).

Za sada ima veoma malo literaturnih podataka o korelaciji *in vitro* antiproliferativne aktivnosti i *in silico* predviđenih vrednosti vezivanja za određene receptore i dobijeni rezultati sa novosintetisanim jedinjenjima sukcinimida su pionirski u ovoj oblasti.

7. Zaključak

Primenom visoko efikasne hromatografije na tankom sloju na obrnutim fazama dobijene su R_f vrednosti za 11 ispitivanih derivata sukcinimida. Na osnovu dobijenih R_f vrednosti, izračunate su retencione konstante R_M , a potom i R_M^0 i S parametri (iz linearne jednačine zavisnosti R_M od udela organskog modifikatora u mobilnoj fazi).

Eksperimentalno dobijene retencione konstante R_M^0 , primenom reverzno-fazne visokoefikasne hromatografije na tankom sloju (RP-HPTLC), daju značajne linearne korelacije sa softverski izračunatim $\log P$ i $\log D$ vrednostima, što znači da mogu da se koriste kao alternativna mera lipofilnosti jedinjenja. Rastvorljivost ispitivanih jedinjenja, izražena kao $\log S$, linearno opada sa povećanjem lipofilnosti jedinjenja.

Statistički značajne linearne korelacije između retencionih parametara R_M^0 i S impliciraju da se i parametar S ravnopravno može koristiti kao pokazatelj lipofilnosti. Regresione jednačine sa visokim stepenom korelacije između parametra S i *in silico* parametara lipofilnosti $\log P$ i $\log D$, takodje potvrđuju mogućnost primene parametra S kao mere lipofilnosti ispitivanih jedinjenja.

Imajući u vidu da su rezultati ispitivanja pokazali da se R_M^0 vrednosti istog jedinjenja razlikuju pri primeni različitih organskih modifikatora mobilne faze i da je dokazano da oni međusobno koreliraju dajući regresione jednačine visoke statističke značajnosti, zaključuje se da su R_M^0 vrednosti dobijene u bilo kom od analiziranih hromatografskih sistema relevantne i da se sa istom pouzdanošću mogu koristiti kao molekularni deskriptori. Retencionni parametri S, dobijeni primenom različitih organskih modifikatora takođe međusobno koreliraju i relevantni su za primenu kao molekularni deskriptori, nezavisno od primenjenog organskog modifikatora.

Na osnovu pravila Lipinskog, Vebera i Egana očekuje se dobra i brza peroralna apsorpcija ispitivanih jedinjenja, što potvrđuju i *in silico* izračunate konstante apsorpcije koje imaju male vrednosti. Volumeni distribucije derivata sukcinimida su srednjih vrednosti, što znači da neće doći do akumulacije ovih supstanci u masnom tkivu pacijenata. Afinitet za proteine plazme je relativno mali, zbog čega je moguć bezbedan režim doziranja. Na osnovu *in silico* deskriptora, očekuje se dobra permeacija kroz krvno-moždanu barijeru, sa izuzetkom jedinjenja **4** i **7**, koje zbog postojanja grupa koje jonizuju imaju ograničenu sposobnost prolaska kroz lipidnu barijeru u moždano tkivo.

Visoko značajne korelacije K_a i V_d sa R_M^0 i S ukazuju na to da oba farmakokinetička deskriptora zavise od lipofilnosti jedinjenja. Afinitet za vezivanje za proteine plazme raste sa

povećanjem lipofilnosti jedinjenja, sa izuzetkom supstance **4**, koja zbog postojanja karboksilne grupe pokazuje veći afinitet za proteine plazme. Zavisnost prolaznosti kroz krvno-moždanu barijeru može se opisati kvadratnom jednačinom, ali zbog umerenih vrednosti koeficijenata korelacije te zavisnosti se ne smatraju idealnim. Razlog tome je činjenica da permeacija u mozak ne zavisi samo od lipofilnosti, već i od drugih faktora – veličine molekula, polarnosti, što potvrđuju višestruke linearne regresije visoke statističke značajnosti.

Na osnovu *in silico* podataka o toksičnosti jedinjenja i poređenjem srednje letalne doze (LD₅₀) za neke već registrovane lekove sa strukturom sukcinimida, može se zaključiti da, osim supstance **5**, sva ostala jedinjenja pokazuju zadovoljavajuće nizak stepen toksičnosti. Srednja letalna doza na miševima (u slučaju intravenske i subkutane primene) može se prikazati kao parabolična funkcija lipofilnosti jedinjenja.

Većina ispitivanih supstanci, izuzev jedinjenja **2** i **4**, pokazuje malu akvatičnu toksičnost, koja je obrnuto proporcionalna lipofilnosti. Može se pretpostaviti da je razlog tome smanjena rastvorljivost lipofilnijih jedinjenja u vodenim sistemima, a već je potvrđeno da je rastvorljivost važan parametar od koga zavisi sposobnost supstance da sa mesta aplikacije dospe do cirkulacije.

Ispitivana jedinjenja ne pokazuju afinitet za vezivanje za G-protein vezane receptore, jonske kanale, inhibitore kinaza i nuklearne receptore, i zbog toga se ne očekuje da pokazuju izrazita neželjena dejstva delovanjem na neki od njih.

Nijedno od jedinjenja iz ispitivane serije ne deluje citotoksično na zdrave ćelije fibroblasta pluća, čime je potvrđena njihova selektivna antiproliferativna aktivnost u odnosu na maligno transformisane ćelije. Najveći citotoksični potencijal imaju supstance **6** i **7** na MCF-7 ćelijskoj liniji i supstanca **11** na ćelijama A549 linije. Iz daljih razmatranja ne treba isključiti ni supstance **3** i **5**, koje su citotoksičnost pokazale na najvećem broju tretiranih ćelijskih linija. Supstance **1**, **8** i **10** deluju takođe citotoksično na pojedine kulture ćelija i predlažu se za ispitivanja u pretkliničkim studijama.

Ispitivana jedinjenja imaju male vrednosti energije formiranja kompleksa sa estrogenim receptorom, određene molekulskim dokingom, iako pokazuju nešto slabiji afinitet za vezivanje za estrogene receptore u odnosu na tamoksifen. *In silico* afinitet vezivanja za estrogene receptore je u pozitivnoj korelaciji sa *in vitro* određenim antiproliferativnim efektom na ćelijske linije karcinoma koje eksprimiraju estrogene receptore.

8. Literatura

1. Keserü GM, Makara GM. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):203-12.
2. Mao F, Ni W, Xu X, Wang H, Wang J, Ji M, Li J. Chemical structure-related drug-like criteria of global approved drugs. *Molecules.* 2016;21(1):75.
3. Cheng F, Li W, Liu G, Tang Y. In silico ADMET prediction: recent advances, current challenges and future trends. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(11):1273-89.
4. 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. *Q Rev Biophys.* 2015;48(4):488-515.
5. Goodman LS, Gilman A. Succinimides. In: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Editors; New York: McGraw-Hill, 2001; p:535-36.
6. Obniska J, Zejc A, Karolak-Wojciechowska J. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of new N-pyridyl derivatives of 3-phenyl- and 3,3-diphenyl-succinimides. *Farmaco.* 1999;30:423-9.
7. Correa R, Filho V, Rosa PW, Pereira CI, Schlemper V, Nunes RJ. Synthesis of new succinimides and sulphonated derivatives with analgetic action in mice. *Pharm Pharmacol Commun.* 1997;3:67-71.
8. Frin ONR, Zeglam TH, Saad SEA, Abuskhuna SM, Alglad RM, Gamberlou HM, Masoud NB. Synthesis and pharmacological activity of N-substituted succinimide analogs. *Int J Pharm Tech Res.* 2015;8:434-9.
9. Arya S, Kumar S, Rani R, Kumar N, Roy P, Sondhi SM. Synthesis, anti-inflammatory and cytotoxicity evaluation of 9,10-dihydroanthracene-9,10- α,β -succinimide and bis-succinimide derivatives. *Med Chem Res.* 2013;22:4278-85.
10. Hall IH, Wong OT, Scovill JP. The cytotoxicity of N-pyridinyl and N-quinolinyl substituted derivatives of phtalimide and succinimide. *Biomed Pharmacother.* 1995;49(5):251-58.
11. Kuran B, Kossakowski J, Cieslak M, Kazmierczak-Barańska J, Królewska K, Cyrański MK, Stepień DK, Krawiecka M. Synthesis and biological activity of novel series of heterocyclic compounds containing succinimide moiety. *Heterocycl Commun.* 2013;19:287-96.

12. Ishizumi K, Kojima A, Antoku F, Saji I, Yashigi M. Succinimide derivatives. II. Synthesis and antipsychotic activity of N-[4-[4-(1,2-benzisothiazol-3-yl)-1-piperazinyl]butyl]-1,2-cis-cyclohexanedicarboximide (SM-9018) and related compounds. *Chem Pharm Bull, Tokyo*. 1995;43:2139-51.
13. Zentz F, Guillou RI, Labia R, Sirot D, Linard B, Valla A. Synthesis, in vitro antibacterial and cytotoxic activities of a series of 3-substituted succinimides. *Farmaco*. 2004;59:879-86.
14. Zentz F, Valla A, Guillou RI, Labia R, Mathot AG, Sirot D. Synthesis and antimicrobial activities of N-substituted imides. *Farmaco*. 2002;57:421-26.
15. World Health Organization, Cancer, Key facts. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [Approached: 10.10.2018.].
16. López-Gómez M, Malmierca E, de Górgolas M, Casado E. Cancer in developing countries: the next most preventable pandemic. The global problem of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(1):117-22.
17. Cheek CF. Protecting normal cells from the cytotoxicity of chemotherapy. *Cell Cycle*. 2012;11(12):2227-8.
18. Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*. 1996;17(13):1259-64.
19. Milosevic M, Kojic V, Curcic J, Jakimov D, Milic N, Banjac N, Uscumlic G, Kaliszan R. Evaluation of in silico pharmacokinetic properties and in vitro cytotoxic activity of selected newly synthesized N-succinimide derivatives. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;137:252-7.
20. Acharya R, Chacko S, Bose P, Lapenna A, Prasad Pattanayak S. Structure based multitargeted molecular docking analysis of selected furanocoumarins against breast cancer. *Sci Rep*, 2019;9:15743. doi: 10.1038/s41598-019-52162-0.
21. Miller EH. Succinimid. *J Am Chem Soc*. 1894;16:433–642.
22. Takahashi K, Hashimoto N, Nakama C, Kamata K, Sasaki K, Yoshimoto R, Ohyama S, Hosaka H, Maruki H, Nagata Y, Eiki JI, Nishimura T. The design and optimization of a series of 2-(pyridin-2-yl)-1H-benzimidazole compounds as allosteric glucokinase activators. *Bioorg Med Chem*. 2009;17:7042–51.
23. Vogt N, Khaikin LS, Grikina OE, Karasev NM, Vogt J, Vilkov LV. Flexibility of the saturated five-membered ring in 2,5-pyrrolidinedione (succinimide): electron diffraction and quantum-

- chemical studies with use of vibrational spectroscopy data. *J Phys Chem A*. 2009;113:931–37.
24. Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (1994–2009 ACD/ /Labs).
25. Karolak-Wojciechowska J, Blaszczyk M, Kwiatkowsky W, Obniska J, Zejc A. Electronic conditions for anticonvulsant activity of diphenylsuccinimides: crystal and molecular structure of 1,1-diphenyl-*N*-(2-pyridyl)-succinimide. *J Chem Cryst*. 1997;27:297–301.
26. Hargreaves MK, Pritchard JG, Dave HR. Cyclic carboxylic monoamides. *Chem Rev*. 1970;70: 439–69.
27. Wang G, Xiao Y, Xu H, Hu P, Liang W, Xie L, Jia J. Development of Multifunctional Avermectin Poly(succinimide) Nanoparticles to Improve Bioactivity and Transportation in Rice. *J Agric Food Chem*. 2018;66(43):11244-11253.
28. Bleicher KH, Bohm HJ, Muller K, Alanine AI. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening, *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:369–78.
29. Banjac N, Trišović N, Valentić N, Ušćumlić G, Petrović S. Sukcinimidi: dobijanje, svojstva i antikonvulzivna aktivnost. *Hem Ind*. 2011;65(4):439-53.
30. Grande F, Rizzuti B, Occhiuzzi MA, Ioele G, Casacchia T, Gelmini F, Guzzi R, Garofalo A, Statti G. Identification by Molecular Docking of Homoisoflavones from *Leopoldia comosa* as Ligands of Estrogen Receptors. *Molecules*. 2018;23(4). pii: E894. doi: 10.3390/molecules23040894.
31. Winkler DA. The role of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in biomolecular discovery. *Briefings in Bioinformatics*. 2002;3(1):73-86.
32. Li AP. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2001;6:357-66.
33. Tsaïoun K, Blaauboer BJ, Hartung T. Evidence-based absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and its interplay with alternative toxicity methods. *ALTEX*. 2016;33(4):343-58.
34. Perišić-Janjić N, Milošević N, Popović JK, Ušćumlić G, Petrović S. Ispitivanje i karakterizacija novosintetisanih jedinjenja kandidata za lekove. Nova interdisciplinarna ostvarenja i unapređenje kliničke prakse i zdravlja, urednika Jovana K Popovića. Monografije naučnih skupova AMN LSD ISBN 978-86-6061-021-0.2012;3(1):75-102.

35. Yu W, MacKerell AD Jr. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol.* 2017;1520:85-106.
36. Correa-Basurto J. Molecular modeling and QSAR studies for drug design. *Curr Pharm Des.* 2013;19(12):2137.
37. Butina D, Segall MD, Frankcombe K. Predicting ADME properties in silico: Methods and models. *Drug Discovery Today.* 2002;7(11):S83-8.
38. Todeschini R, Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors.* Weinheim: Wiley-VCH; 2000.
39. Bajorath J. Selected Concepts and Investigation in Compound Classification, Molecular Descriptor Analysis and Virtual Screening. *J Chem Inf Comput Sci.* 2001;41(2):233-45.
40. Ferydoun A, Ali RA, Najmeh M. Study on QSPR method for theoretical calculation of heat of formation for some organic compounds. *African Journal of Chemistry.* 2019;6(1):379-82.
41. Randić M. Generalized molecular descriptors. *J Math Chem.* 1991;7(1):155-68.
42. Benigni R, Giuliani A, Franke R, Gruska A. Quantitative structure-activity relationships of mutagenic and carcinogenic aromatic amines. *Chemical Reviews.* 2000;100(10):3697-714.
43. Cash GG. Prediction of the genotoxicity of aromatic and heteroaromatic amines using electrotopological state indices. *Mutation Research.* 2001;491(1-2):31-7.
44. Abraham MH, Hassanisadi M, Jalali-Heravi M, Ghafourian T, William S, Cain WS, Cometto-Muniz JE. Draize Rabbit Eye Test Compatibility with Eye Irritation Tresholds in Humans: A Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis. *Toxicological Sciences.* 2003;76(2):384-91.
45. Patlewicz GY, Basketter DA, Smith Pease CK, Wilson K, Wright ZM, Roberts DW, Bernard G, Gimenez Arnau E, Lepoittevin J-P. Further evaluation of quantitative structure-activity relationship models for the prediction of the skin sensitization potency of selected fragrance allergens. *Contact Dermatitis.* 2004;50(2):91-7.
46. Papa E, Villa F, Gramatica P. Statistically Validated QSARs, Based on Theoretical Descriptors, for Modeling Aquatic Toxicity of Organic Chemicals in *Pimephales promelas* (Fathead Minnow). *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2005;45(5):1256-66.
47. Franklin EN, Richard MH, Stenley GW, Raymond W. Physicochemical-activity relations in practice. 1. Rational and self-consistent data bank. *J Med Chem.* 1975;18(6):604-7.

48. Kaleman S. Analiza hromatografskih podataka novosintetisanih derivate hidantoina primenom hemometrijskih metoda – doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, autorski reprint, 2012.
49. Milosevic NP, Dimova VB, Perisic-Janjic NU. RT TLC data in correlation studies with in silico pharmacokinetic properties of benzimidazole and benzotriazole derivatives. *European J Pharm Sci.* 2013;49:10-7.
50. Borchardt RT. Scientific, educational and communication issues associated with integrating and applying drug-like properties in drug discovery. In: Borchardt R, Kerns E, Lipinski C, Thakker D, Wang B, editors. *Pharmaceutical profiling in drug discovery for lead selection.* American Association of Pharmaceutical Scientists; 2004. p. 451-66.
51. Kerns EH, Di L. Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 2003;8(7):316-23.
52. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):711-5.
53. Kerns EH, Di L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization.* 1st ed. Oxford: Elsevier Inc; 2008.
54. Di L, Kerns EH. Profiling drug-like properties in discovery research. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2003;7:402-8.
55. Milošević NP, Stojanović SZ, Penov-Gaši K, Perišić-Janjić N, Kaliszan R. Reversed- and normal-phase liquid chromatography in quantitative structure retention-property relationships of newly synthesized seco-androstene derivatives. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;88:636-42.
56. Leahy DE, Taylor PJ, Wait AR. Model Solvent Systems for QSAR Part I. Propylene Glycol Dipelargonate (PGDP). A new Standard Solvent for use in Partition Coefficient Determination. *Molecular Informatics.* 1989;8(1):17-31.
57. Arnott JA, Pianey SL. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin Drug Discov.* 2012;7(10):863-75.
58. Comer JEA. High-throughput Measurement of logD and pKa. In: Artursson P, Lennernas H, van de Waterbeemd H, editors. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry,* Weinheim: Wiley-VCH; New Jersey ,2003;18:21-45.

59. Hansh C, Leo A, Mekapati SB, Kurup A. QSAR and ADME. *Bioorg Med Chem.* 2004;12(12):3391-400.
60. Keserû GM, Molnár L, Greiner I. A neural network based virtual high throughput screening test for the prediction of CNS activity. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2000;3(6):535-40.
61. Crivori P, Cruciani G, Carrupt PA, Testa B. Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure. *J Med Chem* 2000;43(11):2204-16.
62. Platts JA, Abraham MH, Zhao YH, Hersey A, Ijaz L, Butina D. Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set: an LFER study. *Eur J Med Chem.* 2001;36(9):719-30.
63. Bober K, Bębenek E, Boryczka S. Application of TLC for Evaluation of the Lipophilicity of Newly Synthetized Esters: Betulin Derivatives *J Anal Methods Chem.* 2019;2019:1297659.
64. 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);81-8.
65. Moriguchi L, Hirono S, Liu Q, Nakagome I, Matsushita Y. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. *Chem Pharm Bull.* 1992;40(1):127-30.
66. Tetko IV, Poda GI. Prediction of Log P with property-based methods. In: *Molecular drug properties, measurement and prediction* (R. Mannhold, ed.) Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2008. pp 381-406.
67. Daina A, Michielin O, Zoete V. iLOGP: a simple, robust and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *J Chem Inf Model.* 2014;54(12):3284-301.
68. Wildman SA, Crippen GM. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. *J Chem Inf Comput Sci.* 1999; 39(5):868-73.
69. Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. *Chem Rev* 1971;71(6):525-616.
70. Craig PN. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry.* Hansch C, Sammers PG, Taylor JB, editors. Oxford: Pergamon Press, London 1990;6:237-991.
71. Hansch C. Use of homolytic, steric, and hydrophobic constants in a structure-activity study of 1,3-benzodioxole synergists. *J. Med. Chem.* 1968;11(5); 920-924.

72. Avdeef A. pH-metric logP. Part 1. Difference Plots for Determining Ion-Pair Octanol-Water Partition Coefficients of Multiprotic Substances. *Quant Struct Act Relat.* 1992;11(4):510-17.
73. Kaliszan R. QSRR: Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chem Rev.* 2007;107(7):3212-46.
74. Starek M, Komsta L, Krzek J. Reversed-phase thin-layer chromatography technique for the comparison of the lipophilicity of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;85:132-7.
75. Bhal SK, Kassam K, Peirson IG, Pearl GM. The Rule of Five Revisited: Applying logD in Place of logP in Drug-Likeness Filters. *Mol Pharmaceutics.* 2007;4(4):556-60.
76. Wildman SA, Crippen GM. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. *J Chem Inf Comput Sci* 1999;39(5):868-73.
77. Leo A. Calculating logP from structures. *Chem Rev.* 1993;93(4):1281-306.
78. 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. *Quant Struct-Act Relat.* 1998;17(6):537-48.
79. Kellogg GE, Joshi GS, Abraham DJ. New Tools for Modeling and Understanding Hydrophobicity and Hydrophobic Interactions. *Med Chem Res.* 1992;1:444-53.
80. Juranić IO, Drakulić BJ, Petrović SD, Mijin DZ, Stanković MV. A QSAR study of acute toxicity of N-substituted fluoroacetamides to rats. *Chemosphere.* 2006;62(4):641-9.
81. Pearlman RS. Rapid generation of high quality approximate 3D molecular structures. *Chem Des Autom News.* 1987;2:1-7.
82. Klopman G, Wang S, Balthasar DM. Estimation of aqueous solubility of organic molecules by the group contribution approach. Application to the study of biodegradation. *J Chem Inf Comput Sci.* 1992;32(5):474-82.
83. Yalkowski S, Banerjee S. *Aqueous solubility: Methods of estimation for organic compounds.* New York: Marcel Dekker; 1992.
84. Venkatesh S, Lipper RA. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *J Pharm Sci.* 2000;89(2):145-54.
85. Van de Waterbeemd H, Smith DA, Beaumont K, Walker DK. Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *J Med Chem.* 2001;44(9):1313-33.

86. Kaznessis YN, Snow ME, Blankley CJ. Prediction of blood-brain partitioning using Monte Carlo simulations of molecules in water. *J Comput-Aided Mol Des.* 2001;15:697-708.
87. Doniger S, Hofmann T, Yeh J. Predicting CNS permeability of drug molecules: comparison of neural network and support vector machine algorithms. *J Comput Biol.* 2002;9(6):849-64.
88. Clark DE. Prediction of intestinal absorption and blood-brain barrier permeation by computational methods. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2001;4(6):477-96.
89. Clark DE. In silico prediction of blood-brain permeation. *Drug Discov Today.* 2003;8(20):927-33.
90. Wohnsland F, Faller B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water logP with artificial membranes. *J Med Chem.* 2001;44(6):923-30.
91. Avdeef A. Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State). *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2001;1(4):277-351.
92. Gratton JA, Abraham MH, Bradbury MW, Chadha HS. Molecular factors influencing drug transfer across the blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49(12):1211-16.
93. Tamai I, Tsuji A. Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci.* 2000;89(11):1371-88.
94. Varagić VM, Milošević MP. Farmakokinetika (dinamika resorpcije, raspodele i eliminacije leka). In: Gavrilović S, editor. *Farmakologija.* 20. izdanje. Beograd: Elit Medica; 2005.p.11-20.
95. Obata K, Sugano K, Saitoh R et al. Prediction of oral drug absorption in humans by theoretical passive absorption model. *Int J Pharm.* 2005;293(1-2):183-92.
96. Hou T, Wang J, Zhang W, Wang W, Xu X. Recent advances in computational prediction of drug absorption and permeability in drug discovery. *Curr Med Chem.* 2006;13(22):2653-67.
97. Van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Raevsky OA. Estimation of Caco-2 cell permeability using calculated molecular descriptors. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 1996;15(6):480-90.
98. Stepensky D. Use of unbound volumes of drug distribution in pharmacokinetic calculations. *Eur J Pharm Sci.* 2011;42(1-2):91-8.
99. Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(9):1355-74.
100. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1994;45:153-203.

101. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3580-95.
102. Larsen MT, Kuhlmann M, Hvam ML, Howard KA. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Mol Cell Ther.* 2016;4:3.
103. Saiakhov RD, Stefan LR, Klopman G. Multiple computer-automated structure evaluation model of the plasma protein binding affinity of diverse drugs. *Perspectives in Drug Discovery and Design.* 2000;19(1):133-55.
104. Brocks DR, Ala S, Aliabadi HM. The effect of increased lipoprotein levels on the pharmacokinetics of cyclosporine A in the laboratory rat. *Biopharm Drug Dispos.* 2006;27(1):7-16.
105. Colussi D, Parisot C, Legay G, Lefèvre G. Binding of artemether and lumefantrine to plasma proteins and erythrocytes. *Eur J Pharm Sci.* 1999;9(1):9-16.
106. Morris JJ, Bruneau PP. Prediction of physicochemical properties. In: Böhm HJ, Schneider G, editors. *Virtual screening for bioactive molecules.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000.p.33-56.
107. Krueger-Thiemer E, Buenger P. The role of the therapeutic regimen in dosage design. *Chemotherapia* 1965;10:61-73.
108. Doogue MP, Polasek TM. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther Adv Drug Saf.* 2013;4(1):5-7.
109. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L. Modeling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):650-61.
110. Reichel A. The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry. *Curr Drug Metab.* 2006;7(2):183-203.
111. Ghersi-Egea JF, Leninger-Muller B, Suleman G, Siest G, Minn A. Localisation of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J Neurochem.* 1994;62(3):1089-96.
112. El-Bacha RS, Minn A. Drug-metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol.* 1999;45(1):15-23.

113. Rowland LP, Fink ME, Rubin L. Cerebrospinal fluid: Blood-brain barrier, brain edema and hydrocephalus. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell T, editors. Principles of Neural Behaviour. New York: Elsevier; 1994. pp.1050-60.
114. Valerio LG Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;241(3):356-70.
115. Toropov AA, Toropova AP, Raska I Jr, Leszczynska D, Leszczynski J. Comprehension of drug toxicity: software and databases. *Comput Biol Med.* 2014;45:20-5.
116. Kar S, Roy K, Leszczynski J. Impact of Pharmaceuticals on the Environment: Risk Assessment Using QSAR Modeling Approach. *Methods Mol Biol.* 2018;1800:395-443.
117. Fernández-Pumarega A, Amézqueta S, Farré S, Muñoz-Pascual L, Abraham MH, Fuguet E, Rosés M. Modeling aquatic toxicity through chromatographic systems. *Anal Chem* 2017;89(15):7996-8003.
118. U.S. Environmental Protection Agency (<https://www.epa.gov>) [Accessed 25 August 2019]
119. Birge VJ, Cassidy RA. Structure-activity relationships in aquatic toxicology. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3(5):359-68.
120. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev.* 2009;30(4):293-342.
121. Shi LM, Fang H, Tong W, Wu J, Perkins R, Blair RM, Branham WS, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM. QSAR models using a large diverse set of estrogens. *J Chem Inf Comput Sci.* 2001;41(1):186-95.
122. Jacobson KA. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochem Pharmacol.* 2015;98(4):541-55.
123. Kolakowski LF Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels.* 1994;2(1):1-7.
124. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256-72.
125. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(12):993-6.

126. Rask-Andersen M, Masuram S, Schiöth HB. The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:9-26.
127. Armstrong CM. Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev.* 1981;61(3):644-82.
128. Yu FH, Catterall WA. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE.* 2004(253):re15.
129. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001;294(5548):1866-70.
130. Bhullar KS, Lagarón NO, McGowan EM, Parmar I, Jha A, Hubbard BP, Rupasinghe HPV. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer.* 2018;17(1):48.
131. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):3-26.
132. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002;45(12):2615-23.
133. Egan WJ, Merz KM Jr, Baldwin JJ. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J Med Chem.* 2000;43(21):3867-77.
134. Van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target.* 1998;6(2):151-65.
135. Kelder J, Grootenhuis P, Bayada D, Delbressine L, Ploemen JP. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm Res.* 1999;16(10):1514-19.
136. Doan KM, Humphreys JE, Webster LO, Wring SA, Shampine LJ, Serabjit-Singh CJ, Adkison KK, Polli JW. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303(3):1029-37.
137. Oprea TI, Davis AM, Teague SJ, Leeson PD. Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. *J Chem Inf Comput Sci.* 2001;41(5):1308-15.

138. Muegge I, Heald SL, Brittelli D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J Med Chem.* 2001;44(12):1841-6.
139. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendolski JJ. A knowledge based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem.* 1999;1(1):55-68.
140. Stark DM, Shopsis C, Borenfreund E, Babich H. Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Food Chem Toxicol.* 1986;24(6-7):449-55.
141. Hollósy F, Lóránd T, Orfi L, Erös D, Kéri G, Idei M. Relationship between lipophilicity and antitumor activity of molecule library of Mannich ketones determined by high-performance liquid chromatography, clogP calculation and cytotoxicity test. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;768(2):361-8.
142. Wilson AP. Cytotoxicity and viability assays. In: Freshney RI, editor. *Animal cell culture*, 2nd edition. Oxford: IRL Press, 1989.
143. Ekwall B. Preliminary studies on the validity of in vitro measurement of drug toxicity using HeLa cells. IV. Therapeutic effects and side effects of 50 drugs related to the HeLa toxicity of the therapeutic concentrations. *Toxicol Lett.* 1981;7(4-5):359-66.
144. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods.* 1993;157(1-2):233-40.
145. Stuffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, editor. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*; Academic Press: London, UK, 1990; Volume 6, pp. 71-133.
146. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica.* 1996;4:14-9.
147. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cance Res.* 1991;51(10):2515-20.
148. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

149. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;(3):589-601.
150. Pavlovic S, Mitrovic T, Zaric J, Popovic Z. In vitro cultivation of mammalian established cell lines. *Yug Med Biochem.* 1996;15:107-12.
151. Petković Cvetković J, Božić BĐ, Banjac NR, Petrović S, Sokolović M, Vitnik VD, Vitnik ŽJ, Ušćumlić GS, Valentić NV. Synthesis, antimicrobial activity and quantum chemical investigation of novel succinimide derivatives. *J Mol Struct.* 2019;1181:148-56.
152. Perisic Janjic 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. *Mol Pharmaceutics.* 2011;8:555-63.
153. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other cell lines. *Cancer Res* 1988;48(17):4827-33.
154. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91(4):479-89.
155. Labar B. Molekularna genetika-budućnost onkologije. *Medicus.* 2001;10:141-5
156. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell.* 1998;95(7):927-37.
157. Manas ES, Xu ZB, Unwalla RJ, Somers WS. Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods. *Structure.* 2004;12(12):2197-207.
158. Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) [Accessed 25 August 2019]
159. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem.* 2006;49(11):3315-21.
160. Singh PS, Konwar BK. Virtual screening and molecular descriptor analysis on dietary phytochemicals against heat shock protein 90 enzyme. *Lett Drug Discov.* 2014;11(1):40-9.

161. Soczewiński E. Mechanistic molecular model of liquid-solid chromatography retention-eluent composition relationship. *J Chromatogr A*. 2002;965(1-2):109-16.
162. Bate-Smith EC, Westall RG. Chromatographic behavior and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochim Biophys Acta*. 1950;4:427-40.
163. Daina A, Michielin O, Zoete V. iLOGP: a simple, robust and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *J Chem Inf Model*. 2014;54(12):3284-301.
164. Dahan A, Miller JM, Amidon GL. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *AAPS J*. 2009;11(4):740-6.
165. Jorgensen WL, Duffy EM. Prediction of drug solubility from structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(3):355-66.
166. Đaković-Sekulić T, Ačanski M, Perišić-Janjić N. Evaluation of the predictive power of calculation procedure for molecular hydrophobicity of some estradiol derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;766(1):65-75.
167. Snyder LR. *Principles of Adsorption Chromatography*. New York: Marcel Dekker;1968.
168. Collander R. The partition of organic compounds between higher alcohols and water. *Acta Chem Scand*. 1951;5:774-80.
169. Scott RPW, Kucera P. Solute interactions with the mobile and stationary phases in liquid-solid chromatography. *J Chromatogr A*. 1975;112:425-42.
170. Scott RPW, Kucera P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel. II. *J Chromatogr A*. 1979;171:37-48.
171. Scott RPW, Kucera P. Examination of five commercially available liquid chromatographic reversed phases (including the nature of the solute-solvent-stationary phase interactions associated with them). *J Chromatogr A*. 1977;142:213-32.
172. Scott RPW, Kucera P. The silica gel surface and its interactions with solvent and solute in liquid chromatography. *J Chromatogr* 1980;18:297-306.
173. Biagi LG, Barbaro AM, Sapone A, Recanatini M. *J Chromatogr A* 1994;669:246.
174. Guillot A, Henchoz Y, Moccand C, Guillarme D, Veuthey JL, Carrupt PA, Martel S. Lipophilicity determination of highly lipophilic compounds by liquid chromatography. *Chem Biodivers*. 2009;6(11):1828-36.

175. Valkó K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J Chromatogr A*. 2004;1037(1-2):299-310.
176. Kovačević S, Karadžić Banjac M, Podunavac Kuzmanović S, Milošević N, Čurčić J, Vulić J, Šeregelj V, Banjac N, Ušćumlić G. Chromatographic and computational screening of anisotropic lipophilicity and pharmacokinetics of newly synthesized 1-aryl-3-ethyl-3-methylsuccinimides. *Comput Biol Chem*. 2019; doi: 10.1016/j.compbiolchem.2019.107161.
177. Stepensky D. Use of unbound volumes of drug distribution in pharmacokinetic calculations. *Eur J Pharm Sci*. 2011;42(1-2):91-8.
178. Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2111-9.
179. Kimura T, Sudo K, Kanzaki Y, Miki K, Takeichi Y, Kurosaki Y, Nakayama T. Drug absorption from large intestine: physicochemical factors governing drug absorption. *Biol Pharm Bull*. 1994;17(2):327-33.
180. Ghafourian T, Barzegar-Jalali M, Dastmalchi S, Khavari-Khorasani T, Hakimiha N, Nokhodchi A. QSPR models for the prediction of apparent volume of distribution. *Int J Pharm*. 2006;319(1-2):82-97.
181. Obata K, Sugano K, Saitoh R, Higashida A, Nabuchi Y, Machida M, Aso Y. Prediction of oral drug absorption in humans by theoretical passive absorption model. *Int J Pharm*. 2005;293(1-2):183-92.
182. Bank WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*. 2009; 9(1): S3.
183. Li AP. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2001;6(7):357-66.
184. Pfizer, Material safety data sheet. Etosuximide (Zarontin) capsules, 2012. <http://www.pfizer.com/files/products/materialsafetydata/ETHOSUXIMIDE%20CAPSULES.pdf>. [Accessed 17 July 2019].
185. Pfizer, Material safety data sheet. Celontin (Methsuximide) capsules, 2013. <http://www.pfizer.com/sites/default/files/products/materialsafetydata/0644.pdf>. [Accessed 17 July 2019].
186. Nujić M, Habuda-Stanić M. Nitrates and nitrites, metabolism and toxicity. *Food in Health and Disease*. 2017;6(2):48-89.

187. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55.
188. Kojić V. Sinteza i detaljna biološka ispitivanja tiazolnih c-nukleozida. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, autorski reprint, 2012.
189. Lecomte S, Demay F, Ferrière F, Pakdel F. Phytochemicals Targeting Estrogen Receptors: Beneficial Rather Than Adverse Effects? *Int J Mol Sci.* 2017;18(7). pii: E1381.
190. Farzaneh S, Zarghi A. Estrogen Receptor Ligands: A Review (2013-2015). *Sci Pharm.* 2016;84(3):409-27.
191. TilakVijay J, Vivek Babu K, Uma A. Virtual screening of novel compounds as potential ER-alpha inhibitors. *Bioinformation.* 2019;15(5):321-32.
192. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem.* 2006;49(11):3315-21.