

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena S. Savić

**DIZAJNIRANJE, SINTEZA, FIZIČKO-HEMIJSKE I  
BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE DERIVATA  
 $\beta$ -HIDROKSI- $\beta$ -ARILALKANSKIH KISELINA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Jelena S. Savić

**DESIGN, SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL AND  
BIOLOGICAL PROPERTIES OF  
 $\beta$ -HYDROXY- $\beta$ -ARYLALKANOIC ACID  
DERIVATIVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

**MENTORI:**

---

Dr sc. Jasmina Brborić vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet,  
predsednik komisije

---

Dr sc. Sanda Dilber, docent,  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

**ČLANOVI  
KOMISIJE:**

---

Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Marina Milenković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Silva Dobrić, redovni profesor  
Univerzitet odbrane u Beogradu- Medicinski fakultet  
Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Jasmine Brborić i doc. dr Sande Dilber. Na istom fakultetu, deo doktorske disertacije koji se odnosi na sinteze je rađen na Katedri za organsku hemiju, deo koji se odnosi na biohemijska ispitivanja i in vitro testiranja na ciklooksigenazi je urađen na Katedri za opštu i medicinsku biohemiju, a deo koji se tiče in vivo testiranja na oglednim životinjama na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju.*

*Ovom prilikom bih želela da se zahvalim:*

*Mentorima ovog rada, prof. dr Jasmini Brborić i doc. dr Sandi Dilber, na dragocenoj pomoći, strpljenju i podršci tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Prof. dr Soteu Vladimirovu, za sve ideje i savete u ključnim momentima tokom eksperimentalnog rada, kao i u završnoj fazi pisanja teze.*

*Prof. dr Marini Milenković za izuzetan trud uloženi u eksperimentalno ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti i za korisne sugestije u toku pisanja teze.*

*Prof. dr Silvi Dobrić na iskusnim savetima u toku eksperimentalnog rada sa oglednim životinjama, kao i u toku pisanja teze.*

*Prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević za ogroman trud uloženi u eksperimentalni deo vezan za biohemijska ispitivanja i in vitro testiranje, za obradu i tumačenje rezultata, kao i za sve ideje koje su doprinele interdisciplinarnosti ovog rada.*

*Vladimiru Dobričiću, Katarini Nikolić i Bojanu Markoviću za nesebičnu pomoć u toku praktičnog rada, kao i Milošu Petkoviću za pomoć oko sinteza.*

*Svim dragim kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju na podršci, strpljenju i razumevanju.*

## LISTA SKRAĆENICA:

- 15-HETE – 15-Hidroksieikozatetraenska kiselina
- ABTS – 2,2-Azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)
- ALP – Alkalna fosfataza
- ALT – Alanin aminotransferaza
- ANN – *Artificial Neural Networks* (veštačke neuronske mreže)
- ANOVA – *Analysis of Variance* (analiza varijanse)
- AST – Aspartat aminotransferaza
- ATR-FTIR – *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (refleksiona infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom)
- BMC – *Biopartitioning Micellar Chromatography* (bioparticiona micelarna hromatografija)
- CNS – Centralni nervni sistem
- COX – Ciklooksigenaza
- DAD – *Diode Array Detector*
- DMSO – Dimetilsulfoksid
- DTNB – 2,2'-Dinitro-5,5'-ditiobenzoeva kiselina
- DZO – Diazoksonaza
- ED<sub>50</sub> – Srednja efektivna doza
- FDA – *Food and Drug Administration* (Agencija za hranu i lekove)
- GC – *Gas Chromatography* (gasna hromatografija)
- GIT – Gastrointestinalni trakt
- GSH – Glutation
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (tečna hromatografija visokih performansi)
- IL-1 – Interleukin 1
- IL-10 – Interleukin 10
- IL-13 – Interleukin 13
- IL-2 – Interleukin 2
- IL-4 – Interleukin 4
- IMHP – 2-Izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin

IR – *Infrared spectroscopy* (infracrvena spektroskopija)

LGA – *Lamarckian Genetic Algorithm* (Lamarkianov genetski algoritam)

LPS – *Lypopolysaccharides* (bakterijski lipopolisaharid)

MDA – Malonildialdehid

MLP – *Multilayer Perceptrons* (višeslojni perceptroni)

MLR – *Multiple Linear Regression* (multipla linearna regresija)

MS-TOF – *Mass Spectrometry Time-of-Flight* (masena spektrometrija preciznih masa)

NCE – *New Chemical Entity* (novi hemijski entitet)

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance* (nuklearna magnetna rezonanca)

NSAIL – Nesteroidni antiinflamatorni lekovi

PAB – Prooksidativno-antioksidativni balans

PAMPA – *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* (test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama)

PCA – *Principal Component Analysis* (analiza glavnih komponenti)

PDB – *Protein Data Bank*

PLS – *Partial Least Square Regression* (metoda parcijalnih najmanjih kvadrata)

PM3 – *Parametrized Model 3*

PON1 – Paraoksonaza

PRESS – *Predicted Residual Sum of Squares* (predviđena rezidualna suma kvadrata)

QSPR – *Quantitative Structure-Property Relationship* (kvantitativni odnos strukture i osobina)

QSRR – *Quantitative Structure-Retention Relationship* (kvantitativni odnos strukture i retencije)

RMSD – *Root Mean Square Deviation* (srednja kvadratna standardna devijacija)

RMSEE – *Root Mean Square Error of Estimation* (srednja kvadratna greška procene)

RMSEP – *Root Mean Square Error of Prediction* (srednja kvadratna greška predviđanja)

RP-HPLC – *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi)

RP-TLC – *Reversed Phase Thin Layer Chromatography* (reverzno-fazna tankoslojna hromatografija)

SSA– *Sulphosalicylic Acid* (sulfosalicilna kiselina)

TAS – Totalni antioksidantni status  
TBA – *Thiobarbituric acid* (tiobarbiturna kiselina)  
THF – Tetrahidrofuran  
TLC – *Thin Layer Chromatography* (tankoslojna hromatografija)  
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin  
TMS – Tetrametilsilan  
TMSCl – Trimetilsililhlorid  
TNF  $\alpha$  – *Tumor Necrosis Factor alpha* (Faktor nekroze tumora  $\alpha$ )  
TOS – Totalni oksidantni status  
Trolox – 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina  
TXA<sub>2</sub> – Tromboksan A<sub>2</sub>  
UV/VIS – Spektrofotometrija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti  
VIP – *Variable Importance in the Projection*  
PTFE – Politetrafluoroetilen  
PVDF – Polivinilidenfluorid  
0D – Nulti deskriptori  
1D – Jednodimenzionalni deskriptori  
2D – Dvodimenzionalni deskriptori  
3D – Trodimenzionalni deskriptori  
4D – Četvorodimenzionalni deskriptori

#### **LISTA SKRAĆENICA ISPITIVANIH JEDINJENJA:**

1A – 3-Hidroksi-3-(4-difenilil)butanska kiselina  
1B – 3-Hidroksi-2-metil-3-(4-difenilil)butanska kiselina  
1C – 3-Hidroksi-2,2-dimetil-3-(4-difenilil)butanska kiselina  
2A – 3-Hidroksi-3,3-difenilpropanska kiselina  
2B – 3-Hidroksi-3,3-difenil-2-metilpropanska kiselina  
2C – 3-Hidroksi-3,3-difenil-2,2-dimetilpropanska kiselina  
2APN – 3-Hidroksi-3-(4-nitrofenil)-3-fenilpropanska kiselina  
2APTF – 3-(4-(Trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina  
2APH – 3-(4-Hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina

2APM – 3-Hidroksi-3-(4-metilfenil)-3-fenilpropanska kiselina  
2AMN – 3-Hidroksi-3-(3-nitrofenil)-3-fenilpropanska kiselina  
2AMTF – 3-(3-(Trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina  
2AMH – 3-(3-Hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina  
2AMM – 3-(3-Metilfenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina  
2ABPMX – 3-Hidroksi-3,3-bis(4-metoksi)propanska kiselina  
2ABPDMA – 3-Hidroksi-3,3-bis(4-dimetilamino)propanska kiselina  
SC-558 – 4-[5-(4-Bromofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]benzensulfonamid



# **DIZAJNIRANJE, SINTEZA, FIZIČKO-HEMIJSKE I BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE DERIVATA $\beta$ -HIDROKSI- $\beta$ -ARILALKANSKIH KISELINA**

## **REZIME**

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) se koriste za ublažavanje simptoma akutne i hronične inflamacije već više od pedeset godina. Grupa NSAIL je veoma brojna i obuhvata različite hemijske strukture. Potreba za pronalaženjem novih NSAIL i dalje postoji jer neselektivni NSAIL često izazivaju neželjene gastrointestinalne efekte, a neki noviji selektivni lekovi se dovode u vezu sa ozbiljnim neželjenim kardiovaskularnim efektima.

U ovoj disertaciji opisani su dizajniranje, sinteza, ispitivanje fizičko-hemijskih i bioloških osobina  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina. U doking studijama je ispitan uticaj  $\alpha$  supstitucije jednom ili dvema metil grupama bočnog niza šest prethodno već sintetisanih  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina koje su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline ili  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difetilpropionske kiseline na inhibiciju enzima ciklooksigenaze kao i na selektivnost prema izoformi ciklooksigenaza-2. Doking studijama je ispitan uticaj različitih supstituenata (nitro, trifluorometil, metil, metoksi, dimetilamino grupe i hlora) na benzenovom prstenu sedam derivata 3-hidroksi-3,3-difenilpropanske kiseline na inhibiciju i selektivnost prema COX-2 izoformi. Izračunate su molekulske zapremine za sva dokovana jedinjenja i utvrđeno je da ispunjavaju uslov da su za minimalno 15 Å<sup>3</sup> veće od molekulske zapremine ibuprofena, što znači da su ove kiseline potencijalno selektivne za COX-2.

Modifikovanom Reformatski reakcijom sintetisano je sedam derivata 3-hidroksi-3,3-difenilpropanske kiseline. Tri planirana jedinjenja nije bilo moguće sintetisati na ovaj način, kao ni korišćenjem indijuma kao katalizatora, niti klasičnom Reformatski reakcijom. Modifikovana Reformatski reakcija se sastoji iz dve faze. U prvoj fazi se sintetišu  $\alpha$ -bromo alkil 1-etoksiestri iz  $\alpha$ -bromsirćetne kiseline i etilvinil etra. Druga

faza predstavlja reakciju između sintetisanih intermedijera i odgovarajućeg ketona uz zagrevanje na 65 °C. Prednost modifikovane Reformatski reakcije uz zagrevanje u drugoj fazi je u znatnom skraćenju vremena trajanja reakcije (sa nekoliko dana na 17-24 sata), kao i u većoj čistoći sintetisanih jedinjenja. Čistoća sintetisanih jedinjenja je potvrđena hromatografskim tehnikama (TLC i HPLC), a strukture određivanjem temperature topljenja i spektroskopskim metodama (UV/VIS, ATR-FTIR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS TOF i MS-MS).

Eksperimentalno su određene konstante jonizacije ( $pK_a$ )  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina reverzno faznom visokoefikasnom tečnom hromatografijom. Dobijeni rezultati su upoređeni sa vrednostima koje su predviđene uz pomoć računarskih programa MarvinSketch i ACD/I-Labs. Izračunat je procenat jonizacije jedinjenja na pH vrednostima karakterističnim za želudac i tanko crevo i upoređen je sa procentom jonizacije ibuprofena.

Eksperimentalno su određeni particioni koeficijenti ( $\log P$ )  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina reverzno faznom visokoefikasnom tečnom hromatografijom i dobijene vrednosti su upoređene sa vrednostima koje su izračunate uz pomoć različitih računarskih programa (MarvinSketch, Molinspiration, KOWWIN, ALOGPS).

*In vitro* procena gastrointestinalne apsorpcije za šest prethodno sintetisanih i sedam novosintetisanih  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina je izvršena primenom paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membranama (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) i bioparticione micelarne hromatografije (eng. *Biopartitioning Micellar Chromatography*, BMC). Za sva jedinjenja je procenjena niža gastrointestinalna apsorpcija u odnosu na ibuprofen. Izvršena je analiza kvantitativnog odnosa strukture i osobina (eng. *Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR) i kvantitativnog odnosa strukture i retencije (eng. *Quantitative Structure-Retention Relationship*, QSRR) ispitivanih jedinjenja. Formirani su QSPR i QSRR modeli koji uspostavljaju funkcionalnu zavisnost između geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i odgovarajućih PAMPA (%T,  $-\log P_{app}$ ) i BMC ( $k$ ) parametara. Na osnovu odgovarajućeg QSPR ili QSRR modela, a imajući u vidu rezultate doking studija, dizajnirane su strukture jedinjenja koje bi trebalo da imaju poboljšanu gastrointestinalnu apsorpciju.

Antiinflamatorna aktivnost odabranih  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina i ibuprofena je ispitana *in vivo* testom edema šape pacova izazvanog karagenanom. Najnižu  $ED_{50}$  vrednost pokazuje jedinjenje koje je derivat  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline sa metil grupom u  $\alpha$  položaju bočnog niza (14,79  $\mu\text{mol/kg}$ ). Jedinjenje koje je takođe derivat  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline sa nitro grupom u *para* položaju ima sličnu  $ED_{50}$  vrednost (47,76  $\mu\text{mol/kg}$ ) kao ibuprofen (43,97  $\mu\text{mol/kg}$ ). Još dva jedinjenja imaju nešto višu  $ED_{50}$  od ibuprofena (oko 50  $\mu\text{mol/kg}$ ), dok preostala jedinjenja imaju  $ED_{50}$  vrednosti koje su iznad 80  $\mu\text{mol/kg}$ .

Nakon testa edema šapice pacova, eksperimentalnim životinjama su uzorkovani želuci koji su makroskopski ispitivani na prisustvo lezija, a zatim zamrzavani kako bi se kasnije odredili biohemijski parametri: malonildialdehid (MDA) i glutation (GSH). Makroskopsko ispitivanje želuca pokazalo je prisustvo minimalnih lezija, a rezultati određenih koncentracija MDA i GSH su pokazali da jedinjenja sa trifluorometil grupom izazivaju veći oksidativni stres u tkivu želuca od ibuprofena. Sva ostala jedinjenja izazivaju manji oksidativni stres u poređenju sa ibuprofenom.

Parametri oksidativnog stresa su određeni i u hepariniziranoj plazmi životinja koja je takođe sakupljana prilikom *in vivo* ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti. Vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa su niže kod svih ispitivanih jedinjenja nego kod ibuprofena. Određeni su parametri: totalni antioksidantni status (TAS) i totalni oksidantni status (TOS), a njihov količnik (OS indeks) pokazuje da ni jedna od ispitivanih kiselina ne izaziva veći oksidativni stres od ibuprofena. U plazmi životinja kojima su aplikovane dve kiseline koje sadrže trifluorometil grupu kao supstituent u benzenovom prstenu utvrđeno je statistički značajno sniženje aktivnosti enzima paraoksonaze u odnosu na kontrolnu grupu, ali nema statistički značajnog sniženja aktivnosti paraoksonaze u odnosu na ibuprofen.

U hepariniziranoj plazmi životinja su određeni enzimi jetre: alkalna fosfataza (ALP), aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT) čije bi prisustvo u plazmi ukazalo na oštećenje ćelija jetre. Rezultati su pokazali da nema statistički značajnog povećanja ovih enzima u plazmi životinja tretiranih bilo kojim od ispitivanih jedinjenja u odnosu na grupu koja je tretirana ibuprofenom.

Inhibicija enzima ciklooksigenaze kao i selektivnost prema inhibiciji izoforme ciklooksigenaza-2 je ispitana *in vitro* na komercijalnom kitu za šest jedinjenja. Odabrano je pet jedinjenja koja su pokazala najbolje rezultate antiinflamatorne aktivnosti *in vivo*, za koja je dobijena najniža ED<sub>50</sub> vrednost i jedinjenje sa trifluorometil grupom za koje je dobijena najviša ED<sub>50</sub> vrednost. Najbolju selektivnost prema COX-2 izoformi pokazalo je jedinjenje sa polarnom nitro grupom kao supstituentom benzenovog prstena što je u skladu sa zaključkom doking eksperimenata.

**Ključne reči:** β-hidroksi-β-arilalkanske kiseline, Reformatski reakcija, ciklooksigenaza, doking, gastrointestinalna apsorpcija, PAMPA, BMC, QSRR, QSPR, oksidativni stres.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

**UDK broj:** 615.212.3.074/.076(043.3)

# DESIGN, SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF $\beta$ -HYDROXY- $\beta$ -ARYLALKANOIC ACID DERIVATIVES

## ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been used to treat acute and chronic inflammation for more than fifty years. NSAIDs belong to a group of drugs with various chemical structures. There is still a strong need for developing new NSAIDs supported by the fact that nonselective NSAIDs often produce gastrointestinal side effects and some new selective drugs are linked to serious cardiovascular side effects.

In the framework of this doctoral thesis, design, synthesis and evaluation of physicochemical and biological properties of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids are presented. The impact of alpha substitution of side chain with one or two methyl groups in six previously synthesized  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids on the inhibition of cyclooxygenase enzyme as well on selectivity for COX-2 isoform was evaluated through docking studies. Selected acids were derivatives of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -biphenylbutanoic acids or  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -propanoic acids. Docking studies were used to evaluate the impact of benzene ring substitution of selected 3-hydroxy-3,3-diphenylpropanoic acid with different substituents (nitro, trifluoromethyl, methyl, methoxy, dimethylamino group and chlorine) on inhibition and selectivity towards COX-2. Molecular volumes for all docked compounds were calculated and it was found that they fulfill the requirement needed for selectivity towards COX-2, that they are at least 15 Å<sup>3</sup> larger than molecular volume of ibuprofen which means that these acids have potential selectivity for COX-2.

Seven derivatives of 3-hydroxy-3,3-diphenylpropanoic acid are synthesized using modified Reformatsky reaction. Three compounds could not be synthesized in this way, neither by using indium as catalyst, nor by classic Reformatsky reaction. Modified Reformatsky reaction consists of two phases. During the first phase

$\alpha$ -bromoalkyl-1-ethoxyesters were synthesized from  $\alpha$ -bromoacetic acid and ethyl vinyl ether. Second phase represents reaction between synthesized intermediates and corresponding ketone on 65°C. Purity and chemical structures of synthesized compounds were confirmed using chromatography techniques (TLC and HPLC), and structural characterization is done by spectroscopic methods (UV/VIS, ATR-FTIR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS TOF, MS-MS).

Ionization constants ( $\text{p}K_a$ ) of six previously synthesized and seven newly synthesized  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids were determined using reversed-phase high performance liquid chromatography. Obtained results were compared to values predicted by MarvinSketch and ACD/I-Labs softwares. Percent of ionization in gastric and intestinal pH values was calculated and compared to percent of ibuprofen ionization.

Partitioning coefficient ( $\log P$ ) values of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography and compared to the values calculated using different softwares (MarvinSketch, Molinspiration, KOWWIN, ALOGPS).

*In vitro* assessment of gastrointestinal absorption for thirteen  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids was performed using Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) and Biopartitioning Micellar Chromatography (BMC). In comparison with ibuprofen, lower gastrointestinal absorption was estimated for all tested compounds. Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) and Quantitative Structure-Retention Relationship (QSRR) were performed for tested compounds. QSPR and QSRR models were created in order to establish relationship between geometrical, thermodynamic, physicochemical, electronical molecular descriptors and corresponding PAMPA (%T,  $-\log P_{app}$ ) and BMC ( $k$ ) parameters. Structures of compounds with potentially improved gastrointestinal absorption were designed based on selected QSPR or QSRR model and docking results.

*In vivo* assessment of anti-inflammatory activity of selected  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids and ibuprofen was performed using rat paw oedema test. The lowest  $\text{ED}_{50}$  value was obtained with  $\alpha$  methyl substituted derivative of  $\beta$ -hydroxy-

$\beta$ -diphenylpropionic acid ( $ED_{50}=14.79 \mu\text{mol/kg}$ ). Derivative of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -diphenylpropionic acid containing nitro group in *para* position has similar  $ED_{50}$  value ( $47.76 \mu\text{mol/kg}$ ) comparing to ibuprofen ( $43.97 \mu\text{mol/kg}$ ). Two more compounds show slightly higher  $ED_{50}$  values than ibuprofen (around  $50 \mu\text{mol/kg}$ ), while  $ED_{50}$  values of remaining compounds were above  $80 \mu\text{mol/kg}$ .

During the anti-inflammatory testing, rat's stomachs were taken for macroscopic lesion examination and thereupon were frozen until determination of biochemical parameters malonyldialdehyde (MDA) and glutathione (GSH). Macroscopic examination of rat stomachs showed presence of minimal lesions, and results of MDA and GSH determination showed that compounds containing trifluoromethyl group cause more oxidative stress in gastric tissue than ibuprofen. All other compounds cause less oxidative stress than ibuprofen.

Parameters of oxidative stress were determined in heparinized rat plasma which was collected during *in vivo* anti-inflammatory testing. Values of balance between pro-oxidants and antioxidants were lower for all tested compounds comparing to ibuprofen. Total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) were determined and their quotient (OS index) showed that none of the acids cause more oxidative stress than ibuprofen. In the plasma of animals treated with two acids containing trifluoromethyl group activity of enzyme paraoxonase was statistically lower than in the plasma of animals treated with ibuprofen.

Concentrations of hepatic enzymes: alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined in heparinized animal plasma. The presence of these enzymes in plasma can indicate liver cells damage. Results showed that there was no statistically significant difference between groups of animals treated with any tested compound and the group of animals treated with ibuprofen.

*In vitro* assessment of cyclooxygenase inhibition and selectivity of six selected compounds towards COX-2 inhibition were performed using commercial COX kit. Five compounds with the best anti-inflammatory results *in vivo* (lowest  $ED_{50}$  values), and sixth compound, the one with trifluoromethyl group in the structure with highest  $ED_{50}$

were chosen. The best selectivity towards COX-2 isoform showed compound containing polar nitro group in *para* position of benzene ring which was in accordance with docking experiments.

**Key words:**  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids, Reformatsky reaction, cyclooxygenase, docking, gastrointestinal absorption, PAMPA, BMC, QSRR, QSPR, oxidative stress.

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

**UDK number:** 615.212.3.074/.076(043.3)



# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. INFLAMACIJA, ISTORIJSKI RAZVOJ I HEMIJSKA STRUKTURA ANTIINFLAMATORNIH LEKOVA</b> ---	<b>2</b>
1.1.1. Simptomi i mehanizam nastanka inflamacije.....	2
1.1.2. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi: razvoj, hemijska struktura i mehanizam delovanja.....	4
<b>1.2. CIKLOOKSIGENAZA</b> -----	<b>9</b>
1.2.1. Uloga ciklooksigenaze.....	9
1.2.2. Struktura ciklooksigenaze .....	11
<b>1.3. TERAPIJSKI EFEKTI, NEŽELJENI EFEKTI I KONTRAINDIKACIJE ZA PRIMENU NESTEROIDNIH ANTIINFLAMATORNIH LEKOVA</b> -----	<b>15</b>
1.3.1. Gastrotoksičnost.....	16
1.3.2. Uticaj na agregaciju trombocita .....	17
1.3.3. Nefrotoksičnost .....	17
1.3.4. Hepatotoksičnost.....	18
1.3.5. COX-1 i COX-2 u CNS-u: novi aspekt lečenja Alchajmerove bolesti .....	19
1.3.6. COX-2 u jedru: novi aspekt lečenja kancera .....	20
1.3.7. Trudnoća i porođaj-kontraindikacije za primenu NSAIL.....	21
<b>1.4. MOLEKULSKI DOKING</b> -----	<b>22</b>
<b>1.5. REFORMATSKI REAKCIJE</b> -----	<b>24</b>
<b>1.6. ISPITIVANJA I ZNAČAJ OSNOVNIH FIZIČKO-HEMIJSKIH I BIOFARMACEUTSKIH OSOBINA FARMAKOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA</b> -----	<b>27</b>
1.6.1. Konstanta jonizacije i pregled metoda za određivanje $pK_a$ .....	27
1.6.2. Particioni koeficijent i pregled metoda za određivanje $\log P$ .....	30
1.6.3. Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA) .....	32
6.4. Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC) .....	35
1.6.5. Formiranje, procena kvaliteta i validacija QSPR i QSRR modela.....	37
1.6.6. Izbor molekuskog seta podataka .....	38
1.6.7. Molekulski deskriptori .....	38
1.6.8. Statističke metode za formiranje QSRR i QSPR modela.....	39
1.6.8.1. Multipla linearna regresija .....	39
1.6.8.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata .....	40

1.6.8.3. Veštačke neuronske mreže.....	40
1.6.9. Validacija QSAR, QSPR i QSRR modela.....	42
<b>1.7. IN VIVO ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI</b> -----	<b>43</b>
<b>1.8. IN VITRO ISPITIVANJE INHIBICIJE CIKLOOKSIGENAZE</b> -----	<b>44</b>
<b>1.9. BIOHEMIJSKI PARAMETRI</b> -----	<b>45</b>
<b>2. CILJ RADA</b> .....	<b>47</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO I REZULTATI</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1. DOKING STUDIJE</b> -----	<b>52</b>
3.1.1. Računarski programi.....	52
3.1.2. Izvođenje doking studija.....	52
3.1.3. Izračunavanje molekulske zapremine.....	55
3.1.4. Rezultati doking studija i izračunavanja molekulskih zapremina.....	55
<b>3.2. SINTEZA DERIVATA <math>\beta</math>-HIDROKSI-<math>\beta</math>-ARILPROPIONSKE KISELINE</b> -----	<b>61</b>
3.2.1. Hemikalije.....	61
3.2.2. Materijal i oprema.....	62
3.2.3. Hromatografske kolone.....	64
3.2.4. Priprema aparature.....	64
3.2.5. Aktivacija cinka.....	64
3.2.6. Sušenje tetrahidrofurana.....	64
3.2.7. Postupak sinteze.....	65
3.2.8. Hidroliza estra.....	66
3.2.9. Izolovanje kiseline.....	67
3.2.10. Prečišćavanje sintetisanih jedinjenja.....	67
<b>3.3. STRUKTURNA ANALIZA SINTETISANIH JEDINJENJA</b> -----	<b>68</b>
3.3.1. Rezultati strukturne analize sintetisanih jedinjenja.....	69
3.3.1.1. Hemijske strukture sintetisanih jedinjenja.....	69
3.3.1.2. Strukturna analiza sintetisanih derivata $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilpropionske kiseline.....	69
<b>3.4. OSNOVNA FIZIČKO-HEMIJSKA I BIOFARMACEUTSKA ISPITIVANJA <math>\beta</math>-HIDROKSI-<math>\beta</math>-ARILALKANSKIH KISELINA</b> -----	<b>72</b>
3.4.1. Određivanje konstanti jonizacije ( $pK_a$ ) $\beta$ -hidroksi- $\beta$ arilalkanskih kiselina.....	72

3.4.1.1. Računarski programi .....	72
3.4.1.2. Reagensi i hemikalije.....	72
3.4.1.3. Oprema .....	73
3.4.1.4. Priprema mobilnih faza za HPLC analizu .....	73
3.4.1.5. Priprema rastvora jedinjenja za analizu .....	74
3.4.1.6. Hromatografski uslovi .....	74
3.4.1.7. Izračunavanje <b>wwpKa</b> vrednosti.....	74
3.4.1.8. Rezultati određivanja i predviđanja $pK_a$ vrednosti $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina.....	75
3.4.2. Određivanje particionog koeficijenta (logP) $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina.....	77
3.4.2.1. Računarski programi .....	77
3.4.2.2. Reagensi i hemikalije.....	77
3.4.2.3. Oprema .....	78
3.4.2.4. Priprema rastvora .....	78
3.4.2.5. Priprema mobilne faze .....	78
3.4.2.6. Hromatografski uslovi .....	79
3.4.2.7. Tok eksperimenta i izračunavanja.....	79
3.4.2.8. Rezultati određivanja i predviđanja logP.....	80
3.4.3. Predviđanje gastrointestinalne apsorpcije primenom PAMPA testa i izvođenje QSPR studija ..	84
3.4.3.1. Računarski programi .....	84
3.4.3.2. Reagensi i hemikalije.....	84
3.4.3.3. Oprema .....	85
3.4.3.4. Hromatografska kolona.....	85
3.4.3.5. Priprema rastvora .....	85
3.4.3.6. Izvođenje PAMPA testa .....	86
3.4.3.7. Hromatografski uslovi .....	87
3.4.3.8. Izračunavanje PAMPA parametara .....	87
3.4.3.9. Rezultati PAMPA testa .....	88
3.4.3.10. Izračunavanje molekulskih deskriptora, formiranje QSPR modela i statistička analiza....	89
3.4.3.11. MLR-QSPR, PLS-QSPR i ANN-QSPR studije.....	91
3.4.3.12. Rezultati formiranih QSPR modela i statistička analiza .....	95
3.4.4. Procena gastrointestinalne apsorpcije primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i QSRR studije .....	101
3.4.4.1. Računarski programi .....	101
3.4.4.2. Reagensi i hemikalije.....	101
3.4.4.3. Oprema .....	102
3.4.4.4. Priprema rastvora .....	102
3.4.4.5. Određivanje optimalnog sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi BMC sistema .....	103

3.4.4.6. Hromatografski uslovi .....	104
3.4.4.7. Izvođenje BMC ispitivanja .....	104
3.4.4.8. Rezultati BMC eksperimenata .....	105
3.4.4.9. Izračunavanje molekulskih deskriptora i QSRR analiza .....	106
3.4.4.10. MLR-QSRR, PLS-QSRR i ANN-QSRR studije .....	106
3.4.4.11. Statistička analiza formiranih QSRR modela.....	107
3.4.4.12. Rezultati formiranih QSRR modela i statistička analiza .....	107
<b>3.5. ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI SINTETISANIH KISELINA I PROCENA NEŽELJENIH EFEKATA -----</b>	<b>110</b>
3.5.1. Reagensi i hemikalije .....	110
3.5.2. Oprema .....	110
3.5.3. Priprema rastvora.....	110
3.5.4. Tok eksperimenta .....	112
3.5.5. Rezultati ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti.....	114
3.5.6. Test gastrične podnošljivosti .....	116
3.5.7. Rezultati testa gastrične podnošljivosti .....	117
<b>3.6. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA-----</b>	<b>118</b>
3.6.1. Homogenizacija tkiva želudaca.....	118
3.6.1.1. Reagensi i hemikalije.....	118
3.6.1.2. Oprema .....	118
3.6.1.3. Priprema rastvora .....	118
3.6.1.4. Procedura.....	119
3.6.2. Dobijanje plazme iz pune krvi .....	119
3.6.2.2. Oprema .....	119
3.6.2.3. Procedura.....	119
3.6.3. Metode određivanja koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite .....	120
3.6.3.1. Računarski programi .....	120
3.6.3.2. Oprema .....	120
3.6.3.3. Određivanje MDA iz homogenata želudaca .....	120
3.6.3.3.1. Reagensi i hemikalije .....	121
3.6.3.3.2. Priprema rastvora.....	121
3.6.3.3.3. Eksperimentalni postupak i izračunavanje.....	122
3.6.3.4. Metoda za određivanje koncentracije redukovanoog glutationa .....	122
3.6.3.4.1. Reagensi i hemikalije .....	123
3.6.3.4.2. Priprema rastvora.....	123

3.6.3.4.3. Eksperimentalni postupak i izračunavanje.....	124
3.6.3.5. Rezultati određivanja MDA i GSH u homogenatima želudaca .....	125
3.6.3.6. Metoda određivanja prooksidativno-antioksidativnog balansa .....	126
3.6.3.6.1. Hemikalije .....	127
3.6.3.6.2. Priprema reagenasa.....	127
3.6.3.6.3. Eksperimentalni postupak.....	128
3.6.3.6.4. Rezultati određivanja PAB.....	129
3.6.3.7. Metoda određivanja totalnog oksidantnog statusa (TOS).....	129
3.6.3.7.1. Hemikalije .....	130
3.6.3.7.2. Priprema reagenasa.....	130
3.6.3.7.3. Eksperimentalni postupak.....	130
3.6.3.8. Metoda određivanja totalnog antioksidantnog statusa (TAS) .....	131
3.6.3.8.1. Hemikalije .....	131
3.6.3.8.2. Priprema reagenasa.....	132
3.6.3.8.3. Eksperimentalni postupak.....	132
3.6.3.8.4. Rezultati određivanja TAS i TOS .....	133
3.6.3.9. Metoda određivanja aktivnosti paraoksonaze 1.....	134
3.6.3.9.1. Hemikalije .....	134
3.6.3.9.2. Priprema rastvora.....	135
3.6.3.9.3. Izvođenje reakcije.....	135
3.6.3.9.4. Izračunavanje diazoksonazne aktivnosti.....	135
3.6.3.9.5. Rezultati određivanja aktivnosti paraoksonaze.....	136
3.6.4. Određivanje biohemijskih parametara: ALP, AST, ALT u plazmi životinja .....	137
3.6.4.1. Rezultati određivanja jetrenih enzima ALP, AST i ALT .....	137
<b>3.7. IN VITRO ISPITIVANJE INHIBICIJE CIKLOOKSIGENAZE .....</b>	<b>139</b>
3.7.1. Hemikalije i materijal .....	139
3.7.2. Oprema .....	139
3.7.3. Priprema rastvora.....	139
3.7.4. Princip metode .....	139
3.7.5. Izvođenje COX reakcije .....	140
3.7.6. Izvođenje enzim imuno analize (EIA).....	140
3.7.7. Rezultati <i>in vitro</i> ispitivanja inhibicije ciklooksigenaze.....	142
<b>4. DISKUSIJA.....</b>	<b>147</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>174</b>

<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>178</b>
<b>7.</b>	<b>PRILOZI.....</b>	<b>205</b>
	<b>PRILOG 1 .....</b>	<b>206</b>
	Spisak publikovanih radova i saopštenja koji čine deo ove doktorske disertacije .....	206
	<b>PRILOG 2 .....</b>	<b>209</b>
	BIOGRAFIJA.....	209

# 1. UVOD

## 1.1. INFLAMACIJA, ISTORIJSKI RAZVOJ I HEMIJSKA STRUKTURA ANTIINFLAMATORNIH LEKOVA

### 1.1.1. Simptomi i mehanizam nastanka inflamacije

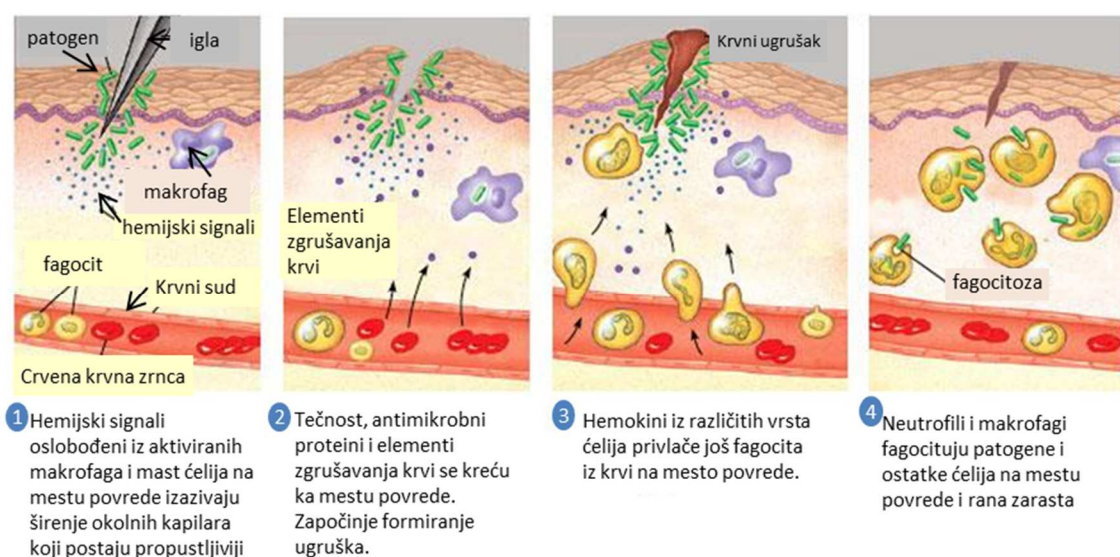
Inflamacija je odbrambena reakcija organizma na nespecifične endogene ili egzogene štetne faktore i predstavlja komponentu urođenog imunskog sistema.<sup>1</sup> Ovaj vitalni zaštitni mehanizam kojim organizam pokušava da se oslobodi štetnog agensa obuhvata niz promena koje se odigravaju u krvnim sudovima i međucelijskom matriksu. Primarna funkcija procesa inflamacije je da brzo uništi ili izoluje osnovni uzrok poremećaja, zatim da ukloni oštećeno tkivo i da, na kraju, ponovo uspostavi tkivnu homeostazu.<sup>2,3</sup> Kada nije pravilno regulisana inflamacija može imati štetne efekte po druga tkiva ili može biti uzrok nove patološke promene.<sup>4</sup>

Uzročnici inflamacije mogu biti patogeni mikroorganizmi (bakterije, virusi, gljivice, protozoe). Inflamaciju može uzrokovati i trauma tkiva izazvana fizičkim ili hemijskim putem. Izloženost humanog organizma različitim hemijskim agensima kao što su benzen, halogenovani ugljovodonici, ketoni, nitrozamini može pokrenuti inflamatorni odgovor.<sup>5</sup> Postoje podaci o tome da i neki lekovi mogu da izazovu inflamatorni odgovor u oku ili u tankom crevu.<sup>6,7</sup> Inflamacija može biti lokalizovana ili generalizovana, akutna ili hronična. Simptomi inflamacije su prvi put opisani od strane rimskog enciklopediste Aulus Cornelius Celsusa i čine tzv. Celsusovu tetradu. U simptome inflamacije spadaju: povišena temperatura (*calor*), crvenilo (*rubor*), bol (*dolor*) i otok (*tumor*). Kasnije je Galen, poznati rimski lekar i filozof, dodao još jedan simptom—gubitak funkcije (*functio laesa*).<sup>8</sup>

Mehanizam nastanka inflamacije uzrokovane mikroorganizmima je mnogo bolje opisan nego mehanizmi izazvani drugim uzročnicima.<sup>9</sup> Faze akutne inflamatorne reakcije su shematski prikazane na Slici 1. Komponente urođene imunosti prepoznaju određene strukture mikroorganizma i molekule koji se oslobađaju iz oštećenih ili nekrotičnih ćelija domaćina.<sup>1</sup> U inicijalnom prepoznavanju infekcije učestvuju makrofagi i mast ćelije koje pokreću produkciju različitih inflamatornih medijatora uključujući hemokine, citokine, vazoaktivne amine, eikozanoide i produkte proteolitičke kaskade. Glavni zadatak ovih medijatora je da omoguće lokalno stvaranje eksudata.



Proteini plazme i leukociti (uglavnom neutrofil) koji se normalno nalaze u krvnim sudovima sada dobijaju prolaz u ekstravaskularno tkivo koje je inficirano. Aktivirani endotel krvnih sudova omogućava selektivan prolaz za neutrofile u intersticijum u odnosu na eritrocite koji ostaju u krvnim sudovima. Po dolasku u oštećeno tkivo neutrofil se aktiviraju i pokušavaju da neutrališu invazivni agens tako što oslobađaju toksične komponente iz svojih granula: reaktivna jedinjenja sa kiseonikom ili azotom, proteinaze, katepsin G i elastaze. Ova reaktivna jedinjenja ne prave razliku između mikrobiološkog uzročnika i ćelije domaćina tako da je kolateralna šteta, tj. oštećenje tkiva domaćina neizbežno.



**Slika 1.** Shematski prikaz faza akutne inflamatorne reakcije

Izvor slike: <https://clinicalscienceblogwiahm.wordpress.com/>

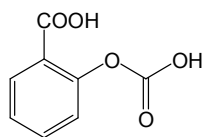
Uspešna inflamatorna reakcija ima za cilj eliminaciju infektivnog agensa i obavezno je praćena fazom reparacije tkiva. Odlučujući korak za prelazak inflamatornog procesa u proces oporavka tkiva je prestanak produkcije pro-inflamatornih citokina i početak produkcije lipoksina koji su antiinflamatorni agensi. Lipoksini inhibiraju regrutovanje neutrofila, a aktiviraju monocite koji uklanjaju nekrotične ćelije i iniciraju remodelovanje tkiva. Ako akutna inflamatorna reakcija ne uspe da eliminiše patogen, inflamatorni proces dobija hronični tok, koji ima drugačije karakteristike.<sup>2</sup>

### 1.1.2. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi: razvoj, hemijska struktura i mehanizam delovanja

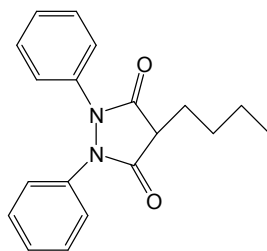
Lekovi koji se koriste za ublažavanje simptoma inflamacije su nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL).<sup>10,11</sup> Postoje dokazi da su se pre nove ere koristile razne biljke i njihovi ekstrakti za ublažavanje upalnih procesa. Među njima je naročito značajna kora bele vrbe (*Salix alba*) iz koje je izolovana aktivna supstanca,  $\beta$ -glukozid salicin, a zatim i salicilna kiselina.<sup>8</sup> U Nemačkoj je 1882. godine sintetisan fenazon (antipirin) u fabrici boja „*Hoechst*“ koja je kasnije prerasla u farmaceutsku kompaniju. Acetilsalicilna kiselina (aspirin) koja se smatra prvim lekom koji je dobijen sintetskim putem je takođe sintetisana u jednoj fabrici boja („*Bayer*“) u Nemačkoj 1897. godine.<sup>12</sup> U istoj zemlji su sintetisani aminopirin, propifenazon, fenacetin kao i njegov metabolit paracetamol. Svi lekovi koji su sintetisani u vreme kada se nije znalo ništa o mehanizmu nastanka inflamacije, sve do otkrića prostaglandina i enzima ciklooksigenaze (COX), nastali su u pre-prostaglandinskoj eri koja je trajala sve do sedamdesetih godina prošlog veka. U tom periodu su sintetisani mnogi tzv. neselektivni antiinflamatorni lekovi kao što su fenilbutazon (1946. godine u Švajcarskoj), indometacin (1964. godine u SAD), ibuprofen (1969. godine u Velikoj Britaniji), flurbiprofen (1977. godine u Velikoj Britaniji), ali i selektivni nimesulid (1971. godine u SAD), za koji je tek dve decenije kasnije utvrđeno da je selektivan, kao i selektivni etodolak, meloksikam, piroksikam i tenoksikam. Sedamdesetih godina prošlog veka u terapiju su uvedeni i diklofenak i ketoprofen. Neselektivni NSAIL su brojniji od selektivnih.

Krajem devedesetih godina prošlog veka u terapiju je uveden celekoksib, lek koji je označio početak razvoja COX-2 selektivnih NSAIL, tzv. koksiba. Posle celekoksiba, u terapiju je uveden i rofekoksib, ali je 2004. godine povučen zbog toga što su sa njim u vezu dovedeni neželjeni kardiovaskularni efekti sa letalnim ishodom.<sup>13</sup> Još uvek nije utvrđeno da li su neželjene kardiovaskularne komplikacije karakteristika cele grupe koksiba ili se vezuju za pojedine strukture, a dok se to ne utvrdi FDA (*Food and Drug Administration*) je donela odluku da koksibi koji su u upotrebi imaju istaknuto upozorenje o mogućim neželjenim kardiovaskularnim efektima i merama opreza.<sup>14</sup> Strukture nekih selektivnih i neselektivnih antiinflamatornih lekova su prikazane na Slici 2.

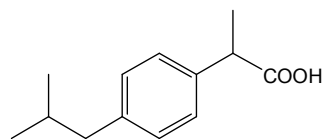
a)



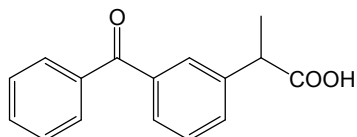
Aspirin



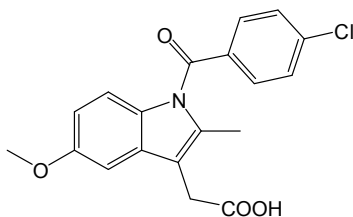
Fenilbutazon



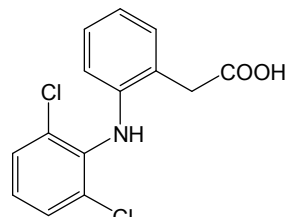
Ibuprofen



Ketoprofen

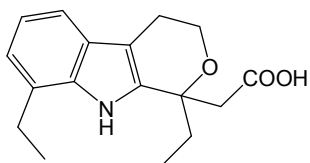


Indometacin

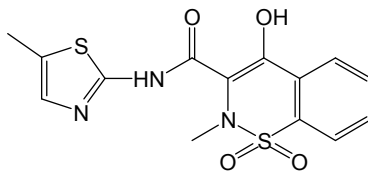


Diklofenak

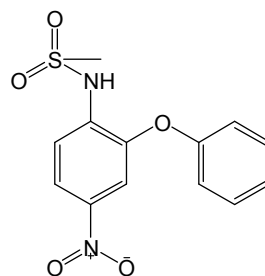
b)



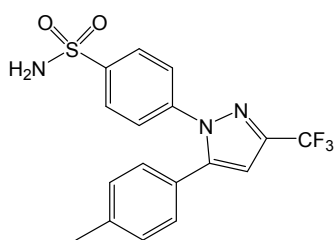
Etodolak



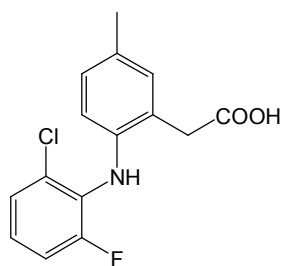
Meloksikam



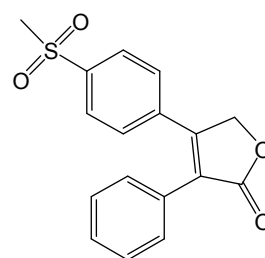
Nimesulid



Celekoksib



Lumirakoksib



Rofekoksib

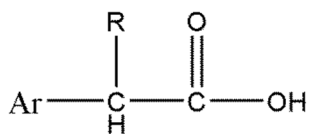
**Slika 2.** Strukturne formule a) neselektivnih

b) selektivnih nesteroidnih antiinflamatornih lekova

Sa aspekta hemijske strukture, NSAIL predstavljaju veoma raznorodnu grupu lekova, premda su većina karboksilne kiseline. Najvažnije podgrupe unutar NSAIL<sup>15</sup> su:

- derivati salicilne kiseline (aspirin, diflunisal),
- derivati 1,2-dihidro-3*H*-pirazol-3-ona (fenazon, aminofenazon, metamizol),
- derivati pirazolidin-3,5-diona (fenilbutazon),
- homolozi N-antranilne kiseline (diklofenak, lumirakoksib),
- derivati indolsirćetne kiseline (indometacin),
- derivati indensirćetne kiseline (sulindak),
- derivati piranoindolsirćetne kiseline (etodolak),
- derivati arilalkanskih kiselina (ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen, naproksen),
- oksikami (piroksikam, meloksikam, nimesulid) i
- koksibi (celekoksib, rofekoksib, etorikoksib).

Derivati arilalkanskih kiselina (Slika 3) predstavljaju grupu NSAIL koja se najčešće koristi. Njihovoj čestoj upotrebi doprinosi i činjenica da se mnogi lekovi iz ove grupe mogu dobiti bez lekarskog recepta.



R = H, CH<sub>3</sub>, ili alkil  
Ar = aril ili heteroaril

**Slika 3.** Opšta formula NSAIL-arilalkanskih kiselina

Ovi lekovi poseduju karboksilnu grupu kao jedini kiseli centar u strukturi. Uvođenjem dva ili tri ugljenikova atoma između kisele grupe i prstena povećava se rastojanje i gubi

se antiinflamatorna aktivnost. Uvođenjem metil grupe u  $\alpha$  položaj karboksilnog bočnog lanca sirćetne ili propionske kiseline, ugljenikov atom postaje hiralan, pa svaki takav lek ima enantiomere. Farmakološki je aktivan S enantiomer, ali se ovi lekovi proizvode kao racemske smeše. U organizmu, kod derivata arilalkanskih kiselina dolazi do inverzije konfiguracije na hiralnom ugljenikovom atomu, pa R enantiomer prelazi u aktivni S, tako da nema potrebe za proizvodnjom čistog S enantiomera.<sup>16</sup> Takav je slučaj i kod ibuprofena, jednog od danas najčešće korišćenih NSAIL koji je prvi put sintetisan iz p-izobutilacetofenona. Ibuprofen je derivat propionske kiseline, a utvrđeno je da se uvođenjem metil grupe u  $\alpha$  položaj u odnosu na karboksilnu grupu pojačava antiinflamatorna aktivnost i smanjuju neželjeni efekti. Uvođenje veće grupe od metil grupe dovodi do smanjenja aktivnosti.<sup>10</sup>

Mehanizam delovanja NSAIL je inhibicija enzima prostaglandin endoperoksid H sintaze. Generički naziv ovog enzima koji je češće u upotrebi je ciklooksigenaza (COX). COX gen je kloniran 1988. godine od strane tri različite grupe istraživača.<sup>17-19</sup> Nekoliko godina kasnije identifikovane su dve izoforme enzima: ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2), što je bilo izuzetno važno otkriće za razumevanje nastanka inflamacije i mehanizma delovanja NSAIL. Neselektivni NSAIL inhibiraju obe izoforme COX enzima, a selektivni samo COX-2. Istorijski razvoj NSAIL se kretao od neselektivnih ka selektivnim lekovima sa ciljem da se izbegnu neželjeni gastrointestinalni efekti koji su vrlo česti, a mogu da budu i veoma ozbiljni. U pre-prostaglandinskoj eri antiinflamatorna aktivnost je bila deo standardnog seta testova na eksperimentalnim modelima na oglednim životinjama u sklopu procesa otkrivanja lekova.<sup>14</sup> Otkrićem da postoje dve izoforme ciklooksigenaze fokus je premešten na sintezu selektivnih NSAIL i potpuno se promenio pristup odabiru jedinjenja za sintezu, pa polako računarski skrining preuzima primat nad skriningom na oglednim životinjama.

Krajem devedesetih godina prošlog veka otkriveni su kontroverzni koksibi (celekoksib, etorikoksib, valdekoksib, parekoksib, lumirakoksib). S jedne strane koksibi su bili u prednosti u odnosu na neselektivne NSAIL jer su ispunili očekivanja u smislu odsustva gastrointestinalnih (GIT) neželjenih efekata, ali s druge strane pojavili su se neočekivani kardiovaskularni neželjeni efekti (infarkt miokarda)<sup>20</sup>, pa su neki lekovi

povučeni (rofekoksib, valdekokoksib), dok su neki i dalje u upotrebi (celekokoksib, etorikoksib, lumirakoksib).

Strukturno posmatrano, stariji NSAIL su karboksilne kiseline, a novija jedinjenja su sulfoni ili sulfonamidi.<sup>14</sup> Međutim, lumirakoksib se može smatrati zaokretom u otkrivanju novih selektivnih NSAIL jer sadrži karboksilnu grupu. Osim toga, lumirakoksib ima jednostavniju strukturu i može se smatrati analogom neselektivnog diklofenaka.<sup>14</sup> Iako je postojalo uverenje da selektivni COX-2 inhibitor ne sme da sadrži karboksilnu grupu, treba napomenuti i to da lumirakoksib ne samo da sadrži karboksilnu grupu već je i najjači COX-2 inhibitor. Strukturno se može smatrati članom grupe arilalkanskih kiselina. U Kanadi je lumirakoksib povučen iz upotrebe zbog sumnje da je povezan sa hepatotoksičnim efektima.<sup>21</sup>

I pored mnogo selektivnih i neselektivnih NSAIL koji su u kliničkoj upotrebi, različiti neželjeni efekti neselektivnih inhibitora sa jedne strane (gastrointestinalni, renalni, hepatici) i selektivnih (kardiovaskularni) sa druge strane stvaraju potrebu za otkrivanjem novih<sup>22-25</sup> struktura koje bi bile selektivniji COX-2 inhibitori, čime bi se omogućila njihova primena u terapiji akutne i hronične inflamacije u najširoj populaciji.

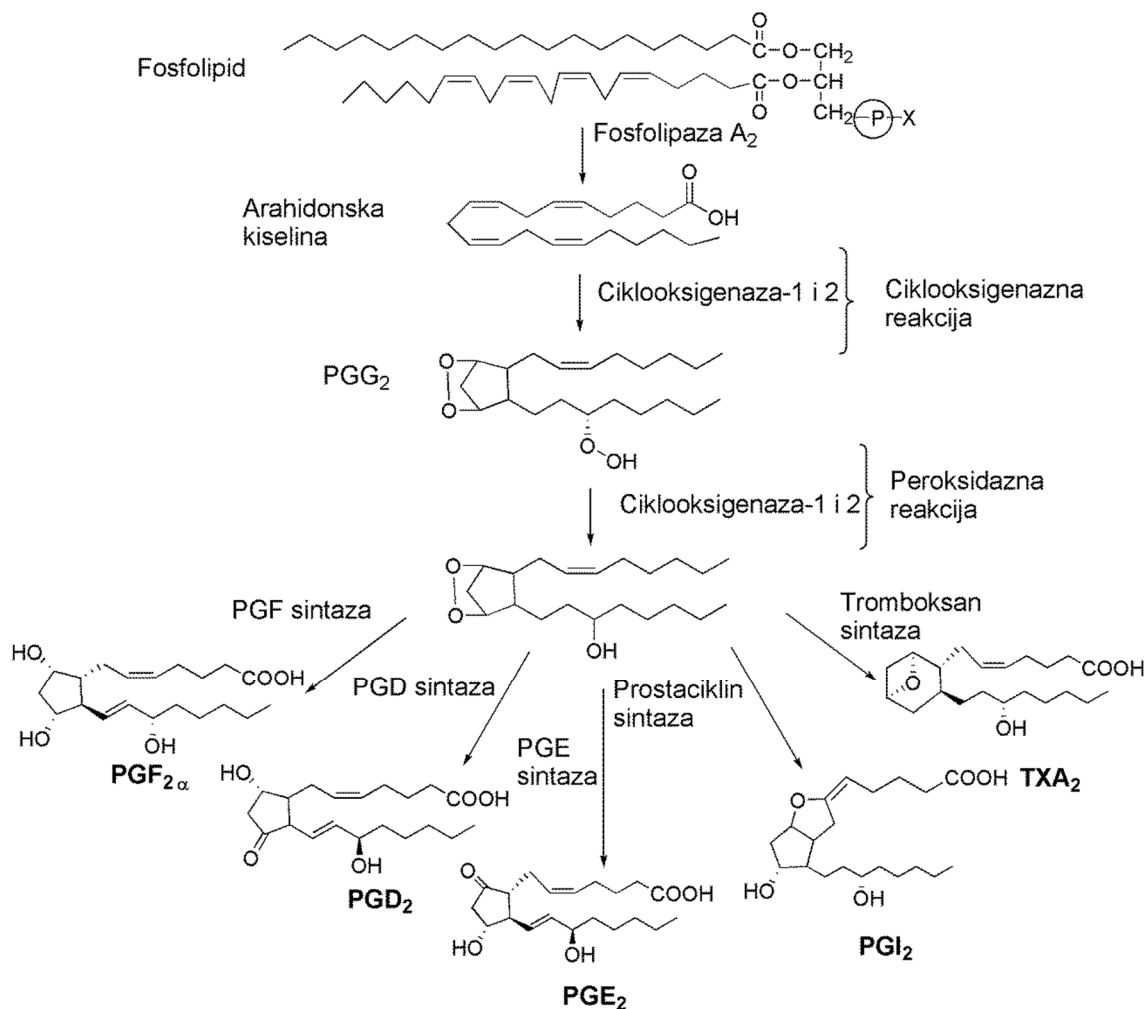
## 1.2. CIKLOOKSIGENAZA

### 1.2.1. Uloga ciklooksigenaze

Katalitičkim delovanjem ciklooksigenaze (COX) iz arahidonske kiseline nastaju prostanoidi (prostaglandini, tromboksani i leukotrieni) (Slika 3).<sup>26</sup>

Prostanoidi pripadaju velikoj grupi hormonski aktivnih C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> i C<sub>22</sub> masnih kiselina čiji je zajednički naziv eikozanoidi. Glavni prekursor prostanoida je arahidonska kiselina, nezasićena masna kiselina sa 20 ugljenikovih atoma koja ulazi u sastav fosfolipidnih estara ćelijske membrane. Biosinteza prostanoida je proces koji se sastoji iz tri koraka, a započinje hidrolizom arahidonata iz glicerofosfolipida uz pomoć fosfolipaze A<sub>2</sub>. Nakon toga, dolazi do oksidacije arahidonske kiseline, adicijom dva molekula kiseonika do hidroksi endoperoksida PGG<sub>2</sub> uz pomoć enzima prostaglandin endoperoksid sintaze (ciklooksigenaze, COX). Redukcijom PGG<sub>2</sub> nastaje PGH<sub>2</sub> koji je prekursor prostaglandina (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>), tromboksana (TXA<sub>2</sub>) i prostaciklina (PGI<sub>2</sub>). Redukciju PGG<sub>2</sub> takođe katalizuje ciklooksigenaza svojom peroksidaznom aktivnošću. NSAIL svoju aktivnost ostvaruju vezujući se za aktivno mesto u ciklooksigenaznom delu enzima, a ne u peroksidaznom.

Neki prostaglandini su medijatori inflamacije, bola i povišene temperature, a neki imaju protektivnu ulogu u organizmu (regulišu protok krvi, intravaskularno formiranje krvnog ugruška, gastrointestinalnu, renalnu i reproduktivnu funkciju), pa je očigledno da inhibicija obe izoforme ciklooksigenaze donosi terapijsku korist, ali može da dovede i do neželjenih efekata.



**Slika 4.** Biosintetski putevi za formiranje prostanoida iz arahidonske kiseline

COX-1 je konstitutivna izoforma enzima koja katalizuje sintezu fizioloških, protektivnih prostaglandina koji imaju esencijalnu ulogu u homeostatskim procesima kao što su agregacija trombocita, zaštita sluznice gastrointestinalnog trakta i održavanje normalne bubrežne funkcije. Prisutna je u skoro svim tipovima ćelija na konstantnom nivou ekspresiranosti. Izoforma COX-2 se smatra inducibilnom i učestvuje u sintezi prostaglandina koji su medijatori inflamacije, bola, povišene telesne temperature i kancerogeneze.<sup>27</sup> Normalno nije ekspresirana u ćelijama (mada ima nekoliko vrlo važnih izuzetaka kao što su mozak, bubrezi, testisi i dušnik) i indukuju je različiti stimuli: bakterijski lipopolisaharid (LPS), pro-inflamatorni citokini (interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2)), faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Antiinflamatorni citokini kojima pripadaju: interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) i interleukin-13 (IL-13), kao i kortikosteroidi smanjuju nivo COX-2.<sup>28</sup> Istraživanja pokazuju da



konstitutivno eksprimirana COX-2 ima ulogu u reprodukciji, održavanju bubrežne funkcije, resorpciji kostiju i neurotransmisiji.<sup>29-32</sup> Dovoljan je samo jedan stimulus, pa da se nivo COX-2 u ćeliji poveća ili smanji u roku od samo nekoliko sati.

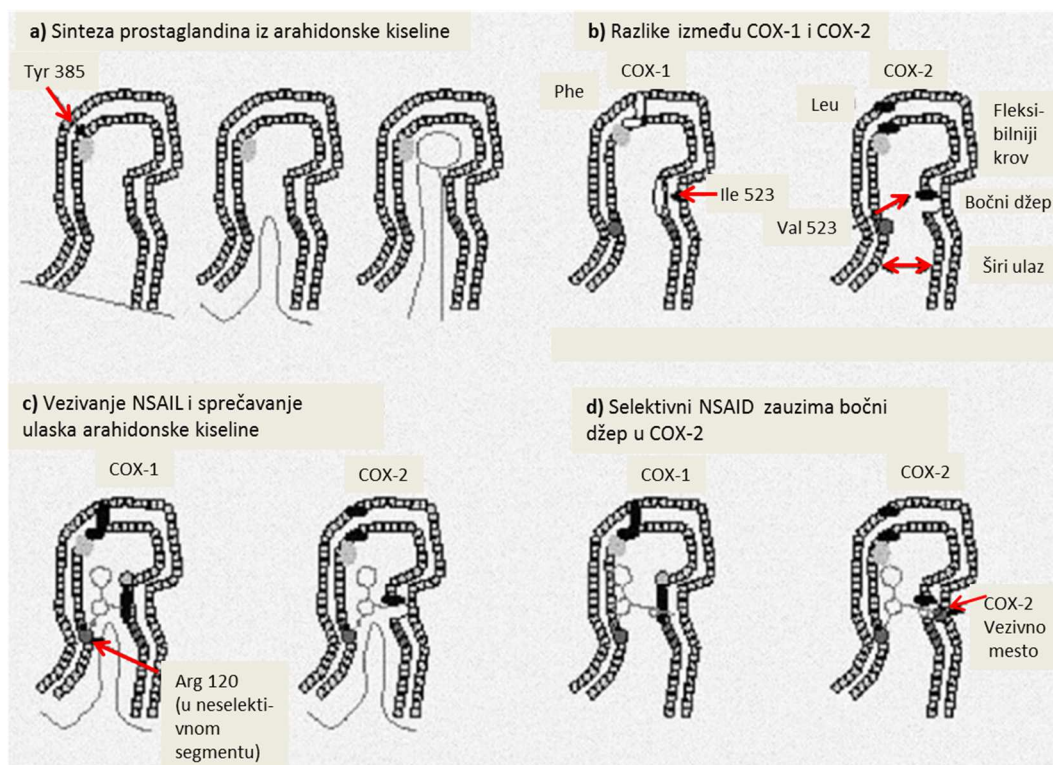
### 1.2.2. Struktura ciklooksigenaze

Struktura molekuskog kompleksa izoforme COX-1 i flurbiprofena je kristalografski rešena 1994. godine,<sup>33</sup> a dve godine kasnije rešena je i struktura molekuskog kompleksa izoforme COX-2 sa selektivnim inhibitorom SC-558.<sup>34</sup> Posle toga je bilo moguće proniknuti u aminokiselinski sastav izoformi, uporediti ih, identifikovati aktivno mesto i utvrditi interakcije koje ostvaruju pojedini NSAIL sa aminokiselinama u aktivnom mestu. Mehanizam delovanja NSAIL je kompetitivna reverzibilna inhibicija COX enzima, osim kod aspirina koji deluje kompetitivnom ireverzibilnom inhibicijom jer acetiluje aminokiselinu *Ser530* u aktivnom mestu. U niskim koncentracijama aspirin vrlo brzo (tokom nekoliko minuta) acetiluje ciklooksigenazu i na taj način sprečava vezivanje arahidonske kiseline za enzim.<sup>35</sup>

COX-1 i COX-2 izoforme imaju masu od oko 71 kDa, 63% homologije u aminokiselinskom sastavu, sličnu tercijarnu strukturu i slično aktivno mesto.<sup>27</sup> Zrela izoforma COX-1 se sastoji od 576 aminokiselina, a COX-2 od 587 aminokiselina. Postoji 60-65% sličnosti u sekvenci aminokiselina između izoforme COX-1 i COX-2 u okviru iste vrste. Sličnost u sekvenci aminokiselina između odgovarajućih COX izoformi različitih vrsta iznosi 85-90%.

COX izoforme su homodimeri, ali uloga dimerizacije u katalizi nije utvrđena. Svaki od monomera se sastoji iz tri domena: epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor*, EGF) sa oko 50 aminokiselina, domen koji se vezuje za membranu (*membrane binding domain*, MBD) sa oko 50 aminokiselina i katalitički domen sa oko 460 aminokiselina. Najveće razlike između izoformi su na domenima vezanim za membrane.<sup>36,37</sup> Obe izoforme su vezane za membranu, tako da arahidonska kiselina oslobođena iz membrane biva usisana u najbliži otvor kanala COX enzima i savijena oko katalitičkog domena enzima koji podseća na ukosnicu (Slika 5a). Iz arahidonske kiseline dalje započinje proces sinteze prostanoida, kao što je opisano u poglavlju 1.2.1.

Ciklooksigenazna aktivnost se odvija u hidrofobnom kanalu koji se nalazi u srcu enzima, a peroksidazna je vezana za prisustvo hema i odvija se blizu površine enzima. Vezivanje NSAIL i sprečavanje ulaska arahidonske kiseline u enzimski kanal je prikazano na Slici 5a).



**Slika 5.** a) Inicijalne faze u sintezi prostaglandina  
b) Vezivanje standardnog NSAID za Arg 120 da bi se inhibirala sinteza prostaglandina direktnom blokadom COX kanala  
c) Razlika između COX-1 i COX-2  
d) Specifična blokada COX-2

Izvor slike: Hawkey C.J. COX-2 Inhibitors. *Lancet* **1999**, 353, 307-314.

Aktivno mesto COX-2 je veće i fleksibilnije u odnosu na aktivno mesto COX-1 (Slika 5d). Još jedna važna razlika je što kod COX-1 postoji negativna alosterija pri niskim koncentracijama arahidonske kiseline, što praktično znači da, u slučaju da su obe izoforme istovremeno eksprimirane u ćeliji, COX-2 se mnogo efikasnije takmiči za oslobođenu arahidonsku kiselinu nego COX-1.

Postoji nekoliko značajnih razlika u aminokiselinskom sastavu u okviru katalitičkog domena koje se mogu iskoristiti za dizajniranje selektivnog NSAID (Slika 5b).<sup>21</sup> Ključna razlika je na poziciji 523 na kojoj se kod COX-1 nalazi izoleucin koji je

voluminozniji od valina koji se nalazi na istoj poziciji kod COX-2. Zbog manje voluminoznosti valina otvara se mogućnost ostvarivanja interakcija u jednom hidrofilnom bočnom džepu u aktivnom mestu COX-2 koji nije dostupan za interakcije u COX-1 jer je blokiran voluminoznijim izoleucinom. Iz ovog razloga aktivno mesto COX-2 u celini zauzima 25% veću zapreminu od aktivnog mesta COX-1 (Slika 5d).

Drugom značajnom razlikom između ove dve izoforme smatra se supstitucija izoleucina na poziciji 434 u izoformi COX-1 valinom u izoformi COX-2. Kurumbail i saradnici su izneli pretpostavku da ova promena u strukturi COX-2 takođe doprinosi otvaranju bočnog džepa za interakcije sa selektivnim inhibitorima.<sup>38</sup> Smatra se da je zbog valina na poziciji 434 u COX-2 povećana mobilnost ostalih aminokiselina, pa je *Phe518* tako pomeren da se dodatno povećava zapremina bočnog kanala.<sup>39</sup> Ispitana je COX-2 izoforma kod koje je acetilovan *Ser530* uz pomoć aspirina i nije detektovano smanjenje produkcije 15-HETE (15-hidroksieikozatetraenska kiselina, metabolit arahidonske kiseline) što govori u prilog tome da zbog valina na poziciji 434 postoji mogućnost da se arahidonska kiselina „uvuče“ u aktivno mesto i pored acetilovanog serina.<sup>27</sup>

Treća razlika u sastavu aminokiselina u aktivnom mestu je ta što se u COX-2 izoformi nalazi *Arg513*, dok je u izoformi COX-1 na toj poziciji *His*. *Arg513* je jedna od aminokiselina u hidrofilnom bočnom džepu sa kojom selektivni inhibitori ostvaruju bliske interakcije.

Još jedna bitna razlika između ove dve izoforme enzima je odsustvo sekvence od 17 aminokiselina na N-terminusu i prisustvo sekvence od 18 aminokiselina na C-terminusu u COX-2 izoformi u odnosu na COX-1 izoformu.<sup>38</sup> Funkcija ovog umetnutog segmenta u COX-2 izoformi još uvek nije utvrđena. Ovo je razlog za različito brojanje aminokiselina u ove dve izoforme (npr. serin koji se acetiluje aspirinom je na poziciji 530 u COX-1, a na poziciji 516 u COX-2). Da bi bilo jasnije, nadalje će aminokiseline u COX-2 biti brojane kao u COX-1. Obe izoforme COX enzima imaju identičnu sekvencu četiri poslednje aminokiseline na C terminusu jer one generišu signal za vezivanje enzima za membranu endoplazmatskog retikuluma. Međutim, COX-2 može da se veže i za membranu jedra, a objašnjenje za to može biti u

činjenici da trodimenzionalne strukture 18 aminokiselina u COX-1 i 30 aminokiselina u COX-2 nisu kristalografski rešene, što ostavlja izvestan nivo fleksibilnosti u prostoru.<sup>27</sup>

Izoforma COX-2 se može podeliti na tri regiona: P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> i P<sub>3</sub>. Najznačajnije aminokiseline u regionu P<sub>1</sub> su *Arg120* i *Tyr355*. NSAIL koji imaju karboksilnu grupu, najznačajniju interakciju jonskog tipa ostvaruju upravo sa gvanidino grupom *Arg120*, dok jedinjenja bez karboksilne grupe ne ostvaruju interakciju sa ovom aminokiselinom. NSAIL ostvaruju vodonične veze sa *Tyr355* najčešće preko hidroksilne grupe.

P<sub>2</sub> region je hidrofobni kanal veličine 25 Å oivičen mnogim aminokiselinama, a koji se završava aminokiselinama *Tyr385* i *Tyr387*. Ovaj P<sub>2</sub> region je prisutan u obe izoforme enzima. Vezujuće mesto za NSAIL obuhvata gornju polovinu ovog kanala, od *Arg120* do *Tyr385*. Od ovog hidrofobnog kanala se odvaja bočna grana, formirana od aminokiselina *Leu352*, *Ser353*, *Phe518* i *Val523*, koja nije dostupna za interakcije kod izoforme COX-1 zato što ta izoforma ima *Ile523* koji blokira ulaz inhibitora u kanal.

Ključne aminokiseline za interakcije u regionu P<sub>3</sub> su *His90*, *Gln192* i *Arg513* (kod COX-1 je na poziciji 513 *His*). Ovaj region nije dostupan u COX-1 izoformi, tako da se najznačajnijom razlikom između selektivnih i neselektivnih inhibitora smatra upravo to što selektivni imaju takvu strukturu da mogu da zauzmu region P<sub>3</sub>.<sup>38</sup>

### **1.3. TERAPIJSKI EFEKTI, NEŽELJENI EFEKTI I KONTRAINDIKACIJE ZA PRIMENU NESTEROIDNIH ANTIINFLAMATORNIH LEKOVA**

Osnovni terapijski efekti NSAIL su antiinflamatorni, analgetski i antipiretički. Postoji veliki broj akutnih i hroničnih oboljenja u kojima se primenjuju NSAIL. Najčešće indikacije za primenu NSAIL su blag do umeren bol izazvan inflamatornim procesom ili povredom tkiva, uganuća zglobova, istegnuća mišića, reumatizam, bolovi u leđima, išijas, osteoartritis, reumatoidni artritis, akutna kostobolja, inflamatorne artropatije, dismenoreja, glavobolja, postoperativni bol, bubrežne i žučne kolike, povišena telesna temperatura.<sup>40</sup> Osteoartritis predstavlja indikaciju za koju se najčešće propisuju NSAIL. Procenjeno je da čak 80% populacije iznad 55 godina ima radiografski nalaz osteoartritisa, iako je uobičajeno da se simptomi ispoljavaju kod 60% takvih pacijenata.<sup>10</sup> Dostupnost NSAIL bez lekarskog recepta i starenje populacije koja često oboljeva od osteoartritisa doprinosi sve većoj upotrebi NSAIL. Najčešća primena NSAIL koji se mogu dobiti bez lekarskog recepta je u tretmanu akutnog i hroničnog bola. Najčešće se primenjuju *per os*, a prednost njihove parenteralne primene kod akutnog bola je brzo otpočinjanje dejstva.<sup>41</sup> Aspirin se u malim dozama koristi u profilaksi infarkta miokarda u starijoj populaciji i to je još jedna važna indikacija ovih lekova.

Inhibicija COX-1 u pojedinim organima kao što su želudac, jetra i bubrezi može dovesti do neželjenih efekata, dok inhibicija COX-2 u centralnom nervnom sistemu (CNS-u) i ćelijama kancera otvara perspektivu za razvoj novih aspekata lečenja Alchajmerove bolesti i nekih tipova kancera. Primena NSAIL je kontraindikovana u trudnoći.

Analizom neželjenih efekata koji su se javljali posle primene NSAIL bilo je moguće razumeti fiziološku ulogu COX-1 i pre nego što je bilo moguće klonirati COX gen, rešiti sekvencu enzima i odrediti organe u kojima je ekspresija COX-1 esencijalna za normalno funkcionisanje.

NSAIL su lekovi koji su u širokoj upotrebi i procenjuje se da više od 30 miliona pacijenata širom sveta koristi NSAIL, a da oko milion ljudi koristi ove lekove

svakodnevno.<sup>42</sup> Ovo treba imati na umu kada se razmatra incidenca svakog neželjenog efekta, jer iako može da bude relativno niska, s obzirom na raširenost upotrebe NSAIL, broj pacijenata kod kojih se ispolji neki neželjeni efekat može da bude ogroman. Podaci pokazuju da se od ukupnog broja prijavljenih neželjenih efekata čak 25% odnosi na NSAIL.<sup>42</sup>

### 1.3.1. Gastrotoksičnost

Glavno neželjeno dejstvo neselektivnih NSAIL je oštećenje sluznice gastrointestinalnog trakta koje se javlja kako kod akutne, tako i kod hronične primene. Podaci pokazuju da se svake godine u SAD hospitalizuje 100 000 pacijenata, a da 16 500 umre od komplikacija u gornjim delovima gastrointestinalnog trakta kao posledice primene NSAIL.<sup>43</sup>

Intenzitet gastrointestinalnih neželjenih efekata varira od blagih kao što su dispepsija, dijareja, nauzeja ili povraćanje do vrlo ozbiljnih kao što je peptički ulkus ili krvarenje u gastrointestinalnom traktu.<sup>44-47</sup> Utvrđeno je da će jedna od pet osoba koje su na hroničnoj terapiji konvencionalnim NSAIL imati oštećenje želuca koje, iako može biti čak i asimptomatsko, nosi nedvosmisleni rizik od ozbiljnog krvarenja ili perforacije.<sup>46</sup> Gastrointestinalna toksičnost koja je nastala kao posledica primene NSAIL jedan je od najozbiljnijih neželjenih efekata lekova uopšte. Razlog zbog koga dolazi do ovog neželjenog efekta je inhibicija COX-1 izoforme koja je u želucu zadužena za produkciju citoprotektivnih prostaglandina koji smanjuju sekreciju parijetalnih ćelija želuca, izazivaju vazodilataciju zbog čega je prokrvljenost bolja i stimulišu produkciju viskoznog mukusa.

U sprovedenim meta studijama utvrđen je redosled potencijala NSAIL da izazovu ozbiljne gastrointestinalne neželjene efekte kada se primenjuju u terapijskim dozama.<sup>48-50</sup> Na prvom mestu je ketoprofen, zatim slede piroksikam, indometacin, naproksen, sulindak, aspirin, fenoprofen, diflunisal, diklofenak i ibuprofen.

Indoprofen je primer leka koji je povučen iz upotrebe zbog toga što je izazivao gastrointestinalno krvarenje.

### **1.3.2. Uticaj na agregaciju trombocita**

Primenom neselektivnih NSAIL može se smanjiti sposobnost trombocita da agregiraju.<sup>51</sup> U trombocitima se detektuje jedino COX-1, tako da inhibicijom ove izoforme dolazi do inhibicije produkcije tromboksana (TXA<sub>2</sub>), i smanjenja agregacije trombocita. S obzirom da trombociti ne poseduju jedro i da je njihov vek 8-10 dana, može se reći da je inhibicija produkcije tromboksana u tom smislu konačna. S druge strane, dolazi do inhibicije proizvodnje prostaciklina (fiziološkog antagoniste tromboksana) u endotelnim ćelijama krvnih sudova. Prostaciklin poseduje antitrombocitno, antikoagulantno, profibrinolitičko, vazodilatatorno i citoprotektivno delovanje. Endotelne ćelije poseduju jedro, pa se COX-1 u njima rekonstituiše i prostaciklin se ponovo stvara. Ako se primeni adekvatna doza acetilsalicilne kiseline, efekat na trombocitima će se ostvariti već u presistenskoj cirkulaciji. Nakon toga će se 50% preostale doze metabolisati u jetri (efekat prvog prolaza kroz jetru), tako da preostala količina unete doze neznatno utiče na endotelne ćelije. Može se reći da je sistemska vaskulatura delimično zaštićena presistemskim metabolizmom acetilsalicilne kiseline u jetri.<sup>10</sup> Za ostvarivanje ovog antiagregacijskog efekta ključno je da doza acetilsalicilne kiseline bude relativno niska (75-100 mg na dan) jer bi veća doza, tj. doza od 500 mg koja se koristi za postizanje antiinflamatornog efekta dovela do inhibicije COX-1 u endotelnim ćelijama i smanjenja produkcije prostaciklina. Konačan ishod je blokada produkcije tromboksana koji povećava koagulabilnost krvi, a prostaciklin se i dalje stvara i ostvaruje vazodilatatorni efekat na krvni sud.<sup>52</sup> Ovaj efekat je osnova primene acetilsalicilne kiseline u prevenciji ishemijske bolesti srca kod pacijenata sa aterosklerotski izmenjenim koronarnim krvnim sudovima.

### **1.3.3. Nefrotoksičnost**

Kod pacijenata sa očuvanom bubrežnom funkcijom neželjeni efekat na bubrege je beznačajan, ali kod pacijenata kod kojih je kompromitovana bubrežna funkcija dolazi do izražaja. Kod pacijenata koji boluju od kongestivne srčane insuficijencije, ciroze jetre ili bubrežne insuficijencije protok krvi kroz bubrege zavisi od produkcije prostaglandina (što nije slučaj kod zdravih bubrega), tako da inhibicijom produkcije prostaglandina može da dođe do renalne ishemije. Ovaj neželjeni efekat se primećuje kod hronične primene NSAIL.<sup>53</sup>

#### 1.3.4. Hepatotoksičnost

Postoji mnogo podataka u literaturi o pojavi hepatotoksičnih efekata pri hroničnoj primeni NSAIL, mada se hepatotoksičnost može ispoljiti i posle samo jedne doze ovih lekova.<sup>54-56</sup> Tačni mehanizmi nastanka hepatotoksičnosti nisu do kraja rasvetljeni, ali na osnovu eksperimentalnih podataka može se zaključiti da toksičnosti doprinosi povećana koncentracija NSAIL u hepatobilijarnom traktu i formiranje reaktivnih metabolita koji se kovalentno vezuju za proteine jetre i izazivaju oksidativni stres. Povećanje nivoa jetrenih enzima, alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST), uočeno je kod 15% pacijenata koji su na terapiji NSAIL, a zabeleženi su i vrlo retki slučajevi fatalne hepatotoksičnosti koji se obično javljaju posle primene NSAIL tokom 12 do 15 meseci.<sup>57,58</sup> U ranim fazama kliničkih studija na novim lekovima obično nema znakova ozbiljnih hepatskih problema, ali se javljaju blaga povišenja jetrenih enzima.<sup>59</sup>

Sprovedeno je više meta analiza koje su pokazale da je različita incidenca hepatskih neželjenih efekata kod različitih NSAIL, pa je tako rizik od pojave hepatitisa najveći kod sulindaka (148 slučajeva na 100 000 pacijenata), a najniži kod diklofenaka (od 1-2 slučaja na 1 000 000 pacijenata do 6-18 slučajeva na 100 000 pacijenata godišnje).<sup>42,59</sup> S obzirom na veoma veliki broj pacijenata koji koriste diklofenak u akutnoj terapiji bola i inflamacije ili u hroničnoj terapiji osteoartritisa i reumatoidnog artritisa, apsolutni broj neželjenih hepatskih efekata je veoma veliki. Suzuki i saradnici<sup>60</sup> su predstavili kombinovanu listu nekoliko velikih baza podataka koje su identifikovale 385 različitih lekova koji se dovode u vezu sa oštećenjem jetre, a među njima su i diklofenak, ibuprofen, naproksen, nimesulid, piroksikam i sulindak.

Zbog izražene hepatotoksičnosti iz upotrebe ili iz daljeg testiranja su povučeni mnogi lekovi: benoksaprofen, sudoksikam, izoksikam, bromfenak, oksifenbutazon.



### 1.3.5. COX-1 i COX-2 u CNS-u: novi aspekt lečenja Alchajmerove bolesti

COX-1 je eksprimirana u neuronima mozga i preovlađuje u frontalnom režnju. Smatra se da prostaglandini učestvuju u kompleksnim integrativnim funkcijama kao što je, na primer, modulacija autonomnog nervnog sistema.<sup>61,62</sup> Mozak je jedan od svega nekoliko organa u kojima je COX-2 konstitutivno eksprimirana i to u korteksu, hipokampusu, hipotalamusu i kičmenoj moždini. Osim u neuronima, nalazi se i u okolnim ćelijama kao što su endotelne ćelije kranijalnih krvnih sudova i mikroglija. Upravo u ovim ćelijama dolazi do povećanja nivoa COX-2 pod dejstvom pirogena kao što je lipopolisaharid. Postoje jasni dokazi da PGE<sub>2</sub> koji učestvuje u febrilnom odgovoru potiče od aktivnosti COX-2 u hipotalamusu. Inflamacija je praćena bolom, a smatra se da je kičmena moždina mesto gde COX-2 utiče na nociceptivne procese.<sup>27</sup> Nivo COX-2 u neuronima se povećava pri abnormalnoj (konvulzivnoj) neuronskoj aktivnosti. Istraživanja sugerišu da prostaglandini imaju ulogu u neurotransmisiji. Stoga upotreba selektivnih COX-2 inhibitora može da moduliše CNS funkcije. Uslov koji bi morao ispuniti jedan COX-2 selektivni inhibitor sa centralnim delovanjem je da u strukturi ne poseduje karboksilnu grupu ili bilo koju drugu grupu koja bi bila jonizovana u fiziološkim uslovima, kako bi mogao da prođe krvno-moždanu barijeru.

Alchajmerova bolest je najčešći uzrok demencije i jedna od najbolje istraženih neurodegenerativnih bolesti. Danas su vrlo aktuelna istraživanja o primeni COX-2 selektivnih inhibitora u terapiji Alchajmerove bolesti.<sup>63-66</sup> Dobijeni rezultati sugerišu da se upotrebom selektivnih COX-2 inhibitora, dužom od dve godine, smanjuje rizik od nastanka Alchajmerove bolesti. Prvobitni podaci o mogućoj primeni selektivnih NSAIL u lečenju Alchajmerove bolesti su iz epidemioloških studija. U nekoliko takvih studija utvrđena je negativna korelacija između hronične upotrebe NSAIL i incidence Alchajmerove bolesti.<sup>67</sup> Mehanizam delovanja NSAIL u terapiji Alchajmerove bolesti je antiinflamatorni jer je utvrđeno da su upravo inflamatorni procesi uključeni u etiologiju ove bolesti.<sup>68</sup> Oko plakova koji nastaju tokom Alchajmerove bolesti zajedno sa proteinom β-amiloidom prisutni su klasični znaci inflamacije kao što su aktivirane mikroglija ćelije, citokini i fragmenti komplementa. Protein β-amiloid može da aktivira mikroglija ćelije, a NSAIL smanjuju odgovor mikroglija na ovaj protein. Postoji mišljenje da su lezije koje nastaju u Alchajmerovoj bolesti posledica inflamatornog procesa i posledičnog oštećenja tkiva slobodnim radikalima pre nego prisustva samog

$\beta$ -amiloida. Ispitivanja uticaja NSAIL na pacijente obolele od Alchajmerove bolesti su vrlo intenzivna, iako razumevanje ove bolesti otežava činjenica da ne postoji adekvatan eksperimentalni životinjski model. Smatra se da bi glavna korist od upotrebe NSAIL bila kod pacijenata sa genetskom predispozicijom za Alchajmerovu bolest.<sup>27</sup>

### 1.3.6. COX-2 u jedru: novi aspekt lečenja kancera

Ekspresija COX-2 može da pojača nekoliko onkogenih procesa kao što su invazija tumora, angiogeneza i metastaza.<sup>58</sup> Inflamacija je kritična komponenta za progresiju tumora.<sup>69</sup> U prvobitnim istraživanjima ćelija kancera kolona i dojke pokazana je povećana ekspresija COX-2 izoforme.<sup>70-73</sup> Istraživanja koja su usledila su pokazala da postoji prekomerna ekspresija COX-2 izoforme u mnogim drugim tipovima kancera: jednjaka, bešike, grlića materice, prostate, pluća.<sup>74</sup>

Kolorektalni kancer je veoma česta forma kancera u svetu. U Americi je po smrtnosti odmah iza kancera pluća.<sup>75</sup> Podaci pokazuju da je kod 80% pacijenata obolelih od kolorektalnog adenokarcinoma 2-50 puta povećana ekspresija COX-2. Prvobitni dokazi da je COX-2 uključena u patologiju kolorektalnog adenokarcinoma su bili iz epidemioloških studija. Naime, u 10 studija koje su sprovedene od 1988. godine uočena je negativna korelacija između hronične terapije NSAIL i incidence ovog oboljenja.<sup>27</sup> Narочito je važna bila studija na mladim pacijentima sa urođenom adenomatoznom polipozom, stanjem u kome se spontano razvijaju kolorektalni polipi od kojih mnogi progrediraju u tumore. Utvrđeno je da je kod pacijenata koji su bili na terapiji neselektivnim sulindakom došlo do smanjenja broja i veličine polipa.<sup>76</sup> Kasnijim ispitivanjima je utvrđeno da je u ćelijama kolorektalnog karcinoma povećana ekspresija COX-2 izoforme.<sup>77,78</sup> U eksperimentima su korišćeni mutirani *Apc* miševi kao model za urođenu adenomatoznu polipozu, a polipi su značajno smanjeni posle tretmana selektivnim COX-2 inhibitorom, ali i delecijom COX-2 gena. Smatra se da je *Apc* gen odgovoran za apoptozu, a da povećana ekspresija COX-2 dovodi do gubitka *Apc* gena, tako da ćelije gube signal za apoptozu. Usledili su mnogi eksperimenti koji su potvrdili efikasnost selektivnih COX-2 inhibitora u tretmanu ovog oboljenja, tako da se pretpostavlja da bi se COX-2 inhibitori mogli koristiti kao profilaksa kod pacijenata sa genetskom predispozicijom za razvoj kolorektalnog karcinoma. Ako ovakav pristup

bude uspješan, postoje mišljenja<sup>27</sup> da bi se profilaksa COX-2 inhibitorima mogla proširiti i na sve pacijente određene životne dobi, poput aspirina od 100 mg koji se koristi u profilaksi tromboembolijskih komplikacija kod svih pacijenata iznad 65 godina.

### **1.3.7. Trudnoća i porođaj-kontraindikacije za primenu NSAIL**

U epitelu materice su eksprimirane i COX-1 i COX-2, ali ne istovremeno već u različitim periodima u toku rane trudnoće.<sup>58</sup> Prostaglandini imaju vrlo važnu ulogu u održavanju normalne trudnoće, ali i tokom porođaja. Poznato je da su prostaglandini odgovorni za indukciju kontrakcija materice tokom porođaja. NSAIL kao što je indometacin može da odloži prevremeni porođaj, pa je ova potencijalna indikacija NSAIL vrlo interesantna.<sup>79</sup> U srcu, plućima, bubrezima i mozgu fetusa je veća ekspresija COX-1 nego COX-2 izoforme.<sup>80</sup> Konstitutivna ekspresiranost COX-1 u amnionskoj tečnosti je od značaja za normalnu trudnoću.<sup>81</sup> Smatra se da COX-1 i COX-2 u epitelu materice imaju ulogu u implantaciji oplođene jajne ćelije i u angiogenezi koja je potrebna za formiranje placente.<sup>82</sup> U trećem trimestru je primena NSAIL kontraindikovana zbog toga što može doći do pojave neželjenih efekata i kod majke i kod fetusa. Najznačajniji neželjeni efekti koji se mogu javiti kod majke su: prolongiranje trudnoće i porođaja, postporođajno krvarenje i gastrična iritacija. Kod fetusa se može javiti prerano zatvaranje *ductus arteriosus*-a, pulmonarna hipertenzija i smrt.<sup>83</sup> *Ductus arteriosus* predstavlja krvni sud koji spaja plućnu arteriju i descendentnu aortu i omogućava zaobilazanje plućne cirkulacije (jer su pluća fetusa nefunkcionalna), a njegovo zatvaranje normalno nastaje u prvim satima života.

Jasno je da je uloga prostaglandina u trudnoći i porođaju vrlo složena i da primena NSAIL može da onemogući neke veoma bitne procese, pa se NSAIL u prva dva trimestra daju samo kada je to neophodno, tj. kada korist prevazilazi rizik, a tokom trećeg trimestra su apsolutno kontraindikovani.

## 1.4. MOLEKULSKI DOKING

Molekulski doking (eng. *docking*) je kompjuterska metoda uklapanja potencijalnog liganda u trodimenzionalnu strukturu vezivnog mesta ciljanog makromolekula (receptora, enzima) u cilju istraživanja interakcija koje se tom prilikom ostvaruju.<sup>84,85</sup> Na osnovu interakcija i stabilnosti nastalog kompleksa može se predvideti afinitet liganda za odabrani makromolekul, ali i biološka aktivnost. Uklapanje se vrši prema zadatim koordinatama. Koordinate se dobijaju iz kokristalisanog kompleksa liganda i enzima, čime je osigurano da će koordinate biti u aktivnom mestu posmatranog enzima.

Danas postoji veliki broj programa koji mogu automatski da dokuju ligand u vezivno mesto proteina. Prednost automatskog dokovanja je što ne zavisi od predubeđenja istraživača o verovatnim interakcijama, tako da se nekada mogu otkriti sasvim neočekivane interakcije. Doking metodom je moguće vršiti skrining velikog broja jedinjenja sa ciljem da se identifikuje jedinjenje koje će ostvariti najbolju interakciju sa ciljanim proteinom (eng. *lead compound*).<sup>85</sup> Potencijalni ligand je fleksibilan i zauzima različite prostorne orijentacije (poze), a željeni protein (enzim) može da bude rigidan ili fleksibilan što zavisi od postavke metode, pa se na osnovu toga može govoriti o rigidnom ili fleksibilnom dokingu. Prilikom izvođenja doking eksperimenata automatski se meri energija kompleksa, a najniža energija znači i najverovatniju interakciju. Moguće je meriti i udaljenost pojedinih funkcionalnih grupa liganda od aminokiselina u aktivnom mestu enzima i identifikovati tipove interakcija koje se ostvaruju. U literaturi se mogu pronaći podaci o interakcijama određenih  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina u aktivnom mestu obe izoforme enzima ciklooksigenaze.<sup>86</sup>

U doking izračunavanjima se koriste algoritmi kojima se vrši odabir optimalne orijentacije potencijalnog liganda sa odgovarajućim receptorom. Od doking studija se, osim o najverovatnijoj interakciji između potencijalnog liganda i makromolekula, mogu dobiti informacije o stabilnosti tog kompleksa i o strukturnim promenama na nivou liganda koje bi mogle dovesti do optimalne interakcije. Na pouzdanost ispitivanja interakcije potencijalnog liganda sa ciljanim makromolekulom utiču kvalitet trodimenzionalne strukture makromolekula, konformacione slobode, efekat rastvarača i

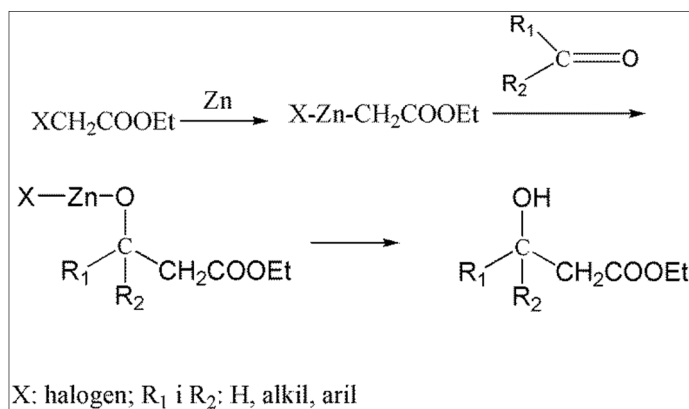
okruženja i drugi faktori koji se biraju tokom izvođenja eksperimenata. Jedna od ključnih postavki za dobar kvalitet i tačnost izvedenih izračunavanja je priprema koordinata.<sup>87,88</sup>

Od 1996. godine se u bazi podataka *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) može pronaći struktura COX-2 kokristalisanog sa selektivnim inhibitorom SC-558, a od 2001. godine i struktura COX-1 kokristalisanog sa ibuprofenom, pa se uz pomoć molekuskog dokinga može predvideti vezivanje drugih molekula za aktivna mesta obe ove izoforme i na taj način se mogu dizajnirati molekuli koji bi bili potencijalno selektivni COX-2 inhibitori.<sup>89</sup>

S obzirom na to da je volumen aktivnog mesta COX-2 ( $394 \text{ \AA}^3$ ) veći od volumena aktivnog mesta COX-1 ( $316 \text{ \AA}^3$ ),<sup>21</sup> postoje podaci u literaturi da je dovoljno da ligand ima za  $15 \text{ \AA}^3$  veću molekulsku zapreminu od ibuprofena, pa da to značajno doprinese selektivnosti prema COX-2.<sup>90</sup>

## 1.5. REFORMATSKI REAKCIJE

Reformatski reakcija je jedna od dobro poznatih fundamentalnih reakcija za formiranje C-C veze koja je prvi put predstavljena još 1887. godine.<sup>91</sup> U ovoj reakciji između karbonilnih jedinjenja (aldehida ili ketona) i  $\alpha$ -halogen estara u prisustvu odgovarajućeg metala nastaju  $\beta$ -hidroksi estri (Slika 6). U reakciji prvo nastaje organometalno jedinjenje (Reformatski reagens) između metala i  $\alpha$ -halogen estera koje se zatim adira na karbonilno jedinjenje. Kiselim hidrolizom ovog intermedijera nastaje  $\beta$ -hidroksi ester. Saponifikacijom  $\beta$ -hidroksi estara, a zatim kiselim hidrolizom nastaju  $\beta$ -hidroksi kiseline.



**Slika 6.** Shematski prikaz klasične Reformatski reakcije

Izvor slike: R. Ocampo, W. R. Dolbier, Jr. *Tetrahedron* **2004**, 60, 9325–9374

Može se smatrati da Reformatski reakcija predstavlja svako formiranje enolata oksidativnom adicijom metala ili soli ili kompleksa metala niske valence na ugljenik-halogen vezu (ili vezu ugljenik-odlazeća grupa) aktiviranu vicinalnom grupom izvedenom iz karbonila praćenom reakcijom enolata sa odgovarajućim elektrofilom. Reformatski reagens je organometalni intermedijer nastao od halogenovanih ugljovodoničnih jedinjenja, haloestara, halotioestara, halonitrila, haloamida, haloimida, haloanhidrida, halolaktone ili halofosfonata. U reakciji sa aktiviranim cinkom ova jedinjenja formiraju nukleofil koji se može adirati na veliki broj elektrofila, a ne samo na aldehide i ketone.<sup>92</sup>

Jedna od prednosti Reformatski reakcije je što se ova reakcija odvija pod blagim uslovima za razliku od npr. aldolne kondenzacije koja zahteva prisustvo jake baze.

Druga važna prednost je što u Reformatski reakciji dolazi do C-C adicije bez formiranja C-O veze, tako da je mesto odigravanja reakcije određeno pozicijom halogena.

Reformatski reakcija ima i svoje nedostatke od kojih su najvažniji formiranje velikog broja sporednih proizvoda i odsustvo stereoselektivnosti. Sporedni proizvodi koji često nastaju u klasičnoj Reformatski reakciji su  $\beta$ -keto estri. Mogu nastati nukleofilnim napadom Reformatski reagensa na  $\alpha$ -brom ester ili Klajzenovom kondenzacijom Reformatski reagensa. Kao sporedni proizvodi klasične Reformatski reakcije izolovani su i  $\alpha,\beta$ -nezasićeni estri koji nastaju eliminacijom iz  $\beta$ -hidroksi estara, zatim nezasićene kiseline, a često se dešava i retro-aldolna kondenzacija.<sup>93</sup>

Postoje različite modifikacije Reformatski reakcije u cilju dobijanja što boljeg prinosa  $\beta$ -hidroksi estara i izbegavanja velikog broja sporednih proizvoda koji mogu nastati. Jedna od modifikacija za dobijanje  $\beta$ -hidroksi- $\alpha$ -propionske kiseline je metoda dianjona kiseline.<sup>94</sup> Dejstvom litijum-diizopropilamida na difenilsirćetnu kiselinu dobija se nukleofilni dianjon koji se adira na odgovarajuće karbonilno jedinjenje.

Razlog za nizak prinos mogu biti i konkurentske reakcije, a jedna od značajnijih je  $\beta$ -eliminacija koja se dešava u toku hidrolize estera.<sup>95</sup> U cilju izbegavanja ove konkurentske reakcije mogu se upotrebiti *tert*-butil estri  $\alpha$ -halogen kiselina umesto etil- $\alpha$ -halogen estara. Od *tert*-butil estara korišćeni su *tert*-butil  $\alpha$ -bromacetat, *tert*-butil  $\alpha$ -brompropanoat i *tert*-butil- $\alpha$ -bromizobutanoat. Konkurentske reakcije nisu primećene samo kod *tert*-butil  $\alpha$ -bromacetata, dok kod ostalih estara ni ne dolazi do Reformatski reakcije zbog sternih smetnji. U cilju izbegavanja pomenutih  $\beta$ -eliminacija kao i retro-aldolnih reakcija, Reformatski reakcija je modifikovana tako da su korišćeni trimetilsilil estri  $\alpha$ -brom kiselina.<sup>96</sup>

Još neke od modifikacija Reformatski reakcije su direktna sinteza  $\beta$ -hidroksikiselina iz Reformatski reagensa dobijenog iz cink-bromidnih soli,<sup>97</sup> brom-magnezijumovih soli<sup>98</sup> i iz tetrahidropirani estara.<sup>99</sup>

Reakcijom  $\alpha$ -bromokiselina i viniletara mogu se lako dobiti acetali  $\alpha$ -bromoestara koji se onda mogu iskoristiti za direktnu sintezu  $\beta$ -hidroksikiselina. Ova reakcija se izvodi u tetrahidrofuranu na niskoj temperaturi (0 °C). Tretiranjem reakcione smeše razblaženom hlorovodoničnom kiselinom uz uklanjanje acetaldehida uz pomoć

vakuuma moguće je dobiti  $\beta$ -hidroksikiseline u dobrom prinosu.<sup>100</sup> Ova reakcija je korišćena u radu Dilber i saradnika,<sup>101</sup> u kom je sintetisano petnaest  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina iz 1-etoksietil-2-bromoalkanoata, aromatičnih ili cikloalkil ketona i aromatičnih aldehida.

Kao metalni katalizator u Reformatski reakcijama se često koristi cink odgovarajućeg stepena granulacije, a na prinos reakcije značajno utiče način aktiviranja cinka kojim se uklanja sloj cink-oksida sa površine metala. Cink se najpre ispira odgovarajućim rastvaračima, a zatim aktivira upotrebom depasivizirajućih reagenasa kao što su živa(II)-jodid,<sup>99</sup> molekularni jod,<sup>102</sup> 1,2-dibrometan,<sup>103</sup> hlormetilsilan.<sup>104</sup> Osim cinka mogu se koristiti i neki drugi metali: indijum,<sup>105</sup> hrom,<sup>106</sup> samarijum-dijodid<sup>107</sup> i drugi.

Reakcija se može izvoditi u prisustvu različitih polarnih rastvarača kao što su tetrahidrofuran, dimetilformamid, dimetilsulfoksid ili u njihovim smešama. Postoje primeri Reformatski reakcija u halogenovanim rastvaračima kao što je metilen hlorid.<sup>108-110</sup>

Reformatski reakcije se najčešće izvode na sobnoj temperaturi ili na temperaturi ključanja rastvarača, ali postoje primeri reakcija koje se izvode uz primenu ultrazvuka, visokog pritiska ili mikrotalasa<sup>111</sup> kako bi se skratilo vreme trajanja reakcije. Moguće je izvođenje Reformatski reakcije bez prisustva rastvarača uz primenu mikrotalasa.<sup>112</sup>

U današnje vreme ne jenjava interesovanje za sintezu novih jedinjenja korišćenjem klasične ili modifikovane Reformatski reakcije,<sup>113,114</sup> a predmet istraživanja je i stereoselektivnost u Reformatski reakcijama. Veliki napredak je načinjen na tom polju i brojni su primeri dijastereo- i enantioselektivne Reformatski reakcije.<sup>115-119</sup>

Reformatski reakcija je jedan od ključnih koraka u višestepenom procesu sinteze mnogih jedinjenja sa biološkom aktivnošću kao što su:  $\alpha$  i  $\beta$ -aminokiseline, njihovi estri i  $\beta$ -laktami,<sup>120</sup> ( $\pm$ ) pilokarpin,<sup>121</sup>  $1\beta$ -karbapenemi,<sup>122</sup> tienomicin,<sup>123</sup> derivati nukleozida i nukleotida.<sup>124</sup>



## 1.6. ISPITIVANJA I ZNAČAJ OSNOVNIH FIZIČKO-HEMIJSKIH I BIOFARMACEUTSKIH OSOBINA FARMAKOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA

### 1.6.1. Konstanta jonizacije i pregled metoda za određivanje $pK_a$

Većina farmakološki aktivnih jedinjenja su slabe organske baze ili slabe organske kiseline, pa u zavisnosti od toga u vodenim rastvorima mogu da budu protonovane ili deprotonovane. Mera kiselosti ili baznosti nekog jedinjenja je  $pK_a$  i predstavlja negativni logaritam konstante jonizacije jedinjenja ( $pK_a = -\log K_a$ ). Za razliku od pH vrednosti koje se kreću u opsegu 0-14,  $pK_a$  može imati bilo koju vrednost. Ako jedinjenje u svojoj strukturi ima jednu jonizujuću grupu, na pH vrednosti koja je jednaka  $pK_a$  vrednosti 50% molekula će biti jonizovano. Na osnovu  $pK_a$  vrednosti se ne može zaključiti da li je jedinjenje kiselina ili baza jer mnoge kisele funkcionalne grupe imaju  $pK_a$  veću od 7, a mnoge bazne manju od 7.

Najvažniji podatak koji se može izračunati iz  $pK_a$  je procenat jedinjenja u jonizovanom obliku na određenom pH. Ova informacija je vrlo važna za lek koji se nađe u uslovima biosredine. pH nije konstantan u organizmu i ima širok opseg, pa procenat jonizovanog leka varira, što ima uticaja na apsorpciju. Jonizovani oblik leka je bolje rastvorljiv u vodi, ali slabo prolazi kroz ćelijske membrane (i sporije se apsorbuje) dok obrnuto važi za molekularni (nejonizovani) oblik leka.<sup>125</sup> Mora se, međutim, napomenuti da je ovo generalizovan zaključak donesen imajući u vidu lipoproteinsku strukturu bioloških membrana, ali treba istaći da je pasivna difuzija lekova kroz ćelijske membrane vrlo složen proces koji zavisi od mnogo faktora i nije ispravno doneti precizan zaključak o apsorpciji leka isključivo na osnovu  $pK_a$  vrednosti.<sup>126,127</sup>

Stepen jonizacije leka je vrlo važan podatak za procenu farmakokinetičkih parametara (ADME). Osim toga, stepen jonizacije leka ima važan uticaj na proces vezivanja leka za receptorsko mesto. Razlikuju se vrste interakcija koje može da ostvari jonizovani oblik leka (npr. jonske veze, dipol-dipol interakcije) od interakcija koje može da ostvari nejonizovani oblik leka (hidrofobne, hidrofilne interakcije).<sup>128</sup>

Osim značaja  $pK_a$  vrednosti leka sa aspekta ponašanja u biosredini, ogroman je značaj sa aspekta analitike leka, za odabir adekvatnih uslova u metodi (npr. pH mobilne faze u HPLC metodi).

Iz navedenih razloga je poželjno odrediti  $pK_a$  vrednost lekova kandidata što je ranije moguće u toku procesa razvoja leka.

Lekovi su jedinjenja koja se slabo rastvaraju u vodi i zato se primenjuju različite metode za određivanje  $pK_a$  kao što su: potenciometrijska titracija, spektrofotometrijska titracija, kapilarna elektroforeza, reverzno-fazna hromatografija, nuklearno magnetna rezonanca.<sup>129,130</sup>

Potenciometrijska titracija je vrlo često korišćena tehnika zbog svoje preciznosti i reproduktivnosti rezultata. Zasniva se na titraciji uzorka kiselinom ili bazom uz korišćenje pH elektrode za praćenje toka titracije.<sup>131</sup> Ograničenja ove tehnike su što jedinjenje mora da bude rastvorljivo u vodi, treba da je visoke čistoće jer nečistoće interferiraju i potrebna je relativno velika količina jedinjenja jer je neophodno dostići koncentraciju od  $5 \times 10^{-4}$  mol/L.

Spektrofotometrijska titracija je dobra alternativa potenciometrijskoj titraciji.<sup>132</sup> I za ovu metodu je neophodno da jedinjenje bude dobro rastvorljivo u vodi i da bude visoke čistoće, ali je prednost veća osetljivost (koncentracije  $10^{-6}$  mol/L). Da bi se odredila  $pK_a$  vrednost nekog jedinjenja ovom metodom, neophodno je da to jedinjenje ima hromoforu u blizini jonizujućeg centra molekula.

Kapilarna elektroforeza ima nekoliko prednosti u odnosu na prethodno opisane metode: nije neophodna visoka čistoća jedinjenja niti dobra rastvorljivost u vodi, a ne mora se čak ni znati tačna koncentracija jedinjenja jer se meri samo elektroforetska pokretljivost jedinjenja. Princip određivanja  $pK_a$  vrednosti ovom tehnikom se zasniva na merenju efektivne elektroforetske pokretljivosti jonizujućih jedinjenja u seriji rastvora elektrolita različitih pH vrednosti i konstantne jonske jačine.<sup>134-136</sup>

Imajući u vidu s jedne strane sve prednosti HPLC tehnike i rasprostranjenost HPLC uređaja u rutinskoj upotrebi u mnogim laboratorijama, a s druge strane slabu rastvorljivost većine lekova, RP-HPLC tehnika se nametnula kao tehnika izbora za

određivanje  $pK_a$  vrednosti. RP-HPLC metode su jednostavne, zahtevaju relativno malu količinu ispitivanog jedinjenja i, što je naročito pogodno, nije potrebna visoka čistoća ispitivanog jedinjenja. Ovo poslednje je velika prednost u slučaju novosintetisanih jedinjenja koja se onda ne moraju previše prečišćavati.<sup>137-139</sup>

S obzirom na to da su antiinflamatorni lekovi slabo rastvorljivi u vodi,  $pK_a$  vrednosti se vrlo često određuju potenciometrijski u smeši vode i organskog rastvarača, kako bi se obezbedila zadovoljavajuća rastvorljivost. Konstante jonizacije za NSAIL kao što su ibuprofen, diklofenak, flurbiprofen, ketoprofen se mogu odrediti u seriji rastvarača koji se sastoje od izopropil alkohola i vode u različitom odnosu.<sup>140</sup> Organski rastvarači koji se često koriste su dimetilsulfoksid, metanol, etanol, propanol, aceton i tetrahidrofur. Metanol je rastvarač izbora, s obzirom na to da ima dosta podataka o smešama metanol-voda i da pokazuje efekat solvatacije najbliži vodi.<sup>141</sup> Princip RP-HPLC metode koju su predložili Oumada i saradnici je praćenje retencionog vremena ispitivanog jedinjenja rastvorenog u različitim smešama organskog rastvarača i vode na različitim pH vrednostima koje se dalje koriste u računu na osnovu odgovarajućih jednačina.<sup>142</sup>

Postoji više softvera kojima je moguće predvideti  $pK_a$  vrednost nekog jedinjenja (ACD/pKa, Marvin, PALLAS, SPARC, Jaguar) koji se baziraju na različitim principima. Metode za predviđanje  $pK_a$  vrednosti se mogu podeliti na empirijske i kvantno-hemijske. Glavna prednost empirijskih metoda je brzina izvođenja, dok se znatno sporije kvantno-hemijske metode smatraju preciznijim, mada ima studija koje su opovrgle ovu tvrdnju.<sup>143</sup> Česta su istraživanja koja porede eksperimentalno dobijene  $pK_a$  vrednosti sa predviđenim uz pomoć različitih softvera i veliki napori se ulažu u razvoj novih softvera kojima bi bilo moguće sa zadovoljavajućom tačnošću predvideti  $pK_a$  vrednost.<sup>144-146</sup>

### 1.6.2. Particioni koeficijent i pregled metoda za određivanje logP

Lipofilnost je jedna od najvažnijih fizičko-hemijskih osobina nekog leka koja se definiše kao afinitet prema lipidnoj fazi. Bez obzira na put primene, svaki lek mora da prođe određene barijere lipidnog karaktera na putu do svog mesta delovanja i dalje na putu eliminacije, tako da lipofilnost leka ima veliki uticaj na biološku aktivnost, resorpciju, raspodelu, metabolizam i eliminaciju. Molekuli veće lipofilnosti se bolje apsorbuju, bolje prodiru u tkiva i imaju veći stepen raspodele u odnosu na manje lipofilne molekule sličnih osobina. Pored toga, lipofilnost produžava delovanje aktivnih supstanci i utiče na puteve eliminacije: manje lipofilni lekovi se dobro eliminišu putem urina dok veoma lipofilni imaju hepatični put eliminacije.<sup>147</sup> Međutim, prevelika lipofilnost je nekada i ograničavajući faktor s obzirom da prolazak kroz biološke barijere zahteva i određeni stepen polarnosti jedinjenja. Takođe, visok afinitet ka lipidima može usloviti vezivanje leka za proteine plazme (nastaje farmakološki neaktivan kompleks) ili akumulaciju leka u masnom tkivu (što bi potenciralo neželjene ili toksične efekte primenjenog leka).<sup>148</sup>

Pojam lipofilnosti su uveli autori Fujita, Iwasa i Hansch 1964. godine.<sup>149</sup> Ovi autori su pokazali da put leka kroz organizam koreliše sa raspodelom tog leka u sistemu *n*-oktanol/voda. Koeficijent raspodele P (particioni koeficijent) predstavlja odnos koncentracija neutralnog oblika leka u lipidnoj i vodenoj fazi. Zbog jednostavnijeg poređenja vrednosti partitionih koeficijenata primenjuje se logaritamska vrednost, logP. Ako ispitivano jedinjenje ostvaruje neke interakcije sa jednom od faza (jonizacija, agregacija, formiranje jonskih parova) pogodniji parametar za definisanje lipofilnosti tog jedinjenja je efektivni koeficijent raspodele D. Ovaj koeficijent predstavlja odnos koncentracija jonizovanog i nejonizovanog oblika leka u lipidnoj i vodenoj fazi. Analogno logP, za jednostavnije poređenje efektivnih koeficijenta raspodele koristi se logD. Oba parametra (logP i logD) imaju uticaj na gastrointestinalnu apsorpciju,<sup>150</sup> permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru<sup>151</sup> i na farmakokinetičke parametre.<sup>152</sup>

Particioni koeficijent se može odrediti eksperimentalno ili se može izračunati pomoću različitih računarskih programa (AlogPS, Molinspiration, MarvinSketch, KOWWIN, AClogP, AB/logP). Računarski programi koriste različite teorijske algoritme zasnovane na različitim metodama fragmentacije, pa se zato predviđene

vrednosti mogu međusobno znatno razlikovati. Postoje brojne metode za određivanje logP ili logD i svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke, a svaka od njih može biti manje ili više pouzdana za određeni tip jedinjenja.

Najstarija i najšire prihvaćena metoda za određivanje logP je *shake flask* metoda. Princip metode je da se poznata količina analizirane supstance unese u sistem *n*-oktanol/voda i mućka određeno vreme nakon čega se određuje koncentracija analita u obe faze odabranom metodom (spektrofotometrija, HPLC, GC). *Shake flask* metoda ima svoje nedostatke kao što su slaba reproduktivnost, velika dužina trajanja eksperimenta, nemogućnost primene na visoko lipofilna ili visoko hidrofilna jedinjenja, problem stvaranja emulzija...

Danas se vrlo često koriste hromatografske tehnike za određivanje logP.<sup>153,154</sup> Prednosti hromatografskih tehnika su brzina, preciznost, reproduktivnost i korišćenje male količine uzorka. Prvenstveno se primenjuju reverzno fazne hromatografske metode: RP-HPLC i RP-TLC. Princip određivanja RP-HPLC metodom koju su predložili autori Benhaim i Grushka<sup>155</sup> se zasniva na merenju retencionih vremena u HPLC sistemu sa četiri mobilne faze koje se razlikuju u udelu metanola. Na osnovu retencionih vremena se može izračunati logaritam retencionog faktora,  $\log K_w$ . Vrednost  $\log K_w$  je moguće korelisati sa koncentracijom organske komponente u mobilnoj fazi. Kao mera lipofilnosti ispitivane supstance koristi se vrednost  $K_w$  (odsečak prave), tj.  $\log K$  vrednost ekstrapolisana na nulu koncentracije organske komponente. Vrednost nagiba  $a$  odgovara specifičnoj hidrofobnoj površini ispitivane supstance i takođe se može smatrati merom lipofilnosti.

Postoje brojni radovi u kojima je pokazana dobra korelacija između  $\log K_w$  i logP određenog *shake flask* metodom.<sup>156</sup> Autori ovih radova su pokazali da postoji linearna zavisnost između logP i  $\log K_w$ , pa je moguće konstruisati grafik za jedinjenja čije su logP vrednosti poznate i ekstrapolacijom za analizirana jedinjenja očitati logP.

### 1.6.3. Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA)

Bioraspoloživost predstavlja udeo primenjene doze leka koji u nepromenjenom obliku dospe u sistemsku cirkulaciju. Smatra se da je bioraspoloživost leka koji se primeni intravenskim putem 100%. Najčešći, najkomfortniji i najbezbedniji put primene lekova je peroralna primena. U slučaju *per os* primene bioraspoloživost se smanjuje zbog presistemskog metabolizma, hemijske degradacije u želucu ili zbog loših biofarmaceutskih osobina kao što su loša rastvorljivost ili loša permeabilnost. Zbog toga je poželjno da se biofarmaceutske osobine odrede u ranoj fazi razvoja farmakološki aktivnog jedinjenja. Ukoliko se utvrdi da su neodgovarajuće, može se doneti odluka o obustavljanju daljeg testiranja jedinjenja uprkos tome što jedinjenje ispoljava zadovoljavajuću farmakološku aktivnost. Koliko su biofarmaceutske karakteristike nekog jedinjenja važne pokazuje i podatak da su upravo neodgovarajuće biofarmaceutske karakteristike glavni razlog za povlačenje novog hemijskog entiteta (eng. *new chemical entity*, NCE) iz procesa razvoja leka.<sup>157</sup>

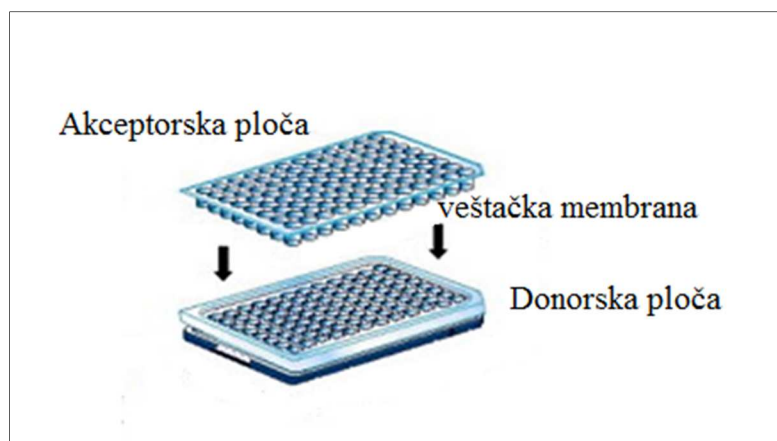
Da bi bilo koji lek dospeo do ciljnog mesta delovanja i ostvario odgovarajuću interakciju neophodno je da na svom putu prođe mnoge biološke membrane, tj. da se apsorbuje. Mehanizmi kojima lek prolazi biološke membrane uključuju pasivnu difuziju, aktivni transport, paracelularni put i efluks. Apsorpcija u gastrointestinalnom traktu se može proceniti *in silico*, *in vitro* ili *in vivo* metodama. Eksperimentalni animalni modeli i odgovarajuće *in vivo* studije nisu adekvatne u ranim fazama razvoja farmakološki aktivnog jedinjenja jer je često količina jedinjenja koje se testira vrlo mala ili postoji potreba za testiranjem velikog broja jedinjenja. Predviđanje *in vivo* parametara na osnovu *in vitro* eksperimenata je velika pogodnost ako se uzmu u obzir jednostavnost, isplativost, mogućnost testiranja velikog broja jedinjenja i etički principi, tako da se ulažu veliki naponi u razvoj takvih *in vitro* metoda.

Jedna od brzih i jednostavnih *in vitro* tehnika kojom se može proceniti permeabilnost jedinjenja kroz različite biološke membrane kao što su koža, krvno-moždana barijera i gastrointestinalni trakt je PAMPA (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*).<sup>158,159</sup> PAMPA je tehnika kojom može da se ispita permeabilnost kroz veštačku membranu sa ciljem procene *in vivo* permeabilnosti ili apsorpcije velikog broja jedinjenja istovremeno. Ovom tehnikom se predviđa

permeabilnost ili apsorpcija koja je rezultat pasivne difuzije. Glavni nedostatak ove tehnike je nemogućnost predviđanja apsorpcije posredstvom transportera, jer veštačkoj membrani nedostaju neke biološke karakteristike membrana enterocita. Neki drugi modeli kao što su Caco-2, HT-29 ili MDCK umesto veštačke membrane koriste *in vitro* membranu sa ćelijama, tako da uključuju i fenomen aktivnog transporta. Prednosti PAMPA modela nad ovim modelima su veća efikasnost testiranja i veća ekonomičnost. Uobičajeni pristup *in vitro* ispitivanju permeabilnosti je testiranje jedinjenja prvo na PAMPA modelu, a zatim na nekom od navedenih ćelijskih modela.

Veštačka membrana u PAMPA modelu simulira biološku membranu, što se postiže adekvatnim odabirom rastvarača i supstanci za formiranje membrane i imitira pasivni transcelularni transport. S obzirom na to da se većina lekova apsorbuje potpuno ili delimično pasivnim transportom, stopa permeacije u PAMPA testu može da pruži dobar nagoveštaj o apsorpciji testiranog jedinjenja. U prilog korišćenju PAMPA testa za ispitivanje gastrointestinalne apsorpcije idu i rezultati novijih studija koji pokazuju da se čak 80-95% lekova apsorbuje pasivnom difuzijom.<sup>160</sup> PAMPA je našla široku primenu u farmaceutskoj industriji za određivanje permeabilnosti različitih jedinjenja u ranoj fazi procesa razvoja leka<sup>161-166</sup>

U PAMPA testu se koristi veštačka membrana koja razdvaja donorski odeljak od akceptorskog (Slika 7). U donorski odeljak se unosi ispitivano jedinjenje rastvoreno u pogodnom rastvaraču, a u akceptorski odeljak se unosi samo rastvarač. Spajanjem donorskog i akceptorskog odeljka formira se PAMPA sistem („sendvič”) u kome se odvija difuzija ispitivane supstance kroz veštačku membranu, koja se nalazi između odeljaka, u pravcu gradijenta koncentracije - iz donorskog u akceptorski odeljak. U slučaju PAMPA testa za GIT apsorpciju akceptorski odeljak se postavlja iznad donorskog, dok u nekim drugim slučajevima može biti obrnuto. PAMPA test se može izvoditi u izokraskim pH (ista pH vrednost u donorskom i akceptorskom odeljku) ili gradijentnim pH uslovima.<sup>167</sup> Nakon određenog vremena inkubacije, donorski i akceptorski odeljci se razdvajaju i određuje se sadržaj ispitivane supstance u oba odeljka odgovarajućom analitičkom metodom. Inkubacija traje 4-7 sati uz mućkanje, odnosno 24-40 sati bez mućkanja.



**Slika 7.** Model PAMPA sistema

Komponente koje ulaze u sastav veštačke membrane u PAMPA testu mogu da budu različite u zavisnosti od toga da li se ispituje permeabilnost kroz kožu, krvno-moždanu barijeru ili gastrointestinalni trakt. Tako se za ispitivanje permeabilnosti kroz kožu mogu koristiti izopropilmiristat, silikonsko ulje i njihove smeše u različitim odnosima<sup>168</sup> ili smeše cetrimida, holesterola i stearinske kiseline.<sup>169,170</sup> Za PAMPA test kroz krvno-moždanu barijeru mogu da se koriste polarni lipidi mozga svinje rastvoreni u dodekanu,<sup>171</sup> a za PAMPA test za GIT apsorpciju se može koristiti lecitin jajeta rastvoren u dodekanu.<sup>161</sup> Postoji i *PAMPA-Double Sink* metod koji takođe predviđa apsorpciju u GIT-u, a kao veštačka membrana se koristi komercijalno dostupni lipidni rastvor GIT-a, koji se sastoji od 20% lecitina soje rastvorenog u dodekanu. U sastav ovakve lecitinske veštačke membrane ulaze: fosfatidil holin, fosfatidiletanolamin, fosfatidil inozitol, fosfatidna kiselina, lizo-fosfatidil holin i trigliceridi.<sup>172</sup>

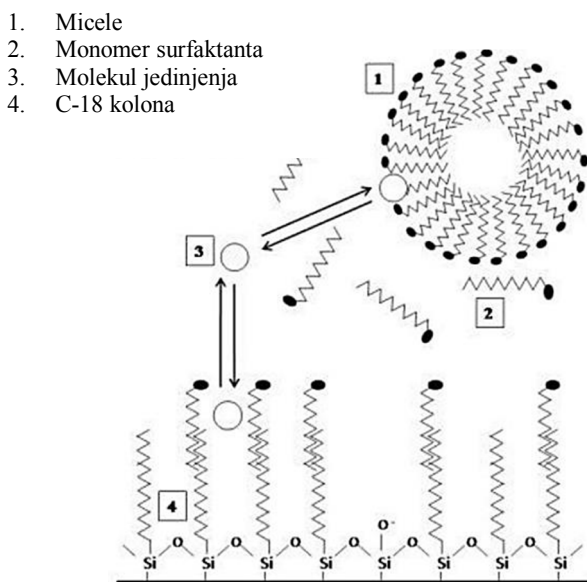


#### 6.4. Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC)

Hromatografske metode su našle svoju primenu u ispitivanju transporta lekova kroz biološke membrane. Njihova najveća prednost u inicijalnim ispitivanjima nad *in vitro* metodama koje podrazumevaju korišćenje ćelijskih kultura je jednostavnost izvođenja.

BMC (eng. *Biopartitioning micellar chromatography*) je modifikacija reverzno-fazne tečne hromatografije u kojoj je mobilna faza rastvor surfaktanta iznad kritične micelarne koncentracije.<sup>173,174</sup>

Pokazano je da BMC može da imitira biološke barijere i ekstracelularnu tečnost.<sup>175</sup> Monomeri surfaktanta se adsorbuju na stacionarnu fazu, a retencija zavisi od interakcija supstance sa monomerima na stacionarnoj fazi i micelama u mobilnoj fazi. Surfaktanti koji se koriste u BMC mogu biti katjonski, anjonski, cviter-jonski i nejonski. Monomeri surfaktanta polioksietilen (23) lauril etra (Brij 35) koji su adsorbovani na stacionarnu fazu podsećaju na ugljovodonične nizove fosfolipida u biološkoj membrani dok hidrofilni/hidrofobni karakter adsorbovanih monomera podseća na polarne delove membrane (Slika 8).



Slika 8. Interakcije koje ostvaruju jedinjenja u BMC sistemu

Retenciono ponašanje ispitivanog jedinjenja u BMC je određeno raspodelom jedinjenja između vodene faze i micela, vodene i stacionarne faze i između stacionarne faze i micela u mobilnoj fazi. Odabirom odgovarajućih surfaktanata kao i uslova pripreme mobilne faze moguće je simulirati odgovarajuće biološko okruženje.<sup>176</sup>

Retenciono ponašanje jedinjenja u hromatografskom sistemu koji se sastoji iz C-18 stacionarne faze i Brij 35 pripremljenog na odgovarajući način kao mobilne faze može da se koristi za predviđanje oralne apsorpcije,<sup>177</sup> permeacije kroz kožu ili rožnjaču<sup>178</sup> i kroz krvno-moždanu barijeru.<sup>176</sup>

Udeo organskog rastvarača je vrlo važan parametar za izvođenje BMC i treba da bude optimalan tako da se u hromatografiji dobiju relativno kratka retenciona vremena, zadovoljavajući izgled pikova i formiranje micela od Brij 35. Dodatkom organskog rastvarača smanjuje se polarnost mobilne faze i utiče na količinu adsorbovanog monomera na stacionarnu fazu. Ukoliko je organski rastvarač prisutan u višku može da dođe do raspada micela. U tom slučaju BMC sistem više ne postoji, već prelazi u jon-par reverzno-faznu tečnu hromatografiju u kojoj se odvijaju jon-par interakcije između monomera surfaktanta i ispitivanih supstanci i nema ni govora o simuliranju bioloških uslova u gastrointestinalnom traktu. Za odabrani hromatografski sistem je potrebno utvrditi optimalni udeo organskog rastvarača. Najjednostavniji test kojim se može ispitati da li je došlo do raspada micela je test merenja mase 50 kapi. Ovaj test se zasniva na činjenici da 50 kapi smeše u kojoj su prisutne micidele ima veću masu od istog broja kapi smeše u kojoj je došlo do raspada micela.

### 1.6.5. Formiranje, procena kvaliteta i validacija QSPR i QSRR modela

Kompjuterske metode koje koriste podatke iz *in vitro* ili *in vivo* testova kao što su vreme retencije u hromatografskom sistemu ili procenat transporta (%T) da bi se na osnovu njih formirali matematički modeli koji prikazuju kvantitativni odnos strukture i osobina (eng. *Quantitative structure-property relationship*, QSPR) ili strukture i retencije u odgovarajućem hromatografskom sistemu (eng. *Quantitative structure-retention relationship*, QSRR)<sup>179</sup> su vrlo korisne jer mogu identifikovati deskriptore sa najvećim uticajem na neku osobinu jedinjenja. Pravi značaj uspostavljenih QSPR ili QSRR modela je u tome što je na osnovu njih moguće predvideti ispitivanu osobinu za jedinjenje koje nije testirano u eksperimentalnim uslovima. Tumačenjem ovih modela mogu se dobiti podaci o tome kako treba promeniti strukturu ispitivanih molekula da bi se poboljšala posmatrana osobina ispitivanog molekula. Na taj način je moguće prikupiti odgovarajuća znanja i ciljano sprovesti sintezu novih jedinjenja čime se dobija velika ušteda u vremenu i materijalnim resursima.

Čitav proces formiranja modela se sastoji iz tri koraka. U prvom koraku se računaju geometrijski, termodinamički, fizičko-hemijski i elektronski deskriptori ispitivanih jedinjenja. U drugom koraku se formiraju modeli korišćenjem odgovarajuće statističke metode. Najčešće korišćene statističke metode su multipla linearna regresija (eng. *Multiple Linear Regression*, MLR),<sup>180</sup> metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Square Regression*, PLS),<sup>179,181</sup> veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks*, ANN).<sup>182,183</sup> U svakom od pomenutih pristupa, deskriptori predstavljaju nezavisnu promenljivu (X), a retencija u hromatografskom sistemu ili procenat transporta kroz veštačku membranu predstavljaju zavisnu promenljivu (Y).

U poslednjem koraku u kome se ogleda suštinski značaj formiranog modela, vrši se validacija modela što znači da se procenjuje mogućnost primene formiranog modela za predviđanje ispitivane osobine novog, prethodno eksperimentalno netestiranog jedinjenja. Na osnovu rezultata ovih studija mogu se dizajnirati nova jedinjenja sa optimalnim osobinama.

### 1.6.6. Izbor molekuskog seta podataka

Za QSPR ili QSRR analizu je važno odabrati adekvatan broj jedinjenja. Testiranje prevelikog broja jedinjenja nije dobro iz praktičnih razloga, a ako je broj jedinjenja premali, dovodi se u pitanje pouzdanost modela. Maksimalni broj jedinjenja koje je moguće testirati je određen odabranim softverom i vremenom koje je na raspolaganju za testiranje.

Jedan deo ispitivanih jedinjenja se svrsta u trening set na osnovu koga se formira model, a drugi deo u test set na osnovu koga se vrši procena sposobnosti predviđanja ispitivane osobine novih jedinjenja, tj. validacija modela. Broj jedinjenja koja ulaze u sastav trening seta takođe treba da bude adekvatan. Ukoliko je prevelik broj jedinjenja koja ulaze u trening set, moguće je problem rešiti podelom trening seta na nekoliko manjih setova. Maksimalan broj jedinjenja u trening setu može da bude i 2000. Premali broj jedinjenja u trening setu može dovesti do formiranja pogrešnog modela što za posledicu može da ima pogrešne korelacije ili preterano prilagođavanje modela jedinjenjima u trening setu (eng. *overfitting*).<sup>184</sup>

### 1.6.7. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptor je krajnji rezultat logičke i matematičke procedure kojom se hemijska informacija koja je kodirana u okviru simboličke predstave o molekulu transformiše u broj.<sup>185</sup> Ova definicija najbolje odgovara teorijskim deskriptorima, ali po svojoj prirodi deskriptor može da bude i eksperimentalni koji je dobijen kao rezultat nekog eksperimentalnog postupka. Deskriptori se koriste za formiranje QSPR ili QSRR modela kojim se ispitana osobina može predvideti za druga jedinjenja.

Deskriptori se mogu podeliti u grupe sa više aspekata, pa se tako sa aspekta dimenzionalnosti molekuskog predstavljanja dele na nulte (0D), jedno- (1D), dvo- (2D), tro- (3D) i četvorodimenzionalne (4D). Nulti deskriptori se dobijaju iz molekulske formule i ne zavise od molekulske strukture (npr. molekulska masa, broj i vrsta atoma...). 1D deskriptori predstavljaju molekul u obliku skupa molekulskih fragmenata (npr. broj atoma donora vodonične veze ili broj amino grupa u molekulu ili bilo kojih drugih funkcionalnih grupa). 2D deskriptori su topološki jer uzimaju u obzir tip

vezivanja i interakcije između atoma (npr. Balaban indeks, Wiener indeks, Zagreb indeks...). 3D deskriptori se računaju na osnovu trodimenzionalne ili geometrijske strukture molekula, pa se često i nazivaju geometrijskim (npr. 3D MoRSE deskriptori, GETAWAY deskriptori). 4D deskriptori se dobijaju iz stereoelektronskog prikazivanja molekula ili prikazivanja u formi rešetke.<sup>185</sup> Korisni su samo oni deskriptori koji se mogu interpretirati, tj. koji imaju uticaj na neku biološku osobinu ili na aktivnost. Teorijski, moguće je izračunati hiljade deskriptora, ali je pitanje da li oni imaju statistički značaj i da li se svaki može interpretirati.

## **1.6.8. Statističke metode za formiranje QSRR i QSPR modela**

### **1.6.8.1. Multipla linearna regresija**

Statistička metoda koja se vrlo često koristi za formiranje QSPR ili QSRR modela je multipla linearna regresija (MLR). Ovom metodom se može pronaći linearna zavisnost između zavisne varijable (retencija u hromatografskom sistemu ili permeabilnost) i nezavisnih varijabli (molekulski deskriptori). Prednost ove statističke metode je što se mogu formirati pouzdani MLR modeli od relativno malog broja odabranih molekulskih deskriptora. U formiranju MLR modela se ne može koristiti veliki broj deskriptora koji bi znatno premašio broj testiranih jedinjenja, već se taj broj mora smanjiti odgovarajućim odabirom. Metode koje se koriste za odabir najinformativnijeg seta deskriptora su genetski algoritmi,<sup>186</sup> analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA)<sup>187</sup> ili postupna (eng. *stepwise*) multilinearna regresija (MLR).<sup>188-190</sup> Primenom postupne MLR, nezavisne varijable se jedna po jedna dodaju u model i analiziraju nakon svakog koraka da bi se zadržale ili uklonile iz modela na osnovu prethodno definisanih kriterijuma (*F to enter* i *F to remove* kriterijumi).

### 1.6.8.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

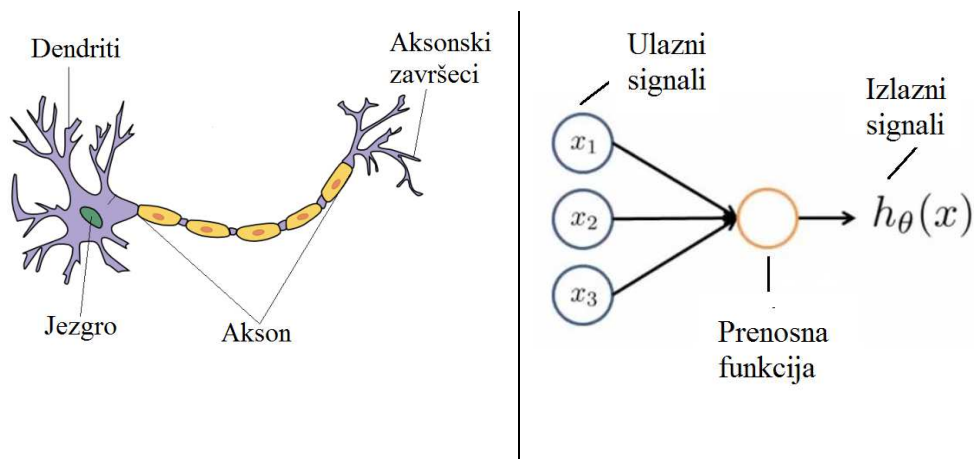
Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Squares*, PLS) je uvedena da bi se prevazišli problemi u modelovanju složenih setova podataka na koje nije bilo moguće primeniti MLR analizu. PLS modeli su korisni kada se analiziraju podaci koji su kolinearni, nepotpuni i sa brojnim nezavisnim varijablama (X varijable). Prednost predstavlja i to što je moguće istovremeno modelovati nekoliko zavisnih promenljivih Y. Setovi podataka se moraju organizovati u matrice (blokove). Značaj svakog deskriptora (tj. njegov uticaj na zavisnu varijablu) se procenjuje na osnovu VIP (eng. *Variable Importance in the Projection*) koeficijenta. Najznačajniji su molekularni deskriptori kod kojih je  $VIP > 1$ , umereno su značajni oni kod kojih je  $0,5 < VIP < 1$ , a oni kod kojih je  $VIP < 0,5$  se smatraju beznačajnim prema zavisnoj varijabli. Iz PLS modela se postupno uklanjaju molekularni deskriptori sa najnižim VIP vrednostima. Pošto se PLS metoda zasniva na uspostavljanju linearne zavisnosti između zavisne promenljive i niza latentnih (predviđajućih) promenljivih, tzv. PLS faktora, često se naziva i projekcija na latentne strukture (eng. *Projection to Latent Structures*, PLS).<sup>191-</sup>

193

### 1.6.8.3. Veštačke neuronske mreže

Način obrade i prenosa podataka u ljudskom mozgu je poslužio kao inspiracija za familiju statističkih metoda koje se nazivaju veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks*, ANN). Osnovna ideja veštačke neuronske mreže je simulacija velike količine gusto napakovanih, međusobno povezanih neurona u okviru računara tako da je omogućeno učenje pojmova, prepoznavanje šablona i donošenje odluka na način sličan ljudskom mozgu. Građa ANN mreže (Slika 9) podseća na građu ljudskog mozga jer je sastavljena iz neurona koji međusobno komuniciraju sinapsama.

Svaki neuron ima svoj težinski ulaz (eng. *weight input*), prenosnu funkciju (eng. *transfer function*) i izlaz (eng. *output*).

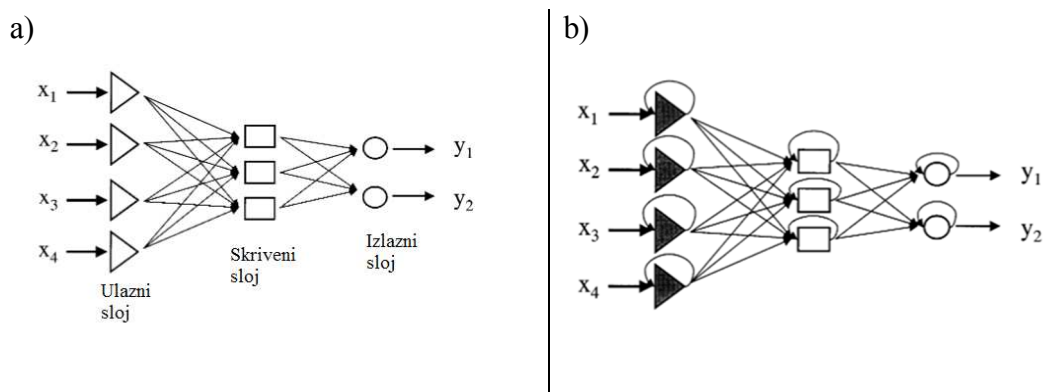


**Slika 9.** Sličnost u građi humanog neurona i neurona ANN

Ulazni signali se množe težinskim faktorima veze i prvo se sabiraju, nakon čega prolaze kroz prenosnu funkciju da bi na kraju stvorili izlazni signal za taj neuron. Prenosna funkcija nije linearna, već najčešće sigmoidalna. Težinski faktori veze su podložni promjenama u zavisnosti od iskustva. Upravo to čini mreže adaptivnim i sposobnim za učenje. Težinski faktori su od ključnog značaja za prilagođavanje modela podacima i za ceo proces učenja jer se posle svakog primera menjaju njihove vrednosti. Kada ulazni podaci koji se dovode mreži više ne dovode do promene ovih težinskih faktora, smatra se da je mreža obučena za rešavanje nekog problema.

Veštačke mreže se korišćenjem različitog broja neurona i slojeva mogu urediti na različite načine, a jedan od najčešće korišćenih načina su višeslojni perceptroni (eng. *Multilayer Perceptrons*, MLP) čiji se grafički prikaz može videti na Slici 10. Ovaj tip mreže se sastoji od tri sloja: ulaznog, skrivenog (jedan ili više slojeva) i izlaznog sloja.

Ulazni sloj čine nezavisne varijable (molekulski deskriptori), a izlazni sloj čini zavisna varijabla (odgovarajuća osobina molekula). U svakom sloju ima nekoliko povezanih neurona. S obzirom na to da je prenos signala jednosmeran (od ulaza do izlaza), MLP spada u višeslojne nerekurventne mreže (eng. *Multi Layer Feedforward Networks*). Postoje i višeslojne rekurentne mreže (eng. *Multi Layer Feedback Networks*), kod kojih su izlazni neuroni povezani sa ulaznim i tako se dobija povratna informacija. Algoritam kod ovih mreža je sa povratnom propagacijom (eng. *backpropagation*).<sup>194</sup>



**Slika 10. a)** Višeslojna nerekurentna mreža  
**b)** Višeslojna rekurentna mreža

Izvor slike: Agatonovic-Kustrin S., Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2000**, *22*, 717–727.

Pre formiranja odgovarajućih ANN modela, sva ispitivana jedinjenja se podele u tri grupe: trening, verifikacioni i test set. Trening set se koristi za formiranje modela, a verifikacionim setom se prate performanse mreže i proces njenog treniranja. Test set se koristi za nezavisnu proveru kvaliteta kreirane mreže.

### 1.6.9. Validacija QSAR, QSPR i QSRR modela

Validacija formiranog modela je ključni korak testiranja uspešnosti formiranog modela jer predstavlja proces kojim se proveravaju kvalitet i sposobnost predviđanja formiranih QSPR i QSRR modela. Validacija formiranih modela se vrši na osnovu izračunavanja statističkih parametara:

- RMSEE (eng. *Root Mean Square Error of Estimation*),
- RMSEP (eng. *Root Mean Square Error of Prediction*),
- $R^2$  (koeficijent determinacije formiranog modela),
- F-odnos,
- p-vrednost (nivo značajnosti F-odnosa),
- $Q^2$  (interni validacioni parametar),
- r (koeficijent korelacije između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti zavisne varijable jedinjenja test seta)
- $R^2_{pred}$  (eksterni validacioni parametar).



## 1.7. *IN VIVO* ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI

Postoje tri faze u razvoju inflamatornog odgovora i čitav spektar endogenih supstanci koje su uključene u proces nastanka inflamacije i kasniju reparaciju tkiva (histamin, serotonin, bradikinin, supstanca P i već pominjani eikozanoidi: prostaglandini, tromboksani i leukotrieni). U skladu sa tim postoje i odgovarajuće metodologije na eksperimentalnim animalnim modelima<sup>195</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1.** Metodologije za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti na eksperimentalnim animalnim modelima

<b>Akutna faza</b> Vazodilatacija i povećana permeabilnost kapilara, pa posledična eksudacija tečnosti iz krvotoka u intersticijalni prostor	<ul style="list-style-type: none"><li>• Test edema šapice pacova izazvan karagenanom</li><li>• Edem uva pacova ili miševa izazvan krotonskim uljem</li><li>• Edem uva pacova izazvan oksazolonom</li><li>• UV eritem kod zamoraca</li><li>• Test edema pluća kod pacova</li><li>• Tehnika granuloma (različite modifikacije i različiti iritansi)</li><li>• Vaskularna permeabilnost</li></ul>
<b>Subakutna faza</b> Infiltracija leukocita i fagocita	
<b>Hronična faza</b> Formiranje granuloma	<ul style="list-style-type: none"><li>• Granulom izazvan pamučnom vatom</li><li>• Granulom izazvan staklenim štapićem</li><li>• Tehnika implantacije suđera</li></ul>

Ovim testovima se meri neimunološki inflamatorni odgovor izazvan egzogenim medijatorom inflamacije u prisustvu ispitivanog jedinjenja u odnosu na neinflamirano tkivo. Mnogi od ovih eksperimenata su invazivni i terminalni. Test edema šapice izazvane karagenanom<sup>196,197</sup> se vrlo često koristi i zasniva se na merenju otoka zadnje šapice pacova u kojoj je izazvana inflamacija injektovanjem karagenana kod životinja tretiranih ispitivanim jedinjenjem i upoređuje se sa šapicom grupe koja nije tretirana ispitivanim jedinjenjem (kontrolna grupa). Osim karagenana mogu se koristiti i neki drugi iritansi kao što su: pivski kvasac, formaldehid, dekstran, kaolin ili sulfonovani polisaharidi. Eksperiment može biti terminalni i u tom slučaju se životinja žrtvuje i odsecaju se šapice čija se masa meri, a može se koristiti i sofisticiranija metoda merenja otoka šapice pomoću pletizmometra (aparatus za merenje volumena šape). I u tom slučaju

je eksperiment često terminalni, ali upotreba pletizmometra omogućava da se otok meri više puta u različitim vremenskim intervalima tokom eksperimenta čime se može pratiti kinetika antiinflamatornog odgovora. Međutim, u oba slučaja treba preduzeti izvesne korake kako bi eksperiment bio izveden bez subjektivnih grešaka (npr. odrediti liniju do koje se odseca/uranja šapa).

## **1.8. *IN VITRO* ISPITIVANJE INHIBICIJE CIKLOOKSIGENAZE**

*In vitro* ispitivanje inhibicije ciklooksigenaze se obično, pre svega iz etičkih razloga, izvodi pre *in vivo* ispitivanja. Teoretski omogućava testiranje velikog broja jedinjenja. Postoje različiti *in vitro* modeli koji mogu da uključuju ćelije humane hrskavice,<sup>198</sup> pune krvi<sup>199</sup> ili endotelne ćelije goveđe aorte,<sup>200</sup> a postoje i modeli u kojima se radi na izolovanoj prečišćenoj ili rekombinantnoj izoformi COX-1 ili COX-2.<sup>201-203</sup>

S obzirom na to da su danas komercijalno dostupni kitovi koji sadrže sve što je potrebno za izvođenje testiranja, preciznost u radu se povećava i dobijaju se pouzdaniji rezultati. Na tržištu postoje i kitovi koji sadrže COX-1 i COX-2 tako da se može testirati selektivnost ispitivanog jedinjenja ka svakoj izoformi pojedinačno i to su jedini relevantni rezultati na osnovu kojih se može tvrditi da je ispitivano jedinjenje selektivno. Kada se testiraju novosintetisana jedinjenja vrlo često se koriste komercijalni kitovi.<sup>201-203</sup>

## 1.9. BIOHEMIJSKI PARAMETRI

Određivanjem koncentracije pojedinih biohemijskih parametara u tkivu nekog organa, u plazmi ili u serumu može se dobiti uvid u procese koji se dešavaju u organima, tkivima ili na nivou same ćelije. Uticaj lekova ili novosintetisanih jedinjenja na funkciju jetre može se proceniti određivanjem koncentracije jetrenih enzima kao što su alanin aminotferaza (ALT), aspartat aminotferaza (AST) i alkalna fosfataza (ALP).<sup>204,205</sup> Ovi enzimi potiču iz oštećenih ćelija jetre i jasan su indikator hepatičke lezije. U studiji iz 1995. godine analizirano je 180 slučajeva kod kojih su primećeni hepatički neželjeni efekti i navedeno je da je oštećenje jetre detektovano na osnovu biohemijskih parametara: ALP, AST, ALT.<sup>56</sup>

Kao proizvodi različitih fizioloških procesa u organizmu konstantno nastaju razni prooksidansi. To su nestabilni molekuli, velike reaktivnosti, koji u organizmu stupaju u hemijske reakcije sa delovima ćelije pri čemu dovode do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih poremećaja. Poznato je da lekovi mogu da izazovu oksidativni stres, a postoje i istraživanja koja dovode u vezu primenu NSAIL i oksidativni stres.<sup>42,206</sup> U plazmi se mogu naći različiti oksidansi koji se mogu određivati odvojeno. Međutim, takvo određivanje nije praktično iz razloga što je efekat ovih parametara aditivan. Mnogo je praktičnije određivati ukupne činioce oksidativnog oštećenja u krvi koji se zajedno nazivaju totalni oksidantni status (TOS).

U zdravom organizmu neprestano funkcioniše fiziološki proces antioksidativne zaštite koji ima za cilj da spreči štetno delovanje prooksidativnih faktora. Antioksidansima se nazivaju supstance koje dovode do odlaganja ili inhibicije oksidacije supstrata. Sistem antioksidativne zaštite deluje na više nivoa, a obuhvata enzimske i neenzimske antioksidanse. Od enzimskih su značajni superoksid dizmutaza, katalaza i glutacion peroksidaza. Među neenzimskim su vrlo važne pre svega proteinske sulfhidrilne grupe i glutacion, a zatim mokraćna kiselina, bilirubin, vitamini C i E.<sup>207</sup> Imajući u vidu aditivnost antioksidanasa u organizmu, oni se u uzorku određuju zajedno kao totalni antioksidantni status (TAS).

U literaturi postoje podaci da je kod primene jedinjenja koja imaju ulcerogeni potencijal, u tkivu želuca povišen nivo malonildialdehida (MDA), glavnog i najviše

proučavanog produkta lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, koji nastaje u krajnjem stadijumu dejstva oksidanasa na lipidne molekule.<sup>208,209</sup> Iz tog razloga je vrlo korisno odrediti MDA u tkivu eksperimentalnih životinja za sintetisana jedinjenja sa potencijalnom antiinflamatornom aktivnošću, imajući na umu ozbiljnost i incidencu javljanja neželjenih gastrointestinalnih efekata NSAIL.

Glutation,  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicin (GSH) je intracelularni tripeptid koji je prisutan u većini tkiva i uključen je u održavanje ćelijske homeostaze i zaštitu ćelija od reaktivnih elektrofila i oksidativnog stresa. Ponaša se kao hvatač slobodnih radikala koji štiti od oksidacije tiolne grupe proteina neophodnih za očuvanje integriteta ćelije gastrične mukoze, što ga čini interesantnim biohemijским parametrom sa aspekta oksidativnog stresa i procene neželjenih gastričnih efekata primene NSAIL.<sup>210</sup>

Istraživanja pokazuju da mnogi NSAIL deluju kao prooksidansi i da bi upravo taj mehanizam mogao da bude uključen u etiologiju neželjenih gastrointestinalnih efekata kao i nekih idiosinkratskih toksičnosti (agranulocitoza) koje su rezultirale odlukom da se povuku neki lekovi poput metamizola sa američkog tržišta.<sup>42</sup> Zato je važno osim TAS i TOS odrediti i druge parametre oksidativnog stresa kao što su prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) i diazoksonaza (DZO).

## 2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- ❖ Ispitivanje interakcija  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina sa aminokiselinama u aktivnom mestu COX-1 i COX-2 izoforme enzima uz pomoć doking studija.
  - Procena selektivnosti derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline i derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline prema COX-2 izoformi;
  - Ispitivanje uticaja supstitucije bočnog niza metil grupom kod  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina na inhibiciju COX-1 i COX-2;
  - Ispitivanje uticaja različitih supstituenata (nitro, trifluorometil, metil, dimetilamino, metoksi grupe i hlora) na benzenovom prstenu  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline na selektivnost prema COX-2 izoformi;
  - Određivanje molekulske zapremine minimizovanih struktura ispitivanih kiselina, kao i dokovanih kiselina u njihovoj najboljoj prostornoj orijentaciji u aktivnom mestu izoforme COX-2 i poređenje sa molekulskom zapreminom ibuprofena.
- ❖ Sinteza odabranih derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilpropionske kiseline.
  - Sinteza odabranih jedinjenja modifikovanom Reformatski reakcijom i prečišćavanje sintetisanih jedinjenja odgovarajućim metodama;
  - Pronalaženje adekvatnih TLC i HPLC uslova za praćenje čistoće sintetisanih jedinjenja;
  - Potvrđivanje hemijske strukture sintetisanih jedinjenja određivanjem temperature topljenja i različitim spektroskopskim metodama (UV spektroskopija, ATR-FTIR spektroskopija,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija MS-MS, MS-TOF), kao i provera čistoće sintetisanih jedinjenja;
- ❖ Ispitivanje osnovnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih osobina  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina.

- Eksperimentalno određivanje konstanti jonizacije ( $pK_a$ ) i particionih koeficijenata ( $\log P$ )  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina primenom reverzno-fazne tečne hromatografije (RP-HPLC);
  - Izračunavanje stepena jonizacije jedinjenja sa najnižom  $pK_a$  na pojedinim pH vrednostima u gastrointestinalnom traktu.
  - Korelisanje eksperimentalno dobijenih  $pK_a$  i  $\log P$  vrednosti sa vrednostima izračunatim primenom računarskih programa;
  - Ispitivanje gastrointestinalne apsorpcije  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina i ibuprofena *in vitro* metodama (PAMPA test i BMC);
  - Formiranje QSPR i QSRR modela u cilju identifikacije molekulskih deskriptora najznačajnijih za gastrointestinalnu apsorpciju;
  - Interpretacija molekulskih deskriptora koji formiraju odabrane modele;
  - Dizajniranje  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina sa boljom gastrointestinalnom apsorpcijom u odnosu na ispitivana jedinjenja na osnovu rezultata QSPR, QSRR i doking studija.
- ❖ *In vivo* procena antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilpropionske kiseline.
- *In vivo* ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti sintetisanih jedinjenja metodom indukcije edema šapice pacova izazvanog karagenanom;
  - Procena gastrične podnošljivosti ispitivanih jedinjenja makroskopskim ispitivanjem lezija želudaca pacova i biohemijским ispitivanjem homogenata uzorkovanih tkiva želudaca;
  - Procena uticaja ispitivanih jedinjenja na funkcionalne parametre jetre u poređenju sa ibuprofenom, na osnovu biohemijških analiza;
  - Procena uticaja sintetisanih jedinjenja na oksidativni stres posle akutne primene jedinjenja i poređenje sa ibuprofenom.

- ❖ *In vitro* ispitivanje selektivnosti odabranih jedinjenja prema ciklooksigenazi-2.
  - *In vitro* ispitivanje inhibitorne aktivnosti sintetisanih jedinjenja prema COX-1 i COX-2, kao i selektivnosti sintetisanih jedinjenja prema COX-2 primenom komercijalnog kita.



# 3. EKSPERIMENTALNI DEO I REZULTATI

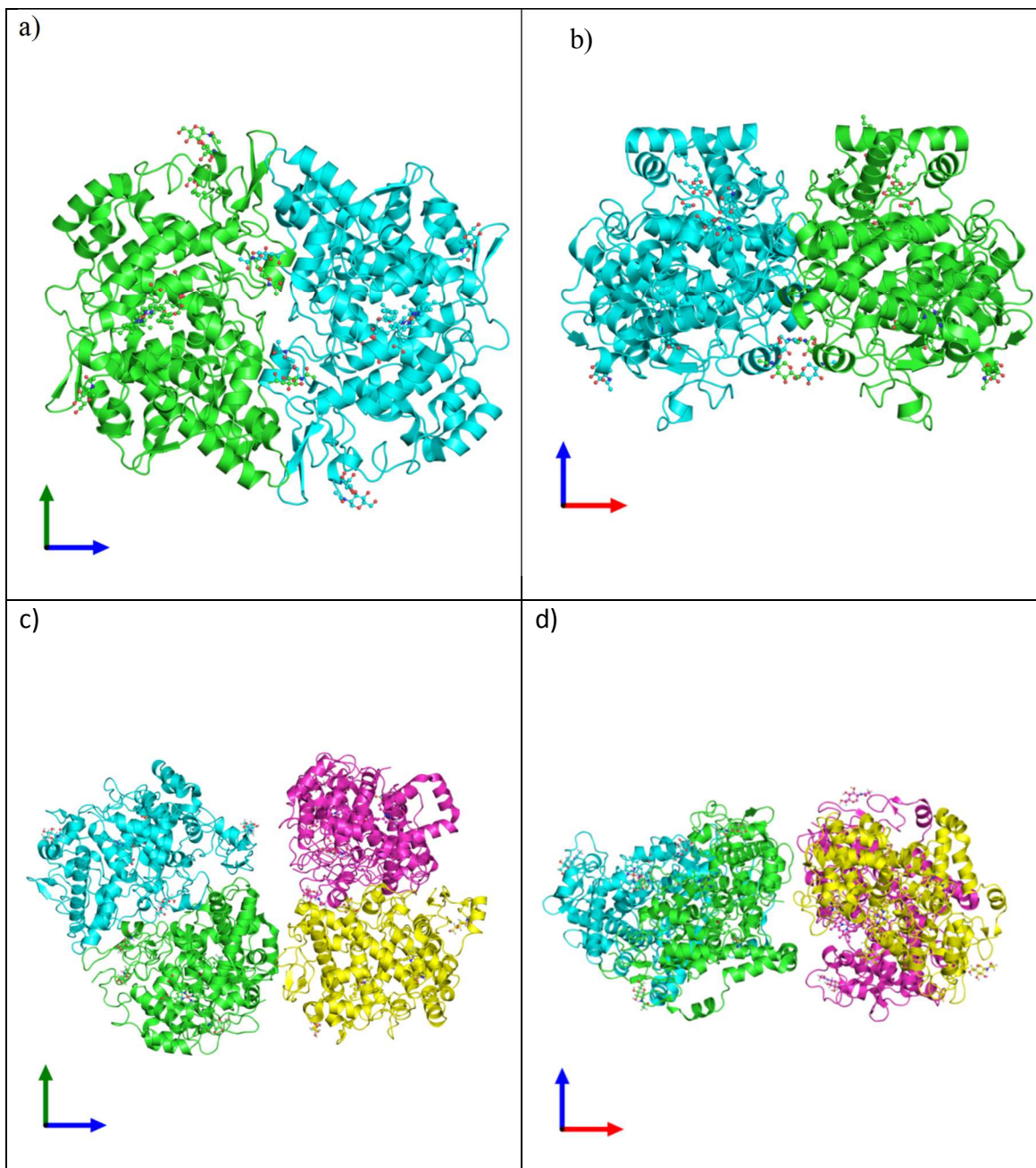
### 3.1. DOKING STUDIJE

#### 3.1.1. Računarski programi

- ChemOffice Ultra 7.0.0 (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>, 2005)
- Chem3D Ultra 9.0.1 program (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>, 2005)
- AutoDock v4.2 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, <http://autodock.scripps.edu/>)
- MarvinSketch 5.11.5 (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>)
- UCSF Chimera v1 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, 2006)
- Swiss-PDB Viewer v4.1 (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://spdbv.vitalit.ch>, 2012)
- Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, <http://www.microsoft.com>, 2010)
- Molinspiration Cheminformatics Software (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>)

#### 3.1.2. Izvođenje doking studija

Doking eksperimenti su izvedeni primenom programa Autodock v4.2 u 3D strukturi aktivnog mesta COX-1 i COX-2. 3D strukture izoforme COX-1 kokristalisane sa ibuprofenom (PDB kod: 1egg) i COX-2 kokristalisane sa selektivnim inhibitorom SC-558 (PDB kod: 1cx2) su preuzete iz baze podataka *RCSB Protein Data Bank*. COX-1 i COX-2 su homodimeri (Slika 11), a sva doking ispitivanja su rađena na monomeru, tj. na lancu A.



**Slika 11.** a) PDB 1eqg obojen po lancima (pogled spreda)  
 b) PDB 1eqg obojen po lancima (pogled sa strane)  
 c) PDB 1cx2 obojen po lancima (pogled spreda)  
 d) PDB 1cx2 obojen po lancima i (pogled sa strane)

Izvor slike: <https://www.ebi.ac.uk>

U programu UCSF Chimera je uklonjen lanac B kao i ligand sa aktivnog mesta (ibuprofen iz COX-1, odnosno SC-558 iz COX-2). Dokovano je petnaest jedinjenja čije su strukture date u Tabeli 2, a metoda je validirana dokovanjem ibuprofena i jedinjenja SC-558 pod identičnim uslovima u aktivno mesto COX-1, odnosno COX-2 (*redocking*).

Strukture svih ispitivanih jedinjenja su nacrtane u programu ChemOffice Ultra 7.0.0 u jonskom obliku (dominantan oblik na fiziološkom pH) i optimizovane u Chem3D Ultra 9.0.1 programu MM2 i MOPAC metodom. AutoDock eksperimenti su sprovedeni u četiri koraka:

- 1) Priprema fajlova sa koordinatama uz pomoć programa AutoDockTools;
- 2) Preliminarno izračunavanje afiniteta atoma uz pomoć opcije AutoGrid u okviru programa AutoDockTools;
- 3) Uklapanje (dokovanje) liganada u 3D strukturu COX-1 i COX-2 uz pomoć programa AutoDock;
- 4) Analiza rezultata korišćenjem AutoDockTools.

Lamarkianov genetski algoritam inkorporiran u AutoDockTools je korišćen za pretraživanje najpovoljnijih konformera. Ovaj algoritam se pokazao efikasnim ukoliko u ligandu postoji bar 10 rotabilnih veza. Zadati broj konformera u programu za svako jedinjenje je iznosio 100. Koordinatna mreža, dimenzija 40 x 40 x 40 tačaka sa međusobnim razmakom između tačaka 0,375 Å, postavljena je u centar aktivnog mesta kako COX-1, tako i COX-2. Parametri u Lamarkian genetskom algoritmu (LGA) su bili sledeći:

- Maksimalan broj energetskih proračuna: 150 000;
- Maksimalan broj generisanja konformacija: 27 000;
- Broj preživelih individua za sledeću generaciju: 1;
- Brzina mutacija: 0,02;
- Brzina rekombinacija: 0,8;
- Translacija: 2 Å;
- Kvaternion: 50 °;
- Torzioni ugao: 50 °;
- Broj proračuna: 100;
- Tolerancija u klasteru: 2 Å;
- Eksterna energija mreže: 1000;
- Maksimalna inicijalna energija: 0,0;
- Maksimalni broj ponavljanja: 10 000.

### 3.1.3. Izračunavanje molekulske zapremine

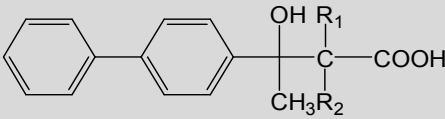
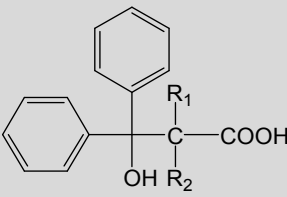
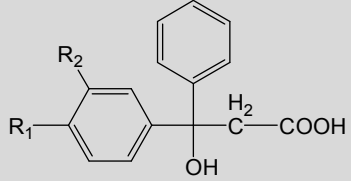
U programu MarvinSketch 5.11.5 su izračunate molekulske zapremine za dokovana jedinjenja u prostornim orijentacijama u kojima su ostvarila najnižu energiju sa izoformom COX-2. Najpre se u programu AutoDock za dokovano jedinjenje u najboljoj prostornoj orijentaciji ukloni receptor i jedinjenje prevede u *pdb* fajl koji je moguće otvoriti u programu MarvinSketch 5.11.5.

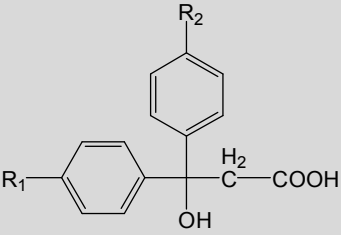
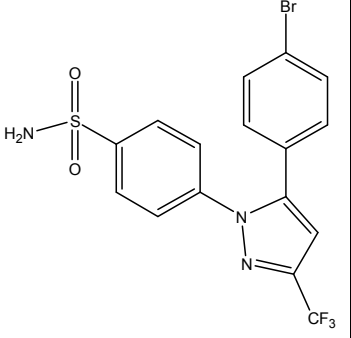
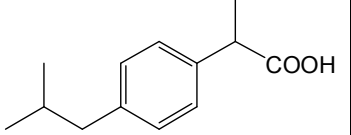
U programu Molinspiration su izračunate molekulske zapremine za jedinjenja koja nisu dokovana već su njihove strukture nacrtane direktno u programu.

### 3.1.4. Rezultati doking studija i izračunavanja molekulskih zapremina

Strukture dokovanih jedinjenja i njihovi hemijski nazivi po IUPAC nomenklaturi su prikazani u Tabeli 2 (poglavlje 3.1.4.). U praksi se češće koriste alternativni nazivi ovih kiselina, kada se one označavaju kao derivati propionske ili buterne kiseline, a ugljenikov atom na kome je hidroksilna grupa se označava sa  $\beta$ .

**Tabela 2.** Strukturne formule dokovanih jedinjenja

			
Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hemijski naziv (IUPAC)
1A	H	H	3-hidroksi-3-(4-difenilil)butanska kiselina
1B	CH <sub>3</sub>	H	3-hidroksi-2-metil-3-(4-difenilil)butanska kiselina
1C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3-hidroksi-2,2-dimetil-3-(4-difenilil)butanska kiselina
			
2A	H	H	3-hidroksi-3,3-difenilpropanska kiselina
2B	CH <sub>3</sub>	H	3-hidroksi-3,3-difenil-2-metilpropanska kiselina
2C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3-hidroksi-3,3-difenil-2,2-dimetilpropanska kiselina
			
2APN	NO <sub>2</sub>	H	3-hidroksi-3-(4-nitrofenil)-3-fenilpropanska kiselina
2APTF	CF <sub>3</sub>	H	3-(4-(trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina
2APH	Cl	H	3-(4-hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina
2APM	CH <sub>3</sub>	H	3-hidroksi-3-(4-metilfenil)-3-fenilpropanska kiselina
2AMN	H	NO <sub>2</sub>	3-hidroksi-3-(3-nitrofenil)-3-fenilpropanska kiselina
2AMTF	H	CF <sub>3</sub>	3-(3-(trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina
2AMH	H	Cl	3-(3-hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina
2AMM	H	CH <sub>3</sub>	3-(3-metilfenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina

			
2ABPMX	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	3-hidroksi-3,3-bis(4-metoksifenil)propanska kiselina
2ABPDMA	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3-hidroksi-3,3-bis(4-dimetilamino)propanska kiselina
SC-558			4-[5-(4-bromofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]benzensulfonamid
Ibuprofen			2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanska kiselina

Energije vezivanja dokovanih jedinjenja i enantiomera (ukoliko ih ima) u aktivnom mestu izoforme COX-1 i COX-2 su date u Tabeli 3. Jedinjenje 1B ima dva hiralna ugljenikova atoma, pa ima dijastereoizomere.

**Tabela 3.** Energije vezivanja najpovoljnijih prostornih orijentacija ispitivanih jedinjenja u aktivnom mestu COX-1 i COX-2

Jedinjenje	Energije vezivanja (kcal/mol)			
	COX-1		COX-2	
1A	R	-8,21	R	-8,31
	S	-8,16	S	-8,15
1B	2R3R	-8,61	2R3R	-8,50
	2R3S	-8,16	2R3S	-8,49
	2S3R	-8,15	2S3R	-8,14
	2S3S	-8,13	2S3S	-8,27

1C	R	-8,18	R	-8,25
	S	-8,13	S	-8,21
2A		-7,31		-6,92
2B	R	-7,20	R	-7,33
	S	-6,78	S	-7,14
2C		-7,50		-6,85
2APN	R	-8,82	R	-7,67
	S	-8,57	S	-7,58
2APTF	R	-7,73	R	-7,27
	S	-6,63	S	-6,90
2APH	R	-7,65	R	-7,45
	S	-7,51	S	-7,30
2APM	R	-7,67	R	-7,41
	S	-7,54	S	-7,29
2AMN	R	-8,71	R	-7,61
	S	-9,11	S	-7,64
2AMTF	R	-7,32	R	-7,68
	S	-7,01	S	-7,15
2AMH	R	-7,79	R	-7,69
	S	-7,66	S	-7,48
2AMM	R	-7,16	R	-7,46
	S	-7,12	S	-6,82
2ABPMX		-7,66		-7,33
2ABPDMA		-7,65		-8,86
SC-558		-6,44		-10,46
Ibuprofen	R	-8,03	R	-6,90
	S	-8,99	S	-7,44



**Tabela 4.** Udaljenost u angstromima ispitivanih jedinjenja od ključnih aminokiselina u regionu P<sub>3</sub>

Jedinjenje	Udaljenost (Å)		
	Aminokiseline		
	<i>His90</i>	<i>Gln192</i>	<i>Arg513</i>
1A	3,296	4,521	3,815
1B	3,317	4,321	3,982
1C	2,918	3,985	3,425
2A	3,225	4,021	3,880
2B	3,564	4,874	3,660
2C	3,495	5,010	3,930
2APN	3,487	3,782	2,030
2APTF	3,381	5,071	3,483
2APH	3,246	4,952	3,438
2APM	3,476	5,200	3,215
2AMN	3,620	5,244	3,465
2AMTF	3,361	5,212	3,346
2AMH	3,614	5,184	3,549
2AMM	3,807	5,201	3,674
2ABPDMA	3,273	3,412	3,069
2ABPMX	3,233	4,060	3,239
SC-558	2,120	3,225	2,008

Rezultati izračunavanja molekulskih zapremina za dokovana jedinjenja u aktivnom mestu COX-2, kao i za ista jedinjenja koja nisu dokovana su dati u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Molekulske zapremine ispitivanih jedinjenja jedinjenja

Jedinjenje	Van der Waalsova zapremina molekula (Å <sup>3</sup> )	
	MarvinSketch	Molinspiration
IBUPROFEN	175,90	211,19
SC-558	277,22	299,97
1A	264,22	240,34
1B	281,01	256,92
1C	297,66	273,16
2A	247,71	223,78
2B	264,62	240,36
2C	281,36	256,60
2APN	271,14	247,11
2APTF	279,57	255,07
2APH	265,90	237,31
2APM	264,28	240,34
2AMN	271,15	247,11
2AMTF	279,42	255,07
2AMH	265,88	237,31
2AMM	264,43	240,34
2ABPDMA	340,19	315,59
2ABPMX	299,44	274,87

## 3.2. SINTEZA DERIVATA $\beta$ -HIDROKSI- $\beta$ -ARILPROPIONSKE KISELINE

### 3.2.1. Hemikalije

- 4-Nitrobenzofenon, 99% (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 3-Nitrobenzofenon, 98% (ABCR, Karlsruhe, Nemačka)
- 4,4'Bis-(dimetilamino)-benzofenon, 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- 4-(Trifluorometil)-benzofenon, 98% (ABCR, Karlsruhe, Nemačka)
- 3-(Trifluorometil)-benzofenon, 97% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- 4-Metilbenzofenon, 98% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- 3-Metilbenzofenon, 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- 4-Hlorobenzofenon, 99% (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 3-Hlorobenzofenon, 98% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- 4, 4'-Dihlorobenzofenon, 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- 4, 4'-Dimetoksibenzofenon, 99% (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Bromsirćetna kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Cink, opiljci (Zorka, Šabac, Srbija)
- Tetrahidrofuran, THF,  $\geq 99,9\%$  (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Jod (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Živa(II)-hlorid (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Etilvinil-etar, 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Sumporna kiselina, 98% (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Hlorovodonična kiselina, 35% (Lachema, Brno, Češka)

- Dietiletar (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Natrijum-hidroksid, (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Toluen 99,5% (Poch, Poljska)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Dimetilsulfoksid D6, DMSO, >99,9% (Roth, Karlsruhe, Nemačka)
- Tetrametilsilan, TMS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Aceton, p.a. (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- Acetonitril, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)
- Metanol, HPLC čistoće (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Natrijum-karbonat, p. a. grade (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Etil-acetat, p.a. (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- Sirćetna kiselina, glacijalna (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Kalcijum-hlorid, anhidrovani (Carlo Erba, Rodano, Italija)

### 3.2.2. Materijal i oprema

- TLC ploče, 20 x 20 cm, silikagel 60 F<sub>254</sub>, (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- NMR BRUKER ADVANCE III DMX 500 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Nemačka)
- NMR BRUKER ADVANCE III 400 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Nemačka)
- ATR-FTIR spektrofotometar Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)

- ATR modul SMART iTR sa dijamantskim kristalom
  - OMNIC 8.0 program
- Tečni hromatograf spregnut sa masenim detektorom preciznih masa Agilent 6210 Time-of-Flight (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
  - tečni hromatograf Agilent Technologies 1210
  - program AgilentMassHunter Workstation Software
  - program Analyst QS
- UHPLC tečni hromatograf ACELLA spregnut sa triplkvadrupolskim masenim detektorom (ThermoFisherScientificInc., Madison, WI, SAD)
  - triplkvadrupolski MS-MS detektor TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)
  - program TSQ EZ Tune version 2.3.0.1206 SPI
  - program Xcalibur 2.1.0.1139
- Analitička vaga Adventurer TM-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Magnetna mešalica Tehnica Rotamix SHP-10 (Železniki, Slovenija)
- Rotacioni vakuum uparivač ROTAVAPOR-R (Büchi, Švajcarska)
- Aparat za određivanje temperature topljenja Boetius PHMK 05 (Radebeul, Nemačka)
- UV lampa UV-CABINET II (Camag, Švajcarska)
- Analitička vaga METTLER (Zürich, Švajcarska)
- Ultrazvučno kupatilo USK (EI Niš, Niš, Srbija)
- TKA sistem za prečišćavanje vode (Niederelbert, Nemačka)
- Vakuum sušnica Heraeus, (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija)

### 3.2.3. Hromatografske kolone

- ZORBAX Eclipse XDB C18 (4,6 x 250 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ )
- ZORBAX Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ )

### 3.2.4. Priprema aparature

Aparatura za sintezu se sastoji od trogrlog balona, kondenzatora i kalcijum-hloridne cevi. Aparatura mora biti potpuno suva i potrebno je da se najpre dobro izari uz pomoć plamenika u struji azota.

### 3.2.5. Aktivacija cinka

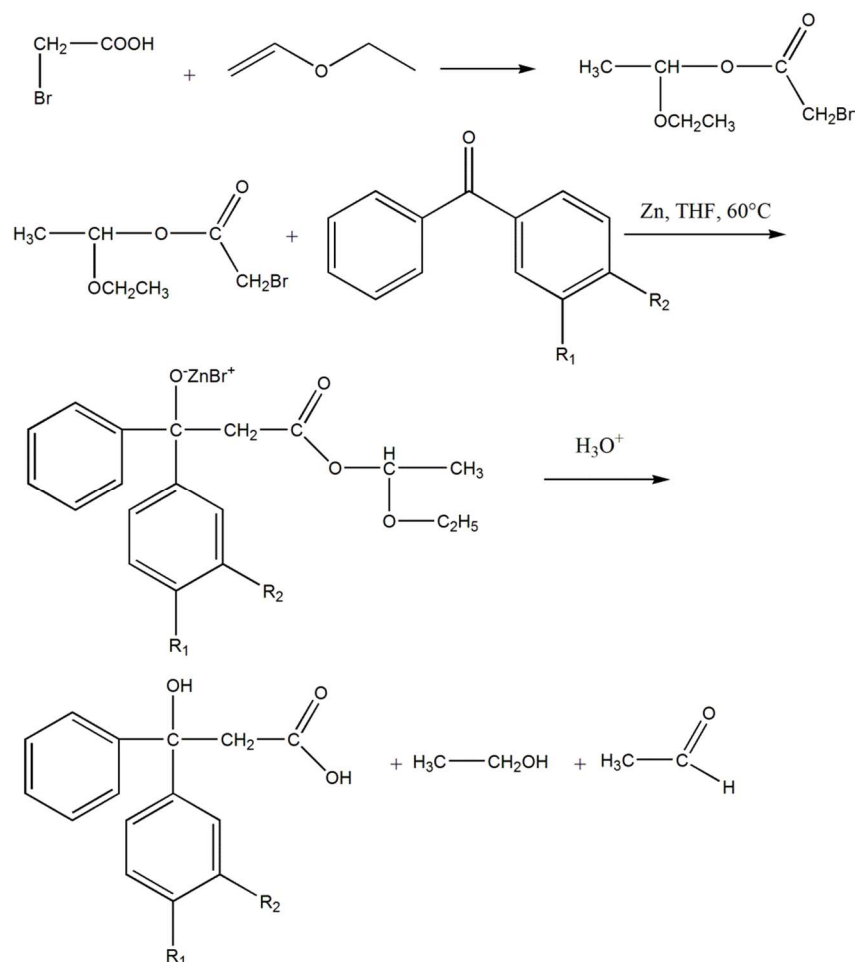
Odgovarajuća količina opiljaka cinka se prenese u čašu, prelije koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom toliko da se prekrije cink. Posle nekoliko minuta cink postaje porozan, pa se prenese u levak i ispira destilovanom vodom do neutralne reakcije, pa etanolom, acetonom i, na kraju, etrom. Cink se zatim suši u sušnici na 120 °C tokom 2 h i može se čuvati najduže mesec dana u eksikatoru iznad anhidrovanog kalcijum-hlorida.

### 3.2.6. Sušenje tetrahidrofurana

Tetrahidrofur se priprema *ex tempore*. U suv balon se izvuče natrijumova žica. Dodaju se tetrahidrofur i benzofenon. Benzofenon služi kao indikator jer je u prisustvu vode bezbojan, a kad se osuši u struji azota poplavi. Već prilikom zagrevanja rastvor u balonu poplavi. THF se destiluje dok je rastvor u balonu plav i ohladi se u struji azota. Predestilisani THF se sakuplja i koristi sveže pripremljen.

### 3.2.7. Postupak sinteze

Sinteza modifikovanom Reformatski reakcijom se odvija u dve faze. U prvoj fazi se u troglom balonu od 100 mL sa okruglim dnom,  $\text{CaCl}_2$  cevi i ulazom azota odmeri 4,17g (0,03 mol)  $\alpha$ -bromsircetne kiseline. Doda se 5 mL etilvinil-etra i sintetiše intermedijer tokom 60 minuta uz mešanje i još 30 minuta bez mešanja. Sadržaj iz balona se zatim prenese u kapalicu. U isti balon se odmeri 0,02 mol odgovarajućeg ketona, 1,95 g opiljaka aktiviranog cinka, 30 mL predestilisanog tetrahidrofurana, 3 mg živa(II)-hlorida i isto toliko joda. Balon se uroni u uljano kupatilo zagrejano na  $65^\circ\text{C}$  (refluks THF-a). Iz kapalice se u vremenskom intervalu od oko 30 min dokapava sintetisani intermedijer. Sinteza se odvija u struji azota dok ne izreaguje sav cink (Slika 12).



Slika 12. Shema sinteze derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilpropionske kiseline

Prema ovom opštem postupku sintetisani su sledeći derivati:

- **3-Hidroksi-3-(4-nitrofenil)-3-fenilpropanska kiselina (2APN):** Odmeri se 4,54 g 4-nitrobenzofenona i sintetiše prema postupku sinteze.
- **3-(4-(Trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina (2APTF):** Odmeri se 5,00 g 4-(trifluorometil)benzofenona i sintetiše prema opštem postupku sinteze.
- **3-(4-Hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina (2APH):** Odmeri se 4,33 g 4-hlorobenzofenona i sintetiše prema opštem postupku sinteze.
- **3-Hidroksi-3-(4-metilfenil)-3-fenilpropanska kiselina (2APM):** Odmeri se 3,92 g 4-metilbenzofenona i sintetiše prema opštem postupku sinteze.
- **3-(3-(Trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina (2AMTF):** Odmeri se 5,00 g 3-(trifluorometil)benzofenona i sintetiše prema opštem postupku sinteze.
- **3-(3-Hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kislina (2AMH):** Odmeri se 4,33 g 3-hlorobenzofenona i sintetiše prema opštem postupku sinteze.
- **3-(3-Metilfenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina (2AMM):** Odmeri se 3,92 g (3,58 mL) 3-metilbenzofenona i sintetiše prema opštem postupku sinteze.

### 3.2.8. Hidroliza estra

Proizvod ove modifikovane Reformatski reakcije je estar i istovremeno acetal koga je potrebno hidrolizovati do kiseline. U balon se doda oko 50 g leda, a kada se reakciona smeša dobro ohladi i 1 mL koncentrovane sumporne kiseline. Hidroliza traje 2 sata uz mešanje, hlađenje balona spolja ledom i korišćenje vakuum pumpe da bi se uklanjali etanol i acetaldehid.



### 3.2.9. Izolovanje kiseline

Nakon hidrolize estera potrebno je izolovati sintetisanu kiselinu. Sadržaj iz balona se prenese u levak za odvajanje. S obzirom da je kiselina u molekulskom obliku, odvoji se organski sloj, a vodeni se ekstrahuje etrom (3 x 5 mL). Etarski sloj se pripoji odvojenom organskom sloju. U organski sloj se dodaje 10% rastvor Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> do postizanja pH 8. Na taj način se kiselina prevodi u natrijumovu so da bi se odvojila od eventualno zaostalog neizreagovalog ketona. Kad se taj bazni vodeni rastvor odvoji od organskog sloja i ohladi na ledu zakišeljava se hlorovodoničnom kiselinom do pH 2. Sintetisana kiselina se izdvaja u vidu taloga koji se filtrira i suši u vakuum sušnici.

### 3.2.10. Prečišćavanje sintetisanih jedinjenja

Prečišćavanje se vrši višestrukim prekrizacijama iz toluena. Čistoća jedinjenja se prvo proverava TLC metodom, a zatim i HPLC metodom.

**Mobilna faza za TLC:** glacijalna sirćetna kiselina/etilacetat/toluen (3:10:87 v/v/v)

**Rastvarač:** metanol

**Detekcija mrlja:** pod UV lampom na 254 nm

Ploče za TLC su isečene na pločice dimenzija 2,5 x 7,5 cm

**Hromatografski uslovi za HPLC:** Mobilna faza: 0,02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3 / acetonitril (40:60 v/v), injektovana zapremina: 20 µL, protok: 1 mL/min, temperatura kolone: 25 °C, detekcija na 237 nm.

**Rastvarač:** metanol

### 3.3. STRUKTURNA ANALIZA SINTETISANIH JEDINJENJA

Temperature topljenja novosintetisanih kiselina određene su metodom trenutnog topljenja na aparatu Boetius PHMK 05 (Nemačka) koji je opremljen digitalnim termometrom.

IR spektri su snimljeni na FT-IR aparatu Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD). Korišćena je metoda atenuisane refleksije uz primenu ATR modula SMART iTR opremljenog dijamantskim kristalom. Spektri su obrađeni primenom računarskog programa OMNIC 8.0.

NMR spektri ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) su snimljeni na NMR aparatima Bruker Advance III DMX 500 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Nemačka) i NMR Ascend 400 (Bruker, SAD). Kao rastvarač je korišćen DMSO, a hemijska pomeranja su određivana u odnosu na tetrametilsilan kao interni standard.

Tačne mase sintetisanih kiselina su određene na masenom detektoru preciznih masa Agilent 6210 Time-of-Flight (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) koji je kupovan sa tečnim hromatografom Agilent Technologies 1210. Maseni spektri su obrađeni primenom računarskih programa Agilent Mass Hunter Workstation Software i Analyst QC.

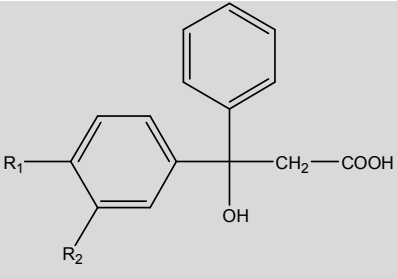
MS-MS fragmentacija je izvršena na UHPLC-MS-MS sistemu koji je opremljen UHPLC tečnim hromatografom ACCELA (Thermo Scientific Inc., Madison, WI, SAD) i triplkvadrupolskim MS-MS detektorom (Thermo Scientific Inc., Madison, WI, SAD). Korišćena je elektron sprej jonizacija, a izolovani su joni u negativnom modu. Za obradu rezultata korišćen je računarski program Xcalibur 1.2 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, SAD). Prvi kvadrupol je korišćen za izolovanje molekuskog jona [M-H], drugi kvadrupol za fragmentaciju, a treći za detekciju fragmenata.

### 3.3.1. Rezultati strukturne analize sintetisanih jedinjenja

#### 3.3.1.1. Hemijske strukture sintetisanih jedinjenja

U Tabeli 6 su prikazane strukturne i molekulske formule sintetisanih jedinjenja i odgovarajuće molekulske mase izračunate u programu ChemOffice v 7.0.0.

**Tabela 6.** Strukture sintetisanih jedinjenja



Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Molekulska formula	Molekulska masa
<b>2APN</b>	NO <sub>2</sub>	H	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>	287,27
<b>2APTF</b>	CF <sub>3</sub>	H	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	310,27
<b>2APH</b>	Cl	H	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>3</sub>	276,71
<b>2APM</b>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	256,30
<b>2AMTF</b>	H	CF <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	310,27
<b>2AMH</b>	H	Cl	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>3</sub>	276,71
<b>2AMM</b>	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	256,30

#### 3.3.1.2. Strukturna analiza sintetisanih derivata β-hidroksi-β-arilpropionske kiseline

##### 3-Hidroksi-3-(4-nitrofenil)-3-fenilpropionska kiselina (2APN)

Svetlo žut kristalan prašak. **Prinos:** 24%. **Temperatura topljenja:** 183,7-185,5°C. **ATR-FTIR**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3468,27; 2545,00; 1685,22; 1440,80; 1369,21; 1230,63. **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 7,48-7,18 (m, 9H); 3,29 (ABq,  $J = 15$  Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 172,71; 147,04; 146,36; 127,97; 127,74; 127,57; 125,48; 75,28; 45,17. LC/MS  $m/z$ : 285,80 ( $M^+-1$ ), 59,17; 229,40; 165,34; 41,59. MS (CI) HRMS (ESI): Izračunato za C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>Na: 310,06901; određeno: 310,06923. CAS registarski broj: 19207-61-5.

**3-(4-(Trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenipropanska kiselina (2APTF)**

Beli kristalni prašak. **Prinos:** 68% **Temperatura topljenja:** 169,7-171,1°C. ATR-FTIR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3469,38; 2546,89; 1685,13; 1441,47; 1230,37; 1069,99. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 7,71-7,18 (m, 9H); 3,36 (ABq, 15 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 172,48; 151,95; 146,81; 128,08; 125,51; 124,70; 123,27; 124,73; 75,44; 45,12 ppm. LC/MS  $m/z$ : 308,90 ( $M^+-1$ ), 59,15; 246,93; 226,97; 264,95. MS (CI) HRMS (ESI): Izračunato za C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 309,07519; određeno: 309,07440.

**3-(4-Hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina (2APH)**

Beli kristalni prašak. **Prinos:** 72%. **Temperatura topljenja:** 160,7-162,9°C. ATR-FTIR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3468,27; 2536,94; 1685,79; 1441,78; 1230,97; 694,10. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 7,48-7,18 (m, 9H); 3,30 (ABq,  $J = 15$  Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 172,96; 147,31; 146,62; 131,29; 125,72-128,23; 75,48; 45,34. LC/MS  $\delta$  (ppm): 274,90 ( $M^+-1$ ), 59,19; 233,78; 213,04; 41,56. MS (CI) HRMS (ESI): Izračunato za C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>ClO<sub>3</sub>N: 294,08839; određeno: 294,08915. CAS registarski broj: 65565-13-1.

**3-Hidroksi-3-(4-metilfenil)-3-fenilpropanska kiselina (2APM)**

Beli kristalni prašak. **Prinos:** 49%. **Temperatura topljenja:** 165,3-168,0°C. ATR-FTIR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3471,56; 2544,52; 1684,91; 1440,21; 1412,44; 1230,04. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 7,44-7,06 (m, 9H); 3,26 (s, 2H); 2,23 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 173,19; 147,42; 144,37; 135,44; 128,45; 127,83; 125,45; 75,47; 45,20; 20,52. LC/MS  $m/z$ : 254,90 ( $M^+-1$ ), 59,15; 193,12; 60,86; 194,85. MS (CI) HRMS (ESI): Izračunato za C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>Na: 279,09908; određeno: 279,09917. CAS registarski broj: 412014-20-1.

### **3-(3-(Trifluorometil)fenil)-3-hidroksi-3-fenil-propanska kiselina (2AMTF)**

Beli kristalni prašak. **Prinos:** 68%. **Temperatura topljenja:** 120,9-122,5°C. **ATR-FTIR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3474,59; 2548,59; 1688,81; 1436,36; 1239,16; 1069,99. **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 7,83-7,19 (m, 9H); 3,37 (ABq,  $J = 15$  Hz, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 172,44; 148,76; 146,91; 129,93; 128,91; 128,10; 125,59; 75,37; 45,21. **LC/MS  $m/z$ :** 308,90 ( $M^+-1$ ), 59,14; 246,90; 226,98; 97,09. **MS (CI) HRMS (ESI):** Izračunato za C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na: 333,07062; određeno: 333,07090.

### **3-(3-Hlorofenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina (2AMH)**

Beli kristalni prašak. **Prinos:** 60%. **Temperatura topljenja:** 185,3-188,3°C. **ATR-FTIR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3468,07; 2549,34; 1684,83; 1488,59; 1230,63; 693,29. **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 7,46-6,98 (m, 9H); 3,28 (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 172,70; 147,02; 146,36; 127,99; 127,74; 125,57; 125,48; 75,29; 45,17; **LC/MS  $m/z$ :** 274,90 ( $M^+-1$ ), 59,16; 41,44; 231,09; 164,88. **MS (CI) HRMS (ESI):** Izračunato je za C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub> 275,04860; određeno: 275,04805.

### **3-(3-Metilfenil)-3-hidroksi-3-fenilpropanska kiselina (2AMM)**

Beli kristalni prašak. **Prinos:** 45%. **Temperatura topljenja:** 154,3-156,4°C. **ATR-FTIR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3478,54; 2543,12; 1685,81; 1439,57; 1408,16; 1221,9. **<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 7,46-6,98 (m, 9H); 3,28 (s, 2H); 2,25 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 173,21; 147,31; 147,26; 127,86; 127,79; 125,47; 122,61; 75,51; 45,16; 21,27. **LC/MS  $m/z$ :** 254,90 ( $M^+-1$ ), 59,15; 193,14; 209,06; 191,00. **MS (CI) HRMS (ESI):** Izračunato za C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>: 255,10289; određeno: 255,10267.

### **3.4. OSNOVNA FIZIČKO-HEMIJSKA I BIOFARMACEUTSKA ISPITIVANJA $\beta$ -HIDROKSI- $\beta$ -ARILALKANSKIH KISELINA**

#### **3.4.1. Određivanje konstanti jonizacije ( $pK_a$ ) $\beta$ -hidroksi- $\beta$ arilalkanskih kiselina**

##### **3.4.1.1. Računarski programi**

- MarvinSketch 5.11.5 (ChemAxon, <http://www.chemaxon.com>, 2013)
- ACD/I-Lab (Basic PhysChem Properties, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2015)
- OriginPro 8 (OriginLab Corporation, <http://www.originlab.com>, 2007)
- Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, SAD, 2010)

##### **3.4.1.2. Reagensi i hemikalije**

- *Orto*fosforna kiselina, 85% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Kalijum-dihidrogenfosfat (Fisher Scientific UK, Loughborough Leics, Velika Britanija)
- Sirćetna kiselina, glacialna (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-acetat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-hidrogenfosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Ibuprofen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- Metanol HPLC čistoće (J. T. Baker, Deventer, Holandija)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)
- Pufferi za kalibraciju: pH=1,679; pH=4,005; pH=7,00 i pH=9,18 (Radiometer Analytical, Villeurbanne Cedex, Francuska)

### 3.4.1.3. Oprema

- pH metar, Radiometer, model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- HPLC uređaj, Agilent Technologies 1200 Series systems (Santa Clara, CA, SAD) opremljen binarnom pumpom, 20  $\mu$ L manuelnim injektorom, UV detektorom i programom ChemStation
- Analitička vaga Adventurer<sup>TM</sup> – Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Kolona: ZORBAX Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu$ m)

### 3.4.1.4. Priprema mobilnih faza za HPLC analizu

Svaka mobilna faza se sastojala od smeše metanol:puffer (60:40 v/v). Merena je pH vrednost pripremljenog pufera i označena sa  $^w\text{pH}$ , a zatim i pH vrednost mobilne faze i označena sa  $^s\text{pH}$ . Sastav pufera, njihove  $^w\text{pH}$  vrednosti, kao i  $^s\text{pH}$  vrednosti mobilnih faza su prikazani u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Sastav pufera,  $^w\text{pH}$  vrednosti pufera i  $^s\text{pH}$  vrednosti mobilnih faza

	Sastav pufera	pH pufera, $^w\text{pH}$	pH mobilne faze, $^s\text{pH}$
1.	0,01 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,339	3,126
2.	0,007 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 0,003 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,555	3,456
3.	0,005 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 0,005 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,712	3,699
4.	0,001 mol/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 0,009 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,338	4,537
5.	0,01 mol/L CH <sub>3</sub> COOH	3,433	4,207
6.	0,009 mol/L CH <sub>3</sub> COOH + 0,001 mol/L CH <sub>3</sub> COONa	4,199	5,293
7.	0,005 mol/L CH <sub>3</sub> COOH + 0,005 mol/L CH <sub>3</sub> COONa	4,835	5,801
8.	0,001 mol/L CH <sub>3</sub> COOH + 0,009 mol/L CH <sub>3</sub> COONa	5,537	6,827
9.	0,007 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,003 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,585	7,258
10.	0,005 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,005 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,046	8,679

### 3.4.1.5. Priprema rastvora jedinjenja za analizu

Osnovni rastvor se priprema rastvaranjem 10 mg svakog od derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina, ibuprofena i  $\text{NaNO}_3$  u 10 mL metanola u odmernom sudu. Od tog rastvora napravljen je test rastvor prenošenjem 0,6 mL osnovnog rastvora u odmerni sud od 10 mL i dopunjavanjem mobilnom fazom do oznake, tako da je koncentracija dobijenog rastvora 600 ppm.

### 3.4.1.6. Hromatografski uslovi

Korišćena kolona je termostatirana na temperaturi  $25^\circ\text{C}$ , pri protoku 1 mL/min. Injektovana je zapremina od 20  $\mu\text{L}$ , a detekcija je vršena na 254 nm. Svaki test rastvor je injektovan u duplikatu da bi se preciznije odredilo retenciono vreme analizirane supstance.

### 3.4.1.7. Izračunavanje $^w pK_a$ vrednosti

Konstruisan je grafik na kome je x osa niz  $^s pH$  vrednosti mobilne faze, a y osa je niz odgovarajućih retencionih vremena za analiziranu supstancu. Iz jednačine sigmoidne krive dobijene su  $^s pK_a$  vrednosti. Iz jednačine 1 izračunate su  $^s pK_a$  vrednosti, a iz jednačine 2  $^w pK_a$  vrednosti.

$$^s pK_a = ^w pK_a - \delta \quad \text{jednačina 1}$$

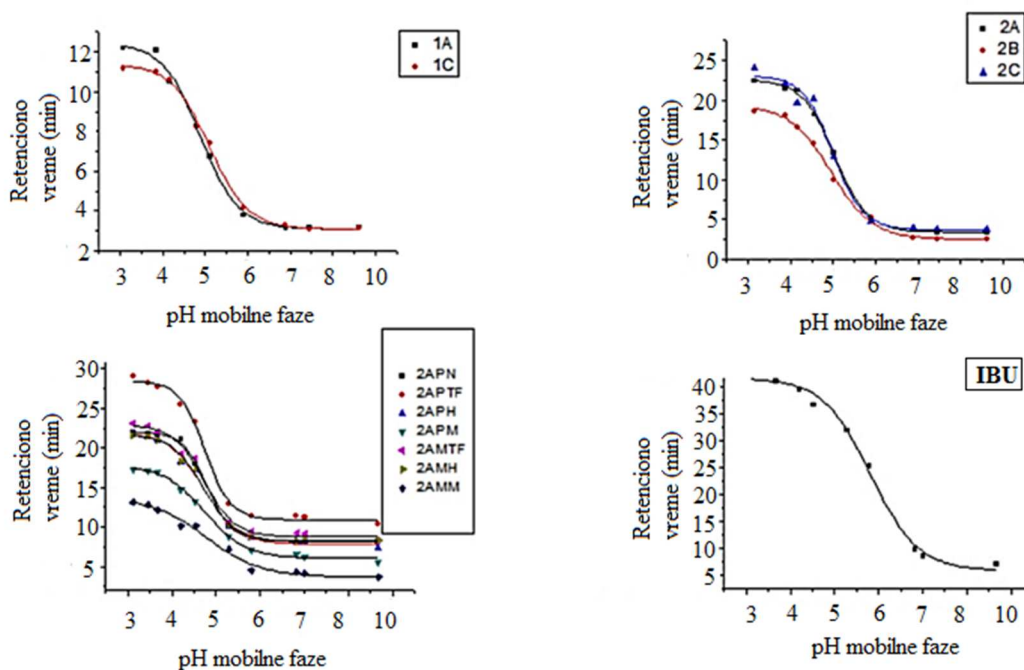
$$^w pK_a = \frac{^s pK_a - b}{a} \quad \text{jednačina 2}$$

$$\delta = 0,1756; \quad a = 1,364; \quad b = 0,18$$



### 3.4.1.8. Rezultati određivanja i predviđanja $pK_a$ vrednosti $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina

Na Slici 13 je dat grafički prikaz varijacija retencionih vremena u zavisnosti od  $^s_w pH$  mobilne faze.



**Slika 13.** Varijacija retencionih vremena u zavisnosti od  $^s_w pH$  mobilne faze

U Tabeli 8 su prikazani rezultati maksimalnog i minimalnog retencionog vremena u hromatografskom sistemu za svako jedinjenje. Prikazane su izračunate  $^w_p K_a$  vrednosti, kao i predviđene vrednosti uz pomoć programa MarvinSketch i ACD/I-Labs.

**Tabela 8.** Izračunate i predviđene  $w_pKa$  vrednosti za ispitivana jedinjenja

Jedinjenje	$t_{R(HA)}$ (min)	$t_{R(A)}$ (min)	$s_pH$	$s_pKa$	$w_pKa$	$w_pKa$ MarvinSketch	$w_pKa$ ACD/I-Labs
1A	12,17	3,18	4,90	4,73	3,60	4,53	4,4±0,4
1C	11,17	3,15	5,10	4,93	3,74	4,54	4,4±0,4
2A	22,44	3,33	5,04	4,87	3,70	4,73	4,1±0,4
2B	18,62	2,53	4,96	4,79	3,64	4,73	4,1±0,4
2C	24,01	3,79	5,00	4,83	3,67	4,72	4,1±0,4
2APN	22,02	8,12	4,80	4,63	3,52	3,53	3,9
2APTF	29,01	10,37	4,75	4,58	3,49	4,17	4,0±0,5
2APH	21,76	7,40	4,72	4,54	3,46	4,08	3,9±0,5
2APM	17,28	5,64	4,74	4,56	3,48	4,52	4,1±0,5
2AMTF	23,06	8,20	4,73	4,55	3,47	4,17	4,0±0,5
2AMH	21,60	8,26	4,72	4,54	3,46	4,08	3,9±0,5
2AMM	13,15	3,69	4,64	4,46	3,40	4,52	4,1±0,5
Ibuprofen	42,06	7,02	5,82	5,65	4,27	4,85	4,41±0,10

U Tabeli 8  $t_{R(HA)}$  predstavlja maksimalno retenciono vreme koje je dobijeno za kiselinu u molekulskom obliku, tj. za mobilnu fazu koja je sadržala 0,01 M  $H_3PO_4$ , a  $t_{R(A)}$  predstavlja minimalno retenciono vreme dobijeno za kiselinu u jonskom obliku, tj. za mobilnu fazu koja je sadržala 0,005 M  $KH_2PO_4$  + 0,005 M  $Na_2HPO_4$ .

Korelacija koja je dobijena između eksperimentalnih rezultata i predviđenih rezultata programom MarvinSketch je nezadovoljavajuća i iznosi 0,3126.

### **3.4.2. Određivanje particionog koeficijenta (logP) $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina**

#### **3.4.2.1. Računarski programi**

- ALOGPS2.1 (<http://www.vcclab.org>)
- Molinspiration (Molinspiration Cheminformatics, <http://www.molinspiration.com>, 2017)
- MarvinSketch 5.11.5 (ChemAxon, <http://www.chemaxon.com>, 2014)
- KOWWIN (Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov>, 2010)

#### **3.4.2.2. Reagensi i hemikalije**

- Dinatrijum-hidrogenfosfat, anhidrovani, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- *n*-oktanol, p.a. (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Deventer, Holandija)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)
- Aspirin (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD)
- Ibuprofen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)

- Fenantren (AcrosOrganics, Geel, Belgija)
- Ketoprofen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- Naproksen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- Natrijum-nitrat (AcrosOrganics, Geel, Belgija)

### 3.4.2.3. Oprema

- pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- HPLC uređaj, Agilent Technologies 1200 Series systems (Santa Clara, CA, SAD) opremljen binarnom pumpom, 20  $\mu$ L manuelnim injektorom, UV detektorom i programom ChemStation
- Vibraciona mešalica Kinetor-m (Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija)
- Analitička vaga Adventurer<sup>TM</sup> – Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Analitička vaga METTLER (Ciri, Švajcarska)
- Kolona: ZORBAX Eclipse XDB C18 (4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu$ m)

### 3.4.2.4. Priprema rastvora

Odmeri se po 5 mg svakog derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanske kiseline kao i aspirina, ibuprofena, ketoprofena, naproksena, fenantrena i natrijum-nitrata, prenese u penicilinsku bočicu i rastvori u 10 mL mobilne faze.

### 3.4.2.5. Priprema mobilne faze

Korišćena je eksperimentalna procedura opisana u radu autora Benhaim i Grushka.<sup>155</sup>

**Priprema pufera.** Odmeri se 2,84 g dinatrijum-hidrogenfosfata, prenese u odmerni sud od 1 L, rastvori u vodi i dopuni do oznake. pH pufera se podesi na 3 uz pomoć ortofosforne kiseline. Pufer se zatim zasiti *n*-oktanolom tako što se u 1 L pufera doda 10 mL oktanela. Ta smeša se mučka na vibracionoj mešalici tokom jednog sata.<sup>195</sup>

**Priprema metanola.** U metanol se doda 0,25 % *n*-oktanela.

**Priprema mobilne faze.** Pripremaju se četiri mobilne faze sa različitim udelom metanola:

- I mobilna faza: 40 % metanola
- II mobilna faza: 45 % metanola
- III mobilna faza: 50 % metanola
- IV mobilna faza: 55 % metanola.

#### 3.4.2.6. Hromatografski uslovi

Korišćena kolona je termostatorana na temperaturi od 40 °C pri protoku 1 mL/min. Injektovana zapremina uzorka je 20 µL. Talasna dužina detekcije je iznosila 254 nm.

#### 3.4.2.7. Tok eksperimenta i izračunavanja

Svi pripremljeni rastvori ispitivanih jedinjenja, uključujući i rastvor NaNO<sub>3</sub> se analiziraju koristeći svaku od pripremljenih mobilnih faza. Rastvor jedinjenja NaNO<sub>3</sub> služi kako bi se očitao vreme  $t_0$  jer se NaNO<sub>3</sub> ne zadržava na koloni već samo prolazi kroz hromatografski sistem. Očitava se retenciono vreme ispitivanog jedinjenja za svaku mobilnu fazu i izračunava se  $\log k$  prema jednačini 3.

$$\text{Log}k = (t_r - t_0)/t_0$$

jednačina 3

$t_r$  - retenciono vreme ispitivanog jedinjenja

$t_0$  - retenciono vreme  $\text{NaNO}_3$

Konstruiše se grafik zavisnosti  $\log k$  od udela metanola u mobilnoj fazi za svako jedinjenje. Odsečak na y osi predstavlja vrednost  $\log K_w$  za dato jedinjenje.

Konstruiše se grafik zavisnosti  $\log P$  za poznata jedinjenja (aspirin, ibuprofen, ketoprofen, naproksen, fenantren) od eksperimentalno dobijenih  $\log K_w$  vrednosti za ta ista jedinjenja. Interpolacijom  $\log K_w$  sa grafika se očitavaju vrednosti  $\log P$  za ispitivana jedinjenja.

#### **3.4.2.8. Rezultati određivanja i predviđanja $\log P$**

U Tabeli 9 su prikazane srednje vrednosti retencionih vremena za sva ispitivana jedinjenja uključujući i aspirin, ibuprofen, ketoprofen, naproksen, fenantren i  $\text{NaNO}_3$ .

Jednačine prave, kao i očitane vrednosti  $\log K_w$  i vrednosti  $\log P$  za sintetisana jedinjenja koje su dobijene ekstrapolacijom su prikazane u Tabeli 10.

**Tabela 9.** Srednja vrednost retencionih vremena ispitivanih jedinjenja u svakoj mobilnoj fazi

Jedinjenje	Srednja vrednost retencionog vremena (min)			
	MF 1	MF 2	MF 3	MF 4
NaNO <sub>3</sub>	0,340	0,330	0,355	0,320
ASPIRIN	0,615	0,532	0,465	0,422
IBUPROFEN	15,225	10,287	5,779	4,037
NAPROKSEN	3,114	2,326	1,551	1,229
FENANTREN	44,132	27,548	13,627	8,435
KETOPROFEN	2,364	1,820	1,265	1,009
1A	3,347	2,474	1,755	1,216
1Ba*	4,996	3,598	2,473	1,616
1Bb*	7,073	4,940	3,259	1,825
1C	11,496	7,824	4,983	3,000
2A	3,382	2,466	1,739	1,216
2B	3,416	2,574	1,776	1,252
2C	7,561	5,352	3,402	2,145
2APN	4,931	3,597	2,338	1,543
2APTF	7,881	5,444	3,315	1,995
2APH	4,939	3,576	2,108	1,570
2APM	3,356	2,557	1,655	1,289
2AMTF	6,211	4,369	2,648	1,663
2AMH	4,939	3,593	2,299	1,544
2AMM	3,016	2,318	1,519	1,181

\*oznake a i b se odnose na pojedinačne diastereoizomere jedinjenja 1B

Dobijena regresiona jednačina na osnovu koje su očitane ekstrapolisane logP vrednosti sintetisanih kiselina glasi:  $y = 0,6736 x + 1,7294$ .

**Tabela 10.** Jednačine prave, vrednosti  $\log K_w$  i  $\log P$  za analizirana jedinjenja

Jedinjenje	Jednačina prave	$\log K_w$	$\log P$
ASPIRIN	$y = -2,996x + 1,0961$	1,0961	-
IBUPROFEN	$y = -4,0406x + 3,2622$	3,2622	-
NAPROKSEN	$y = -3,256x + 2,2156$	2,2156	-
FENANTREN	$y = -4,916x + 4,0861$	4,0861	-
KETOPROFEN	$y = -3,136x + 2,0331$	2,0331	-
1A	$y = -3,426x + 2,3286$	2,3286	3,304
1Ba*	$y = -3,614x + 2,5959$	2,5959	3,478
1Bb*	$y = -4,208x + 3,0058$	3,0058	3,754
1C	$y = -4,032x + 3,1432$	3,1432	3,847
2A	$y = -3,462x + 2,1757$	2,1757	3,105
2B	$y = -3,046x + 2,3321$	2,3321	3,300
2C	$y = -3,916x + 2,9101$	2,9101	3,690
2APN	$y = -3,778x + 2,6588$	2,6588	2,901
2APTF	$y = -4,152x + 3,0342$	3,0342	3,773
2APH	$y = -3,832x + 2,6727$	2,6727	3,530
2APM	$y = -3,326x + 2,2856$	2,2856	3,269
2AMTF	$y = -4,232x + 2,9502$	2,9502	3,718
2AMH	$y = -3,8x + 2,667$	2,667	3,526
2AMM	$y = -3,318x + 2,2318$	2,2318	3,233

\*oznake a i b se odnose na pojedinačne diastereoizomere jedinjenja 1B



U Tabeli 11 su dati rezultati predviđanja logP vrednosti za sintetisana jedinjenja i ibuprofen pomoću navedenih programa.

**Tabela 11.** Rezultati kompjuterskog previđanja logP

Jedinjenje	ALOGPS 2.1.	miLogP Molinspiration	MarvinSketch	KOWWIN
1A	2,91	3,02	2,86	2,96
1B	3,28	3,50	3,34	3,38
1C	3,71	3,91	3,78	3,84
2A	2,36	1,82	3,48	2,42
2B	2,75	2,30	3,97	2,84
2C	3,06	2,71	4,41	3,29
2APN	2,18	1,78	3,44	2,24
2APTF	3,04	2,72	4,35	3,38
2APH	2,94	2,50	4,14	3,06
2APM	2,60	2,27	4,05	2,96
2AMTF	3,02	2,69	4,35	3,38
2AMH	2,93	2,48	4,14	3,06
2AMM	2,59	2,25	4,05	2,96
Ibuprofen	3,50	3,46	3,74	3,79

Najbolja korelacija između eksperimentalno određenih i predviđenih logP vrednosti je dobijena predviđanjem logP vrednosti u računarskom programu KOWWIN ( $R^2 = 0,8864$ ).

### **3.4.3. Predviđanje gastrointestinalne apsorpcije primenom PAMPA testa i izvođenje QSPR studija**

#### **3.4.3.1. Računarski programi**

- Chromeleon 7 software (Thermo Fisher Scientific, Germering, Nemačka)
- Chem3D Ultra 9.0.1 program (CambridgeSoft Corporation, 2005)
- Dragon software (Talete srl, 2010)
- MarvinSketch 5.11.5 (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>)
- STATISTICA software (StatSoft Inc., 2004)
- SIMCA P+ 12.0 program (Umetrics AB, 2008)

#### **3.4.3.2. Reagensi i hemikalije**

- Ibuprofen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- Dodekan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka)
- Lecitin jajeta, 60% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- *Orto*fosforna kiselina, 85% (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Acetonitril Chromasolv, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)

### 3.4.3.3. Oprema

- Analitička vaga Adventurer<sup>TM</sup> – Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- Vibraciona mešalica Kinetor-m (Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija)
- Dionex Ultimate 3000 sistem opremljen Dionex Ultimate 3000 kvaternarnom pumpom, autosemplerom i DAD detektorom (Thermo Fisher Scientific, Germering, Nemačka)
- Mikrofiltracione ploče, Multiscreen PVDF IP Filter Plate 0,45 µm (Merck Millipore, Carrigtwohill, Irska)
- Mikrofiltracione ploče, MultiScreen Transport Receiver Plate (Merck Millipore, Billerica, MA, SAD)
- Varijabilna automatska pipeta Labopette 100-1000 µL (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Nemačka)
- Varijabilna automatska pipeta Labopette 2-20 µL (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Nemačka)

### 3.4.3.4. Hromatografska kolona

- Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)

### 3.4.3.5. Priprema rastvora

**Rastvor fosfatnog pufera pH 5,5 (20 mmol/L).** Odmeri se 1 g dinatrijum-hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) prenese u odmerni sud od 1 L, i rastvori u 800 mL vode. pH

vrednost se podesi na 5,5 uz pomoć *orto*fosforne kiseline i sud dopuni vodom do oznake.

**Rastvor DMSO (5%) u fosfatnom puferu pH 5,5.** 2,5 mL DMSO se prenese u odmerni sud od 250 mL, rastvori u fosfatnom puferu pH 5,5 i dopuni istim puferom do oznake.

**Rastvori  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina (100 mmol/L).** Odmeri se masa koja odgovara 2,5 mmol ispitivanog jedinjenja, prenese u odmerni sud od 25 mL i rastvori u 1,25 mL DMSO. Nakon rastvaranja, odmerni sud se dopuni do oznake rastvorom fosfatnog pufera pH 5,5.

**Rastvor membrane u *n*-dodekanu (1% v/v).** Odmeri se 500 mg lecitina jajeta i prenese u odmerni sud od 10 mL, rastvori u *n*-dodekanu i dopuni istim rastvaračem do oznake.

#### 3.4.3.6. Izvođenje PAMPA testa

Za ispitivanje permeabilnosti sintetisanih jedinjenja korišćene su hidrofobne MultiScreen™ PVDF mikrofiltracione ploče sa 96 odeljaka i dijametrom pora od 0,45  $\mu$ m. Ploče služe istovremeno kao nosač za veštačku membranu i kao akceptorska ploča. Svaki odeljak akceptorske ploče se impregnira sa 5  $\mu$ L rastvora lecitina jajeta u *n*-dodekanu i ostavi 2 h na sobnoj temperaturi da rastvarač potpuno ispari. Na taj način se formira veštačka membrana. U svaki odeljak donorske ploče MultiScreen Transport Receiver Plate prenese se po 300  $\mu$ L rastvora ispitivanih jedinjenja i poklopi akceptorskom pločom. U odgovarajuće odeljke akceptorske ploče se prenese 300  $\mu$ L 5% fosfatnog pufera pH 5,5. Svaka supstanca se ispituje u triplikatu pri izo-pH uslovima. Akceptorska ploča se prekrije parafilmom i odgovarajućim poklopcem kako bi se sprečilo isparavanje rastvarača i ceo sistem se postavi na vibracionu mešalicu. Posle 17 h inkubacije na sobnoj temperaturi, ploče se rastavljaju, a primenom HPLC metode se određuje koncentracija ispitivanih jedinjenja u polaznim rastvorima, donorskim i akceptorskim odeljcima.

### 3.4.3.7. Hromatografski uslovi

**Mobilna faza:** acetonitril i 20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufer pH 3 (60:40 v/v).

**Temperatura kolone:** 25 °C

**Protok mobilne faze:** 1 mL/min.

**Talasna dužina detekcije:** 210 nm.

### 3.4.3.8. Izračunavanje PAMPA parametara

Nakon određivanja koncentracija ispitivanih jedinjenja u donorskom i akceptorskom odeljku, izračunati su procenat transporta (%T) i prividni koeficijenti permeabilnosti ( $P_{app}$ ), iz jednačina 4 i 5.<sup>163, 211</sup>

$$\%T = 100 \cdot \frac{A_R \cdot V_R}{A_{D0} \cdot V_D} \quad \text{jednačina 4}$$

$$P_{app} = \frac{V_D \cdot V_R}{(V_D + V_R) \cdot S \cdot t} \cdot \ln \left[ \frac{100 \cdot V_D}{100 \cdot V_D - \%T \cdot (V_D + V_R)} \right] \quad \text{jednačina 5}$$

$A_R$  - površina pika na hromatogramu u akceptorskom odeljku

$A_{D0}$  - površina pika na hromatogramu u donorskom rastvoru (pre inkubacije)

$V_A$  - zapremina rastvora u akceptorskim odeljcima (mL)

$V_D$  - zapremina rastvora u donorskim odeljcima (mL)

t - vreme inkubacije (17 h)

S - površina veštačke membrane (0,28 cm<sup>2</sup>, prema proizvođaču).

Izračunate su i vrednosti  $-\log P_{app}$  koje su dalje korišćene u QSPR studijama.

### 3.4.3.9. Rezultati PAMPA testa

U Tabeli 12 su prikazane dobijene vrednosti %T,  $P_{app}$ , i  $-\log P_{app}$  za sintetisana jedinjenja u PAMPA testu.

**Tabela 12.** Rezultati PAMPA testa za ispitivana jedinjenja i ibuprofen

Jedinjenje	%T	$P_{app} (\cdot 10^{-6})$	$-\log P_{app}$
Ibuprofen	45,37±0,77	20,92±1,53	4,68±0,03
1A	4,47±0,11	0,82±0,02	6,09±0,01
1B	18,18±0,90	3,96±0,25	5,40±0,03
1C	30,74±0,95	8,36±0,44	5,08±0,02
2A	1,55±0,21	0,28±0,04	6,55±0,06
2B	0,59±0,02	0,10±0,00	7,00±0,01
2C	16,86±0,18	3,60±0,05	5,44±0,01
2APN	0,99±0,06	0,18±0,01	6,74±0,03
2APTF	8,66±0,50	1,60±0,11	5,80±0,03
2APH	5,06±0,18	0,93±0,04	6,03±0,02
2APM	3,67±0,15	0,67±0,03	6,18±0,02
2AMTF	7,13±0,69	1,35±0,14	5,87±0,04
2AMH	5,88±0,07	1,09±0,01	5,96±0,01
2AMM	3,91±0,15	0,71±0,03	6,15±0,02

### 3.4.3.10. Izračunavanje molekulskih deskriptora, formiranje QSPR modela i statistička analiza

Energije ispitivanih jedinjenja su minimizovane primenom Gaussian semi-empirijske/PM3 metode u Chem3D Ultra 9.0.1 programu.<sup>212</sup> Optimizacija je uvek rezultirala selekcijom S enantiomera kao najstabilnije konfiguracije za jedinjenja sa hiralnim ugljenikovim atomom. Za jedinjenje 1B koje sadrži dva hiralna ugljenika, najstabilnija konfiguracija na oba hiralna ugljenikova atoma je bila S. Geometrijski, termodinamički, fizičko-hemijski i elektronski molekularni deskriptori optimizovanih struktura su izračunati u programima: MarvinSketch 5.11.5 (Tabela 13), Chem3D Ultra 9.0.1 (Tabela 14) i Dragon (Tabela 15).

**Tabela 13.** Neki od molekulskih deskriptora računatih u programu MarvinSketch 5.11.5

Priroda deskriptora	Naziv deskriptora
topološka	<i>Platt index, Randic index, Harary index, Hyper Wiener index, Szeged index, Wiener index, Wiener polarity</i>
geometrijska	<i>Dreiding energy, Minimal projection area, Maximal projection area, Minimal projection radius, Maximal projection radius, Polar surface area, Molecular surface area</i>

**Tabela 14.** Neki od molekulskih deskriptora računatih u programu Chem3D Ultra 9.0.1

Priroda deskriptora	Naziv deskriptora
elektronska	<i>Dipol, Charge at C1 atom, Charge at C2 atom, Electronic density at C1 atom, Electronic density at C2 atom, Highest occupied molecular orbital (HOMO) energy, Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energy, Electronic energy</i>
termodinamička	<i>Molar refractivity, Partition coefficient, Bend energy, Non-1,4-VDW energy, Stretch energy, Stretch bend energy, Torsion energy, Total energy, VDW 1,4 energy</i>
sterna	<i>Total connectivity, Total valence connectivity, Wiener index, Ovality, Balaban index, Cluster count, Shape attribute, Shape coefficient, Sum of degrees, Sum of valence degrees, Molecular weight, Diameter, Radius, Molecular topological index, Steric energy summary</i>

**Tabela 15.** Neki od molekulskih deskriptora izračunatih u programu Dragon

Vrsta deskriptora	Naziv deskriptora
Konstitutivni deskriptori	<i>Molecular weight, average molecular weight, sum of atomic van der Waals volumes, number of atoms, number of non-H atoms, number of bonds, number of non-H bonds, number of sp<sup>3</sup> hybridized carbon atoms...</i>
Deskriptori prstena	<i>Number of rings, number of circuits, ring fusion density, number of ring systems, number of 3-membered rings, number of 4-membered rings...</i>
Topološki indeksi	<i>Vertex degree-based indices, Distance-based indices, MTI indices, Path/walk indices, E-state indices, Centric indices</i>
<i>Walk and path counts</i>	<i>Walk counts, Self-returning walk counts, Path counts, Multiple path counts, ID numbers</i>
<i>Connectivity indices</i>	<i>Kier-Hall molecular connectivity indices, Solvation connectivity indices, Randic-like connectivity indices</i>
Deskriptori bazirani na 2D matriksu	<i>Adjacency matrix, Topological distance matrix, Laplace matrix, Chi matrix, Reciprocal squared distance matrix, Detour matrix, Distance/detour matrix, Barysz matrices, Burden matrices</i>
2D autokorelacije	<i>Broto-Moreau autocorrelations, Centred Broto-Moreau autocorrelations, Moran autocorrelations, Geary autocorrelations, Topological charge autocorrelations</i>
<i>P_VSA-like deskriptori</i>	<i>LogP, Molar Refractivity, Mass, Van der Waals volume, Sanderson electronegativity, Polarizability, Ionization Potential, Intrinsic State</i>
Geometrijski deskriptori	<i>Size indices, Shape indices, Delocalization-degree indices, COMMA descriptors</i>
Deskriptori bazirani na 3D matriksu	<i>Geometrical distance matrix, Reciprocal squared geometrical distance matrix, Distance/distance matrix</i>
<i>3D-MoRSE deskriptori</i>	<i>Unweighted, Weighted by mass, Weighted by van der Waals volume, Weighted by Sanderson electronegativity, Weighted by polarizability, Weighted by ionization potential, Weighted by I-state</i>
<i>GETAWAY deskriptori</i>	<i>H-indices, R-indices</i>

Ostale vrste: *Deskriptori naelektrisanja, Randic molecular profiles, Functional group counts, Atom-type E-state indices, CATS 2D, 2D Atom Pairs, 3D Atom Pairs, Drug-like indices*



Primenom navedenih softvera, izračunato je više od 4500 molekulskih deskriptora. Računarski program Dragon 6 može da izračuna čak 4885 deskriptora. Nakon izračunavanja molekulskih deskriptora ispitana je njihova interkorelacija. Ispitani su parovi molekulskih deskriptora sa interkorelacijom većom od 0,99 (za PLS analizu) ili većom od 0,90 (za ANN i MLR analizu). Deskriptori koji imaju veći uticaj na zavisne varijable (%T i  $-\log P_{app}$ ) su zadržani. Nakon ispitivanja interkorelacije, za formiranje MLR( $-\log P_{app}$ ), ANN( $-\log P_{app}$ ), MLR(%T) i ANN(%T) modela korišćeno je 254 molekulskih deskriptora, a za formiranje PLS( $-\log P_{app}$ ) i PLS(%T) modela korišćeno je 654 molekulskih deskriptora.

#### 3.4.3.11. MLR-QSPR, PLS-QSPR i ANN-QSPR studije

Za formiranje MLR i ANN modela je korišćen računarski program STATISTICA sa *neural network* modulom. Za formiranje PLS modela je korišćen SIMCA P+ 12.0 program (*The Soft Independent Modeling of Class Analogy*), a nezavisne varijable za formiranje PLS modela su birane na osnovu VIP (*Variable Importance in the Projection*) parametra.<sup>192, 213</sup>

Prilikom formiranja QSPR modela korišćeni su isti trening, verifikacioni i test setovi ispitivanih jedinjenja kako bi bilo moguće međusobno poređenje korišćenih metodologija.<sup>214</sup> Test set korišćen za formiranje MLR(%T) i PLS(%T) modela sastojao se od 5 jedinjenja (1C, 2AMH, 2APH, 2B i 2C), dok su ostala jedinjenja korišćena kao trening set. Za formiranje ANN(%T) modela, jedinjenja korišćena kao test set za formiranje MLR(%T) i PLS(%T) modela su podeljena u dve grupe: verifikacioni set (2APH, 2B i 2C – 3 jedinjenja) i test set (1C i 2AMH – 2 jedinjenja). Za formiranje MLR( $-\log P_{app}$ ) i PLS( $-\log P_{app}$ ) modela, test set se sastojao od 5 jedinjenja (1C, 2A, 2AMH, 2AMM i 2C), dok su ostala jedinjenja odabrana za trening set. Za formiranje ANN( $-\log P_{app}$ ) modela, jedinjenja korišćena kao test set za formiranje MLR( $-\log P_{app}$ ) i PLS( $-\log P_{app}$ ) modela su podeljena u dve grupe: verifikacioni set (1C, 2A i 2AMH) i test set (2AMM i 2C). Test i verifikacioni setovi su formirani tako da su %T i  $-\log P_{app}$  vrednosti ovih jedinjenja homogeno distribuirani u celokupnom opsegu vrednosti ovih zavisnih varijabli.<sup>214</sup>

Višeslojni perceptron (eng. *Multilayer perceptrons*, MLP)<sup>194</sup> baziran na propagaciji unazad i sa konjugovanim gradijentnim spustom trening algoritama je korišćen za formiranje ANN-QSPR(%T) i ANN-QSPR(-logP<sub>app</sub>) modela. Prvi korak je pravilan odabir nezavisnih varijabli. U tu svrhu je korišćena postupna multilinearna regresiona analiza (MLR).<sup>168,178,189</sup> Nezavisne varijable se jedna po jedna dodaju u model i procenjuju pri svakom koraku da bi se konačno zadržale ili odbacile na osnovu specifičnog kriterijuma koji je i za ANN(%T) i za ANN (-logP<sub>app</sub>) bio isti:

$$F \text{ to enter} = 10$$

$$F \text{ to remove} = 1.$$

Korišćenjem postupne MLR i navedenih kriterijuma formirani su setovi:

- od 3 nezavisne varijable za ANN(%T): nCsp3, DISPv i VE1\_RG
- od 2 nezavisne varijable za ANN(-logP<sub>app</sub>): nCsp3 i Mor14m.

Nakon toga je formirana mreža od tri sloja. Čvorovi su predstavljeni izabranim nezavisnim varijablama. Prvi sloj je ulazni, drugi sloj je skriveni sloj koji sadrži optimalni broj čvorova, a treći sloj je izlazni sloj sa jednim čvorom koji je predstavljen jednom zavisnom varijablom: %T ili -logP<sub>app</sub>.

U inicijalnim treninzima mreže za svaki set molekulskih deskriptora (odabranih postupnom MLR metodom) određen je optimalan broj čvorova u skrivenom sloju kao i *momentum* i *learning rate* za ANN-QSPR modele. Procenjene su greške predviđanja za trening, verifikacioni i test set. Na ovaj način su formirani modeli sa 3 deskriptora za (ANN-QSPR(%T)) i sa 2 deskriptora za ANN-QSPR(-logP<sub>app</sub>). Konačna struktura modela se određuje prema odnosu broja čvorova u prvom (ulaznom), drugom (skrivenom) i trećem (izlaznom) sloju. ANN modeli formirani u ovoj studiji imaju sledeće strukture: 3 – 4 – 1 (ANN-QSPR(%T)) i 2 – 3 – 1 (ANN-QSPR(-logP<sub>app</sub>)).

Postupna MLR je primenjena kako bi se ispitala linearna povezanost izračunatih molekulskih parametara sa % T i -logP<sub>app</sub> vrednostima ispitivanih jedinjenja. Setovi od 3 nezavisne varijable koji formiraju ANN-QSPR(%T) i dve nezavisne varijable koji

formiraju ANN-QSPR( $-\log P_{app}$ ) modele su korišćeni za formiranje MLR-QSPR modela.

MLR je korišćena da bi se procenila linearna zavisnost između izračunatih molekulskih deskriptora i %T i  $-\log P_{app}$ . Za MLR modelovanje su korišćeni setovi od 3 nezavisne varijable za ANN(%T) i 2 nezavisne varijable za ANN( $-\log P_{app}$ ). Primenom standardne MLR metode sve tri nezavisne varijable: nCsp3, DISPv i VE1\_RG su uključene u konačni MLR(%T) model, a obe nezavisne varijable: nCsp3 i Mor14m su uključene u konačni MLR( $-\log P_{app}$ ) model.

PLS-QSPR modeli su formirani postepenim uklanjanjem nezavisnih varijabli na osnovu vrednosti njihovih VIP parametara. Tako se X varijable kod kojih je  $VIP > 1$  smatraju najznačajnijim, one kod kojih je  $0,5 < VIP < 1$  umereno značajnim i one kod kojih je  $VIP < 0,5$  beznačajnim za formiranje modela.<sup>193,213</sup> U svakom koraku PLS modelovanja, X varijable sa najnižim VIP vrednostima su uspešno uklanjane iz PLS modela i svaki put je kreiran novi PLS model. Procedura je ponavljana dok se nije dobio model sa zadovoljavajućim vrednostima statističkih parametara  $R^2$ ,  $Q^2$ , F-odnosa, p-vrednosti i RMSEE.

Test permutacije zavisne varijable (*The response permutation test, Y scrambling*)<sup>193, 214</sup> je upotrebljen da se ispita statistički značaj  $R^2$  i  $Q^2$  i *overfitting* zbog slučajne korelacije. U testu permutacije zavisne varijable, Y matriks je nasumično preraspoređivan 100 puta, dok X matriks nije menjan. Model je fitovan prema novim Y podacima i novi  $R^2$ ,  $Q^2$  i VIP parametri su izračunati. Linije su umetane između  $R^2$  i  $Q^2$  vrednosti kako bi se dobila dva nezavisna odsečka. Za validan model, potrebno je da budu ispunjeni sledeći uslovi:  $R^2$  odsečak  $< 0,4$  i  $Q^2$  odsečak  $< 0,05$ .<sup>193</sup>

Kvalitet odabranih QSPR modela je procenjen izračunavanjem odgovarajućih statističkih parametara (videti poglavlje 1.6.9.). RMSE i RMSEP predstavljaju greške formiranog modela. RMSEE se izračunava za trening set, a RMSEP se računa za test set i verifikacioni set (kod ANN modela) ili test set (kod MLR i PLS modela).

$Q^2$  je interni validacioni parametar i primenjuje se kao kriterijum robusnosti i prediktivne moći formiranog modela. Nekada se može smatrati da je dovoljno da  $Q^2 > 0,5$  da bi formirani model bio pouzdan,<sup>193,214</sup> ali je češće potrebno potvrditi

pouzdanost modela eksternom validacijom koja podrazumeva proveru prediktivne sposobnosti modela na test setu (eksternom setu jedinjenja). Može se reći da je  $Q^2 > 0,5$  neophodan, ali ne i dovoljan uslov da bi se neki model smatrao pouzdanim zbog toga što se ovaj statistički parametar odnosi na procenu sposobnosti predviđanja modela samo za jedinjenja strukturno slična jedinjenjima koja pripadaju trening setu.

Ako postoji značajnija razlika u strukturi, neophodno je primeniti neke druge statističke parametre kako bi se procenila sposobnost predviđanja formiranog modela kao što je eksterni validacioni parametar  $R^2_{pred}$  koji se može izračunati iz jednačine 6.

$$R^2_{pred} = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad \text{jednačina 6}$$

Ako je  $R^2_{pred} > 0,5$  može se očekivati da formirani model ima dobru sposobnost predviđanja.<sup>214,215</sup>

Za izračunavanje  $Q^2$  se primenjuje *leave-one-out* (LOO) ukrštena validacija koja se zasniva na tome da se svako jedinjenje trening seta eliminiše po jednom, a da se od ostalih jedinjenja formira model. Vrednost zavisne varijable eliminisanog jedinjenja se predviđa primenom tako formiranog modela. Procedura se ponavlja dok sva jedinjenja iz trening seta ne budu eliminisana po jednom i vrednosti njihovih zavisnih varijabli predviđene tako formiranim modelima.<sup>215, 216</sup>  $Q^2$  se izračunava iz jednačine 7.

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(training)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad \text{jednačina 7}$$

gde je:

$\bar{Y}_{training}$  - srednja vrednost zavisne varijable za jedinjenja koja formiraju trening set

$Y_{obs(training)}$  - eksperimentalno dobijena vrednost zavisne varijable za jedinjenja iz trening seta.

PRESS (eng. *Predicted Residual Sum of Squares*) se računa za test set prema jednačini 8 i predstavlja sumu kvadrata razlike ( $e_{(i)}$ ) između eksperimentalno određenih i predviđenih vrednosti zavisne varijable jedinjenja iz trening seta:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2$$

jednačina 8

Odabrani model bi trebalo da ima visoku vrednost koeficijenta korelacije  $r$  između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti zavisne varijable jedinjenja test seta. Da bi se procenila statistička značajnost formiranih QSRR ili QSPR modela koristi se statistički parametar F-odnos. Nivo značajnosti F-odnosa je prikazan statističkim parametrom p-odnos. p-odnos pokazuje verovatnoću da model sa dobijenom F vrednošću bude rezultat slučajnosti. Modeli čija je p-vrednost niža od 0,05 se smatraju statistički značajnim.<sup>193</sup>

#### **3.4.3.12. Rezultati formiranih QSPR modela i statistička analiza**

U Tabeli 16 su prikazani formirani QSPR modeli kao i odgovarajući statistički parametri.

**Tabela 16.** QSPR modeli i statistički parametri

Model	Regresiona jednačina/odabrani deskriptori	RMSEE	RMSEP	Q <sup>2</sup>	r	R <sup>2</sup> <sub>pred</sub>	R <sup>2</sup>	F	p
ANN(%T)	%T=f(nCsp3, DISPv, VE1_RG) <sup>a</sup>	1,322	2,943	0,819	0,966	0,931	0,974	-	-
PLS(%T)	%T=f(nCsp3, X4sol, SssCH2) <sup>b</sup>	2,908	7,246	0,946	0,802	0,580	0,952	52,728	0,00016
MLR(%T)	%T = (-49,3513±3,9864) + (9,2050±0,6256)·nCsp3 + (1,9736±0,4427)·DISPv + (6,3559±1,1471)·VE1_RG	0,916	1,716	0,942	0,990	0,976	0,990	209,16	<0,00007
ANN(-logP <sub>app</sub> )	-logP <sub>app</sub> =f(nCsp3, Mor14m) <sup>c</sup>	0,254	0,177	0,375	0,952	0,892	0,867	-	-
PLS(-logP <sub>app</sub> )	-logP <sub>app</sub> =f(RDF035u, Mor13u, Mor13p) <sup>d</sup>	0,102	1,074	0,947	0,372	-2,979	0,975	53,529	0,00015
MLR(-logP <sub>app</sub> )	-logP <sub>app</sub> = (7,4566±0,3052) - (0,4125±0,0907)·nCsp3 + (0,6707±0,2315)·Mor14m	0,248	0,170	0,645	0,952	0,901	0,852	17,308	<0,00322

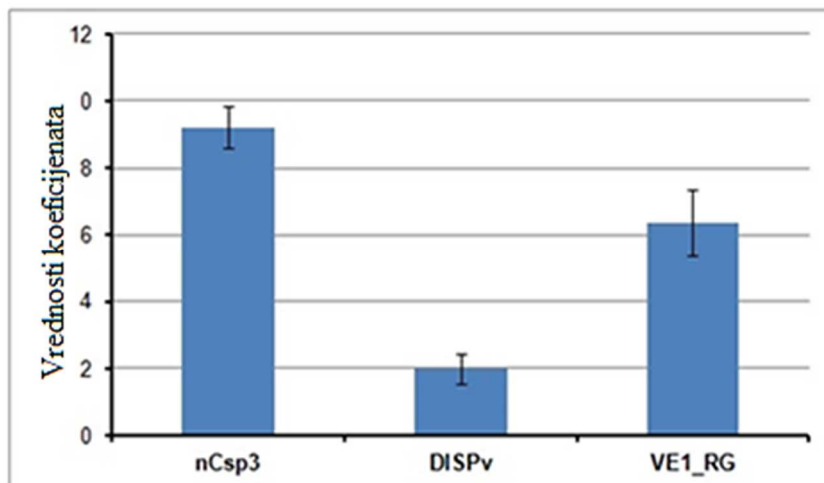
<sup>a</sup> Topologija modela: 3 (prvi sloj) - 4 (drugi sloj) - 1 (treći sloj); nCsp3 - number of sp3 hybridized Carbon atoms; DISPv - displacement value / weighted by van der Waals volume; VE1\_RG - coefficient sum of the last eigenvector from reciprocal squared geometrical matrix;

<sup>b</sup> nCsp3 - number of sp3 hybridized Carbon atoms; X4sol - solvation connectivity index of order 4; SssCH2 - Sum of ssCH2 E-states;

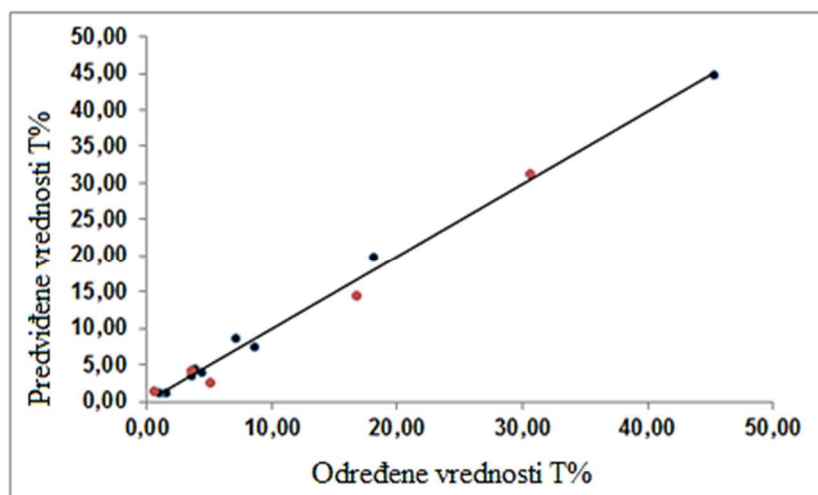
<sup>c</sup> Topologija modela: 2 (prvi sloj) - 3 (drugi sloj) - 1 (treći sloj); nCsp3 - number of sp3 hybridized Carbon atoms; Mor14m - signal 14 / weighted by mass;

<sup>d</sup> RDF035u - Radial Distribution Function - 035 / unweighted; Mor13u - signal 13 / unweighted; Mor13p - signal 13 / weighted by polarizability.

Na Slici 14 je grafički prikazan odabrani MLR(%T) model, a na Slici 15 je prikazana korelacija određenih i predviđenih vrednosti %T.

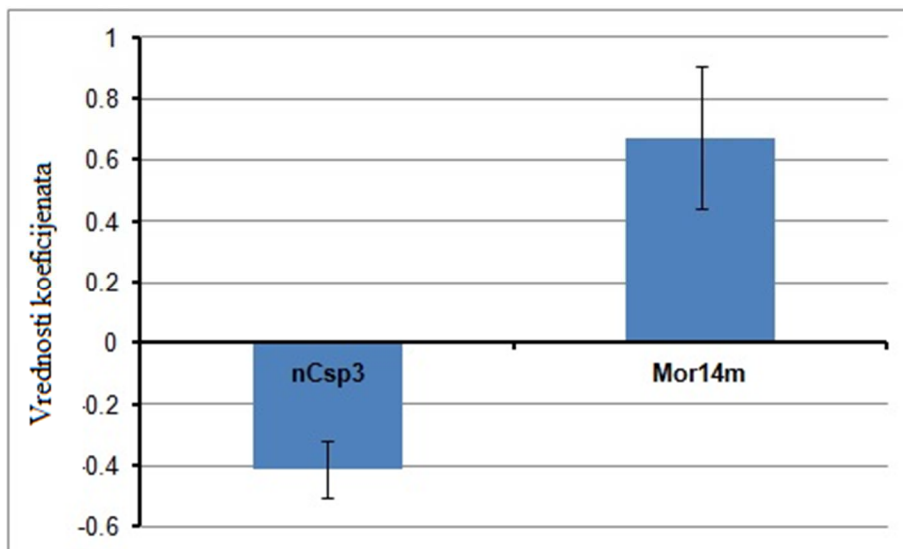


Slika 14. Grafički prikaz MLR(%T) modela

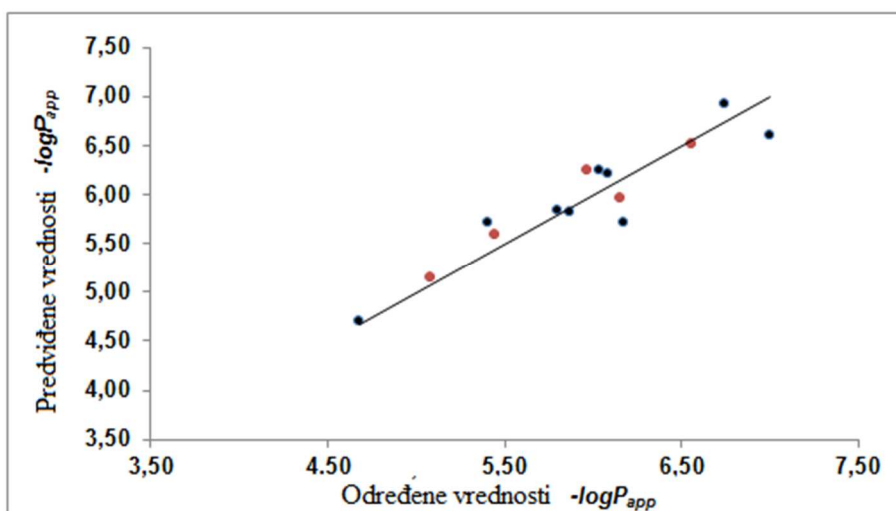


Slika 15. Korelacija između određenih i predviđenih vrednosti %T (crne tačke-trening set; crvene tačke: test set)

Na Slici 16 je grafički prikazan odabrani MLR( $-\log P_{app}$ ) model, a na Slici 17 je prikazana korelacija između određenih i predviđenih vrednosti  $-\log P_{app}$ .



**Slika 16.** Grafički prikaz MLR( $-\log P_{app}$ ) modela



**Slika 17.** Korelacija između određenih i predviđenih vrednosti  $-\log P_{app}$  (crne tačke-  
training set; crvene tačke: test set)

Vrednosti deskriptora koji formiraju odabrane MLR(%T) i MLR( $-\log P_{app}$ ) modele su prikazane u Tabelama 17 i 18.



**Tabela 17.** Vrednosti deskriptora koji formiraju MLR(%T) model

<b>Jedinjenje</b>	<b>%T</b>	<b>nCsp3</b>	<b>DISP<sub>v</sub></b>	<b>VE1_RG</b>
1A	4,47	3	3,856	2,896
1B	18,18	4	5,667	3,436
1C	30,74	5	6,035	3,557
2A	1,55	2	3,127	4,137
2AMH	3,67	2	8,54	2,876
2AMM	3,91	3	3,317	2,839
2AMTF	7,13	3	5,824	2,899
2APH	5,06	2	7,697	2,862
2APM	3,67	3	4,676	2,39
2APN	0,99	2	6,15	2,834
2APTF	8,66	3	5,527	2,838
2B	0,59	3	4,591	2,767
2C	16,86	4	6,403	3,214
Ibuprofen	45,37	6	8,492	3,412

**Tabela 18.** Vrednosti deskriptora koji formiraju MLR( $-\log P_{app}$ ) model

Jedinjenje	$-\log P_{app}$	nCsp3	Mor14m
1A	6,09	3	-0,010
1B	5,40	4	-0,141
1C	5,08	5	-0,370
2A	6,55	2	-0,168
2AMH	5,96	2	-0,572
2AMM	6,15	3	-0,383
2AMTF	5,87	3	-0,579
2APH	6,03	2	-0,576
2APM	6,17	3	-0,737
2APN	6,74	2	0,428
2APTF	5,80	3	-0,574
2B	7,00	3	0,567
2C	5,44	4	-0,318
Ibuprofen	4,68	6	-0,412

### 3.4.4. Procena gastrointestinalne apsorpcije primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i QSRR studije

#### 3.4.4.1. Računarski programi

- Chromeleon 7 software (Thermo Fisher Scientific, Germering, Nemačka)
- Chem3D Ultra 9.0.1 program (CambridgeSoft Corporation, 2005)
- Dragon 6.0 (TALETE srl, 2010)
- MarvinSketch 5.11.5 (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>)
- STATISTICA softver sa *neural network* modulom (StatSoft Inc., 2004)
- SIMCA P+ 12.0 program (Umetrics AB, 2008)

#### 3.4.4.2. Reagensi i hemikalije

- Ibuprofen, 99% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- Brij 35 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Ortofosforna kiselina,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85% (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Kalijum-jodid, p.a. (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Metanol, p.a. (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poljska)
- Acetonitril Chromasolv, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)

### 3.4.4.3. Oprema

- Analitička vaga Adventurer TM – Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- HPLC uređaj: Agilent Technologies 1200 Series systems (Santa Clara, CA, SAD) opremljen binarnom pumpom, 20 µL manuelnim injektorom, UV detektorom i programom ChemStation
- Hromatografska kolona: Zorbax Extend-C18 (4,6 x 150 mm; 5 µm).

### 3.4.4.4. Priprema rastvora

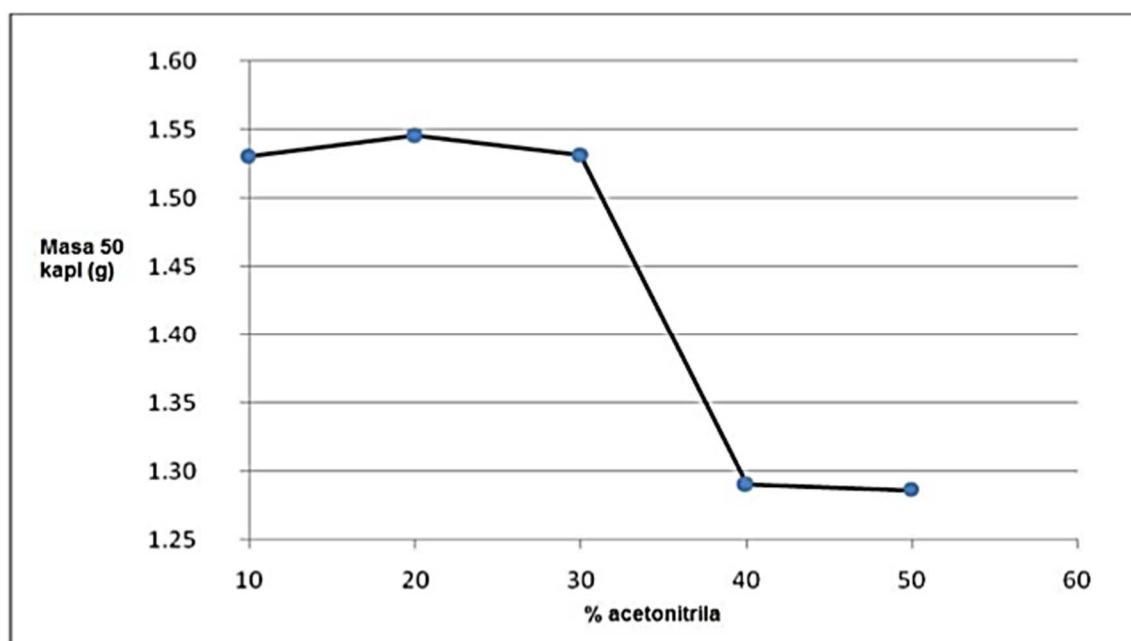
**Rastvor fosfatnog pufera pH 5,5 (20 mmol/L).** Odmeri se 1 g dinatrijum-hidrogenfosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), prenese u odmerni sud od 1 L i rastvori u 800 mL vode. pH se podesi na 5,5 uz pomoć *ortofosforne* kiseline i sud dopuni vodom do oznake.

**Rastvor 0,04 mol/L Brij35 u puferu pH 5,5.** Odmeri se 48 g Brij 35 u 1000 mL pufera pH 5,5 i rastvori uz zagrevanje na magnetnoj mešalici.

**Rastvori sintetisanih jedinjenja, ibuprofena i kalijum-jodida (0,1 mg/mL).** Odmeri se oko 5 mg sintetisanog jedinjenja, ibuprofena ili kalijum-jodida i prenese u penicilinsku bočicu, rastvori u 5 mL metanola i dopuni metanolom do oznake. Razblaži se 1 mL ovog rastvora smešom acetonitrila i rastvora 40 mmol/L Brij 35 u puferu pH 5,5 (50:50 v/v) u odmernom sudu od 10 mL.

### 3.4.4.5. Određivanje optimalnog sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi BMC sistema

Test pomoću koga se može odrediti optimalan sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi BMC sistema se zasniva na merenju mase 50 kapi smeše acetonitrila i rastvora 0,04 mol/L Brij 35 u puferu pH 5,5. Sadržaj acetonitrila je variran od 10 % do 50 %. Nagli pad mase 50 kapi označava razaranje micela i prelazak BMC sistema u jon-par RP-HPLC sistem. U ovom eksperimentu je sadržaj acetonitrila variran od 10 do 30 % jer je već prethodno određeno da u tom opsegu nema oštećenja micela (Slika 18).<sup>178</sup>



**Slika 18.** Određivanje optimalnog odnosa acetonitrila i rastvora Brij 35 u mobilnoj fazi BMC sistema

(izvor slike: Dobričić V., Nikolic K., Vladimirov S., Čudina O. Biopartitioning micellar chromatography as a predictive tool for skin and corneal permeability of newly synthesized 17 $\beta$ -carboxamide steroids. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *56*, 105-112.)

#### 3.4.4.6. Hromatografski uslovi

**Mobilna faza:** acetonitril i 40 mmol/L rastvor Brij 35 u 7 mmol/L puferu pH 5,5 (20:80 v/v)

**Temperatura kolone:** 36,5 °C

**Protok mobilne faze:** 1 mL/min

**Talasna dužina detekcije:** 210 nm.

#### 3.4.4.7. Izvođenje BMC ispitivanja

Rastvori ispitivanih jedinjenja, ibuprofena i kalijum-jodida su injektovani u triplikatu i za svako jedinjenje je izračunata srednja vrednost retencionog faktora  $k$  prema jednačini 9. Kalijum-jodid je supstanca koja prolazi kroz hromatografski sistem bez zadržavanja na koloni tako da njeno retenciono vreme predstavlja tzv. “mrtvo vreme” u datom hromatografskom sistemu.

$$k = \frac{R_t - R_t(0)}{R_t(0)} \quad \text{jednačina 9}$$

gde je:

$R_t$  - retenciono vreme ispitivanog jedinjenja

$R_t(0)$  - retenciono vreme kalijum-jodida.

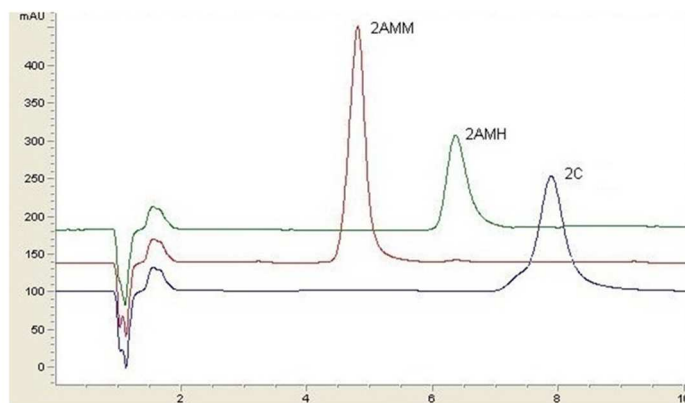
### 3.4.4.8. Rezultati BMC eksperimenata

Retencioni faktori sintetisanih kiselina i ibuprofena su prikazani u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Retencioni faktori ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	$k$ , ( $X \pm SD$ )
Ibuprofen	18,92 $\pm$ 0,13
1A	3,27 $\pm$ 0,01
1B	4,81 $\pm$ 0,00
1C	7,26 $\pm$ 0,01
2A	1,61 $\pm$ 0,01
2B	2,87 $\pm$ 0,01
2C	5,21 $\pm$ 0,00
2APN	0,00 $\pm$ 0,00
2APTF	5,42 $\pm$ 0,01
2APH	4,04 $\pm$ 0,00
2APM	2,98 $\pm$ 0,05
2AMTF	4,98 $\pm$ 0,01
2AMH	4,00 $\pm$ 0,02
2AMM	2,80 $\pm$ 0,04

Primeri hromatograma nekih jedinjenja prikazani su na Slici 19.



**Slika 19.** Primeri hromatograma jedinjenja 2AMM, 2AMH i 2C

### 3.4.4.9. Izračunavanje molekulskih deskriptora i QSRR analiza

Postupak minimizacije energije ispitivanih jedinjenja i izračunavanje molekulskih deskriptora za ANN( $k$ ), PLS( $k$ ) i MLR( $k$ ) studije opisani su u poglavlju 3.4.3.10. Nakon ispitivanja interkorelacije između izračunatih molekulskih deskriptora, 742 molekulska deskriptora je upotrebjeno za formiranje PLS( $k$ ) modela, a 254 za formiranje ANN( $k$ ) i MLR( $k$ ) modela.

### 3.4.4.10. MLR-QSRR, PLS-QSRR i ANN-QSRR studije

MLR i ANN (višeslojni nerekurentni perceptron - *multilayer perceptron feed forward*) modeli su formirani uz pomoć računarskog programa STATISTICA sa *neural network* modulom. PLS modeli su formirani uz pomoć SIMCA P+ 12.0 programa, a nezavisne varijable su birane prema VIP parametru.<sup>193,213</sup> Kvantitativni odnosi strukture i retencije (QSRR) ispitani su u cilju utvrđivanja veze između  $k$  vrednosti izračunatih u BMC sistemu (zavisne varijable) i geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora ispitivanih jedinjenja (nezavisne varijable).

Prilikom formiranja QSRR modela, korišćeni su isti trening, verifikacioni i test setovi ispitivanih jedinjenja tako da je moguće međusobno poređenje različitih metodologija.<sup>214</sup> Za MLR( $k$ ) i PLS( $k$ ) sva ispitivana jedinjenja su podeljena u dve grupe: test set (1A, 1C, 2APN, 2AMM i 2AMTF) i trening set (1B, 2A, 2B, 2C, 2APTF, 2APH, 2APM i 2AMH). Jedinjenja koja su korišćena kao test set u MLR( $k$ ) i u PLS( $k$ ), u ANN( $k$ ) studiji su dodatno podeljena u dve grupe: verifikacioni set (1A, 1C i 2APN) i test set (2AMM i 2AMTF). Verifikacioni i test set su formirani tako da su  $k$  vrednosti homogeno distribuirane u čitavom opsegu.

Višeslojni nerekurentni perceptron sa algoritmom propagacije unazad i gradijentnog spusta je korišćen za ANN modelovanje. Izbor adekvatnih nezavisnih varijabli se može izvršiti na nekoliko načina, kao što je već opisano u poglavlju 1.6.6. U ovoj studiji je odabrana postupna MLR metoda za odabir nezavisnih varijabli na osnovu kriterijuma *F to enter* i *F to remove*. Vrednost *F to enter* podešena je na 25, a *F to remove* na 10. Na taj način su odabrane nezavisne varijable: nBM, P\_VSA\_LogP\_8 i



Eta\_L. Na kraju je formirana troslojna mreža u kojoj su čvorovi predstavljeni izabranim nezavisnim varijablama. Prvi sloj je ulazni, drugi sloj je skriveni sloj koji sadrži optimalni broj čvorova, a treći sloj je izlazni sloj sa jednim čvorom koji je predstavljen jednom zavisnom varijablom,  $k$ . Optimalan broj čvorova u skrivenom sloju, broj epoha, *momentuma* i *learning rate* za ANN( $k$ ) je prethodno određen u inicijalnim treninzima mreže.

MLR analiza je primenjena kako bi se procenila linearnost između izračunatih molekulskih deskriptora i  $k$ . Set od tri nezavisne varijable korišćen u ANN( $k$ ) modelovanju (nBM, P\_VSA\_LogP\_8 i Eta\_L) je upotrebljen i za MLR modelovanje. Korišćenjem standardne MLR metode sve tri nezavisne varijable su uključene u model.

Procedura PLS modelovanja je bila ista kao i u poglavlju 3.4.3.11. Da bi se ispitao *overfitting* kao i značaj statističkih parametara  $Q^2$  i  $R^2$  korišćen je test permutacije zavisne varijable (*Y scrambling*), takođe opisan u poglavlju 3.4.3.11.

#### **3.4.4.11. Statistička analiza formiranih QSRR modela**

Za analizu pouzdanosti formiranih QSRR modela korišćeni su sledeći statistički parametri: RMSE, RMSEP,  $R^2$ , F odnos,  $p$  vrednost,  $r$ ,  $Q^2$  and  $R^2_{pred}$ . Njihovo značenje je objašnjeno u poglavlju 1.6.9., a način izračunavanja u poglavlju 3.4.3.11. RMSEE vrednost je računata za trening set, dok je RMSEP vrednost računata za test i verifikacioni set kod ANN modela ili za test set kod MLR i PLS modela.

#### **3.4.4.12. Rezultati formiranih QSRR modela i statistička analiza**

Formirani QSRR modeli sa odgovarajućim deskriptorima i statistički parametri su prikazani u Tabeli 20.

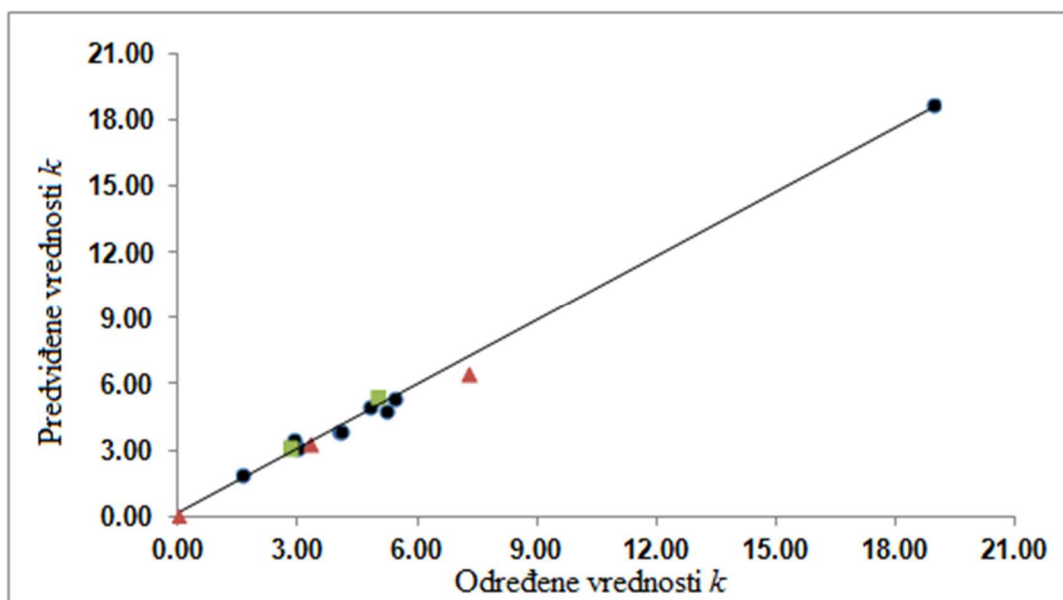
**Tabela 20.** QSRR modeli i statistički parametri

Model	Regresiona jednačina/odabrani deskriptori	Trening set	Test set						
		RMSEE	Q <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	F	p	RMSEP	r	R <sup>2</sup> <sub>pred</sub>
ANN( <i>k</i> )	$k = f(\text{nBM}, \text{P\_VSA\_LogP\_8}, \text{Eta\_L})^a$	0,294	0,725	0,994	–	–	0,441	0,986	0,979
PLS( <i>k</i> )	$k = f(\text{P\_VSA\_LogP\_3}, \text{P\_VSA\_MR\_6}, \text{RDF135m})^b$	0,964	0,959	0,961	69,723	0,00007	5,583	0,164	-1,578
MLR( <i>k</i> )	$k = (18,1908 \pm 1,4729) - (2,4395 \pm 0,0575) \cdot \text{nBM} + (0,0411 \pm 0,0066) \cdot \text{P\_VSA\_LogP\_8} + (4,0239 \pm 0,2777) \cdot \text{Eta\_L}$	0,155	0,989	0,998	983,29	<0,00007	0,720	0,983	0,944

<sup>a</sup> Struktura modela : 3 (prvi sloj) - 4 (drugi sloj) - 1 (treći sloj); nCsp3 - number of multiple bonds; P\_VSA\_LogP\_8 - P\_VSA-like on LogP, bin 8; Eta\_L - eta local composite index;

<sup>b</sup> P\_VSA\_LogP\_3 - P\_VSA-like on LogP, bin 3; P\_VSA\_MR\_6 - P\_VSA-like on Molar Refractivity, bin 6; RDF135m - Radial Distribution Function - 135 / weighted by mass;

Korelacija ( $r = 0,9970$ ) između eksperimentalno određenih i predviđenih  $k$  vrednosti svih testiranih jedinjenja (trening, verifikacioni i test set) je prikazana na Slici 20.



**Slika 20.** Korelacija između eksperimentalno određenih i predviđenih  $k$  vrednosti za testirana jedinjenja

### 3.5. ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI SINTETISANIH KISELINA I PROCENA NEŽELJENIH EFEKATA

#### 3.5.1. Reagensi i hemikalije

- Ibuprofen, 98% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- Karagenan, tip IV (Sigma-Aldrich, Poole, Velika Britanija)
- Fiziološki rastvor, 0,9% natrijum-hlorid (Hemofarm A. D., Vršac, Srbija)
- Dimetilsulfoksid, DMSO,  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Natrijum-tiopental, Thiopental Injection BP 500 mg (Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau, Nemačka)
- Heparin, 25000 i.j./5 mL (Galenika a.d., Beograd, Srbija)

#### 3.5.2. Oprema

- Sterilni špric, 5 mL (Nipro, Zevenem, Belgija)
- Sterilna igla (Nipro, Zevenem, Belgija)
- Staklene epruvete za centrifugu

#### 3.5.3. Priprema rastvora

**Priprema rastvora karagenana:** 50 mg karagenana se suspenduje u 10 mL fiziološkog rastvora. Dobije se koloidna, opalescentna suspenzija.

#### **Priprema rastvora ispitivanih jedinjenja:**

**Ibuprofen:** Rastvor A: 100 mg ibuprofena se rastvori u 10 mL DMSO-a ( $96,96 \mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om ( $48,48 \mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om ( $24,24 \mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor B: 46,5 mg 2APM se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).

**Rastvori jedinjenja 1A, 1B, 1C, 2A, 2B i 2C** su pripremani kao i rastvori ibuprofena u odgovarajućim koncentracijama.

Rastvori sledećih jedinjenja su pripremani u ekvimolarnim dozama:

**2APN:** Rastvor A: 140 mg 2APN se rastvori u 10 mL DMSO-a (96,96  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om (48,48  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om (24,24  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor B: 52,5 mg 2APN se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).

**2APTF:** Rastvor A: 150 mg 2APTF se rastvori u 10 mL DMSO-a (96,96  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om (48,48  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om (24,24  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor B: 56,25 mg 2APTF se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).

**2APH:** Rastvor A: 134 mg 2APH se rastvori u 10 mL DMSO-a (96,96  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om (48,48  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om (24,24  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor B: 50,25 mg 2APH se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).

**2APM:** Rastvor A: 124 mg 2APM se rastvori u 10 mL DMSO-a (96,96  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om (48,48  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om (24,24  $\mu\text{mol/L}$ ).

Rastvor B: 50,25 mg 2APM se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).

- 2AMTF:** Rastvor A: 150 mg 2AMTF se rastvori u 10 mL DMSO-a (96,96  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om (48,48  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om (24,24  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor B: 56,25 mg 2AMTF se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).
- 2AMH:** Rastvor A: 134 mg 2AMH se rastvori u 10 mL DMSO-a (96,96  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om (48,48  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om (24,24  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor B: 50,25 mg 2AMH se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).
- 2AMM:** Rastvor A: 124 mg 2AMM se rastvori u 10 mL DMSO-a (96,96  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor C: 5 mL rastvora A se dopuni do 10 mL DMSO-om (48,48  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor D: 5 mL rastvora C se dopuni do 10 mL DMSO-om (24,24  $\mu\text{mol/L}$ ).  
Rastvor B: 46,5 mg 2AMM se rastvori u 5 mL DMSO-a (72,72  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### 3.5.4. Tok eksperimenta

Ispitivanje sistemske antiinflamatorne aktivnosti je vršeno testom edema šapice pacova izazvanog karagenanom.<sup>196</sup> Ispitivanje je vršeno na mužjacima pacova Wistar soja, starosti 6-8 nedelja i mase 160-180 g. Životinje su kupljene od Odeljenja za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije. Podeljene su u grupe, akomodirane na ambijentalne uslove u trajanju od 24 sata, a zatim im je, prema eksperimentalnom protokolu, ukinuta hrana u trajanju od 18 sati uz slobodan pristup vodi za piće.

Ekspiriment je izveden u dve faze. Prvo su testirane kiseline 1A, 1B, 1C, 2A, 2B i 2C, a zatim i ostale kiseline koje su supstituisani derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline. Svako ispitivano jedinjenje, kao i ibuprofen je testirano u četiri doze. Prema preporukama *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research* odabran je broj životinja po grupi. Sve eksperimentalne procedure sprovedene na pacovima Wistar soja su bile u skladu sa institucionalnim smernicama o brizi i korišćenju životinja u istraživanjima i na osnovu dobijenog rešenja od strane Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (broj rešenja: 323-06-5023/2013-05). Svaka doza je testirana na 6 životinja, tako da su za ispitivanje svakog jedinjenja bile potrebne 24 životinje. Isti broj životinja je bio u kontrolnoj grupi.

Ispitivano jedinjenje se primenjuje subkutano (s.c.) i posle 15 min se u zadnju levu šapicu injektuje 0,1 mL fiziološkog rastvora, a u desnu 0,1 mL 0,5% suspenzije karagenana u fiziološkom rastvoru. Životinje iz kontrolne grupe nisu tretirane ispitivanim jedinjenjem, već samo rastvorom DMSO-a s.c. u istoj zapremini. Nakon 3 sata od injekcije karagenana, životinje se uvode u totalnu anesteziju, uzima im se krv iz portalne vene, a neposredno po žrtvovanju i želudac. Uzorak krvi se uzima hepariniziranim špricom i prenosi u odgovarajuću epruvetu u kojoj je takođe heparin. Uzorak krvi se odmah centrifugira kako bi se izdvojila plazma koja se čuva na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do biohemijskih ispitivanja. Želudačna sluznica se makroskopski ispituje (pod lupom uvećanja 3x) i želuci se odmah zalede na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljih biohemijskih ispitivanja. Zadnje šapice se odsecaju iznad zgloba i na analitičkoj vagi se meri razlika u masi između leve i desne šapice. Procenat antiinflamatorne aktivnosti ispitivanog jedinjenja se izračunava iz jednačine 10.

$$\delta = \frac{k-e}{k} * 100$$

jednačina 10

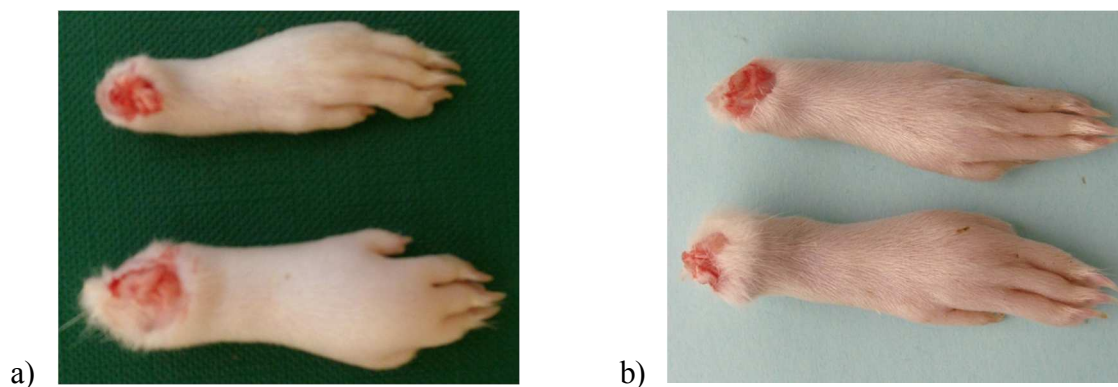
k - razlika u masi desne i leve šapice kontrolne grupe

e - razlika u masi desne i leve šapice tretirane grupe.

ED<sub>50</sub> vrednosti su računane u programu SPSS korišćenjem probit analize. Da bi bilo moguće izračunati ED<sub>50</sub> na ovaj način ključno je procenat antiinflamatornog efekta izraziti kao broj životinja u grupi.

### 3.5.5. Rezultati ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti

Na Slici 21a) su prikazane zadnje šapice jedne od životinja iz kontrolne grupe, a na Slici 21b) zadnje šapice jedne od životinja iz grupe kojoj je aplikovano jedinjenje 2APN.



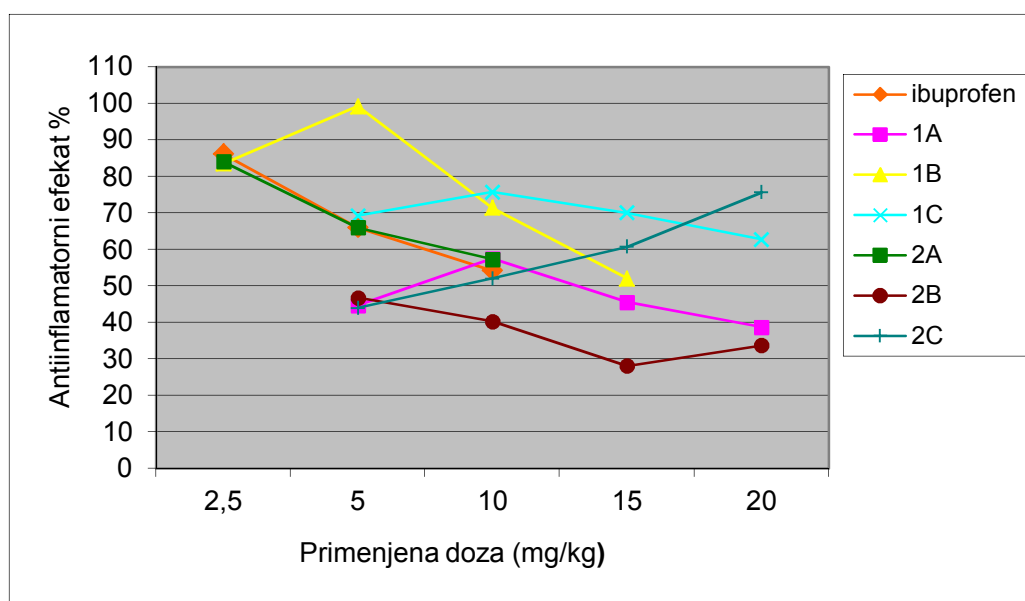
**Slika 21.** a) leva i desna šapica kontrolne grupe, b) desna i leva šapica grupe tretirane ispitivanim jedinjenjem 2APN

U Tabeli 21 su prikazane vrednosti ED<sub>50</sub> za sintetisana jedinjenja i za ibuprofen. Na Slici 22 je prikazana dozna zavisnost za jedinjenja koja su ispitivana u prvoj fazi eksperimenta, a na Slici 23 za jedinjenja koja su ispitivana u drugoj fazi.

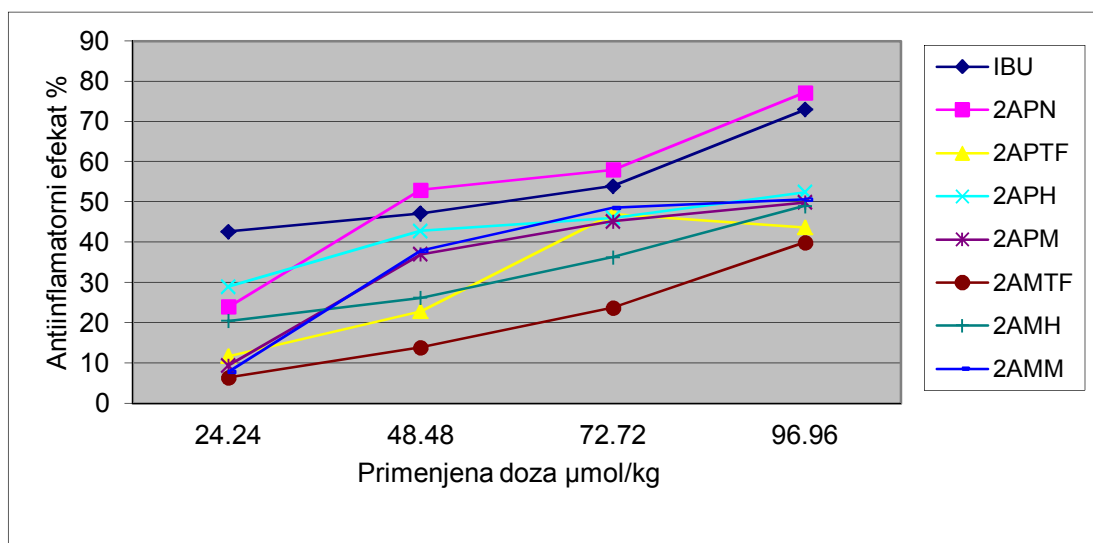


**Tabela 21.** ED<sub>50</sub> za testirana jedinjenja i interval poverenja

Jedinjenje	ED <sub>50</sub> [μmol/kg]	ED <sub>50</sub> interval poverenja [μmol/kg]
1A	52,71	45,45-61,58
1B	70,10	60,55-98,20
1C	126,82	100,08-132,80
2A	50,00	43,25-78,21
2B	14,79	10,11-30,25
2C	74,69	50,32-80,80
2APN	47,76	40,39-55,91
2APTF	100,10	85,44-128,50
2APH	87,49	71,56-120,24
2APM	85,92	72,07-113,08
2AMTF	139,28	114,66-192,18
2AMH	117,76	91,78-184,34
2AMM	84,72	73,40-100,97
IBUPROFEN	43,97	22,69-62,76



**Slika 22.** Dozna zavisnost za derivate β-hidroksi-β-bifenilbuterne kiseline (1A, 1B, 1C) i derivate β-hidroksi-β,β-difenilpropionske kiseline (2A, 2B i 2C)



**Slika 23.** Dozna zavisnost za derivate  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline (2APN, 2APTF, 2APH, 2APM, 2AMTF, 2AMH i 2AMM)

### 3.5.6. Test gastrične podnošljivosti

Ispitivani su samo želuci životinja koje su tretirane najvećom dozom u eksperimentu ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti. Želuci su makroskopski ispitivani nakon žrtvovanja životinje, otvaranja želuca duž velike krivine (*curvatura major gastris*) i ispiranja fiziološkim rastvorom. Intenzitet gastričnih lezija je procenjen na osnovu modifikovane skale bodovanja autora Adami i saradnika<sup>217</sup> (Tabela 22). Primenom lupe (uvećanje 3x) posmatraju se veličina i brojnost lezija.

**Tabela 22.** Modifikovana Adami-jeva skala

<b>Procena intenziteta gastričnih lezija</b>	<b>Broj i opis pojedinačnih gastričnih lezija</b>
0	Odsustvo lezija
0,5	Blaga hiperemija i $\leq 5$ petehija
1	$\leq 5$ erozija dužine $\leq 5$ mm
1,5	$\leq 5$ erozija dužine $\leq 5$ mm i mnoštvo petehija
2	6-10 erozija dužine $\leq 5$ mm
2,5	1-5 erozija dužine $> 5$ mm
3	5-10 erozija dužine $> 5$ mm
3,5	$> 10$ erozija dužine $> 5$ mm
4	1-3 erozije dužine $\leq 5$ mm i širine 0,5-1 mm
4,5	4-5 erozija dužine $\leq 5$ mm i 0,5-1 mm širine
5	1-3 erozija dužine $> 5$ mm i 0,5-1 mm širine
6	4-5 erozija dužine $> 5$ mm i 0,5-1 mm širine
7	$\geq 6$ erozija dužine $> 5$ mm i 0,5-1 mm širine
8	Kompletna lezija gastrične mukoze sa krvarenjem

### 3.5.7. Rezultati testa gastrične podnošljivosti

Nisu primećene značajne lezije gastrične mukoze ni za jedno od testiranih jedinjenja. Od gastričnih lezija bila su prisutna tačkasta krvarenja (petehije) i nekoliko erozija po dužini, manjih od 5 mm, tako da oštećenja gastrične sluznice na modifikovanoj Adami-jevoj skali iznose 1.

## 3.6. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA

Biološki materijal za biohemijska ispitivanja je uziman nakon 3 sata i 15 minuta od injekcije ispitivanog jedinjenja, a nakon 3 h od injekcije karagenana. Sva biohemijska ispitivanja koja su dalje vršena predstavljaju rane promene posle akutne primene jedinjenja i značajna su sa aspekta poređenja sa ibuprofenom.

### 3.6.1. Homogenizacija tkiva želudaca

#### 3.6.1.1. Reagensi i hemikalije

- Tečni azot (Messer Tehnogas AD, Beograd, Srbija)
- Tris pufer, (tris(hidroksimetil)aminometan, Acros Organics, Geel, Belgija)

#### 3.6.1.2. Oprema

- Rotor-stator homogenizator, T25 digital ULTRA-TURRAX® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemačka)
- Centrifuga, Hettich EBA 8S (Hettich, Tuttlingen, Nemačka)
- Vaga Adventurer™ (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Tarionik i pistil

#### 3.6.1.3. Priprema rastvora

**Priprema Tris pufera:** Odmeri se 121,1 g Tris baze, prenese u odmerni sud od 1000 mL, doda oko 800 mL destilovane vode i podesi pH na 7,4 uz pomoć koncentrovane hlorovodonične kiseline. Odmerni sud se dopuni destilovanom vodom do oznake.

### **3.6.1.4. Procedura**

U tarionik se prenese želudac bez odmrzavanja, prelije sa oko 5 mililitara tečnog azota i grubo usitni pistilom. Odmeri se 0,5 g tkiva, prenese u odgovarajuću kivetu, pomeša sa 4,5 mL Tris pufera (10 mmol/L, pH=7,4) i homogenizuje uz pomoć homogenizatora (Ultra Turrax) tokom 15 minuta uz hlađenje na ledu. Homogenat se filtrira i centrifugira na 1000 g i na temperaturi 4°C tokom 20 minuta. Odvoji se supernatant, alikvotira i čuva na -80°C do biohemijskih ispitivanja.<sup>218</sup>

### **3.6.2. Dobijanje plazme iz pune krvi**

#### **3.6.2.2. Oprema**

- Plastične tube za mikrocentrifugu Eppendorf® (Sigma-Aldrich, Salzee, Nemačka)
- Centrifuga Hettich EBA 8S (Hettich, Tuttlingen, Nemačka)

#### **3.6.2.3. Procedura**

Plazma za analize dobijena je iz pune krvi koja je vađena hepariniziranim špicem i sakupljana u odgovarajuće epruvete u kojima se nalazio heparin-natrijum, a odvajanje supernatanta (plazme) od koaguluma postignuto je centrifugiranjem 15 minuta na 3000 obrtaja. Na ovaj način dobijena plazma je alikvotirana i čuvana na temperaturi od 4 °C za analize koje se odmah izvode ili na temperaturi od -80 °C za kasnija određivanja.

### 3.6.3. Metode određivanja koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

#### 3.6.3.1. Računarski programi

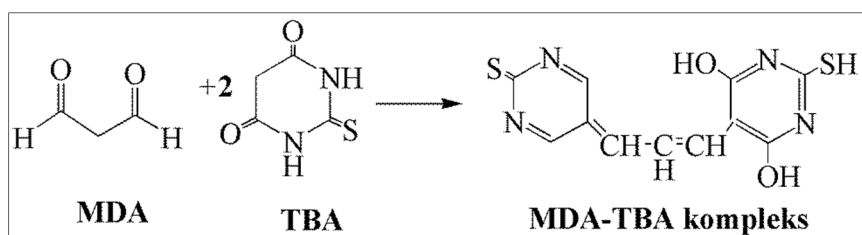
- Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, SAD)
- PASW® Statistic version 18 (Chicago, Illinois, SAD)

#### 3.6.3.2. Oprema

- Šejker za ELISA ploče, Wallac (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)
- UV/VIS spektrofotometar sa termostatiranom kivetom (UV-1800, Shimadzu, Nishinokyo-Kuwabara-cho, Japan)
- Vorteks mešalica (VELPScientifica, Milano, Italija)
- ELISA čitač (Pharmacia LKB, Wien, Austrija)
- Automatska pipeta 100-1000  $\mu\text{L}$  (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)
- Automatska pipeta 10-100  $\mu\text{L}$  (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)
- Automatska pipeta 2-20  $\mu\text{L}$  (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)

#### 3.6.3.3. Određivanje MDA iz homogenata želudaca

Princip metode se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju kompleksa čiji je maksimum apsorpcije na 535 nm, a koji nastaje reakcijom MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (Slika 24).<sup>219</sup>



Slika 24. Reakcija MDA sa TBA

### 3.6.3.3.1. Reagensi i hemikalije

- Trihlorsirćetna kiselina, TCA (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Tiobarbiturna kiselina, TBA (Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)
- Hlorovodonična kiselina, 37 % (Zorka, Šabac, Srbija)
- TRIS, Tris(hidroksimetil) aminometan (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Malondialdehid standard, MDA (4,17 mol/L) (Acros Organics, Geel, Belgija)

### 3.6.3.3.2. Priprema rastvora

**TBA reagens.** Odmeri se 92  $\mu\text{L}$  trihlorsirćetne kiseline, 374,8 g tiobarbiturne kiseline i 20,53 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline i prenese u odmerni sud od 1000 mL. Rastvori se u vodi i dopuni vodom do oznake.

**Tris-Cl pufer.** Odmeri se 121,1 g TRIS, prenese u odmerni sud od 1000 mL i doda oko 800 mL destilovane vode. pH dobijenog rastvora se podesi na 7,4 koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom. Odmerni sud se dopuni do oznake destilovanom vodom.

**Osnovni standard MDA 1 mol/L.** Odmeri se 25  $\mu\text{L}$  koncentrovanog rastvora standarda MDA (4,17 mol/L), prenese u odmerni sud od 100 mL i dopuni vodom do oznake (Osnovi rastvor I). 100  $\mu\text{L}$  ovog rastvora se prenese u ependorf i dopuni vodom do 1 mL, čime se dobija rastvor čija je koncentracija 10  $\mu\text{mol/L}$  (Osnovni rastvor II). Od Osnovnog rastvora II se pravi serija rastvora rastuće koncentracije u opsegu od 1 do 10  $\mu\text{mol/L}$  razblaživanjem prema Tabeli 23.

**Tabela 23:** Priprema rastvora za kalibracionu krivu za određivanje koncentracije MDA

V( $\mu\text{L}$ )	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>	S <sub>10</sub>
MDA	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pufer	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900

**Uzorak:** homogenati tkiva želudaca

### 3.6.3.3.3. Eksperimentalni postupak i izračunavanje

Za izračunavanje koncentracije MDA prvo se pripreme uzorci razblaživanjem osnovnog rastvora standarda MDA prema Tabeli 24, pa se mere apsorbancije tako pripremljenih rastvora i konstruiše se kalibraciona kriva.

**Tabela 24.** Priprema uzoraka za određivanje koncentracije MDA

V (μL)	Slepa proba	Standard	Analiza
Homogenat	-	-	300
TRIS-Cl puffer	300	-	-
Standard	-	300	-
TBA reagens	600	600	600

Uzorci se promešaju na *vortex* mešalici i inkubiraju u vodenom kupatilu zagrejanom na 100°C tokom 5 minuta. Uzorci se ohlade i centrifugiraju na 10000 g tokom 10 minuta na 4 °C. Apsorbancija se meri na 535 nm.

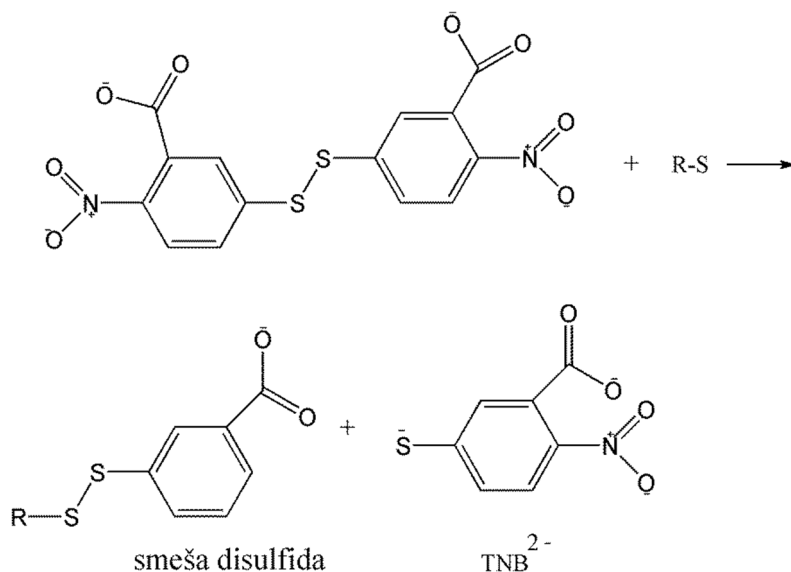
Na osnovu izmerenih apsorbancija rastvora standarda konstruisana je kalibraciona kriva:  $y = 0,0042 + 0,0512x$  ( $r = 0,999753$ ).

Sa kalibracione krive se ekstrapolacijom očitava koncentracija MDA.

### 3.6.3.4. Metoda za određivanje koncentracije redukovano glutatona

Na samom početku ove procedure iz uzorka se moraju ukloniti proteini taloženjem sa 5 % sulfosalicilnom kiselinom. Određivanje redukovano glutatona se zasniva na reakciji sulfhidrilnih grupa glutatona sa 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoevom kiselinom (DTNB) (Slika 25). Apsorbancija nastalog p-nitrotiolatnog anjona se meri na 412 nm.<sup>220</sup> Koncentracija GSH se izračunava metodom standardne krive, korišćenjem serije razblaženih rastvora redukovano glutatona u 5 % sulfosalicilnoj kiselini (standard).





**Slika 25.** Redukcija Elmanovog reagensa slobodnim sulfhidrilnim grupama

#### 3.6.3.4.1. Reagensi i hemikalije

- Sulfosalicilna kiselina, 2-hidroksi-5-sulfobenzoeva kiselina (Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)
- Natrijum-hidrogenfosfat, anhidrovani (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- DTNB, 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoeva kiselina (Sigma-Aldrich, Seelze, Nemačka)

#### 3.6.3.4.2. Priprema rastvora

**5 % Sulfosalicilna kiselina.** Odmeri se 2,5 g sulfosalicilne kiseline, prenese u odmerni sud od 50 mL, rastvori u destilovanoj vodi i dopuni vodom do oznake.

**0,3 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.** Odmeri se 4,259 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, prenese u odmerni sud od 100 mL, rastvori u destilovanoj vodi i dopuni vodom do oznake.

**Rastvor 0,5 mmol/L DTNB** se priprema *ex tempore* i zaštićeno od svetlosti. Odmeri se 0,198 g supstance, prenese u odmerni sud od 10 mL, rastvori u fosfatnom puferu pH 7 i dopuni puferom do oznake. 1 mL pripremljenog rastvora se prenese u odmerni sud od 100 mL i dopuni fosfatnim puferom pH 7 do oznake.

**Osnovni rastvor redukovano glutationa 0,2 mmol/L** se priprema tako što se prenese 0,00615 g supstance u odmerni sud od 100 mL, rastvori u destilovanoj vodi i dopuni vodom do oznake. Od osnovnog rastvora priprema se serija razblaženih rastvora glutationa u 5 % sulfosalicilnoj kiselini koncentracije od 3,125 do 50  $\mu\text{mol/L}$ . Rastvori se čuvaju zaštićeni od svetlosti.

**Uzorak:** homogenati tkiva želudaca

### 3.6.3.4.3. Eksperimentalni postupak i izračunavanje

Prenese se 400  $\mu\text{L}$  uzorka i 400  $\mu\text{L}$  5 % sulfosalicilne kiseline (SSA) u ependorf zapremine 1000  $\mu\text{L}$ , dobro izmeša na vorteksu i centrifugira na +4 °C tokom 10 minuta, pri brzini obrtaja 10000 g. Zapremina od 300  $\mu\text{L}$  supernatanta se prenese u čist ependorf i dodaju ostali reagensi prema postupku koji je prikazan u Tabeli 25.

**Tabela 25.** Priprema slepe probe, analiziranog uzorka i standardnog rastvora GSH

V ( $\mu\text{L}$ )	Slepa proba	Analizirani uzorak homogenta	Standardni rastvor GSH
0,3 mol/L $\text{Na}_2\text{HO}_4$	950	800	800
0,5 mmol/L DTNB	100	100	100
5% SSA	150	/	/
Supernatant	/	300	/
Standardni rastvor GSH	/	/	300

Dobijena reakciona smeša se dobro promeša, inkubira 25 min zaštićeno od svetlosti, na sobnoj temperaturi, a zatim se meri apsorbancija na 412 nm.

### 3.6.3.5. Rezultati određivanja MDA i GSH u homogenatima želudaca

Da bi se uporedila jedinjenja koja snižavaju koncentraciju MDA, a povećavaju koncentraciju GSH izračunat je oksidativno-stresni indeks (OSI) prema jednačini 11.

$$\text{OSI} = \text{GSH} / \text{MDA}$$

jednačina 11

Jedinjenja koja imaju više vrednosti ovog indeksa, obezbeđuju bolji nivo zaštite od oksidativnog stresa u tkivu želuca. Rezultati određenih vrednosti MDA, GSH kao i izračunati OS indeks su prikazani u Tabeli 26.

**Tabela 26.** Koncentracije MDA i GSH u tkivu želuca pri najvećoj dozi jedinjenja i OS indeks

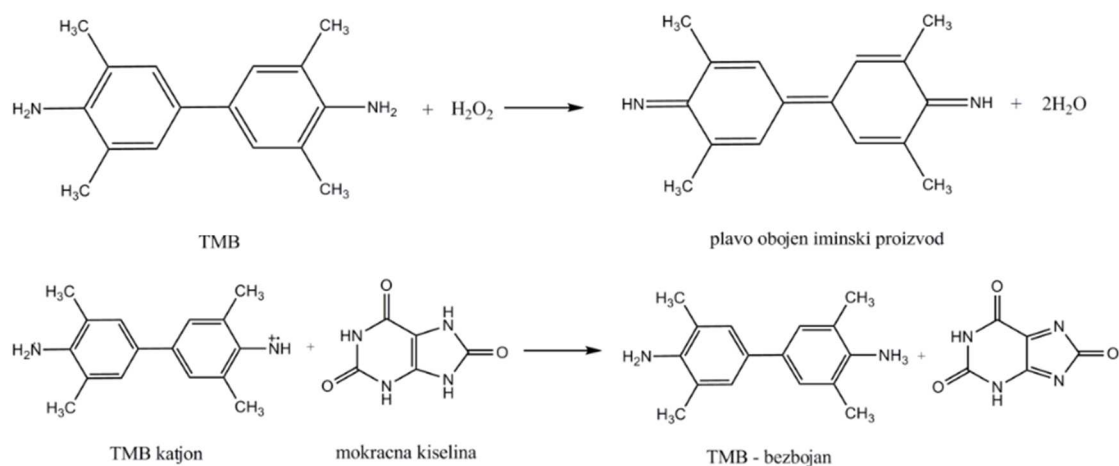
Grupa	MDA, (X±SD) (μmol/g proteina)	GSH, (X±SD) (μmol/g proteina)	OS indeks (AU)
Kontrola	0,388±0,081	28,231±6,534	72,760
Ibuprofen	0,882±0,107 <sup>aaa</sup>	70,500±13,478 <sup>aaa</sup>	79,932
2APN	0,358±0,059 <sup>bbb</sup>	66,750±14,592 <sup>aaa</sup>	186,452
2APTF	0,905±0,087 <sup>aaa, ccc, e</sup>	55,250±10,468 <sup>aaa</sup>	61,050
2APH	0,362±0,102 <sup>bbb, ddd, eee, iii</sup>	48,000±5,292	132,597
2APM	0,362±0,026 <sup>bbb, ddd, eee</sup>	32,333±7,118 <sup>bbb, ccc</sup>	89,318
2AMTF	0,692±0,151 <sup>aaa, ccc, d</sup>	33,250±8,421 <sup>bbb, ccc</sup>	48,049
2AMH	0,455±0,026 <sup>bbb, ddd, eee</sup>	62,500±22,308 <sup>aaa</sup>	137,363
2AMM	0,355±0,066 <sup>bbb, ddd, eee, iii</sup>	40,750±13,500 <sup>c</sup>	114,789

<sup>a</sup>U poređenju sa kontrolnom grupom, <sup>b</sup>U poređenju sa ibuprofenom, <sup>c</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APN, <sup>d</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APTF, <sup>e</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APH, <sup>f</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APM, <sup>g</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMTF, <sup>h</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMH, <sup>i</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMM, JEDNOFAKTORSKA ANOVA, a<0,05, aa<0,01, aaa<0,005

### 3.6.3.6. Metoda određivanja prooksidativno-antioksidativnog balansa

Određivanjem vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) može se istovremeno meriti opterećenost prooksidansima i kapacitet antioksidanasa određenog organizma. U odnosu na dosadašnje metode uz pomoć kojih se odvojeno merio nivo prooksidanasa i antioksidanasa, izvođenje PAB testa omogućava simultano određivanje prooksidanasa i antioksidanasa u datom uzorku, a time i merenje postojeće ravnoteže između njih.

Za određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa korišćena je modifikacija metode koju su uveli Hamidi-Alamdari i saradnici.<sup>221</sup> Ovom metodom se određuje koncentracija vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ) u antioksidativnom okruženju. Hromogen koji se koristi u reakciji (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB) reaguje istovremeno i sa oksidansima i sa antioksidansima kao što je mokraćna kiselina (Slika 26). U reakciji  $H_2O_2$  i hromogena koja je enzimski katalizovana peroksidazom, oksiduje se TMB i nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod. Za razliku od ove reakcije, reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana, a rezultat te reakcije je redukovani TMB katjon koji je bezbojan. Intenziteti boje standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina  $H_2O_2$  i mokraćne kiseline. Kapacitet prisutnih antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj kiselini i izražava u  $\mu\text{mol/L}$  mokraćne kiseline, a kapacitet prooksidanasa se kalibriše prema  $H_2O_2$  i izražava u  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ . Za konstruisanje standardne krive koriste se rastvori  $H_2O_2$  i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da na početku dominira mokraćna kiselina, a na kraju  $H_2O_2$ . Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa jer međusobno ne reaguju i ne kompetiraju jedna drugoj za hromogen.



Slika 26. Reakcija TMB sa vodonik-peroksidom i mokraćnom kiselinom

### 3.6.3.6.1. Hemikalije

- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Dimetilsulfoksid, DMSO, (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Hloramin T (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Enzim peroksidaza (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Natrijum-acetat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Sirćetna kiselina, glacijalna (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Vodonik-peroksid (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Mokraćna kiselina (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-hidroksid (Merck, Darmstadt, Nemačka)

### 3.6.3.6.2. Priprema reagenasa

**TMB I rastvor.** Odmeri se 60 mg TMB, prenese u odmerni sud od 10 mL i rastvori u DMSO. Pripremljeni rastvor se alikvotira na zapremine od 1,1 mL i čuva u zamrzivaču, na -20 °C.

**TMB katjon.** Odmeri se 1 mL TMB I rastvora, prenese u odmerni sud od 50 mL i doda acetatni pufer (0,05 mol/L, pH 4,5). U dobijeni rastvor se doda 175 µL sveže pripremljenog hloramina T (100 mmol/L), dobro promeša i inkubira 1 sat na 37 °C. Rastvor se priprema zaštićen od svetlosti uz stalno mešanje. Nakon inkubacije, u 50 mL rastvora TMB katjona doda se 25 U enzima peroksidaze. Dobijeni rastvor se pažljivo promeša, podeli u zapremine od 1 mL i čuva u zamrzivaču na -20 °C.

**TMB II rastvor.** 200 µL TMB I rastvora se prenese u odmerni sud od 10 mL i dopuni acetatnim puferom (0,05 mol/L, pH 5,6) do oznake. Ovako pripremljen rastvor se koristi u roku od 2 dana, pri čemu se čuva u frižideru, na temperaturi od 4 °C.

**Radni rastvor** se priprema *ex tempore* tako što se 10 mL TMB II rastvora prenese u epruvetu i doda se 1 mL rastvora TMB katjona. Dobijeni rastvor se meša na sobnoj temperaturi i zaštićeno od svetlosti tokom 6 minuta.

**Standardni rastvori** se pripremaju mešanjem različitih odnosa (0 –100 %) 1 mmol/L vodonik-peroksida sa 6 mmol/L mokraćnom kiselinom (rastvorenom u 10 mmol/L NaOH). Priprema standardnih rastvora prikazana je u Tabeli 27.

**Tabela 27.** Priprema standardnog rastvora za PAB test

Standardni rastvor	1	2	3	4	5
Mokraćna kiselina (μL)	100	75	50	25	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μL)	0	25	50	75	100

*Uzorak:* plazma

### 3.6.3.6.3. Eksperimentalni postupak

Metoda je spektrofotometrijska, a reakcija se izvodi na ELISA ploči. U svaki od 96 odeljaka ploče pomeša se po 10 μL uzorka, standardnog rastvora ili slepe probe (destilovana voda) sa 180 μL radnog rastvora i inkubira 12 minuta na 37 °C, zaštićeno od svetlosti. Nakon inkubacije, reakcija se prekida dodatkom 40 μL 2 mol/L hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja menja u žutu. Apsorbancija se meri odmah na ELISA čitaču, na 450 nm. Na osnovu izmerenih apsorbancija standardnih rastvora konstruiše se kalibraciona kriva sa koje se ekstrapolacijom očitavaju koncentracije uzoraka. Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama -HK (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u standardnim rastvorima pomnožen sa 6.

### 3.6.3.6.4. Rezultati određivanja PAB

U Tabeli 28 su prikazani rezultati određivanja PAB u plazmi eksperimentalnih životinja tretiranih najvišom dozom sintetisanog jedinjenja i ibuprofena.

**Tabela 28.** Vrednosti PAB u plazmi životinja

Grupa	PAB (HK jedinice) (X±SD)
Kontrola	142±50,69
Ibuprofen	252,25±84,52 <sup>aa</sup>
2APN	210,91±89,34
2APTF	186,08±100,84
2AMTF	157,16±64,82 <sup>b</sup>
2APM	133,18±61,85 <sup>bbb</sup>
2AMH	271,74±120,04 <sup>aaa, e, fff</sup>
2AMM	192,34±89,16
2APH	72,98±42,86 <sup>bbb, ccc, dd, ggg, hhh</sup>

<sup>a</sup>U poređenju sa kontrolnom grupom, <sup>b</sup>U poređenju sa ibuprofenom, <sup>c</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APN, <sup>d</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APTF, <sup>e</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APH, <sup>f</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APM, <sup>g</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMTF, <sup>h</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMH, <sup>i</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMM, JEDNOFAKTORSKA ANOVA, a<0,05, aa<0,01, aaa<0,005

### 3.6.3.7. Metoda određivanja totalnog oksidantnog statusa (TOS)

Glavne komponente TOS sistema u plazmi su vodonik peroksid i lipidni hidroperoksidi. Metoda određivanja TOS se zasniva na oksidaciji feri jon-*ortho*-dianizidinskog kompleksa u feri jon pomoću oksidanasa koji se nalaze u plazmi. Reakcija oksidacije olakšana je molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu. Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol oranžom u kiseloj sredini. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 560 nm i proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Kao standard koristi se vodeni rastvor vodonik-peroksida, opsega koncentracije 10-200 μmol/L, što odgovara linearnosti metode i očekivanim koncentracijama u biološkom materijalu.

### 3.6.3.7.1. Hemikalije

- Ksilenol oranž (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Natrijum-hlorid (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Sumporna kiselina (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Amonijum-gvožđe(II)sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- *o*-dianizidin-dihidrohlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Glicerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)

### 3.6.3.7.2. Priprema reagenasa

**Reagens TOS 1.** Odmeri se 114 mg ksilenol oranža i 8,18 g NaCl i rastvori u 900 mL rastvora H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c = 25 mmol/L). U taj rastvor se doda 100 mL glicerola. pH vrednost se podesi na 1,75 uz pomoć sumporne kiseline.

**Reagens TOS 2.** Odmeri se 1,96 g amonijum-gvožđe(II)sulfata i 3,17 g *o*-dianizidin dihidrohlorida i rastvori u 1000 mL rastvora H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c = 25 mmol/L).

### 3.6.3.7.3. Eksperimentalni postupak

U odgovarajuće epruvete se pipetiraju rastvori prema Tabeli 29. Sadržaj se promeša i inkubira 3-4 minuta, nakon čega se apsorbancije očitaju na spektrofotometru na talasnoj dužini od 560 nm.

**Tabela 29.** Priprema epruveta analize, standarda i slepe probe za određivanje TOS

	Analiza	Standard	Slepa proba
TOS 1	450μL	450μL	450μL
TOS 2	22μL	22μL	/
Plazma	70μL	/	/
Dejonizovana voda	/	/	70μL
Standard	/	70μL	/



### 3.6.3.8. Metoda određivanja totalnog antioksidantnog statusa (TAS)

Za određivanje totalnog antioksidantnog statusa korišćena je modifikacija metode koju je formulisao Erel.<sup>207</sup> Totalni antioksidantni status se određuje kolorimetrijski uz upotrebu stabilnog katjona 2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonata) (ABTS<sup>+</sup> katjona) kao hromogena. Rastvor ABTS-a je bezbojan, ali oksidacijom do katjona pomoću vodonik-peroksida u kiselom medijumu (acetatni pufer; pH 3,6) rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Kada se obojeni ABTS<sup>+</sup> jon pomeša sa nekom supstancom koja može da se oksiduje (antioksidans), redukuje se do bezbojnog ABTS-a. Intenzitet obezbojavanja srazmeran je koncentraciji ukupno prisutnih antioksidanasa u uzorku.

Apsorbancije ispitivanih rastvora očitavane su pomoću ELISA čitača na talasnoj dužini od 660 nm nakon inkubacije u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Modifikacija metode se odnosi na prilagođavanje preporučenih zapremina standardnim zapreminama ELISA ploče sa 96 odeljaka na kojoj se izvode sve reakcije.

Koncentracija prisutnih antioksidanasa u uzorku određuje se metodom standardne krive. Kao standard je korišćen Trolox, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E. Za pripremu rastvora korišćen je 30 mmol/L fosfatni pufer, pH 7,4. Dobijeni rezultati izražavaju se u mmol/L *Trolox ekvivalenta*. Pri konstruisanju standardne krive korišćeni su rastvori Troloksa rastućih koncentracija i to: 0,125 mmol/L; 0,25 mmol/L; 0,5 mmol/L; 0,75 mmol/L; 1 mmol/L; 1,5 mmol/L; 2 mmol/L.

#### 3.6.3.8.1. Hemikalije

- Natrijum-acetat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Sirćetna kiselina, glacijalna (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- 2,2-azobis 3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat, ABTS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Vodonik-peroksid (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina, *Trolox* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)

### 3.6.3.8.2. Priprema reagenasa

**Acetatni pufer (pH 3,6; 0,4 mol/L):** U odmerni sud od 1000 mL se prenese 940 mL natrijum-acetata (0,4 mol/L) i dodaje oko 60 mL sirćetne kiseline (0,4 mol/L) do postizanja odgovarajućeg pH.

**Rastvor ABTS-a:** Odmeri se 30 mL acetatnog pufera (pH 3,6; 30 mmol/L) prenese u čašu, doda 70 mL rastvora vodonik-peroksida (2 mmol/L). Odmeri se 0,549 g čvrstog ABTS-a i rastvori u tako pripremljenom rastvoru (krajnja koncentracija rastvora ABTS-a je 10 mmo/L). Inkubira se 1 sat na sobnoj temperaturi, dok rastvor ne poprimi karakterističnu intenzivnu plavozelenu boju ABTS<sup>+</sup> jona.

**Rastvor Troloksa** – Odmeri se 0,75 g *Troloxa*, prenese u odmerni sud, rastvori u fosfatnom puferu, pH 7,4 i dopuni puferom do oznake.

### 3.6.3.8.3. Eksperimentalni postupak

Postupak određivanja TAS-a se sastoji iz nekoliko koraka. U odeljke Elisa ploče se pipetira 200 µL acetatnog pufera, 12,5 µL plazme i 37,5 µL rastvora ABTS-a. Priprema analize, standarda i slepe probe je prikazana u Tabeli 30. Sadržaj ploče se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancije ispitivanih rastvora očitavaju se na Elisa čitaču, na talasnoj dužini od 660 nm. Kao slepa proba reagensa korišćen je rastvor ABTS-a.

**Tabela 30.** Priprema analize, standarda i slepe probe za određivanje TAS u plazmi

	Analiza	Standardi	Slepa proba
Plazma	12,5µL	/	/
Reagens 1	200µL	200µL	200µL
Reagens 2	37,5µL	37,5µL	37,5µL
Rastvor standarda	/	12,5µL	
Dejonizovana voda	/	/	12,5µL

### 3.6.3.8.4. Rezultati određivanja TAS i TOS

Rezultati određivanja TAS i TOS u plazmi eksperimentalnih životinja za derivate  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline su prikazani u Tabeli 31. Određivanje je vršeno samo u grupi životinja kojima je primenjena najveća doza sintetisanog jedinjenja ili ibuprofena. Izračunat je oksidativno-stresni indeks prema jednačini 12 kako bi se istakla jedinjenja koja pružaju bolju antioksidativnu zaštitu.

$$\text{OSI} = \text{TAS}/\text{TOS}$$

Jednačina 12

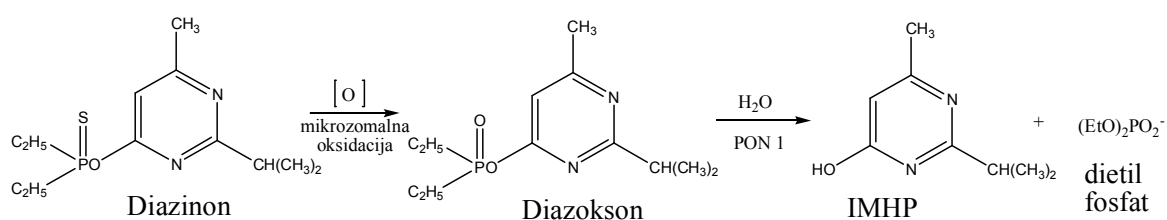
**Tabela 31.** Rezultati za TAS i TOS za sintetisana jedinjenja i ibuprofen i vrednosti OSI

Jedinjenje	TAS ( $\mu\text{mol/L}$ ) ( $\bar{X}\pm\text{SD}$ )	TOS ( $\mu\text{mol/L}$ ) ( $\bar{X}\pm\text{SD}$ )	OSI (AU)
Kontrola	698,94 $\pm$ 199,36	199,57 $\pm$ 68,48	3,50
Ibuprofen	595,13 $\pm$ 153,43	92,45 $\pm$ 61,298 <sup>aaa</sup>	6,44
2APN	725,54 $\pm$ 59,529	111,36 $\pm$ 74,52 <sup>a</sup>	6,51
2APTF	787,19 $\pm$ 117,63 <sup>bbb</sup>	161,14 $\pm$ 93,259	4,88
2AMTF	766,88 $\pm$ 154,648 <sup>b</sup>	132,80 $\pm$ 100,25	5,77
2APM	720,38 $\pm$ 153,22	130,45 $\pm$ 92,042	5,22
2AMH	781,56 $\pm$ 52,083 <sup>bbb</sup>	225,66 $\pm$ 54,368 <sup>bbb,ccc,f</sup>	3,46
2AMM	803,88 $\pm$ 52,753 <sup>bbb</sup>	217,44 $\pm$ 41,647 <sup>bbb,ccc,ee,ff</sup>	3,70
2APH	763,13 $\pm$ 169,96 <sup>b</sup>	103,59 $\pm$ 78,78 <sup>aa,ggg,hhh</sup>	7,37

<sup>a</sup>U poređenju sa kontrolnom grupom, <sup>b</sup>U poređenju sa ibuprofenom, <sup>c</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APN, <sup>d</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APTF, <sup>e</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APH, <sup>f</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APM, <sup>g</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMTF, <sup>h</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMH, <sup>i</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMM, JEDNOFAKTORSKA ANOVA, a<0,05, aa<0,01, aaa<0,005

### 3.6.3.9. Metoda određivanja aktivnosti paraoksonaze 1

Aktivnost enzima paraoksonaze 1 (PON1) je određena kao aktivnost prema nefiziološkom supstratu diazoksonu (diazoksonazna, DZO-azna aktivnost), primenom spektrofotometrijske kinetičke metode koju su opisali Richter i Furlong.<sup>222</sup> Reakcija se zasniva na delovanju PON1 enzima iz plazme na supstrat diazokson pri čemu dolazi do konverzije diazoksona u 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin (IMHP) (Slika 27). Brzina promene se prati kinetički na talasnoj dužini 270 nm, na kojoj je karakteristični apsorpcioni maksimum za IMHP.



**Slika 27.** Reakcija koju katalizuje enzim PON1 u slučaju kada je supstrat diazokson (diazoksonazna aktivnost PON1)

Promena aktivnosti se prati tokom tri minuta i izračunava se promena apsorbancije u minutu ( $\Delta A/\text{min}$ ). Diazoksonazna aktivnost se određuje na 23 °C i na pH 8,5, uz upotrebu 1 mmol/L TRIS-HCl pufera i u prisustvu natrijum-hlorida (solju stimulisana enzimaska aktivnost PON1). Zbog visokih aktivnosti prema supstratu, odnosno velike brzine reakcije nastajanja IMHP potrebno je da spektrofotometar ima dobru temperaturnu kontrolu kivete, a ambijentalna temperatura, takođe, treba da se održava ispod 23 °C. Diazoksonazna aktivnost PON1 se izražava u IU/L.

#### 3.6.3.9.1. Hemikalije

- Diazokson (O,O-dietil-O-(2-izopropil-4-metil-6-pirimidinil)-fosfat, (ChemService, West Chester, PA, SAD)
- Tris (*trishidroksimetilaminometan*, 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol; AcrosOrganics, Geel, Belgija)

### 3.6.3.9.2. Priprema rastvora

**Radni pufer.** Odmeri se 116 g NaCl i prenese u odmerni sud od 1 L koji sadrži oko 800 mL destilovane vode, 100 mL 1 mol/L Tris-HCl pufera pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L CaCl<sub>2</sub>. Odmerni sud se dopuni destilovanom vodom do oznake. Dobijene koncentracije su: 2 mol/L NaCl; 0,1 mol/L Tris-HCl pH 8,5 i 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>.

**Pufer za razblaživanje.** Odmeri se 10 mL 1 mol/L Tris-HCl pufera pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L CaCl<sub>2</sub>, prenese u odmerni sud i dopuni destilovanom vodom do oznake. Dobijene koncentracije su: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,5 i 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>.

**Zasićen rastvor NaOH.** Priprema se rastvor minimalne koncentracije 2 mol/L i koristi za dekontaminaciju korišćenog posuđa i razgradnju preostalog diazoksone pre odlivanja.

**Diazokson supstrat 1 mmol/L.** Odmeri se 2,8 µL diazoksone u odmerni sud od 10 mL i dopuni radnim puferom do oznake. Čuva se u plastičnim, neprozirnim bočicama, dobro zatvorenim, u zamrzivaču na -20 °C. Dekontaminacija se izvodi rastvorom jake baze (NaOH). Tokom rada nositi zaštitne laboratorijske naočare i masku.

### 3.6.3.9.3. Izvođenje reakcije

Uzorci plazme se razblaže puferom za razblaživanje u odnosu 1:20. U epruvete se odmeri po 50 µL razblažene plazme, doda 500 µL rastvora diazoksone, promeša, sipa u kivetu i započne merenje na spektrofotometru. Na UV/VIS spektrofotometru se odabere kinetički način rada, vreme očitavanja se podesi na 3 minuta, temperatura na 23 °C i talasna dužina na 270 nm.

### 3.6.3.9.4. Izračunavanje diazoksonazne aktivnosti

Enzimska aktivnost se izražava u broju mikromolova proizvoda koji nastane u minutu u jednom litru rastvora. Iz Lambert-Beerovog zakona (jednačina 13) može se dalje izvesti jednačina 14.

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

jednačina 13

A – apsorbancija

$\varepsilon$  – molarni apsorpcioni koeficijent izražen u L/mol/cm (molarni apsorpcioni koeficijent IMHP na pH 8,5 je 3000 L/mol/cm)

b – dužina optičkog puta (obično je 1 cm)

$$c = \frac{\Delta A / \text{min}}{\varepsilon \times 1 \text{ cm} \times 10^{-6}} \times \frac{V_{uk}}{V_{uz}} = \frac{\frac{\Delta A}{\text{min}} \times 10^{-6}}{300 \times \text{L mol}^{-1} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{0,55}{0,05} \times 20 \quad \text{jednačina 14}$$

$10^{-6}$  – faktor kojim se mol prevodi u  $\mu\text{mol}$

20 – faktor inicijalnog razblaženja seruma (1:100)

$V_{uk}$  – ukupna zapremina u epruveti (0,5 mL supstratni reagens + 0,05 mL uzorak = 0,55 mL)

$V_{uz}$  – zapremina uzorka (0,05 mL)

Krajnji izraz za izračunavanje je predstavljen jednačinom 15.

$$\Delta A / \text{min} \times 73333 = \mu\text{mol IMHP u litru rastvora} = \frac{IU}{L} \text{ PON1 aktivnosti} \quad \text{jednačina 15}$$

### 3.6.3.9.5. Rezultati određivanja aktivnosti paraoksonaze

Rezultati određivanja aktivnosti paraoksonaze za derivate  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenil-propionske kiseline prikazani su u Tabeli 32. Aktivnost paraoksonaze je određena u grupi životinja kojima su primenjena sintetisana jedinjenja ili ibuprofen u maksimalnoj dozi koja je korišćena u eksperimentu ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti.

**Tabela 32.** Rezultati određivanja aktivnosti paraoksonaze

Grupa	DZO (U/L), (X±SD)
Kontrola	4613,45±1324,592
Ibuprofen	4193,18±944,294
2APN	4007,78±1124,922
2APTF	3502,45±1048,41 <sup>a</sup>
2APH	4219,32±941,622
2AMTF	3226,40±497,860 <sup>aa,e</sup>
2AMH	4138,73±591,74
2APM	72,98±42,86 <sup>bbb, ccc, dd, ggg, hhh</sup>

<sup>a</sup>U poređenju sa kontrolnom grupom, <sup>b</sup>U poređenju sa ibuprofenom, <sup>c</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APN, <sup>d</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APTF, <sup>e</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APH, <sup>f</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APM, <sup>g</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMTF, <sup>h</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMH, <sup>i</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMM, JEDNOFAKTORSKA ANOVA, a<0,05, aa<0,01, aaa<0,005

### 3.6.4. Određivanje biohemijskih parametara: ALP, AST, ALT u plazmi životinja

Koncentracije osnovnih biohemijskih parametara (ALT, AST, ALP i TP) su određene iz plazme životinja na analizatoru ILAB 300+ (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija) primenom automatizovanih enzimskih metoda i reagenasa proizvođača Bioanalytica (Beograd, Srbija).

#### 3.6.4.1. Rezultati određivanja jetrenih enzima ALP, AST i ALT

U Tabeli 33 su prikazani rezultati određivanja jetrenih enzima u plazmi eksperimentalnih životinja posle primene sintetisanih derivata β-hidroksi-β,β-difenilpropionske kiseline i ibuprofena u najvećoj dozi korišćenoj u eksperimentu ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti.

**Tabela 33.** Koncentracije ALP, ALT i AST enzima u plazmi eksperimentalnih životinja

Grupa	ALP (IU), (X±SD)	ALT (IU), (X±SD)	AST (IU), (X±SD)
Kontrola	106,85±24,42	39,33±22,78	109,00±20,10
Ibuprofen	171,69±34,38 <sup>aaa</sup>	57,38±15,57	163,08±39,50 <sup>a</sup>
2APN	134,12±26,75 <sup>bb</sup>	56,59±19,09	120,94±21,79 <sup>b</sup>
2APTF	174,44±37,68 <sup>aaa, ccc</sup>	53,00±19,67	133,77±22,48
2APH	143,69±24,47	56,69±17,72	165,33±24,69 <sup>a, c</sup>
2APM	96,00±27,64 <sup>bbb, cc, ddd, eee</sup>	35,12±10,89 <sup>bbb, cc, e</sup>	137,62±35,12
2AMTF	102,25±24,96 <sup>bbb, c, ddd, eee</sup>	47,50±19,99	202,69±49,04 <sup>aaa, ccc, ddd, fff</sup>
2AMH	99,44±24,61 <sup>bbb, c, ddd, eee</sup>	34,5±9,44 <sup>bbb, ccc, d, ee</sup>	126,50±33,01 <sup>ggg</sup>
2AMM	145,81±27,42 <sup>fff, ggg, hhh</sup>	35,43±8,69 <sup>bbb, cc, e</sup>	121,00±23,81 <sup>b, e, ggg</sup>

<sup>a</sup>U poređenju sa kontrolnom grupom, <sup>b</sup>U poređenju sa ibuprofenom, <sup>c</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APN, <sup>d</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APTF, <sup>e</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APH, <sup>f</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2APM, <sup>g</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMTF, <sup>h</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMH, <sup>i</sup>U poređenju sa jedinjenjem 2AMM, JEDNOFAKTORSKA ANOVA, a<0,05, aa<0,01, aaa<0,005



### **3.7. IN VITRO ISPITIVANJE INHIBICIJE CIKLOOKSIGENAZE**

#### **3.7.1. Hemikalije i materijal**

- COX Inhibitor Screening Assay Kit 560131 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, SAD)
- Ultračista voda (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, SAD)
- Ibuprofen, 99% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)

#### **3.7.2. Oprema**

- Elisa čitač, ELISA Microplate reader with processor LKB 5060-006 (LKB Vertriebs GmbH, Austrija)
- Šejker za ELISA ploče, Wallac (PerkinElmer, Massachusetts, SAD)
- Automatska pipeta 100-1000  $\mu\text{L}$  (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)
- Automatska pipeta 10-100  $\mu\text{L}$  (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)
- Automatska pipeta 2-10  $\mu\text{L}$  (Socorex®, Isba S.A., Švajcarska)

#### **3.7.3. Priprema rastvora**

Svako testirano jedinjenje (1A, 2B, 2A, 2APN, 2APH, 2APM, 2AMM) je rastvoreno u DMSO tako da se dobiju koncentracije: 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ .

Svi ostali reagensi se nalaze u kitu i njihova priprema je objašnjena u uputstvu proizvođača.

#### **3.7.4. Princip metode**

*In vitro* ispitivanje inhibitornog potencijala odabranih derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina je izvršeno na komercijalno dostupnom kitu prema uputstvu proizvođača. Kit sadrži goveđu COX-1 i humanu rekombinantnu COX-2 izoformu.

Za izvođenje testa se pripremaju:

- *blank* rastvori,
- *background* rastvori (sadrže inaktiviran COX-1 ili COX-2),
- rastvori sa 100% aktivnosti COX (ne sadrže inhibitore),
- standardni rastvori (sadrže tačno određenu količinu prostaglandina u 8 razblaženja),
- test rastvori (rastvori koji sadrže ispitivano jedinjenje-potencijalni inhibitor).

U daljem tekstu će biti objašnjen samo način pripreme test rastvora jer se na osnovu toga dobija uvid u princip metode. Detaljne pripreme ostalih rastvora, kao i njihovo nanošenje na ploču su objašnjene u uputstvu proizvođača.

### **3.7.5. Izvođenje COX reakcije**

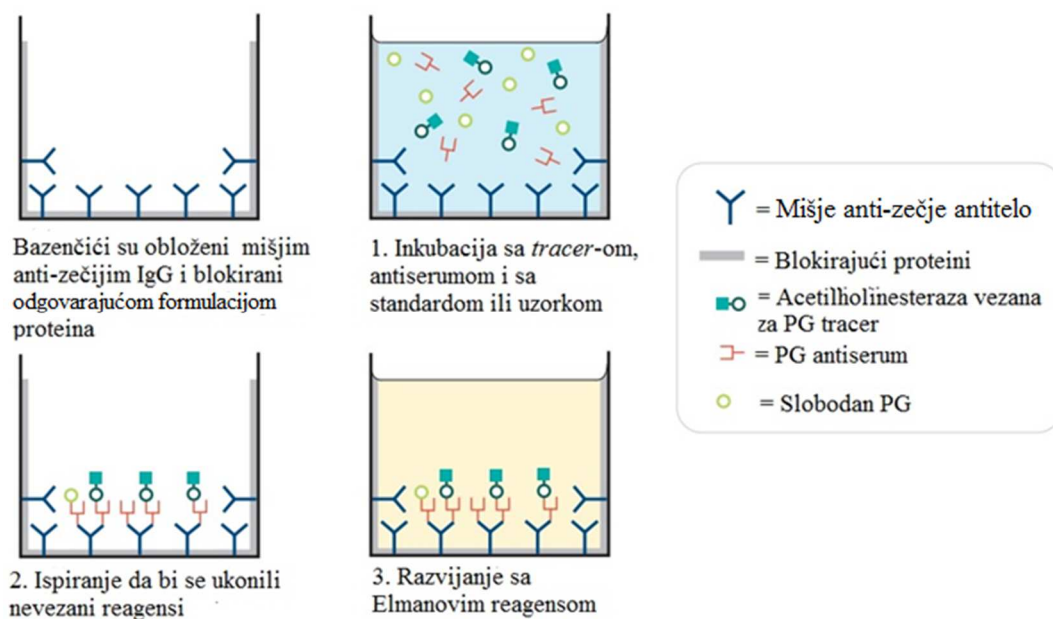
U ependorfe koji sadrže 950  $\mu\text{L}$  reakcionog pufera i 10  $\mu\text{L}$  COX-1 ili COX-2 u prisustvu HEMA dodaje se 10  $\mu\text{L}$  rastvora svakog ispitivanog jedinjenja u svakoj od pripremljenih koncentracija. Na ovaj način ispitivano jedinjenje dolazi u kontakt sa ciklooksigenazom i dobija priliku da je inhibira. Ovako dobijeni rastvori se inkubiraju 5 min na 37°C, a zatim se dodaje po 10  $\mu\text{L}$  arahidonske kiseline čime se inicira produkcija prostaglandina. Reakcija se zaustavlja dodatkom 50  $\mu\text{L}$  HCl posle 2 min. Nakon toga se dodaje po 100  $\mu\text{L}$  SnCl<sub>2</sub> čija je uloga da PGH<sub>2</sub> koji je nastao u reakciji, a koji je izuzetno nestabilan, redukuje do stabilnijeg PGH<sub>2 $\alpha$</sub> .

### **3.7.6. Izvođenje enzim imuno analize (EIA)**

U čiste ependorfe se prenese 990  $\mu\text{L}$  EIA pufera i dodaje 10  $\mu\text{L}$  rastvora u kojima se odigrala COX reakcija. Naprave se dva razblaženja koja se zatim nanose na ploču. Ploča se sastoji od 96 bazenčića koji su obloženi mišijim monoklonskim anti-zečijim antitelom. U bazenčiće se dodaje 50  $\mu\text{L}$  pripremljenog razblaženja u duplikatu. Nakon toga se dodaje 50  $\mu\text{L}$  antiseruma koji se vezuje za mišije monoklonsko anti-zečije antitelo. S druge strane, antiserum ima afinitet za sve glavne tipove PG (između ostalih i za PGH<sub>2 $\alpha$</sub> ), tako da se PGH<sub>2 $\alpha$</sub>

vezuje za antiserum. 50  $\mu\text{L}$  PG *tracer*-a koji se zatim dodaje predstavlja acetilholinesterazu vezanu za prostaglandin i takođe ima afinitet za vezivanje za antiserum, tako da se test bazira na kompeticiji  $\text{PGH}_{2\alpha}$  i PG *tracer*-a (Slika 28). Zbog toga što je koncentracija PG *tracer*-a konstantna dok koncentracija  $\text{PGH}_{2\alpha}$  varira (u zavisnosti u kom stepenu je inhibirana COX ispitivanim jedinjenjem), količina PG *tracer*-a koji će se vezati za PG antiserum je obrnuto proporcionalna koncentraciji PG u svakom bazenčiću. Posle inkubacije koja traje 36 sati, ploča se ispira kako bi se eliminisali svi nevezani reagensi i zatim se u svaki bazenčić dodaje Elmanov reagens koji sadrži u sebi supstrat za acetilholinesterazu. Produkt enzimske reakcije između PG *tracer*-a i Elmanovog reagensa razvija žutu boju koja apsorbuje na 412 nm. Intenzitet ove boje se određuje spektrofotometrijski i proporcionalan je količini PG *tracer*-a vezanog za bazenčić koja je obrnuto proporcionalna količini PG u bazenčiću.

Apsorbanca  $\sim$  Vezani PG *tracer*  $\sim 1/[\text{PG}]$

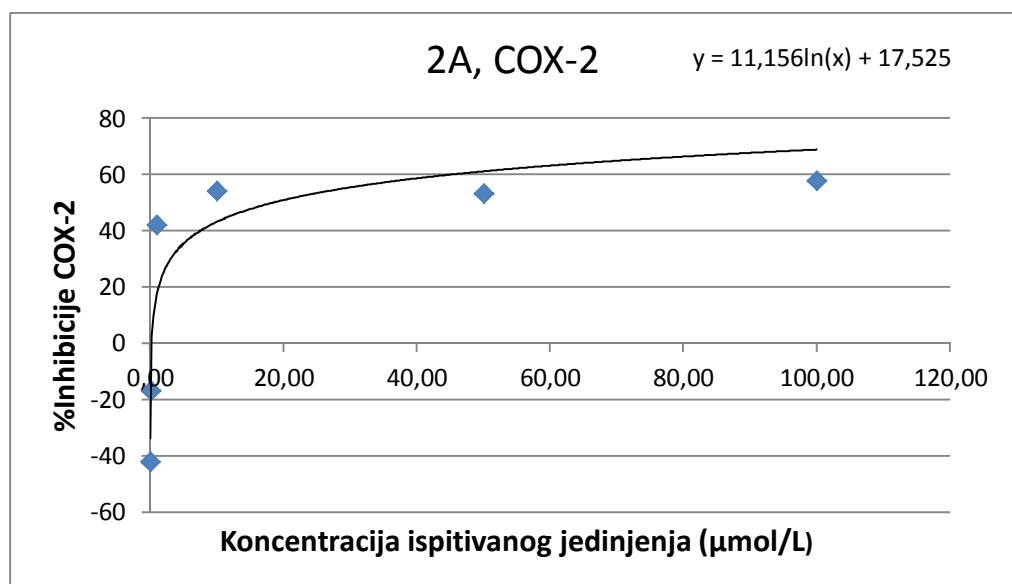
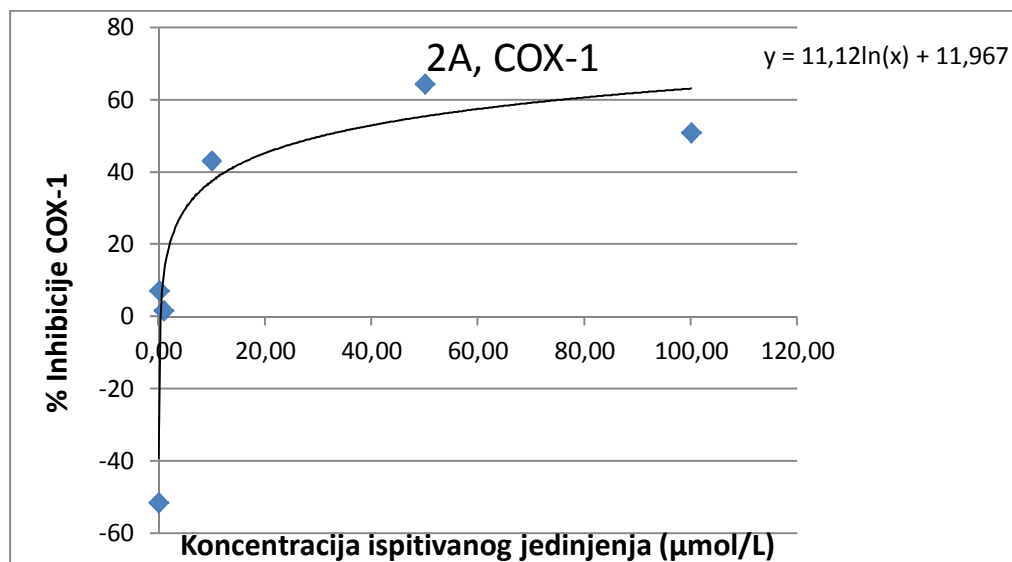


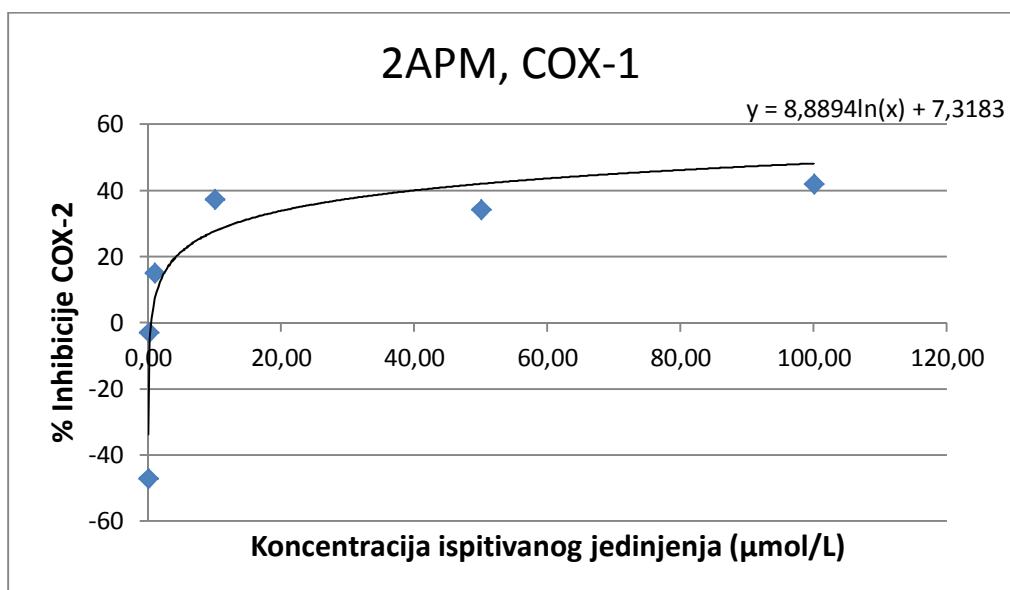
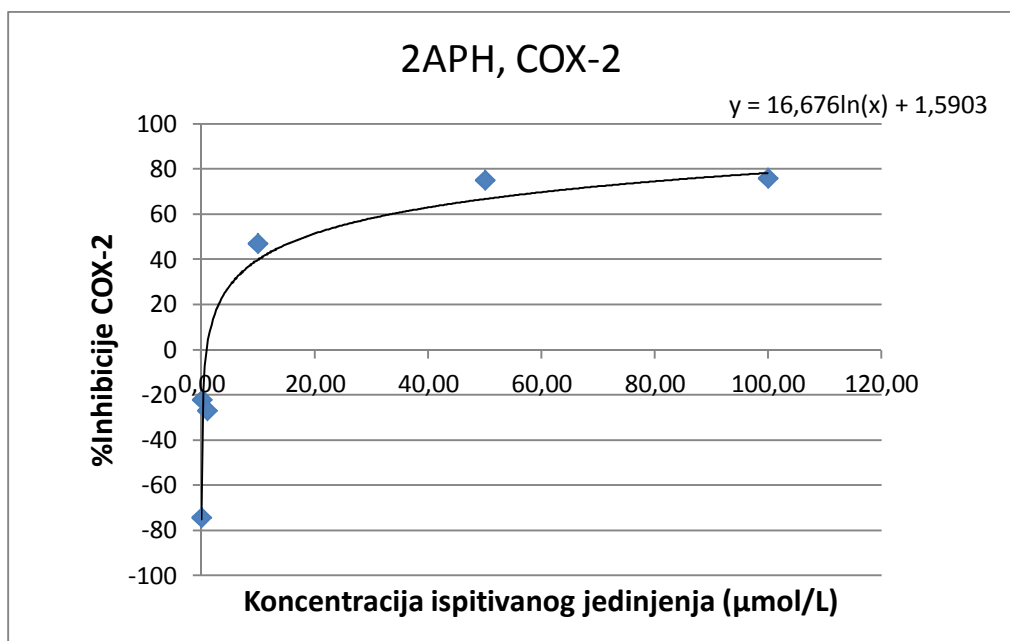
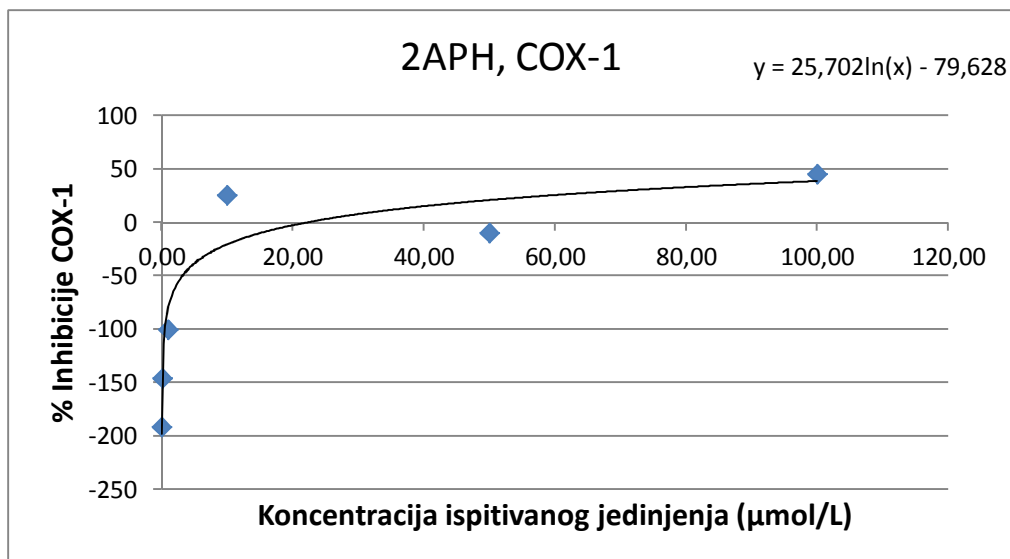
**Slika 28.** Shematski prikaz principa *COX Inhibitor Screening Assay Kit*

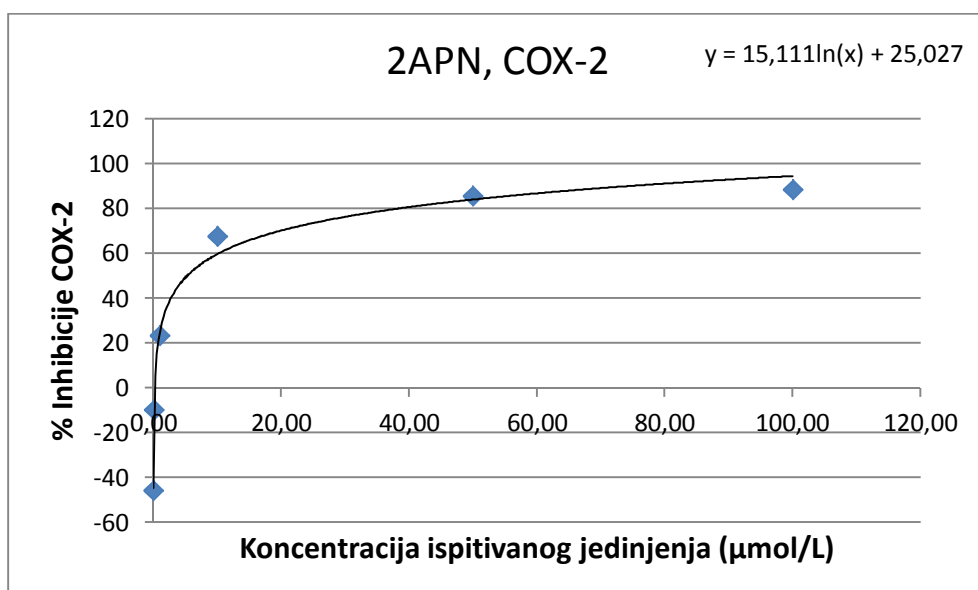
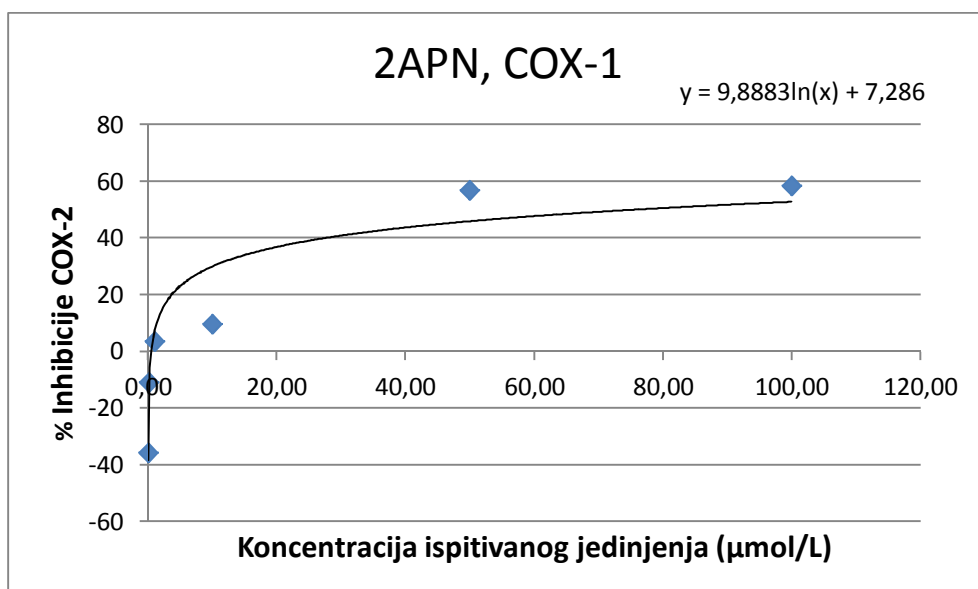
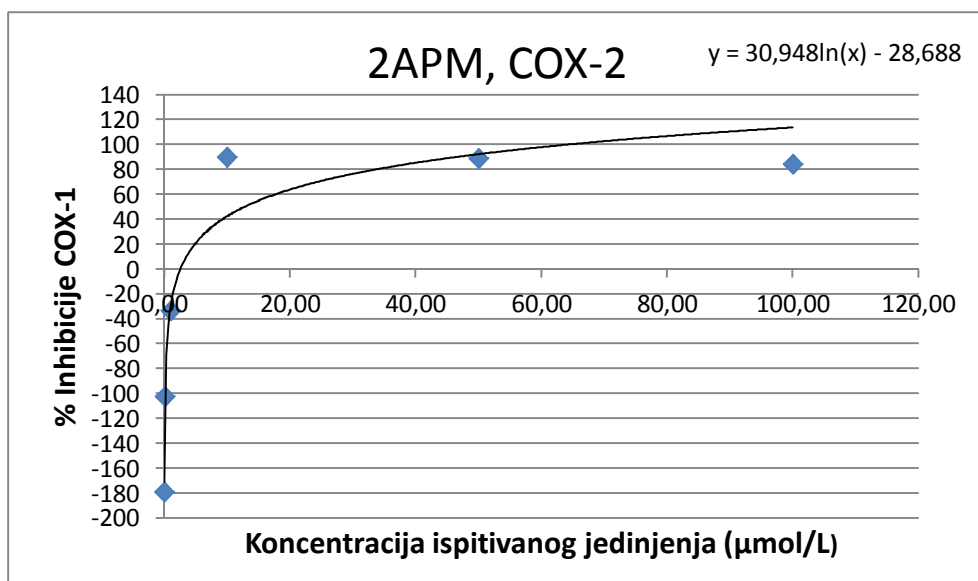
Izvor slike: <https://www.caymanchem.com/pdfs/560131.pdf>

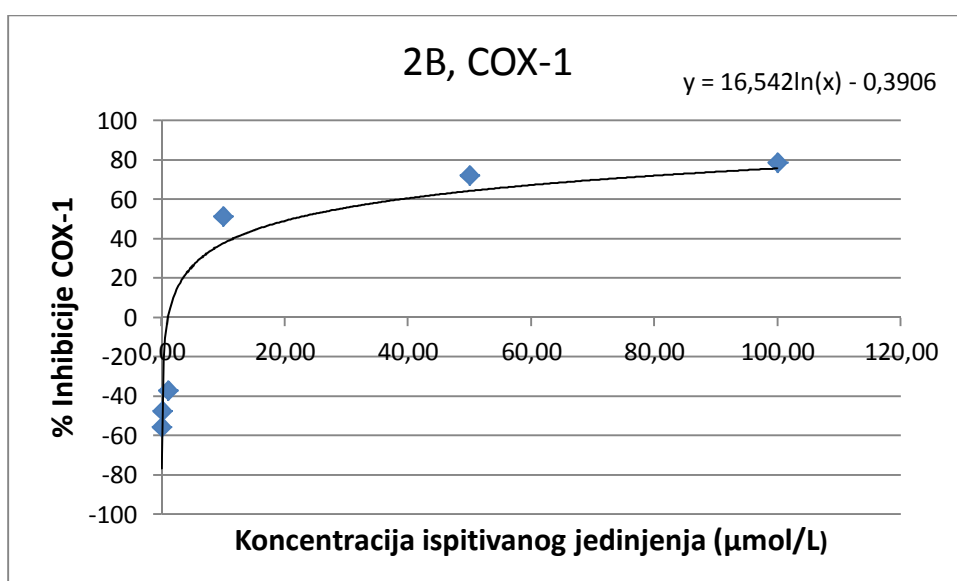
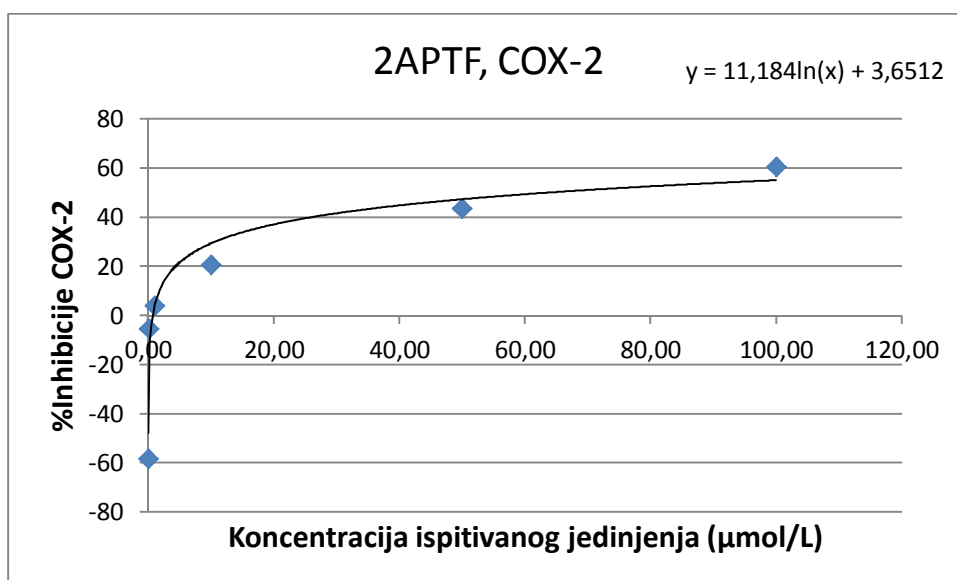
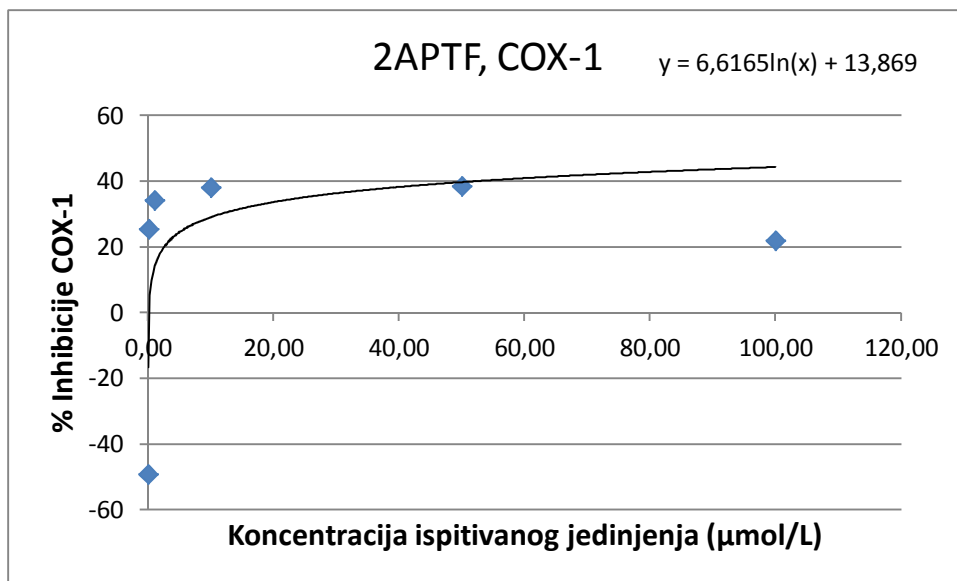
### 3.7.7. Rezultati *in vitro* ispitivanja inhibicije ciklooksigenaze

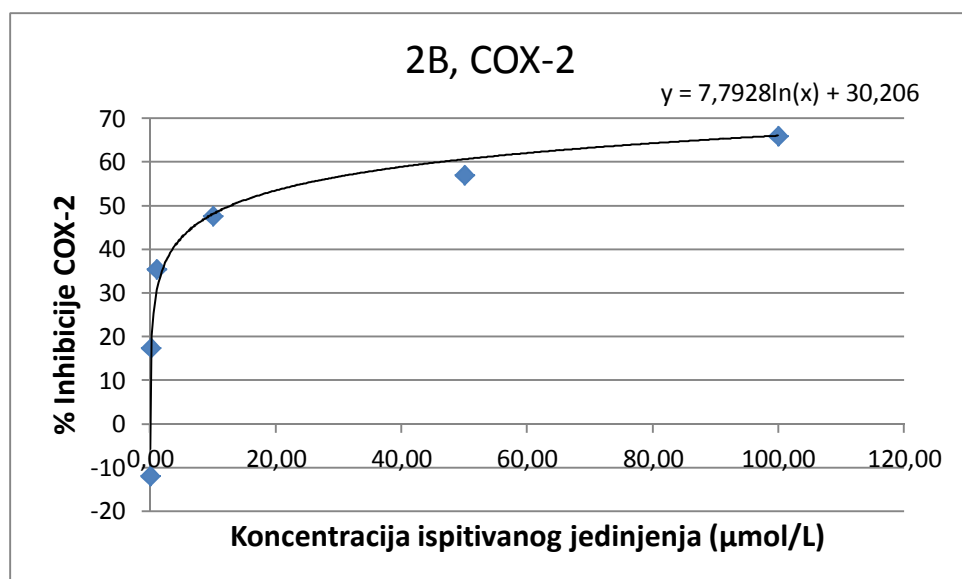
Na Slici 29 su prikazani dobijeni grafici zavisnosti procenta inhibicije COX-1 ili COX-2 od različitih koncentracija ispitivanog jedinjenja.











**Slika 29.** Inhibicija COX-1 i COX-2 sa različitim koncentracijama odabranih jedinjenja

Indeks selektivnosti se računa kao količnik  $IC_{50}$ , COX-1 i  $IC_{50}$ , COX-2 vrednosti. Rezultati indeksa selektivnosti za ispitivana jedinjenja su prikazani u Tabeli 34.

**Tabela 34.**  $IC_{50}$  vrednosti i indeks selektivnosti ispitivanih jedinjanja

Jedinjenje	$IC_{50}$ , COX-1 (µM)	$IC_{50}$ , COX-2 (µM)	Indeks selektivnosti
2A	30,569	18,357	1,665
2APH	154,93	18,228	8,500
2APM	121,63	12,713	9,568
2APN	327,013	5,217	62,680
2APTF	235,33	62,80	3,747
2B	21,031	12,67	1,670



## 4. DISKUSIJA

Neke od  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina, koje su poslužile za doking i *in vivo* ispitivanja, u svojoj strukturi sadrže fenilpropionsku kiselinu koja je deo hemijske strukture nesteroidnih antiinflamatornih lekova poput ibuprofena, ketoprofena, fenoprofena. Dilber i saradnici su 2007. godine sintetisali tri  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline (1A, 1B, 1C) i tri  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline (2A, 2B i 2C) čije su strukture i hemijski nazivi prikazani u Tabeli 2 (poglavljje 3.1.4.).<sup>86,101</sup> Ovi autori su odabrali jedinjenja 1A i 1C za *in vivo* testiranje kojim je pokazano da ispoljavaju antiinflamatorni efekat. Sintetisane  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline se međusobno razlikuju po supstituciji bočnog niza jednom ili dvema metil grupama, a ista je razlika i među derivatima  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline. Svih šest navedenih kiselina je odabrano za doking studije kako bi se ispitaio uticaj supstitucije alifatičnog niza jednom ili dvema metil grupama na inhibiciju enzima ciklooksigenaze. Drugi cilj doking studija je bio da se utvrdi da li bi bolji inhibitori ciklooksigenaze bili derivati buterne ili propionske kiseline i da se pretpostavi selektivnost prema inhibiciji COX-2.<sup>223</sup> Nakon doking studija sve pomenute kiseline su ispitane *in vivo* na eksperimentalnim životinjama.<sup>223</sup> Utvrđeno je da bolju antiinflamatornu aktivnost pokazuju derivati propionske kiseline i da je bolje da alifatični niz ne bude supstituisan metil grupom. Na osnovu ovih rezultata je odabrana struktura kiseline 2A kao osnova za modifikacije u cilju dobijanja novih kiselina (2APN, 2APTF, 2APH, 2APM, 2AMN, 2AMTF, 2AMH, 2AMM, 2ABPMX i 2ABPDMA) čije su strukture i hemijski nazivi prikazani u Tabeli 2 (poglavljje 3.1.4.). Ove kiseline su korišćene u doking studijama sa ciljem da se utvrdi uticaj supstituenta na benzenovom prstenu na antiinflamatornu aktivnost i da se proceni selektivnost prema COX-2. U kiselinama 2ABPMX, 2ABPDMA benzenovi prstenovi su bis-supstituisani metoksi i dimetilamino supstituentima, što ih čini ahiralnim jedinjenjima.

Iz izvedenih doking eksperimenata može se očitati energija vezivanja (Tabela 3, (poglavljje 3.1.4.), najpovoljnije prostorne orijentacije liganda (ispitivane kiseline) za COX-1 i COX-2 i mogu se razmotriti interakcije koje su ostvarene u najpovoljnijem molekulskom kompleksu liganda i enzima.

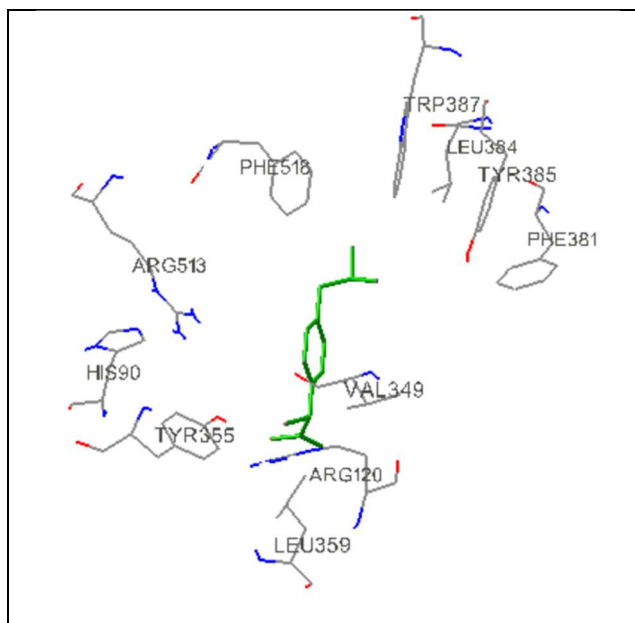
Najniže energije vezivanja u aktivnom mestu COX-1 imaju S enantiomer jedinjenja 2AMN (-9,11 kcal/mol) i R enantiomer jedinjenja 2APN (-8,82 kcal/mol), a najvišu S enantiomeri jedinjenja 2APTF (-6,63 kcal/mol) i 2AMTF (-7,01 kcal/mol). Doking proračuni su predvideli najpovoljniju energiju vezivanja ibuprofena za COX-1 sa devijacijom srednje vrednosti kvadratnog korena (RMSD) od 1,40 Å u odnosu na konformaciju dobijenu iz kristalografskih struktura. Na ovaj način je ispunjen uslov da je  $RMSD < 2 \text{ \AA}$ , što potvrđuje da je metod validan.

Ako posmatramo vezivanje jedinjenja u aktivnom mestu COX-2, najnižu energiju imaju jedinjenje 2ABPDMA (-8,86 kcal/mol) i R enantiomer jedinjenja 1A (-8,31 kcal/mol), a najvišu S enantiomer jedinjenja 2AMM (-6,82 kcal/mol). Najpovoljnija energija vezivanja za jedinjenje SC-558 ima devijaciju od 1,38 Å u odnosu na konformaciju dobijenu iz kristalografskih struktura što potvrđuje da je metod validan.

Među enantiomerima nema značajne razlike u energiji vezivanja i vrlo je slična njihova orijentacija u aktivnom mestu kako COX-1, tako i COX-2. Sve interakcije sa ključnim aminokiselinama se ostvaruju kod oba enantiomera. Za dalja razmatranja interakcija sa odgovarajućim aminokiselinama u aktivnom mestu odabran je R enantiomer zbog toga što je u slučaju jedinjenja sa supstituisanim benzenovim prstenom taj prsten imao sličnu orijentaciju kao i bromfenil prsten selektivnog inhibitora SC-558.

Sva analizirana jedinjenja uključujući i ibuprofen preko karboksilne grupe ostvaruju interakcije sa ključnim aminokiselinama u P<sub>1</sub> regionu COX-2: jonske interakcije sa gvanidino grupom *Arg120* i vodoničnu vezu sa hidroksilnom grupom *Tyr355*. Najjaču interakciju sa *Arg120* ostvaruje jedinjenje 2APN (1,806 Å), a najslabiju ostvaruje jedinjenje 2C (2,94 Å). Najjaču interakciju sa *Tyr355* ostvaruje jedinjenje 2APTF (1,729 Å), a najslabiju 1C (4,9 Å). Bez obzira na razlike u jačini interakcija među ispitivanim jedinjenjima, može se reći da sva dokovana jedinjenja ostvaruju jake interakcije u regionu P<sub>1</sub> jer su sva rastojanja manja od 5 Å. Sva jedinjenja ostvaruju značajne interakcije sa najvažnijim aminokiselinama u hidrofobnom kanalu P<sub>2</sub> (*Leu352*, *Tyr385*, *Trp387*, *Phe518*, *Gly526*, *Ser530*), što ih dodatno stabilizuje u aktivnom mestu enzima. Jedinjenja zauzimaju ovaj kanal svojim bočnim nizom i jednim od benzenovih prstenova.

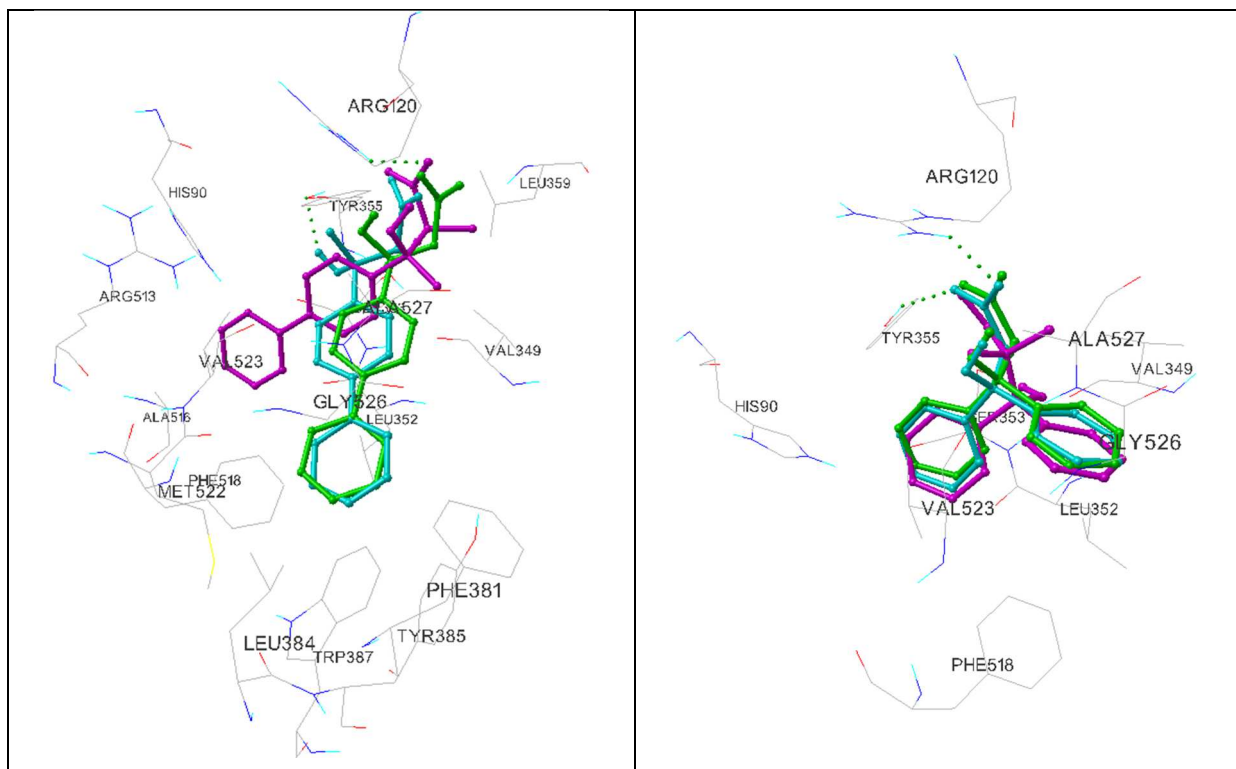
Postoje ključne razlike u ostvarivanju interakcija u regionu P<sub>3</sub> (*His90*, *Arg513*, *Phe518*) koji je važan za selektivnost. Ibuprofen ne ostvaruje značajne interakcije u ovom regionu (Slika 30), čime se može objasniti neselektivnost ibuprofena prema inhibiciji ciklooksigenaze.



**Slika 30.** Najstabilnija konformacija ibuprofena u aktivnom mestu COX-2

Jedinjenja 1A, 1B i 1C koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline ne mogu da prodru duboko u ovaj region (Slika 31, levo). Ove kiseline ostvaruju van der Waalsove interakcije preko metil grupe sa aminokiselinama *Ser353* i *Val349* koje se nalaze u regionu  $P_2$ .

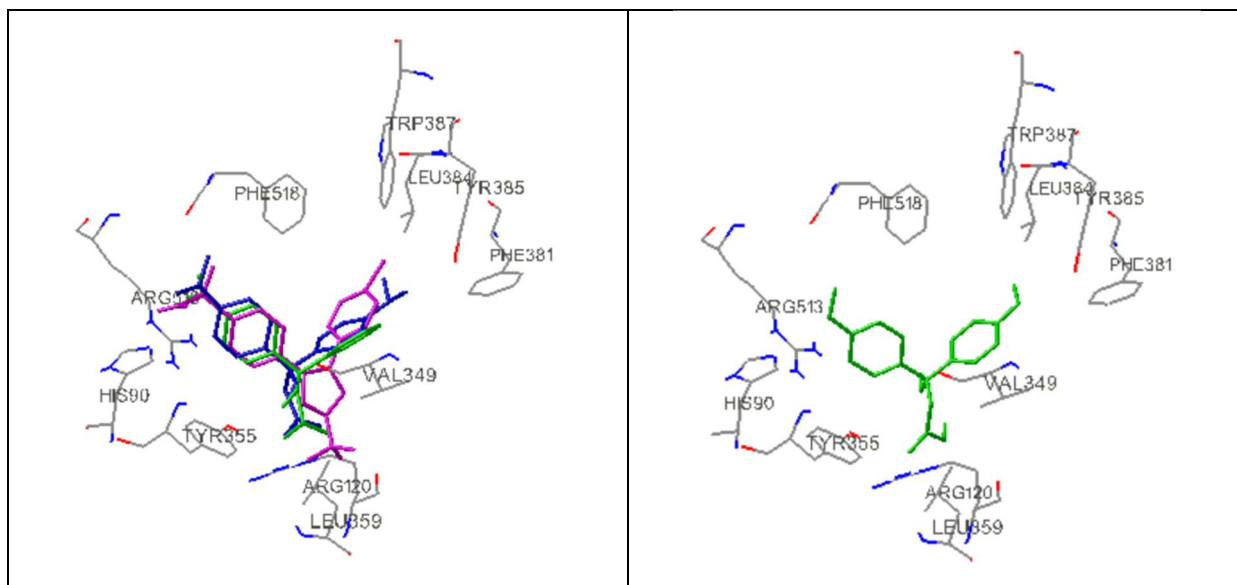
Jedinjenja koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline mogu dublje da prodru u region  $P_3$  (Slika 31, desno) i ostvare više bliskih interakcija sa ključnim aminokiselinama u ovom regionu, tako da se od njih očekuje veća selektivnost prema COX-2. Ta jedinjenja poseduju takvu strukturu koja u aktivnom mestu ciklooksigenaze mogu da zauzmu formu obrnutog slova Y i jedan od benzenovih prstenova može da ostvari interakcije u regionu  $P_3$ .



**Slika 31.** Levo: Najpovoljnije konformacije jedinjenja 1A (zelena), 1B (plava) i 1C (ljubičasta) u aktivnom mestu COX-2; Desno: Najpovoljnije konformacije jedinjenja 2A (plava), 2B (zelena), 2C (ljubičasta) u aktivnom mestu COX-2

Supstitucija bočnog alifatičnog niza jednom ili dvema metil grupama nepovoljno utiče na vezivanje jedinjenja u aktivnom mestu kako COX-1 tako i COX-2 zbog toga što udaljava karboksilnu grupu od *Arg120*.

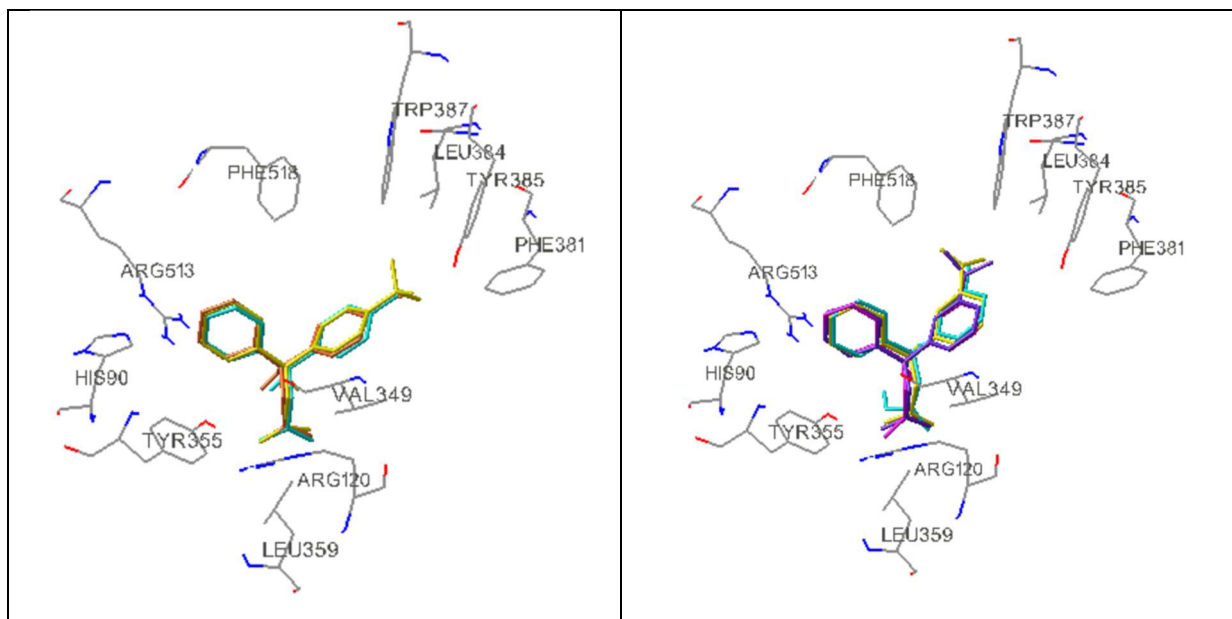
Jedinjenja 2APN i 2ABPDMA u ovaj region prodiru svojim supstituisanim prstenom i ostvaruju hidrofilne ( $\pi \rightarrow$ katjon) interakcije sa aminokiselinama *His90*, *Gln192* i *Arg513*. Ove kiseline ostvaruju bliskije interakcije nego ostale sa ključnim aminokiselinama, kao što se vidi u Tabeli 4 (poglavlje 3.4.1). Njihova orijentacija je slična kao i kod selektivnog inhibitora SC-558 (Slika 32 levo). Od ovih jedinjenja se očekuje veća selektivnost prema inhibiciji COX-2 nego od ostalih.



**Slika 32.** Levo: Najpovoljnije konformacije jedinjenja 2ABPDMA (plava), 2APN (zelena) i SC-558 (roze) u aktivnom mestu COX-2; Desno: Najpovoljnije konformacije jedinjenja 2ABPMX (zeleno) u aktivnom mestu COX-2

Jedinjenje 2ABPMX takođe prodire jednim od svoja dva supstituisana benzenova prstena u hidrofilni bočni kanal (Slika 32, desno), ali njihove interakcije sa ključnim aminokiselinama nisu toliko jake s obzirom na nepolarnu prirodu njihovih supstituenata (Tabela 4).

Sva ostala jedinjenja koja nemaju polarne supstituente (2APTF, 2APH, 2APM, 2AMTF, 2AMH, 2AMM) u ovaj region prodiru svojim nesupstituisanim prstenom (Slika 33). Jedinjenje 2AMN ima polarnu nitro grupu u meta položaju, ali u ovaj bočni džep ne prodire tim supstituisanim prstenom, već nesupstituisanim.



**Slika 33.** Levo: Najpovoljnije konformacije jedinjenja 2APTF (žuta), 2APH (narandžasta) i 2APM (svetlo plava) u aktivnom mestu COX-2; Desno: Najpovoljnije konformacije jedinjenja 2AMTF (ljubičasta), 2AMH (roze), 2AMM (plava) i 2AMN (žuta) u aktivnom mestu COX-2

Molekulska zapremina određuje transportne karakteristike molekula i ima uticaj na intestinalnu apsorpciju ili penetraciju kroz krvno-moždanu barijeru. Zbog toga se ovaj parametar često koristi u QSAR studijama za modelovanje karakteristika molekula ili biološke aktivnosti. Aktivno mesto COX-2 ima veću zapreminu od aktivnog mesta COX-1, tako da selektivniji COX-2 inhibitori moraju imati i veću molekulska zapreminu od neselektivnih.<sup>34</sup>

Različite metode mogu biti korišćene za računanje molekulske zapremine i mogu uključivati 3D molekulska geometriju ili doprinos pojedinačnih fragmanta kao što je McGowan aproksimacija volumena. Molekulska zapremina se može izračunati u programima MarvinSketch ili Molinspiration.

Metod za računanje molekulske zapremine koji je razvijen u programu Molinspiration se bazira na podešavanju doprinosa pojedinačnih grupa realnom 3D volumenu za trening set koji se sastoji od 12000 jedinjenja koja su većinom lekovi. 3D molekulske strukture za trening set su optimizovane semiempirijskom AM1 metodom.

Molekulske zapremine izračunate u programu Molinspiration su nešto veće u poređenju sa molekulska zapreminama u programu MarvinSketch (Tabela 5). Razlog za to može da bude različit način izračunavanja molekulska zapremina u ova dva softvera, ali i činjenica da su u drugom slučaju korišćeni dokovani molekuli u najboljoj prostornoj

orijentaciji u aktivnom mestu COX-2. Može se smatrati da ovaj način izračunavanja molekulske zapremine pruža pouzdanije rezultate.

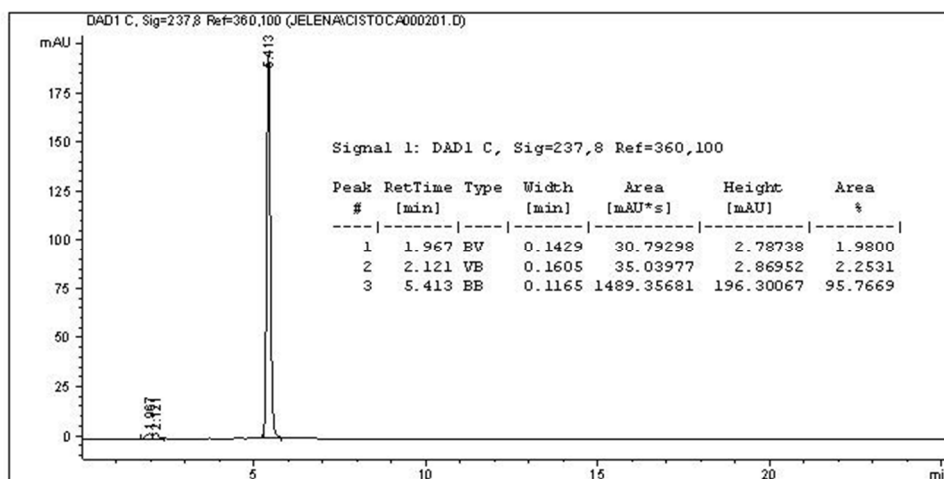
MarvinSketch računa molekulske zapremine tako što uzima u obzir sfere sa van der Waalsovom prečnikom u čijem centru je centar atoma, sabere volumene svih sfera i od njih oduzme deo sfera susednih atoma u molekulu koje se preklapaju.

Najmanju molekulsku zapreminu ima jedinjenje 2A (247,71 Å<sup>3</sup>, MarvinSketch). I ova najniža vrednost ispunjava uslov da je veća za minimalno 15 Å<sup>3</sup> u odnosu na ibuprofen (175,90 Å<sup>3</sup>, MarvinSketch) što je još jedan pokazatelj da bi sva dokovana jedinjenja mogla da budu u izvesnoj meri selektivnija za inhibiciju COX-2.

Rezultati doking studija i izračunavanja molekulskih zapremina su pokazali da se od derivata β-hidroksi-β,β-difenilpropionske kiseline očekuje selektivnost prema inhibiciji COX-2, tako da su ti derivati odabrani za sintezu. Sintetisano je sedam derivata β-hidroksi-β,β-difenilpropionske kiseline modifikovanom Reformatski reakcijom (Slika 12, poglavlje 3.2.7). Modifikacija Reformatski reakcije koja se, za razliku od klasične Reformatski reakcije, sastojala iz dve faze je publikovana u radu Dilber i saradnika.<sup>101</sup>

Prema ovoj modifikaciji, u prvoj fazi se sintetišu α-bromoalkil 1-etoksiestri iz α-bromosirćetne kiseline i etilvinil-etra. Druga faza predstavlja reakciju između sintetisanih intermedijera i odgovarajućeg ketona ili aldehida uz hlađenje na -5 °C tokom prvih nekoliko sati, a zatim postepeno povišenje temperature do sobne u atmosferi inertnog gasa. Na ovaj način su sintetisane kiseline 1A, 1B, 1C, 2A, 2B i 2C.<sup>101</sup> Za neke od ovih kiselina reakcija je trajala i više od 15 dana, pa je, pre svega, u cilju skraćanja vremena trajanja reakcionog smeša u drugoj fazi zagrevana do refluksa tetrahidrofurana (65 °C). To je rezultiralo skraćanjem vremena trajanja reakcije na 17-24 h i povećanjem prinosa. Jedinjenja su bila znatno čistija posle ovako skraćenog vremena sinteze, pa je na HPLC hromatogramu detektovana čistoća od preko 90% (Slika 34). Na ovaj način su sintetisana jedinjenja 2APN, 2APTF, 2APH, 2APM, 2AMTF, 2AMH i 2AMM.<sup>224</sup> Višestrukom prekrizacijom iz toluena bilo je moguće dobiti jedinjenja čistoće iznad 99%.





**Slika 34.** Hromatogram jedinjenja 2AMM bez prečišćavanja

Čistoća jedinjenja je proveravana TLC metodom. Na TLC pločici su se izdvajale dve dominantne mrlje elipsastog oblika: jedna mrlja koja potiče od sintetisanog jedinjenja ( $R_f=0,35-0,40$ ) i jedna od polaznog ketona ( $R_f=0,7-0,8$ ). Nakon nekoliko prekrizacija, kada više nije bilo moguće vizuelno detektovati bilo kakve nečistoće na TLC pločici, čistoća jedinjenja je proveravana HPLC metodom. Odabrana je talasna dužina detekcije od 237 nm jer na toj talasnoj dužini podjednako apsorbuju i polazno i sintetisano jedinjenje, a polazno jedinjenje je bilo i dominantna nečistoća. Najniži prinos je dobijen u reakciji sinteze jedinjenja 2APN (24%), a najviši u sintezi jedinjenja 2APH (72%).

U literaturi su pronađeni navodi o sintezi jedinjenja 2APN, 2APTF i 2APH,<sup>225,226</sup> ali bez hemijske karakterizacije. U poglavlju 3.3.1.2. su dati njihovi CAS brojevi i prikazani su rezultati potpune fizičko-hemijske karakterizacije.

Prethodno je utvrđeno da na brzinu reakcije utiče oblik čestica cinka i da se reakcija brže odvija sa cinkom u obliku ljuspica nego sa cinkom u prahu, tako da je u skladu sa ovim zaključkom korišćen cink u obliku ljuspica. Jedinjenja 2ABPDMA, 2ABPMX i 2AMN nije bilo moguće sintetisati na ovaj način. Postoje literaturni podaci o korišćenju drugih metala u sintezi umesto cinka koji su se pokazali efikasnim kao što su kadmijum,<sup>227</sup> nikel,<sup>228</sup> cerijum,<sup>229</sup> magnezijum<sup>230</sup> ili indijum.<sup>231,232</sup> Zbog toga je za sintezu nabrojanih jedinjenja upotrebljen indijum u prahu uz dodatak živa(II)-hlorida i joda kao katalizatora, najpre na sobnoj temperaturi, a zatim uz zagrevanje na 65-69 °C, ali bez uspeha.

Pokušana je dodatna aktivacija cinka Knochel-ovom metodom uz pomoć trimetilsililhlorida (TMSCI),<sup>233</sup> ali takođe bez uspeha. Ova jedinjenja nije bilo moguće sintetisati ni klasičnom Reformatski reakcijom iz etil-bromoacetata.

Mase novosintetisanih jedinjenja su određene metodom kuplovane tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom preciznih masa (LCMS-TOF).

MS-MS analiza uz primenu triplkvadrupolskog masenog spektrometra izvršena je za sva jedinjenja da bi se uz pomoć fragmentacije dodatno potvrdila struktura novosintetisanih jedinjenja. Sve kiseline su praćene u negativnom modu ( $M^{-1}$ ). Za sva sintetisana jedinjenja karakteristična je  $\beta$  fragmentacija i pojava fragmenta  $m/z$  vrednosti 59 koji potiču od  $CH_2-COOH$ .

Nakon sinteze i strukturne karakterizacije jedinjenja, u cilju dalje fizičko-hemijske karakterizacije određene su konstante jonizacije jedinjenja.  $pK_a$  vrednosti su određene za sve  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilakanske kiseline osim za kiselinu 1B koja je smeša dijastereoizomera, a koji su se razdvajali na hromatogramu sa nekom od korišćenih mobilnih faza. Korišćena je metoda reverzno fazne tečne hromatografije (RP-HPLC). Originalna metoda koju su postavili Oumada i saradnici<sup>142</sup> je modifikovana tako da su četiri korišćena pufera zamenjena trima novim puferima. Umesto citratnih pufera korišćeni su fosfatni i acetatni puferi u različitim odnosima (0,005 mol/L  $H_3PO_4$  + 0,005 mol/L  $KH_2PO_4$ , 0,007 mol/L  $CH_3COOH$  + 0,003 mol/L  $CH_3COONa$ , 0,007 mol/L  $KH_2PO_4$  + 0,003 mol/L  $Na_2HPO_4$ ). Korišćene mobilne faze pokrivaju pH opseg od 3,126 do 8,679 (Tabela 7, poglavlje 3.4.1.4). pH vrednosti svih mobilnih faza su kompatibilne sa korišćenom kolonom, a jonska jačina pufera je relativno mala (0,01 mol/L).

Stacionarnu fazu predstavlja silika gel modifikovan ugljovodoničnim lancima (C18). Na površini C18 kolone postoje neke nedomifikovane silanolne grupe koje mogu da interaguju sa organskom komponentom mobilne faze preko dipol-dipol interakcija ili vodoničnih veza. Verovatnoća ostvarivanja takvih interakcija zavisi od organskog rastvarača koji se koristi, njegovih elektronskih svojstava i sposobnosti za građenje vodoničnih veza.<sup>234</sup> Sadržaj organskog rastvarača metanola je relativno visok u mobilnoj fazi, kako retenciona vremena ne bi bila preduga. Prednost upotrebe metanola je što povećava rastvorljivost mnogih organskih jedinjenja. Takođe, metanol ima i relativno visoku dielektričnu konstantu što sprečava formiranje jonskih parova pod uslovom da nisu previsoke koncentracije rastvora.

Rezultat za  $pK_a$  vrednost ibuprofena koji su dobili Oumada i saradnici iznosi 4,30.<sup>142</sup> Rezultat koji je dobijen u ovom radu je 4,27, a pošto je vrlo blizak rezultatu Oumada i saradnika, može se smatrati da je potvrđena ponovljivost metode. Sva ispitivana jedinjenja uključujući i ibuprofen imaju kiselu karboksilnu grupu u strukturi. Ova jedinjenja se mogu

posmatrati kao derivati hidroksipropionske kiseline, pa se tako mogu objasniti niže  $pK_a$  vrednosti nego za ibuprofen koji je derivat propionske kiseline.

Sve ispitivane kiseline imaju slične  $pK_a$  vrednosti koje su u opsegu od 3,40 do 3,75 (Tabela 8, poglavlje 3.4.1.8). Ako se uporede parovi položajnih izomera (2APTF i 2AMTF, 2APH i 2AMH, 2APM i 2AMM) može se videti da položaj supstituenta (*meta* ili *para*) nema značajan uticaj na konstantu jonizacije, što je i očekivano. Tip supstituenta na benzenovom prstenu (nitro, trifluorometil, hloro, metil) takođe nema uticaja na  $pK_a$  zbog toga što karboksilna grupa nije direktno vezana za taj benzenov prsten već je povezana preko dva  $sp^3$  hibridizovana ugljenikova atoma tako da se efekti ovih supstituenata na jonizaciju karboksilne grupe ne ispoljavaju. Supstitucija bočnog lanca jednom ili dvema metil grupama nema uticaja na protonaciju tako da nema značajne razlike u  $pK_a$  vrednostima između jedinjenja 1A i 1C koji su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline, ni među jedinjenjima 2A, 2B i 2C koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difetilpropionske kiseline. Najnižu  $pK_a$  vrednost ima kiselina 2A.

$pK_a$  vrednosti sintetisanih jedinjenja su predviđene programima MarvinSketch i ACD/I-Labs i prikazane u Tabeli 8. Dobijena je niska korelacija između predviđenih  $pK_a$  vrednosti u programu MarvinSketch i eksperimentalno određenih vrednosti ( $R^2=0,3126$ ). Eksperimentalni rezultati se nalaze u opsegu  $pK_a$  koji je predvideo program ACD/I-Labs, ali je problem što je opseg predviđenih  $pK_a$  vrednosti preširok. Ovi programi se ne mogu koristiti za predviđanje  $pK_a$  vrednosti ovog tipa jedinjenja. Nije neuobičajen slučaj da računarski programi ne mogu adekvatno da predvide  $pK_a$  vrednosti za nova jedinjenja jer koriste algoritme koji su bazirani na fragmentima.

Često se u literaturi za jedan lek mogu naći različite vrednosti  $pK_a$  koje se mogu međusobno znatno razlikovati. Tako se za ibuprofen u zavisnosti od korišćene metode može naći čak 8 različitih navoda  $pK_a$  vrednosti. Neke od tih vrednosti su: 4,45 (potenciometrijska metoda),<sup>235</sup> 4,43 (kapilarna elektroforeza)<sup>236</sup> 4,24 (spektrofotometrijska metoda)<sup>237</sup> 4,51 (potenciometrijska metoda)<sup>238</sup> 4,31 (spektrofotometrijska metoda).<sup>239</sup> Postoje i mnogo drastičniji primeri lekova od ibuprofena kod kojih se eksperimentalno određene  $pK_a$  vrednosti razlikuju i za dve jedinice kao što to je slučaj sa losartanom. Razloge za ovoliko variranje  $pK_a$  vrednosti treba tražiti u različitom odabiru eksperimentalnih uslova i matematičkog modela za izračunavanje iz sirovih podataka. Iz navedenih primera je jasno da je osim pažljivog odabira eksperimentalnih uslova pod kojima se određuje  $pK_a$ , neophodan i kritički osvrt na čitav postupak određivanja i izračunavanja da bi se dobili pouzdani rezultati. Eksperimentalni uslovi na koje posebno treba obratiti pažnju su: temperatura, jonska jačina i sastav rastvarača.<sup>240</sup> U metodi koja je korišćena za određivanje  $pK_a$  vrednosti  $\beta$ -hidroksi-

$\beta$ -arilakanskih kiselina jonska jačina rastvarača je 0,01 mol/L i njen uticaj na konstantu jonizacije je neznatan.<sup>142</sup> Temperatura na kojoj se podešava pH vrednost mobilne faze je 25 °C. Pri mešanju metanola sa puferom dolazi do blagog zagrevanja rastvora, pa je pre podešavanja pH mobilne faze temperatura kontrolisana termometrom i korigovana ukoliko je bilo potrebno.

Konstante jonizacije imaju veliki uticaj na apsorpciju leka u gastrointestinalnom traktu. Procenat slabe kiseline koji je dostupan za apsorpciju se može izračunati ukoliko je poznata pH vrednost na mestu administracije leka. Odnos između pH i  $pK_a$  je dat Henderson-Hasselbalch jednačinom (16):

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

jednačina 16

Na osnovu ove jednačine se može izračunati da varijacija u  $pK_a$  vrednosti od 0,05 koja se može činiti neznatnom, zapravo dovodi do promene u stepenu jonizacije slabe kiseline ili baze od 10,9 % pri određenoj konstantnoj vrednosti pH. Ovolika razlika u stepenu jonizacije može da utiče na apsorpciju, distribuciju, metabolizam, vezivanje za proteine plazme ili interakcije sa receptorom.

Korišćenjem ove jednačine može se izračunati da će na pH vrednostima koje su 2 pH jedinice iznad  $pK_a$  vrednosti 99 % jedinjenja biti jonizovano. U tom slučaju se očekuje da apsorpcija jedinjenja bude loša. Dobro je poznato da se najveći deo apsorpcije mnogih jedinjenja odvija u tankom crevu. Normalne pH vrednosti u tankom crevu su između 5 i 8. Na ovim pH vrednostima će sva sintetisana jedinjenja biti skoro potpuno jonizovana i to će pogoršati pasivan transport kroz membranu tankog creva tako da se u ovom delu gastrointestinalnog trakta očekuje loša apsorpcija.<sup>10</sup> Sintetisana jedinjenja će biti u molekulskom obliku na pH vrednostima koje su u želucu (obično pH=1,5-2). Želudac nije apsorptivni organ, pa se tu ne očekuje značajna apsorpcija bilo kog leka. Međutim, u slučaju ibuprofena doza koja se apsorbuje u želucu nije zanemarljiva.<sup>241</sup> S obzirom na to da sve kiseline imaju niže  $pK_a$  vrednosti nego ibuprofen, očekuje se da imaju i nižu apsorpciju od ibuprofena. Kada se izračuna procenat jonizacije na osnovu jednačine 16 dobija se 1,253 % za jedinjenje 2A sa najnižom  $pK_a$  vrednošću, a 0,170 % za ibuprofen. U oba slučaja je procenat jonizacije vrlo nizak i razlika među njima neće imati značajan uticaj na apsorpciju koja bi se eventualno odigrala u želucu.

Lipofilnost  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilakanskih kiselina je procenjena određivanjem particionog koeficijenta ( $\log P$ ) primenom reverzno-fazne tečne hromatografije (RP-HPLC). Ispitivana jedinjenja su kiseline čije su  $pK_a$  vrednosti u intervalu od 3,40 do 3,75 i na pH vrednosti mobilne faze koja iznosi 3, značajan deo jedinjenja je jonizovan. Poznato je da je za jonizujuća jedinjenja neophodno da se obezbede uslovi gde je pH bar za jednu jedinicu niža od  $pK_a$  vrednosti kako bi se direktno određivao  $\log P$ .<sup>242</sup>

Silika gel modifikovan C18 ugljovodoničnim lancima u hromatografskoj koloni je predstavljao stacionarnu fazu. Nemodifikovane silanolne grupe mogu da stupe u interakcije sa molekulima organske komponente mobilne faze (vodonične veze, dipol-dipol interakcije). Mogućnost uspostavljanja ovih interakcija, kao i njihov stepen zavisi od elektronskih svojstava i mogućnosti građenja vodoničnih veza upotrebljene organske komponente. U nizu organskih rastvarača koji se koriste u određivanju  $\log P$ , metanol ima značajne prednosti kao što su najmanja eluciona moć na oktadecil modifikovanom silika-gelu i najmanja moć sorpcije.<sup>243</sup> *n*-Oktanol koji je dodat u mobilnu fazu se ponaša kao blago maskirajući agens i redukuje sekundarne interakcije nastale preko slobodnih silanolnih grupa. Autori Benhaim i Grushka<sup>155</sup> su pokazali da dodatak *n*-oktanola u mobilnu fazu poboljšava linearnu korelaciju između  $\log P$  vrednosti neutralnih rastvora i njihovih ekstrapolisanih  $\log K_w$  vrednosti.

Dobijeni rezultati za  $\log P$  ispitivanih jedinjenja su prikazani u Tabeli 10 (poglavlje 3.4.2.8) i nalaze se u uskom opsegu od 3,195 (2B) do 3,847 (2C). Među položajnim izomerima (*meta* ili *para*) nema značajne razlike u vrednosti  $\log P$ , tako da jedinjenja 2APTF i 2AMTF sa najlipofilnijim supstituentima imaju  $\log P$  vrednosti 3,773 i 3,718. Položajni izomeri sa hlorom 2APTF i 2AMTF imaju  $\log P$  vrednosti 3,530 i 3,526, a položajni izomeri sa metil grupom 2APM i 2AMM 3,269 i 3,233. Što se tiče uvođenja metil grupe u bočni niz kod jedinjenja koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline dolazi do povećanja vrednosti  $\log P$ . Dijastereoizomeri jedinjenja 1B su bili potpuno razdvojeni u svakom hromatogramu za svaku od korišćenih mobilnih faza, tako da je bilo moguće izračunati  $\log P$  pojedinačno za svaki dijastereoizomer. Uvođenjem metil grupe u bočni niz derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline dolazi do povećanja vrednosti  $\log P$ .

Pomoću četiri računarska programa su predviđene vrednosti  $\log P$  i najbolja korelacija sa eksperimentalnim rezultatima je dobijena korišćenjem programa KOWWIN ( $R^2=0,8864$ ). Korelacija eksperimentalnih rezultata sa predviđenim uz pomoć programa ALOGPS je bila nešto lošija ( $R^2=0,8336$ ), a najlošija korelacija je bila sa predviđenim rezultatima u programu MarvinSktech ( $R^2=0,3398$ ).

Adekvatni fizičko-hemijski parametri kao što su  $pK_a$  i  $\log P$  ne garantuju adekvatne biofarmaceutске osobine, tako da bi njih takođe trebalo proceniti odgovarajućim metodama. Za procenu apsorpcije  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilakanskih kiselina u tankom crevu u odnosu na ibuprofen korišćen je PAMPA test.<sup>244</sup> Membrana koja je korišćena u ovom testu se sastoji iz lecitina jajeta čiji je sadržaj 60% i predstavlja jednkomponentnu membranu. To je najjednostavniji tip membrane. Postoje i dvokomponentne i trokomponentne membrane različitog sastava,<sup>245-247</sup> a moguće je sintetisati i pojedina fosfolipidna jedinjenja kako bi se dobile veštačke membrane koje bi što bolje imitirale biološke membrane.<sup>248</sup>

Temperatura na kojoj se sistem inkubira je važan faktor u PAMPA testu, ukoliko se želi što preciznija procena gastrointestinalne apsorpcije. Prema istraživanju Vizserálek i saradnika, uticaj temperature je veći u PAMPA testu za kožu nego u testovima za gastrointestinalnu apsorpciju ili krvno-moždanu barijeru.<sup>249</sup>

Odabrano vreme inkubacije od 17 h je optimalno jer tada većina lekova dostiže maksimum %T i nema povratne difuzije u donorsku ćeliju.

Za procenu apsorpcije  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina u tankom crevu odabrani su najjednostavniji PAMPA uslovi (jednokomponentna membrana, izokraski pH, sobna temperatura). Ovi uslovi su adekvatni s obzirom da je cilj bio poređenje permeacije sintetisanih jedinjenja sa permeacijom ibuprofena. Za predviđanje tačnih vrednosti apsorpcije jedinjenja u gastrointestinalnom traktu trebalo bi upotrebiti složeniji PAMPA sistem.

U intestinalnom traktu pH varira od 5,5 do 8.<sup>10</sup> Kiseo pH je u delu tankog creva koje se neposredno nastavlja na želudac i u kome se hrana kratko zadržava. Smatra se da veći deo tankog creva ima baznu pH. Međutim, neka istraživanja pokazuju da površine enterocita imaju kiselu mikrosredinu čiji je pH od 5,2 do 6 u proksimalnom jejunumu i kreće se do 6,9 u distalnom ileumu.<sup>250,251</sup>

Odabrana je vrednost pH 5,5 koja se odnosi na početni deo duodenuma.<sup>10</sup> Najveći procenat ispitivanih jedinjenja će biti u molekulskom obliku na pH 5,5 i očekuje se da najbolja apsorpcija bude upravo u ovom delu tankog creva. Računat je parametar  $-\log P_{app}$  zbog toga što je ravnomernija raspodela vrednosti tog parametra od najmanjeg do najvećeg kod ispitivanih jedinjenja, pa je pogodnije koristiti  $-\log P_{app}$  umesto  $P_{app}$  u QSPR studijama. Dobijene vrednosti %T,  $P_{app}$  i  $-\log P_{app}$  se odnose na početni deo duodenuma. Kako pH raste dalje u tankom crevu i dostiže vrednost 8 u ileumu, to će veći procenat jedinjenja biti u jonskom obliku što će nepovoljno uticati na pasivni transport, pa se očekuju niže vrednosti %T i  $-\log P_{app}$ . Promena u pH vrednosti, međutim, neće imati nikakav uticaj na trend

apsorpcije među jedinjenjima, pa se može očekivati da će niz opadajućih ili rastućih vrednosti %T i  $-\log P_{app}$  biti isti.

Jedinjenja 1C, 1B i 2C imaju najviše vrednosti parametra %T (30,74%, 18,18% i 16,86%) i  $P_{app}$  ( $8,36 \cdot 10^{-6}$ ,  $3,96 \cdot 10^{-6}$  i  $3,60 \cdot 10^{-6}$ ), a najniže vrednosti parametra  $-\log P_{app}$  (5,08; 5,40; 5,44) dok jedinjenja 2A, 2B i 2APN imaju najniže vrednosti %T (<1,55) i  $P_{app}$  ( $<0,28 \cdot 10^{-6}$ ) i najviše vrednosti  $-\log P_{app}$  (6,55; 7,00; 6,74), što je prikazano u Tabeli 12 (poglavlje 3.4.3.9)

Među položajnim izomerima derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline nema značajne razlike u vrednosti %T. Tako, položajni izomeri sa trifluorometil grupom u *meta* ili *para* položaju imaju vrednosti %T 7,13 i 8,66, a vrednosti  $P_{app}$  su 1,35 i 1,60 i  $-\log P_{app}$  5,87 i 5,80. Jedinjenja 2AMH i 2APH takođe imaju slične vrednosti i %T (5,88 i 5,06),  $P_{app}$  (1,09 i 0,93) i naravno,  $-\log P_{app}$  (5,96 i 6,03), kao i položajni izomeri 2AMM i 2APM (%T: 3,91 i 3,67,  $P_{app}$ : 0,71 i 0,67 i  $-\log P_{app}$ : 6,15 i 6,18).

U jedinjenjima koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline sa uvođenjem metil grupe u bočni niz rastu vrednosti %T i  $P_{app}$ , što se i očekuje s obzirom da je permeabilnost u korelaciji sa lipofilnošću. Međutim, u jedinjenjima koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline ne postoji takva pravilnost jer jedinjenje 2B ima izuzetno niske vrednosti %T i  $P_{app}$  (0,59 i 0,10), niže od jedinjenja 2A sa jednom metil grupom manje.

Vrednosti %T i  $P_{app}$  su u korelaciji sa lipofilnošću tako da jedinjenja sa najlipofilnijim supstituentima (2APTF, 2AMTF) imaju i najviše vrednosti %T i  $P_{app}$ , dok ona sa manje lipofilnim supstituentima, kao što su hlor ili metil grupa, imaju niže vrednosti %T i  $P_{app}$ . Jedinjenje sa polarnom nitro grupom ima i najnižu vrednost %T i  $P_{app}$  (0,99 i 0,18). Vrednosti  $-\log P_{app}$  su obrnuto proporcionalne lipofilnosti.

Sve navedene vrednosti %T i  $P_{app}$  su niže nego kod ibuprofena (%T = 45,74%,  $P_{app}$  = 20,92) što upućuje na pretpostavku da će sva sintetisana jedinjenja imati nižu gastrointestinalnu apsorpciju od ibuprofena. S obzirom na to da niska apsorpcija može predstavljati veliki problem u daljem razvoju bilo kog potencijalno farmakološki aktivnog jedinjenja<sup>157,252</sup> urađena je QSPR analiza PAMPA rezultata kako bi se utvrdilo šta je to u strukturi jedinjenja što ima najveći uticaj na apsorpciju i kako bi se predložile neke strukturne modifikacije koje bi omogućile bolju GIT apsorpciju.

Kvantitativni odnosi strukture i osobina (permeabilnosti u veštačkoj PAMPA membrani) ispitani su u cilju utvrđivanja veze između % T i  $-\log P_{app}$  (zavisne varijable) analiziranih jedinjenja i izračunatih konstitucionih, geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora (nezavisne varijable).

QSPR studije su sprovedene kako bi se ispitale veze između zavisnih promenljivih koje predstavljaju %T i  $-\log P_{app}$  i nezavisnih promenljivih koje predstavljaju izračunati molekularni deskriptori ispitivanih jedinjenja.

QSPR modeli (ANN(%T), MLR (%T), PLS(%T), ANN( $-\log P_{app}$ ), MLR ( $-\log P_{app}$ ) i PLS( $-\log P_{app}$ )) i odgovarajući statistički parametri su prikazani u Tabeli 16. Kvalitet formiranih QSPR modela procenjen je na osnovu statističkih parametara  $R^2$ , F-odnosa, p-vrednosti, RMSEE, RMSEP, r,  $Q^2$  i  $R^2_{pred}$ , koji su izračunati prema formulama prikazanim u poglavlju 3.4.3.11. Na osnovu dobijenih rezultata, MLR(%T) je odabran kao optimalni model za predviđanje %T zbog toga što su za taj model najniže vrednosti RMSEE (0,916) i RMSEP (1,716), a najviše vrednosti  $R^2$  (0,990), r (0,990),  $Q^2$  (0,942) i  $R^2_{pred}$  (0,976). Ovako visoke vrednosti  $R^2$ , r,  $Q^2$  i  $R^2_{pred}$  ukazuju na dobru prediktivnu sposobnost odabranog modela. Grafički prikaz MLR(%T) modela je dat na Slici 14, a korelacija ( $r = 0,9952$ ) između određenih %T PAMPA testom i modelom predviđenih %T vrednosti je prikazana na Slici 15. Što se tiče modela za predviđanje  $-\log P_{app}$ , PLS( $-\log P_{app}$ ) model nije uziman u razmatranje zbog nezadovoljavajućih vrednosti  $R^2_{pred}$ . ANN( $-\log P_{app}$ ) i MLR( $-\log P_{app}$ ) modeli imaju iste ili slične vrednosti RMSEE, RMSEP,  $R^2_{pred}$ ,  $R^2$  i r, ali MLR( $-\log P_{app}$ ) model ima značajno višu vrednost  $Q^2$ . Zbog toga je MLR( $-\log P_{app}$ ) i odabran kao optimalan model za predviđanje  $-\log P_{app}$ . Ovaj model je grafički prikazan na Slici 16. Korelacija ( $r = 0,9306$ ) između eksperimentalno dobijenih  $-\log P_{app}$  vrednosti u PAMPA testu i predviđenih  $-\log P_{app}$  vrednosti pomoću MLR( $-\log P_{app}$ ) modela je prikazana na Slici 17.

Deskriptori nCsp3, DISPv i VE1\_RG formiraju na osnovu statističkih analiza odabrane MLR(%T) i MLR( $-\log P_{app}$ ) modele. Tumačenjem ovih deskriptora moguće je utvrditi strukturne promene u odnosu na ispitivana jedinjenja koje bi doprinele povećanju parametara %T i  $-\log P_{app}$  i boljoj permeabilnosti u PAMPA testu. Na osnovu bolje *in vitro* permeabilnosti, očekuje se i bolja GIT apsorpcija.

Deskriptor nCsp3 je konstitutivni deskriptor koji predstavlja broj  $sp^3$  hibridizovanih ugljenikovih atoma.<sup>253</sup> Konstitutivni deskriptori su najjednostavniji i vrlo često se koriste, a predstavljaju hemijski sastav jedinjenja i ne pružaju nikakvu informaciju o molekularnoj geometriji ili načinu povezivanja atoma u tom molekulu.<sup>254</sup> Jedinjenja sa najvišim vrednostima nCsp3 deskriptora su ibuprofen, 1B, 1C, i 2C. Sva ova jedinjenja imaju



razgranate bočne lance. Zbog toga se može pretpostaviti da bi uvođenje  $sp^3$  hibridizovanih ugljenikovih atoma u okviru razgranatih bočnih nizova u molekul moglo povećati %T, odnosno gastrointestinalnu apsorpciju. Ako uporedimo strukturu analiziranih jedinjenja sa strukturom ibuprofena može se videti da ibuprofen ima jednu metil grupu više u  $\alpha$  položaju u odnosu na karboksilnu grupu, kao i izobutil grupu u benzenovom prstenu u para položaju. Evidentno je da toliki broj  $sp^3$  hibridizovanih ugljenika doprinosi većoj vrednosti %T i nižoj vrednosti  $-\log P_{app}$  što bi trebalo da rezultira i boljom apsorpcijom ibuprofena u odnosu na analizirana jedinjenja.

DISPv je geometrijski deskriptor koji predstavlja vrednost premeštanja ponderisanu van der Waalsovom zapreminom (eng. *displacement value/weighted by van der Waals volume*).<sup>253</sup> Ovaj deskriptor je povezan sa asimetrijom hidrofobnih grupa u opštoj strukturi molekula i distribucijom van der Waalsovog volumena.<sup>255</sup> Najvišu vrednost ovog deskriptora imaju 2AMH, ibuprofen, 2APH, 2C, 2APN i 1C, što ukazuje na to da bi uvođenje supstituenata na jedan od benzenovih prstenova poremetilo simetriju molekula i doprinelo povećanju %T i gastrointestinalne apsorpcije.

VE1\_RG je 3D deskriptor koji predstavlja sumu koeficijenata poslednjeg svojstvenog vektora recipročnog kvadratnog geometrijskog matriksa (eng. *last eigenevector from reciprocal squared geometrical matrix*).<sup>253</sup> Deskriptori koji se baziraju na 3D matriksu su poznati kao topografski indeksi izračunati iz grafičkog prikaza molekula uz korišćenje geometrijskih Euklidskih rastojanja između atoma umesto topoloških razdaljina. Recipročni kvadrat razdaljina geometrijskog matriksa uzima u obzir recipročne kvadrate razdaljina između svih parova atoma.<sup>256</sup>

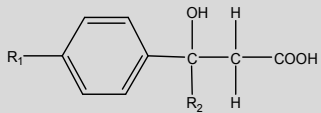
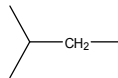
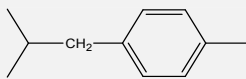
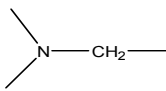
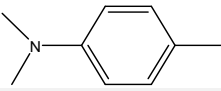
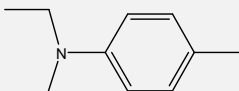
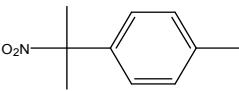
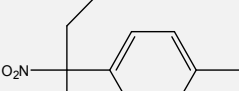
nCsp3 deskriptor ima negativni, a Mor14m ima pozitivni uticaj na  $-\log P_{app}$ . Povećanje vrednosti deskriptora nCsp3 rezultira smanjenjem  $-\log P_{app}$  i povećanjem gastrointestinalne apsorpcije što je u skladu sa MLR(%T) modelom. Mor14m je 3D MoRSE deskriptor koji se definiše kao signal 14 ponderisan masom (*3D MoRSE descriptor, defined as signal 14 / weighted by mass*).<sup>253</sup> Ovi deskriptori su projekcije atoma duž različitih uglova. Jedan od njih je i difrakcija elektrona, koji uzima u obzir 3D raspored atoma u molekulu bez dvoznačnosti. 3D MoRSE deskriptori su nezavisni od veličine molekula i mogu se primeniti na veliki broj strukturno različitih molekula. Međutim, njihovo tačno značenje nije jasno.<sup>185,257,258</sup> Jedinjenja sa najvišim vrednostima ovog deskriptora su 2APN i 2B, koja imaju najniže vrednosti %T i najviše vrednosti  $-\log P_{app}$ , pa s tim u vezi i najnižu očekivanu gastrointestinalnu apsorpciju.

Na osnovu rezultata QSPR studija pretpostavljena je struktura derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina koji će imati više vrednosti %T, niže vrednosti  $-\log P_{app}$  i bolju

gastrointestinalnu apsorpciju u poređenju sa ispitivanim jedinjenjima. Prilikom dizajniranja jedinjenja uzeti su u obzir i zaključci doking studija o strukturnim zahtevima koji treba da budu ispunjeni kako bi jedinjenja bila selektivniji inhibitori COX-2 izoforme.

Minimizacija energije S enantiomera je urađena na isti način kao što je već opisano u poglavlju 3.4.3.10. i odabrani deskriptori (nCsp3, DISPV, VE1\_RG i Mor14m) su izračunati u Dragon programu. Nakon toga su izračunati PAMPA parametri korišćenjem formiranog MLR(%T) i MLR(-log*P<sub>app</sub>*) modela. Isti parametri su izračunati i za R enantiomere i nije bilo značajne razlike u odnosu na parametre S enantiomera. Ovakav ishod je očekivan, s obzirom na to da se odabrani deskriptori ne odnose na 3D strukturu. Hemijske strukture i predviđeni PAMPA parametri su dati u Tabeli 35. Polazne supstance za sintezu jedinjenja 3, 5 i 6 su komercijalno dostupne i ova jedinjenja se mogu sintetisati istom modifikovanom Reformatski reakcijom. Dizajnirana jedinjenja imaju više ili slične vrednosti %T, kao i niže ili slične vrednosti -log*P<sub>app</sub>* od jedinjenja 1C, i bolju gastrointestinalnu apsorpciju u poređenju sa svim testiranim derivatima β-hidroksi-β-arilalkanskih kiselina.

**Tabela 35.** Hemijska struktura dizajniranih β-hidroksi-β-arilalkanskih kiselina i predviđeni PAMPA parametri

				
Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	%T	-log <i>P<sub>app</sub></i>
1	NO <sub>2</sub>		48,49	5,04
2	NO <sub>2</sub>		49,11	5,08
3			46,16	4,72
4	H		47,42	4,84
5	H		30,07	5,24
6	H		37,60	4,95

Apsorpcija  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina u tankom crevu u odnosu na ibuprofen je procenjena i uz pomoć bioparticione micelarne hromatografije (BMC).<sup>259</sup> Acetonitril je korišćen kao organska komponenta mobilne faze. Uz pomoć testa merenja kapi utvrđeno je da pri udelu acetonitrila u mobilnoj fazi od 10 % do 30 % nema razaranja micela. Udeo acetonitrila je variran i kao optimalan je odabran udeo od 20 %.

Retencioni faktori ( $k$ ) ispitivanih jedinjenja su u opsegu od 0,00 do 18,92 (Tabela 19). Jedinjenja sa najvišim vrednostima  $k$  su: ibuprofen, 1C, 2APTF i 2C (18,92; 7,26; 5,42 i 5,21, po redosledu navođenja). Sva sintetisana jedinjenja imaju niže  $k$  vrednosti od ibuprofena, pa se očekuje i niža gastrointestinalna apsorpcija.

Uvođenjem jedne ili dve metil grupe u bočni niz, retencioni faktor blago raste što se vidi kod jedinjenja 1A, 1B i 1C koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline, a takođe i u grupi jedinjenja 2A, 2B i 2C koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline. To znači da se uvođenjem jedne ili dve metil grupe u bočni niz očekuje bolja gastrointestinalna apsorpcija. Derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline imaju nešto veće vrednosti  $k$  faktora nego derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline (Tabela 19).

Razmatranjem uticaja supstituenata u benzenovom prstenu derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline na retencioni faktor, može se zaključiti da jedinjenja sa lipofilnijim supstituentima (2APTF i 2AMTF) imaju nešto više vrednosti retencionog faktora od jedinjenja kod kojih je benzenov prsten supstituisan hlorom (2APH, 2AMH) ili metil grupom (2APM, 2AMM). Jedinjenje sa nitro grupom kao polarnim supstituentom praktično nema retenciju u datom hromatografskom sistemu, pa je za njega određena vrednost retencionog faktora  $k=0$ .

Statistički parametri na osnovu kojih je odabran optimalan QSRR model su računati prema jednačinama 5, 6 i 7 koje su date u poglavlju 3.4.3.11. PLS( $k$ ) model je imao najveće greške izračunate za trening i test set (RMSEE i RMSEP) i nezadovoljavajuće vrednosti za  $r$  i  $R^2_{\text{pred}}$  tako da je ovaj model izuzet iz daljeg razmatranja. Može se smatrati da oba modela, ANN( $k$ ) i MLR( $k$ ) imaju dobru prediktivnu sposobnost zbog toga što je kod oba  $Q^2 > 0,5$  i  $R^2_{\text{pred}} > 0,5$ . Kod ANN( $k$ ) modela je manja razlika između RMSEE i RMSEP nego kod MLR( $k$ ) modela, a to ukazuje na pouzdanost u predviđanju  $k$  vrednosti jedinjenja koja su slična i trening i test setu. Zbog toga je ANN( $k$ ) model odabran kao optimalan i može se koristiti za predviđanje  $k$  vrednosti  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina koje nisu testirane u odabranom hromatografskom sistemu. Interpretacijom deskriptora koji čine ovaj model moguće je zaključiti kako treba promeniti strukturu ispitivanih jedinjenja da bi se dizajnirale

nove  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanske kiseline koje bi imale više vrednosti  $k$  i bolju gastrointestinalnu apsorpciju.

Molekulski deskriptori koji formiraju odabrani ANN( $k$ ) model su nBM, P\_VSA\_LogP\_8 i Eta\_L. Deskriptor nBM se odnosi na broj višestrukih veza (eng. *number of multiple bonds*), pripada konstitutivnim deskriptorima i ima negativan uticaj na  $k$ .<sup>253</sup> Jedinjenje sa najvišom vrednošću ovog deskriptora je 2APN, dok najnižu vrednost ima ibuprofen. S obzirom na značenje ovog deskriptora može se pretpostaviti da bi eliminacija jednog benzenovog prstena ili njegova zamena zasićenim ili delimično nezasićenim prstenom dovela do povećanja  $k$ .

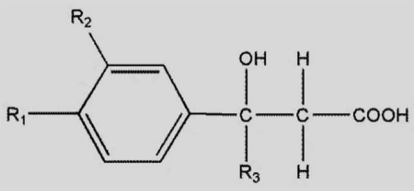
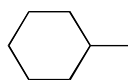
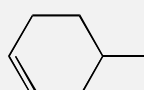
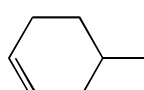
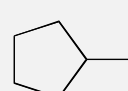
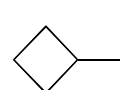
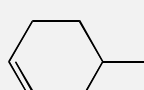
Deskriptor P\_VSA\_LogP\_8 pripada P\_VSA sličnim deskriptorima koji se definišu kao vrednost van der Waalove površine koja ima karakteristiku P u određenom opsegu (eng. *amount of van der Waals surface area (VSA) having a property P in a certain range*).<sup>260</sup> Jedinjenja sa najvišim vrednostima ovog deskriptora su 2AMH, 2APH, 2APN, 2AMTF, 2APTF i sadrže nitro grupu, trifluorometil grupu ili halogen u *para* ili *meta* položaju jednog od benzenovih prstenova. Može se zaključiti da bi dizajnirana jedinjenja koja bi imala više vrednosti  $k$  trebalo da u strukturi sadrže ove supstituente.

Deskriptor ETA\_L pripada ETA (eng. *extended topochemical atom*) deskriptorima koji su definisani kao topološki deskriptori. Jedinjenja sa najvišim vrednostima ovog deskriptora su 1B, 1C, 2C i 2APTF. Nije pronađena zadovoljavajuća veza između ovog deskriptora i strukture molekula, tako da njegov uticaj na  $k$  ne može biti protumačen.

Na osnovu rezultata QSRR studija predložene su strukture derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina koji će imati višu vrednost  $k$  i bolju gastrointestinalnu apsorpciju u poređenju sa ispitivanim jedinjenjima. U toku procesa dizajniranja novih jedinjenja uzeti su u obzir rezultati izvedenih doking eksperimenata o strukturnim zahtevima koje bi trebalo ispuniti kako bi jedinjenja bila selektivniji inhibitori COX-2 izoforme.

Minimizacija energije dizajniranih jedinjenja je opisana u poglavlju 3.4.3.10 i uvek je rezultirala odabirom S enantiomera kao najstabilnije konformacije. Deskriptori koji su odabrani za ispitivana jedinjenja (nBM, P\_VSA\_LogP\_8 and Eta\_L) su izračunati u Dragon programu i za dizajnirana jedinjenja. Predviđena je  $k$  vrednost uz pomoć odabranog ANN( $k$ ) modela. Vrednost  $k$  je predviđena i za R enantiomere, ali nije bilo značajne razlike u odnosu na S enantiomere. Ovakav ishod je očekivan, s obzirom na to da se odabrani deskriptori ne odnose na 3D strukturu. Hemijske strukture i predviđene  $k$  vrednosti su date u Tabeli 36.

**Tabela 36.** Hemijske strukture dizajniranih jedinjenja na osnovu QSRR studija i predviđene  $k$  vrednosti

				
Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$k$
D1	-NO <sub>2</sub>	-H		21,42
D2	-NO <sub>2</sub>	-H		17,17
D3	-H	-Cl		21,56
D4	-H	-NO <sub>2</sub>		19,65
D5	-H	-NO <sub>2</sub>		17,73
D6	-H	-NO <sub>2</sub>		17,17

Jedinjenja D1, D3 i D4 imaju nešto višu vrednost  $k$  od ibuprofena dok jedinjenja D2, D5 i D6 imaju nešto nižu vrednost  $k$  od ibuprofena.

Nakon određivanja fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih osobina, urađeni su biološki testovi koji se odnose na ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina i procenu neželjenih efekata kao i na ispitivanja biohemijskih parametara i na koncentraciju markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

U preliminarnim eksperimentima jedinjenja su primenjivana *per os* i nakon pola sata od primene je izazivana inflamacija injekcijom suspenzije karagenana u zadnju šapu. Primećeno je da postoje velike oscilacije u odgovoru u okviru iste grupe životinja, pa je pretpostavljeno da je razlog u lošoj apsorpciji jedinjenja. Zato je odlučeno da se sva jedinjenja primenjuju subkutanom (potkožnom) injekcijom u abdominalnoj regiji i da se nakon 15 minuta indukuje inflamacija.

U prvoj fazi eksperimenata ispitivana su jedinjenja 1A, 1B, 1C, 2A, 2B i 2C i primenjivana su u dozama od 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg i 20 mg/kg.<sup>223</sup> U drugoj fazi su testirana jedinjenja 2APN, 2APTF, 2APH, 2APM, 2AMTF, 2AMH i 2AMM i odlučeno je da se jedinjenja testiraju u ekvimolarnim dozama.<sup>224</sup> Ovaj pristup je bolji, s obzirom na to da sintetisana jedinjenja imaju različite molekulske mase. Bez obzira na korišćeni pristup, antiinflamatorni efekat jedinjenja testiranih u obe faze se može porediti zbog toga što se poređenje vrši preko ED<sub>50</sub> vrednosti, a ne preko ostvarenog antiinflamatornog efekta.

Najnižu vrednost ED<sub>50</sub> ima jedinjenje 2B (14,79 μmol/kg), što znači da ostvaruje najbolji antiinflamatorni efekat, a za njim sledi jedinjenje 2APN (47,76 μmol/kg) koje ima sličnu vrednost ED<sub>50</sub> kao i ibuprofen (43,97 μmol/kg). ED<sub>50</sub> oko 50 μmol/kg imaju jedinjenja 1A i 2A. Bliske vrednosti ED<sub>50</sub> (oko 80 μmol/kg) imaju jedinjenja 2APTF, 2APH, 2APM, 2AMM, dok najviše vrednosti imaju jedinjenja 2APTF, 2AMTF i 2AMH (preko 100 μmol/kg).

Na osnovu doking eksperimenata nije bilo očekivano da jedinjenje 2B ima toliko bolju ED<sub>50</sub> vrednost od ostalih ispitivanih jedinjenja. Objašnjenje bi se moglo potražiti u činjenici da je inflamacija kompleksan proces i moguće da su ovde veliki uticaj imali još neki faktori osim inhibicije ciklooksigenaze, što bi svakako trebalo dalje istražiti.

Makroskopskim ispitivanjem želudačne sluznice utvrđeno je da nema značajnih gastričnih lezija već su prisutne hiperemije, petehije ili blage erozije. Na Adami-jevoj mernoj skali (Tabela 22) čiji je opseg 0-8 primećene lezije su bile u opsegu 0-1. Na osnovu ovakvih rezultata moglo bi se zaključiti da je gastrična podnošljivost ispitivanih jedinjenja primenjenih u najvećoj dozi korišćenoj za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti dobra.

Kao dopuna makroskopskog ispitivanja, u gastričnom tkivu želudaca eksperimentalnih životinja koje su tretirane derivatima β-hidroksi-β,β-difenilpropionske kiseline određene su koncentracije biohemijskih parametara (MDA i GSH) kako bi se dodatno, na tom nivou razmotrio uticaj primenjenih jedinjenja na tkivo želuca. Dobijeni rezultati (Tabela 26) pokazuju da je maksimum lipidne peroksidacije prisutan u tkivu želuca pacova koji su tretirani ibuprofenom i jedinjenjem 2APTF (koje sadrži trifluorometil grupu u *para* položaju). U grupi životinja tretiranih jedinjenjem 2AMTF koje sadrži trifluorometil grupu u *meta* položaju je takođe visok nivo lipidne peroksidacije u poređenju sa kontrolnom grupom, ali ne i sa grupom tretiranom ibuprofenom. Sva ostala ispitivana jedinjenja pokazuju manji nivo lipidne peroksidacije nego ibuprofen. Treba istaći da je u tkivu želuca životinja tretiranih

jedinjenjima 2APN, 2APH, 2AMH i 2AMM veoma nizak nivo lipidne peroksidacije, jer je koncentracija MDA slična kao u kontrolnoj grupi životinja.

Koncentracije GSH su povećane u gastričnom tkivu životinja koje su tretirane ibuprofenom, jedinjenjima 2APN, 2APTF i 2AMH. Koncentracije GSH u tkivu želuca životinja koje su tretirane ostalim jedinjenjima su slične kao u kontrolnoj grupi.

Oksidativno stresni indeks (OSI) omogućava istovremeno sagledavanje GSH i MDA nivoa jer se računa kao njihov količnik. U grupi životinja kod kojih su primenjena jedinjenja 2APN, 2APH, 2AMH i 2AMM OS indeks je veoma visok, što ukazuje na to da ova jedinjenja pružaju dobru zaštitu tkivu želuca od oksidativnog stresa. Jedinjenja 2APTF i 2AMTF izazivaju veći oksidativni stres u tkivu želuca od ibuprofena dok jedinjenje 2APM izaziva sličan oksidativni stres kao i ibuprofen.

Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) je odnos ukupne koncentracije markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i služi kao mera oksidanasa u antioksidativnom okruženju.<sup>221,261</sup> Veća PAB vrednost ukazuje na povećan oksidativni stres. PAB je određen u plazmi životinja koje su tretirane najvišom dozom derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difetilpropionske kiseline u ispitivanju antiinflamatorne aktivnosti.

Rezultati (Tabela 28) su pokazali da u grupi životinja koje su tretirane ibuprofenom postoji statistički značajno povećanje nivoa PAB u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolnu grupu je primećeno u plazmi životinja koje su tretirane sintetisanim jedinjenjem 2AMH. Bitno je istaći da jedinjenja 2AMTF, 2APM i 2APH imaju statistički značajno nižu vrednost PAB nego ibuprofen, a da ni jedno od sintetisanih jedinjenja nema statistički značajno višu vrednost PAB od ibuprofena.

Osim oksidativnog stresa koji je procenjen na osnovu određivanja koncentracije biohemijskih parametara u želudačnom tkivu, oksidativni stres je procenjen i u plazmi eksperimentalnih životinja. Glavne komponente totalnog oksidantnog statusa (TOS) su lipidni peroksidi i vodonik peroksid. TOS je određen u plazmi životinja koje su u ispitivanju antiinflamatorne aktivnosti tretirane najvišom dozom novosintetisanih  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difetilpropionskih kiselina. U plazmi životinja kojima je primenjen ibuprofen došlo je do statistički značajnog sniženja vrednosti TOS u odnosu na kontrolnu grupu. Do sniženja je došlo i u plazmi životinja kojima su aplikovana jedinjenja 2APN i 2APH. U plazmi životinja koje su tretirane jedinjenjima 2AMM i 2AMH došlo je do statistički značajnog povišenja parametra TOS u odnosu na životinje tretirane ibuprofenom.

Korišćena metoda za određivanje totalnog antioksidantnog statusa (TAS) podrazumeva određivanje neenzimskih antioksidanasa. U plazmi životinja koje su tretirane ibuprofenom je nešto niži TAS u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti (Tabela 31). U plazmi životinja iz grupe koje su tretirane jedinjenjima 2AMTF, 2AMH, 2AMM i 2APH vrednosti TAS se ne razlikuju statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu, ali je statistički značajno viša vrednost TAS u odnosu na grupu životinja tretiranih ibuprofenom. To znači da je određivanjem totalnog antioksidantnog statusa pokazano da navedena sintetisana jedinjenja izazivaju manji oksidativni stres nego ibuprofen.

Kako bi bilo moguće sagledati jedinjenja sa istovremeno niskim TOS i visokim TAS, izračunat je oksidativno stresni indeks (OSI). Može se zaključiti da ni jedno ispitivano jedinjenje ne izaziva oksidativni stres veći od ibuprofena. OSI je neznatno niži samo u grupi životinja koje su tretirane jedinjenjem 2APH u odnosu na kontrolnu grupu, dok je dosta viši u grupi životinja tretiranih ibuprofenom, 2AMTF, 2APN i 2AMH (Tabela 31).

Uticaj sintetisanih jedinjenja na oksidativni stres može se proceniti određivanjem enzima paraoksonaze. U grupama životinja koje su u ispitivanju antiinflamatorne aktivnosti tretirane najvećom dozom jedinjenja 2APN, 2APTF, 2APH, 2APM, 2AMTF, 2AMH i ibuprofena određena je aktivnost enzima paraoksonaze kao diazoksonazne aktivnosti. Statistički značajno sniženje aktivnosti ovog enzima postoji u grupi životinja kojima je aplikovano jedinjenje 2APTF u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Veća statistička značajnost sniženja aktivnosti ovog enzima postoji i u grupi životinja tretiranih jedinjenjem 2AMTF u odnosu na kontrolnu grupu. Snižavanje aktivnosti diazoksonaze je nepovoljno. Kao što se može videti u Tabeli 32 postoji i statistički značajno sniženje aktivnosti diazoksonaze u grupi životinja tretiranoj jedinjenjem 2AMTF u odnosu na grupu tretiranu jedinjenjem 2APH što nije od posebnog značaja za interpretaciju rezultata. Važno je naglasiti da ne postoji statistički značajno sniženje aktivnosti enzima u grupama tretiranim sintetisanim jedinjenjima u odnosu na grupu tretiranu ibuprofenom.

Kako bi se procenio uticaj sintetisanih jedinjenja na jetru, određene su koncentracije enzima jetre: ALP, AST i ALT u plazmi životinja koje su u ispitivanju antiinflamatorne aktivnosti tretirane najvišom dozom sintetisanih derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difetilpropionske kiseline.<sup>224</sup> Na osnovu statističke obrade rezultata prikazanih u Tabeli 33 može se zaključiti da je u plazmi životinja kojima je aplikovan ibuprofen došlo do statistički značajnog povišenja koncentracije enzima ALP ( $p < 0,005$ ) i AST ( $p < 0,005$ ) u odnosu na kontrolnu grupu što



ukazuje na to da je došlo do izvesnog oštećenja ćelija jetre i da su se jetreni enzimi našli u krvotoku. U grupama životinja kod kojih je aplikovano jedinjenje 2APTF takođe je došlo do povišenja koncentracije enzima ALP. U grupama kojima su aplikovana jedinjenja 2APH i 2AMTF je došlo do statistički značajnog povišenja koncentracije enzima AST ( $p < 0,005$ , odnosno  $p < 0,05$ ). Važno je naglasiti da nema statistički značajnog povišenja jetrenih enzima kod životinja tretiranih navedenim jedinjenjima u odnosu na grupu životinja koja je tretirana ibuprofenom što ukazuje na to da u poređenju sa ibuprofenom sintetisana jedinjenja ne izazivaju veća oštećenja funkcije jetre.

Kod životinja koje su tretirane ostalim jedinjenjima nije bilo statistički značajnog povišenja koncentracije jetrenih enzima u odnosu na kontrolnu grupu, pa se može zaključiti da primenjena jedinjenja ne izazivaju nikakvo oštećenje ćelija jetre posle akutne doze. U grupama koje su tretirane jedinjenjima 2APN, 2APM, 2AMTF i 2AMH koncentracije enzima ALP su statistički značajno niže nego u grupi životinja tretiranih ibuprofenom ( $p < 0,005$ , osim za 2APN:  $p < 0,05$ ), što ukazuje na to da ova jedinjenja ne izazivaju oštećenje funkcije jetre u poređenju sa ibuprofenom. U plazmi životinja kojima su aplikovana jedinjenja 2APM, 2AMH i 2AMM koncentracije enzima ALT su statistički značajno niže ( $p < 0,005$ ) nego u plazmi životinja kojima je aplikovan ibuprofen. Postoji statistički značajno ( $p < 0,05$ ) sniženje koncentracije enzima AST u plazmi životinja koje su tretirane jedinjenjima 2APN i 2AMM u odnosu na plazmu životinja tretiranih ibuprofenom.

Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da u poređenju sa ibuprofenom sintetisana jedinjenja ne dovode do oštećenja jetre.<sup>224</sup> Kod nekih jedinjenja nije primećeno statistički značajno povišenje jetrenih enzima u odnosu na kontrolnu grupu što ukazuje na to da ova jedinjenja posle akutne primene ne dovode do oštećenja ćelija jetre. Treba istaći i da jedinjenja 2APTF i 2AMTF koja sadrže trifluorometil grupu u *para* ili *meta* položaju dovode do statistički značajnog povišenja enzima ALP, odnosno AST u odnosu na kontrolnu grupu što bi moglo ukazivati da ova jedinjenja imaju negativan uticaj na funkciju jetre. Upravo je trifluorometil grupa u ovim jedinjenjima odgovorna za rizik od hepatotoksičnosti s obzirom na to da je hepatotoksičnost primećena kod felbamata, leflunomida i flutamida koji takođe sadrže u strukturi trifluorometil grupu.<sup>262-264</sup> Neophodna su dalja ispitivanja koja bi uključivala hroničnu primenu sintetisanih jedinjenja.

Za ispitivanje inhibitorne interakcije između odabranih sintetisanih jedinjenja i obe izoforme COX enzima korišćen je komercijalni kit sa goveđom COX-1 i humanom rekombinantnom COX-2. Novosintetisana jedinjenja je pogodno prvo testirati na ovakvom

kitu koji ne sadrži ćelijske kulture, a za dalja ispitivanja *in vitro* aktivnosti sintetisanih jedinjenja u plazmi adekvatno bi bilo koristiti neke *in vitro* testove sa ćelijskim kulturama kao što je test u humanoj punoj krvi.<sup>265</sup> Na osnovu ovog testa u Tabeli 37 data je klasifikacija NSAIL prema njihovoj inhibitornoj COX-1/COX-2 aktivnosti i indeksu selektivnosti.<sup>21</sup>

**Tabela 37.** Klasifikacija NSAIL prema stepenu inhibicije COX-1 i COX-2 i indeksu selektivnosti

Grupa	Karakteristike NSAIL	Primeri
1	Neselektivni koji potpuno inhibiraju i COX-1 i COX-2	Aspirin, ibuprofen, diklofenak, indometacin, naproksen, piroksikam
2	NSAIL koji inhibiraju COX-2 sa indeksom selektivnosti 5-50	Celekoksib, etodolak, meloksikam, nimesulid
3	NSAIL koji inhibiraju COX-2 sa indeksom selektivnosti većim od 50	Rofekoksib, NS-398
4	NSAIL koji su slabi inhibitori obe izoforme	5-aminosalicilna kiselina, natrijum-salicilat, sulfasalazin

Za testiranje su odabrana jedinjenja koja su pokazala najveću vrednost  $ED_{50}$  u testu ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti: 2B, 2A, 2APH, 2APM i 2APN. U testiranje je uključeno i jedinjenje sa najnižom  $ED_{50}$  vrednošću - 2APTF (Tabela 34). Ispitivana jedinjenja pokazuju nizak afinitet za inhibiciju COX-1 izoforme. Najnižu  $IC_{50}$  vrednost imaju jedinjenja 2A (30,569  $\mu\text{mol/L}$ ) i 2B (21,031  $\mu\text{mol/L}$ ), a najvišu jedinjenje 2APN (327,013  $\mu\text{mol/L}$ ). Sva jedinjenja pokazuju umereni afinitet za inhibiciju COX-2 izoforme. Indeks selektivnosti pokazuje da su sva testirana jedinjenja selektivnija prema COX-2. Najniži indeks selektivnosti pokazuju jedinjenja 2A (1,6652) i 2B (1,6699), a najviši jedinjenje 2APN (62,68). Rezultat za jedinjenje 2APN je u skladu sa *in silico* eksperimentima i potvrđuje pretpostavku da supstitucija  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline polarnim supstituentom (u ovom slučaju nitro grupom) u *para* položaju ima pozitivan uticaj na selektivnost prema COX-2 izoformi. Jedinjenje 2APN ima i najnižu vrednost  $IC_{50}$  (5,217  $\mu\text{mol/L}$ ) u poređenju sa vrednostima svih ostalih testiranih kiselina.

Najvišu vrednost  $IC_{50}$  ima jedinjenje 2APTF iz čega se može zaključiti da supstitucija  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline trifluorometil grupom u *para* položaju ima

nepovoljan uticaj na inhibiciju COX-2 i da čak bolju  $IC_{50}$  vrednost ima jedinjenje bez ikakvih supstituenata na benzenovom prstenu  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -difenilpropionske kiseline (2A).

Među jedinjenjima 2A i 2B nema neke značajne razlike u stepenu selektivnosti, pa je malo verovatno da supstitucija bočnog niza metil grupom ima bilo kakav uticaj na selektivnost prema COX-2 što je u skladu sa rezultatima dokinga. Bočni niz sa ili bez metil grupe se nalazi u regionu  $P_2$  koji je identičnog aminokiselinskog sastava kod COX-1 i COX-2, i interakcije u ovom regionu nemaju uticaj na selektivnost prema COX-2. Vrednost  $IC_{50}$  je neznatno veća kod jedinjenja 2B u odnosu na jedinjenje 2A, što je u suprotnosti sa *in silico* eksperimentima (koji su pokazali da supstitucija bočnog niza udaljava molekul od *Arg120*), a u skladu su sa *in vivo* eksperimentima koji su pokazali bolji rezultat za jedinjenje 2B. Međutim, jedinjenje 2B je *in vivo* pokazalo daleko najbolji antiinflamatorni efekat od svih jedinjenja, a to nije bio slučaj u *in vitro* testiranju.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ Na osnovu rezultata doking studija 16 ispitivanih derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina u aktivnom mestu COX-1 i COX-2, kod svih su utvrđene ključne interakcije sa aminokiselinama neophodne za inhibiciju enzima.
  - Bolja selektivnost se očekuje od jedinjenja koja su derivati  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline od derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -bifenilbuterne kiseline
  - Interakcije su jače kod jedinjenja čiji je bočni lanac nesupstituisan u  $\alpha$  položaju u odnosu na jedinjenja koja u  $\alpha$  položaju imaju jednu ili dve metil grupe.
  - Polarni supstituenti u *para* položaju na benzenovom prstenu  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline doprinose selektivnosti za COX-2 kao što je to slučaj kod kiselina supstituisanih nitro i bisdimetilamino grupom.
  - Izračunata van der Waalsova zapremina za svih 16 jedinjenja obema metodama, veća je za više od 15 Å<sup>3</sup> od van der Waalsove zapremine ibuprofena, što ukazuje na to da sva jedinjenja imaju potencijal da ispolje selektivnost prema inhibiciji COX-2.
  
- ❖ Modifikovanom Reformatski reakcijom je sintetisano sedam derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline.
  - Sintetisana su 4 derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ , $\beta$ -difenilpropionske kiseline koja su supstituisana nitro, trifluorometil, metil grupom i hlorom u *para* položaju i 3 derivata koja su supstituisana trifluorometil, metil grupom i hlorom u *meta* položaju.
  - Hemijske strukture novosintetisanih jedinjenja potvrđene su primenom spektroskopskih metoda (AT-FTIR, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, MS-TOF i LC/MS-MS), kao i određivanjem temperature topljenja. Čistoća jedinjenja je potvrđena hromatografskim metodama (TLC, HPLC).

- Modifikovana Reformatski reakcija je dodatno optimizovana u drugoj fazi povišenjem temperature na 60-65 °C, čime je vreme trajanja reakcije skraćeno sa nekoliko dana na 17-24 sata.
- ❖ Ispitane su fizičko-hemijske i biofarmaceutske osobine β-hidroksi-β,β-arilalkanskih kiselina.
- Konstante jonizacije prethodno sintetisanih i novosintetisanih derivata β-hidroksi-β,β-difenilpropionskih kiselina i derivata β-hidroksi-β-bifenilbuternih kiselina određene su RP-HPLC metodom i  $pK_a$  vrednosti se nalaze u intervalu od 3,40 do 3,75.
  - Utvrđena je nezadovoljavajuća korelacija ( $R^2=0,3126$ ) između eksperimentalno određenih i izračunatih  $pK_a$  vrednosti za ispitivana jedinjenja u programu MarvinSketch 5.11.5, a izračunate  $pK_a$  vrednosti u programu ACD/I-Lab su u širokom intervalu ( $\pm 0,4$  ili  $\pm 0,5$ ), pa se ovi programi ne mogu koristiti za predviđanje  $pK_a$  vrednosti sintetisanih kiselina.
  - Lipofilnost ispitivanih jedinjenja ispitana je RP-HPLC metodom i određene logP vrednosti se nalaze u intervalu od 2,901 do 3,847.
  - Utvrđena je zadovoljavajuća korelacija između eksperimentalno određenih i predviđenih logP vrednosti u KOWWIN računarskom programu ( $R^2=0,8864$ ).
  - *In vitro* procenjena gastrointestinalna apsorpcija ispitivanih jedinjenja primenom PAMPA testa kao i bioparticione micelarne hromatografije je niža u poređenju sa ibuprofenom.
  - QSPR i QSRR studijama utvrđeni su deskriptori sa najvećim uticajem na gastrointestinalnu apsorpciju ispitivanih jedinjenja. Interpretacijom deskriptora je utvrđeno da je za poboljšanje gastrointestinalne apsorpcije potrebno uvesti  $sp^3$  hibridizovane atome u okviru razgranatih bočnih lanaca, da jedan od benzenovih prstenova treba da bude supstituisan kako bi se održala asimetrija molekula, da je povoljno da supstituenti u benzenovom prstenu budu nitro grupa ili hlor u *para* ili *meta* položaju i da jedan prsten bude zasićen ili delimično nezasićen.

- Na osnovu rezultata QSPR i QSRR studija, a uzimajući u obzir i zaključke doking studija, predložene su strukture jedinjenja koje bi imale povoljniju gastrointestinalnu apsorpciju i odgovarajuću selektivnost prema inhibiciji COX-2.
- ❖ Ispitane su biološke osobine  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -arilalkanskih kiselina.
- Ispitana je antiinflamatorna aktivnost  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -arilalkanskih kiselina *in vivo*, na eksperimentalnom modelu indukcije edema šapice pacova izazvanog karagenanom i utvrđeno je da derivat difenilpropionske kiseline sa metil grupom u  $\alpha$  položaju u bočnom nizu položaju pokazuje najbolju antiinflamatornu aktivnost.
  - Ispitana je gastrična podnošljivost u grupama životinja kojima je primenjena najveća doza ispitivanih jedinjenja i zaključeno je da ni u jednoj grupi nema značajnih gastričnih lezija (0-1 na modifikovanoj Adami skali).
  - Određene su koncentracije biohemijskih parametara MDA i GSH u želudačnom tkivu životinja koje su tretirane najvećom dozom ispitivanih jedinjenja, upoređene sa koncentracijama MDA i GSH sa grupom životinja koje su tretirane najvećom dozom ibuprofena i zaključeno je da jedinjenja sa trifluorometil grupama izaziva veću lipidnu peroksidaciju od ibuprofena, a sva ostala manju.
  - Određene su koncentracije jetrenih enzima ALT, AST i ALP u plazmi životinja tretiranih ispitivanim jedinjenjima i upoređene sa koncentracijama istih enzima u plazmi životinja tretiranih ibuprofenom. Utvrđeno je da nema statistički značajnog povišenja jetrenih enzima kod životinja tretiranih ispitivanim jedinjenjima u odnosu na grupu životinja tretiranu ibuprofenom.
  - Određeni su parametri oksidativnog stresa u plazmi: prooksidativno-antioksidativni balans, totalni oksidantni status, totalni antioksidantni status i utvrđeno je da ni jedna od ispitivanih  $\beta$ -hidroksi- $\beta,\beta$ -arilalkanskih kiselina ne izaziva veći oksidativni stres u poređenju sa ibuprofenom.
- ❖ *In vitro* testovima ispitana je aktivnost i selektivnost prema COX-2 i utvrđeno je da ispitivana jedinjenja umereno inhibiraju COX-2, a da kiselina sa nitro grupom u *para* položaju ima najbolji indeks selektivnosti (62,68).

## 6. LITERATURA



1. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 8<sup>th</sup> ed., Elsevier, **2010**.
2. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 428-35.
3. Soehnlein O., Lindbon L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 427-39.
4. Ashley T.N., Weil M.Z., Nelson J.R. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2012**, *43*, 385-406.
5. Parke D.V., Parke A.L. Chemical-induced inflammation and inflammatory diseases. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* **1996**, *9*, 211-17.
6. Fraunfelder F.W. Drug-induced ocular inflammatory diseases. *Drug. Today* **2007**, *43*, 117-23.
7. Bjarnason I., Zanelli G., Smith T., Prouse P., Williams P., Smethurst P., Delacey G., Gumpel M., Levi J. Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology* **1987**, *93*, 480-89.
8. Brune K., Hinz B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheumatol.* **2004**, *50*, 2391-99.
9. Murphy K., Weaver C. Janeway's Immunology, 9<sup>th</sup> ed., Garland Science, New York and London, **2017**.
10. Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2013**.
11. Beale J.M., Block J.H. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 12<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2010**.
12. Wermuth C. The Practice of Medicinal Chemistry, 3<sup>rd</sup> ed., Elsevier, **2008**.
13. Mason P.R., Walter M.F., Day C.A., Jacob R.F. a biological rationale for the cardiotoxic effects of rofecoxib in Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases, The COX-2 controversy. Springer, New York, **2007**.

14. Rainsford K.D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell. Biochem.* **2007**, *42*, 3-27.
15. Radulović D., Vladimirov S. Farmaceutska hemija I deo, Farmaceutski fakultet, Beograd, **2005**.
16. Silvermann R., Holladay M. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, 3<sup>rd</sup> ed, Elsevier, **2014**.
17. DeWitt D.L., Smith W.L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1412-16.
18. Merlie J.P., Fagan D., Mudd J., Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3550-53
19. Yokoyama C., Takai T., Tanabe T. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.* **1988**, *231*, 347-51.
20. White W. Cardiovascular effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitors in Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases, The COX-2 controversy, Springer, New York, **2007**.
21. Rao P., Knaus E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2008**, *11*, 81s-110s.
22. Tozkoparana B., Gökhan N., Aktayb G., Yeşiladac E., Ertana M. 6-Benzylidenethiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazole-5(6H)-ones substituted with ibuprofen: synthesis, characterization and evaluation of anti-inflammatory activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, *35*, 743-50.
23. Amir M., Kumar H., Javed S.A. Condensed bridgehead nitrogen heterocyclic system: synthesis and pharmacological activities of 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazole derivatives of ibuprofen and biphenyl-4-yloxy acetic acid. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 2056-66.

24. Abdellatif, K.R.A.; Lamie, P.F.; Omar, H.A. 3-Methyl-2-phenyl-1-substituted-indole derivatives as indomethacin analogs: design, synthesis and biological evaluation as potential anti-inflammatory and analgesic agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Ch.*, **2016**, *31*, 318-24.
25. Firke S.D., Bari S.B. Synthesis, biological evaluation and docking study of maleimide derivatives bearing benzenesulfonamide as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioorgan. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5273-81.
26. Watson D. *Pharmaceutical Chemistry*, 1<sup>st</sup> ed, Elsevier, **2011**.
27. Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *J. Annu. Rev. Pharm.* **1998**, *38*, 97-120.
28. Otto J.C., Smith W.L. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **1995**, *12*, 139-56.
29. Lim H., Paria B.C., Das S.K., Dinchuk J.E., Langenbach R., Trzaskos J.M., Dey S.K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* **1997**, *91*, 197-208.
30. Cheng H.F., Wang J.L., Zhang M.Z., Miyazaki Y., Ichikawa I., McKanna A., Harris R.C. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 953-61.
31. Breder C.D., DeWitt D.L., Kraig R.P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **1995**, *355*, 296-315.
32. Pilbeam C.C, Fall P.M., Alander C.B., Raisz L.G. Differential effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultured bone cells. *J. Bone. Miner. Res.* **1997**, *12*, 1198-203.
33. Picot D., Loll P., Garavito, M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-1. *Nature* **1994**, *367*, 243-49.
34. Luong C., Miler A., Barnett J., Chow J., Ramesha C., Browner M.F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 927-33.

35. Vane R.J., Botting R.M. The mechanism of action of aspirin. *Thromb. Res.* **2003**, *110*, 225-28.
36. Otto J.C., Smith W.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33157-60.
37. Spencer A.G., Thuresson E.A., Otto J.C., Song I., Smith T., DeWitt D.L., Garavito R.M., Smith W.L. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5821-65.
38. Kurumbail R.G., Stevens A.M., Gierse, J.K., McDonald J.J., Stegeman R.A., Gildehaus D., Miyashiro J.M., Penning T.D., Seibert K., Isakson P.C., Stallings W.C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **1996**, *384*, 644-48.
39. Smith W., DeWitt D.L., Garavito M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 145-82.
40. Pountos I., Georgouli T., Bird H., Giannoudis P.V. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. *Inter. J. Interf. Cyt. Med. Res.* **2011**, *3*, 19-127.
41. Green G. Understanding NSAIDs: From aspirin to COX-2. *Clin. Cornerstone* **2001**, *3*, 50-59.
42. Galati G., Tafazoli S., Sabzevari O., Chan T., O'Brien P. Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. *Chemico-Biological Interact.* **2002**, *142*, 25-41.
43. Wolfe M.M., Lichenstein D.R., Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1888-99.
44. Lanza F.L. A review of gastric ulcer and gastroduodenal injury in normal volunteers receiving aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Gastroenterol Supp.* **1989**, *163*, 24-31.
45. Radi Z., Khan N. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract. *Exp. Tox. Path.* **2006**, *58*, 163-73.

46. Hawkey C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 521-35.
47. Schoen R.T., Vende R.J. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am. J. Med.* **1989**, *86*, 449-58.
48. Carson J.L., Willet L.R. Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* **1993**, *46*, 243-48.
49. Wallace J.L. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) induced gastrointestinal damage-potential for development of gastrointestinal tract safe NSAIDs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1994**, *72*, 1493-98.
50. Henry D., Lim L.L, Garcia Rodriguez L.A., Perez Gutthann S., Carson J.L., Griffin M., Savage R., Logan R., Moride Y., Hawkey C., Hill S., Fries JT. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta analysis. *Br. Med. J.* **1996**, *312*, 1563-66.
51. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-I: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br. Med. J.* **1994**, *308*, 81-106.
52. Schrör, K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, Thieme Medical Publishers, Inc., **1997**, *23*, 349-56.
53. Vane J.R., Botting R.M. Biological properties of cyclooxygenase products in Lipid Mediators, ed. F Cunningham, **1994**, 61–97. London: Academic Press
54. Boelsterli U.A. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. *Drug Safety* **2002**, *25*, 633-48.
55. Aithal G., Day C. Nonsteroidal anti-inflammatory drug–induced hepatotoxicity. *Clin. Liver. Dis*, **2007**, *11*, 563-75.
56. Banks A.T., Zimmerman H.J., Ishak K.G., Harter J.G. Diclofenac-associated hepatotoxicity: Analysis of 180 cases reported to the food and drug administration as adverse reactions. *Hepatology* **1995**, *22*, 820-27.

57. Lazarou J., Pomeranz B.H., Corey P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **1998**, *279*, 1200-05.
58. Gajraj N. Cyclooxygenase-2 inhibitors. *Anesth. Analg.* **2003**, *96*, 1720-38.
59. Boelsterli U.A. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *192*, 307-22.
60. Suzuki A., Andrade R.J., Bjornsson E., Lucena M.I., Lee W.M., Yuen N.A., Hunt C.M., Freston J.W. Drugs associated with hepatotoxicity and their reporting frequency of liver adverse events in Vigibase™. *Drug Safety* **2010**, *33*, 503-22.
61. Yamagata K., Andreasson K.I., Kaufman W.E., Barnes C.A., Worley P.F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons; regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **1993**, *11*, 371-86.
62. Breder C.D., Dewitt D., Kraig R.P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **1995**, *355*, 296-315.
63. Minghetti L. Role of COX-2 in inflammatory and degenerative brain diseases in Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases, The COX-2 controversy, Springer, New York, **2007**.
64. Aisen P.S., Schafer K.A., Grundman M., Pfeiffer E., Sano M., Davis K. L., Farlow M.R., Jin S., Thomas R., Thal, L.J. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA-, J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *289*, 2819-26.
65. McGeer P.L., McGeer E.G. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging* **2007**, *28*, 639-47.
66. Reines S.A., Block G.A., Morris J.C., Liu G., Nessly M. L., Lines C.R., Norman B.A., Baranak C.C., Rofecoxib Protocol 091 Study Group. Rofecoxib No effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology*, **2004**, *62*, 66-71.
67. McGeer P.L., Schulzer M., McGeer E.G. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* **1996**, *47*, 425-32.

68. Breitner J.C. The role of antiinflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* **1996**, *47*, 401-11.
69. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and Cancer. *Nature* **2002**, *420*, 856-67.
70. Soslow R.A., Dannenberg A.J., Rush D., Woerner B.M., Khan K.N., Masferrer J., Koki A.T. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, **2000**, *89*, 2637-45.
71. Hwang D., Scollard D., Byrne J., Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* **1998**, *90*, 455-60.
72. Morris C.D., Armstrong G.R., Bigley G., Green H., Attwood S.E. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am. J. Gastroenterol.* **2001**, *96*, 991-96.
73. Dubois R.N., Smalley W.E. Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. *J. Gastroenterology* **1996**, *31*, 898-06.
74. Harris R. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of cancer in Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases, The COX-2 controversy, Springer, New York, **2007**.
75. Kinzler K.W., Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **1996**, *87*, 159-70.
76. Giardiello F.M., Hamilton S.R., Krush A.J., Piantadosi S., Hylind L.M. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 1313-16.
77. Okudur S.S., M. Özer T., Demirbaş S., Kalemoglu M., Harlak A., Coşkun K., Eryılmaz M. Prognostic importance of increased cyclooxygenase-2 levels in colorectal carcinomas: A 5-year single-institution study. *Eurasian. J. Med.* **2008**, *40*, 6-9.
78. Wang D., DuBois R. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 781-88.

79. Sawdy R., Slater D., Fisk N., Edmonds D.K., Bennett P. Use of a cyclooxygenase type-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory agent to prevent preterm delivery. *Lancet*, **1997**, *350*, 265-66.
80. Gibb W., Sun M. Localization of prostaglandin H synthase type 2 protein and mRNA in term human fetal membranes and decidua. *J. Endocrinol.* **1996**, *150*, 497-503.
81. Trautman M.S., Edwin S.S., Collmer D., Dudley D.J., Simmons D., Mitchell M.D. Prostaglandin H synthase-2 in human gestational tissues: regulation in amnion. *Placenta* **1996**, *17*, 239-45.
82. Chakraborty I., Das S.K., Wang J., Dey S.K. Developmental expression of the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J.Mol. Endocrinol.* **1996**, *16*, 107-22.
83. Koren G., Florescu A., Costei A.M., Boskovic R., Moretti, M.E. Nonsteroidal antiinflammatory drugs during third trimester and the risk of premature closure of the ductus arteriosus: a meta-analysis. *Ann. Pharmacother.* **2006**, *40*, 824-29.
84. Ferreira L.G., Santos dos R.N., Oliva G., Andricopulo A. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **2015**, *20*, 13384-421.
85. Patrick G. An Introduction to Medicinal Chemistry, 5<sup>th</sup> ed., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, **2013**.
86. Dilber S.P., Dobric S.L., Juranic Z.D., Markovic B.D., Vladimirov S.M., Juranic I.O. Docking studies and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -arylpropanoic acids. *Molecules* **2008**, *13*, 603-15.
87. Taylor R.D., Jewsbury P.J., Essex J.W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 151-66.
88. Guvench O., MacKerell Jr A.D. Computational evaluation of protein-small molecule binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *9*, 56-61.
89. Rosati O., Curini M., Marcotullio M. C., Macchiarulo A., Perfumi M., Mattioli L., Cravotto G. Synthesis, docking studies and anti-inflammatory activity of 4, 5, 6, 7-tetrahydro-2H-indazole derivatives. *Bioorgan. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3463-73.



90. Habeeb A., Rao P., Knaus E. Design and synthesis of 4,5-diphenyl-4-isoxazolines: novel inhibitors of cyclooxygenase-2 with analgesic and antiinflammatory activity. *J. Med. Chem.* **2001**, 2921-27.
91. Reformatsky S. Neue Synthese zweiatomiger einbasischer Säuren aus den Ketonen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 1210-11.
92. Ocampo R., Dolbier W.Jr. The Reformatsky reaction in organic synthesis. Recent advances. *Tetrahedron* **2004**, 60, 9325-74.
93. Schriener R. The Reformatsky Reaction in Organic Reactions, John Wiley and Sons, London, **1947**.
94. Varoli L., Guarnieri A., Burnelli S., Gehedini N., Scapini G., Ferri S., Cavicchini E. Nonsteroidal anti-inflammatory agents. Part 17: Stereomeric o-, m-tolyl- and anisyl-biphenyl-yl-hydroxypropionic acids. *Pharmazie* **1988**, 47, 524-26.
95. Conforth D.A., Opara A.E., Read G. General synthetic routes to  $\beta$ -hydroxy-acids from t-butyl esters and the Reformatskii reaction. *J. Chem. Soc. C.* **1969**, 20, 2799-805.
96. Horeau A. Synthèse des  $\beta$ -hydroxy-acides par une réaction de Reformatsky utilisant les  $\alpha$ -bromoesters de triméthylsilyle. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 12, 3227-28.
97. Couffignal R., Gaudemar M. Sur la réaction de Reformatsky: I. Préparation et réactivité des organozinciques issus de divers crotonates d'alcoyles. *J Organometal. Chem.* **1973**, 60, 209-12.
98. Maillard J., Bernard M., Morin R. *U.S. Pat.* 3065.134, **1962**.
99. Bogavac M., Arsenijević L., Arsenijević V. Reaction de Reformatsky a froid avec des  $\alpha$ -bromoesters-acetals I. Une methode generale pour la synthese des  $\beta$ -hydroxy-acides a partir des  $\alpha$ -bromoesters de tetrahydropyrannyle. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1980**, 2, 145-46.
100. Bogavac M., Arsenijević L., Pavlov S., Arsenijević V. Reformatsky reaction with  $\alpha$ -bromo esters-acetals in the cold. II. A general method for the preparation of  $\beta$ -hydroxy acids by using 1-alkoxyalkyl esters of  $\alpha$ -bromo acids. (Printed in serbian abstract in English). *Arh. farm.* **1988**, 38, 93-97.

101. Dilber S., Žižak Ž., Stanojković T., Juranić Z., Drakulić B., Juranić I. Antiproliferative activity of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 214-28.
102. Izquierdo I., Plaza M.T., Robles R., Mota A.J., Franco F. Highly stereocontrolled alkylation of protected 'diacetone hexulose aldehydes'. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2001**, *12*, 2749-54.
103. Gaudemar M. Preparation d'esters  $\gamma$ -etilléniques per allylation du reactif de Reformatsky en presence sels de cuivre. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2749-52.
104. Stephen C. J. Diastereoselective synthesis of 2,5-dialkyl tetrahydrofuran-ones by a copper-catalysed tandem carbenoid insertion and ylide rearrangement reaction. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6193-96.
105. Podlech J., Mayer T.C. Indium in organic synthesis. *Synthesis* **2003**, *5*, 633-56.
106. Furstner A. Carbon-carbon bond formations involving organochromium(iii) reagents. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 991-1045.
107. Krief A., Laval A.M. Coupling of organic halides with carbonyl compounds promoted by  $\text{SmI}_2$ , the Kagan reagent. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 745-78.
108. Andres C., Gonzalez A., Pedrosa R., Perez-Encabo A. Stereoselective ring opening of chiral oxazolidines by Reformatsky reagents: an enantioselective entry to  $\beta$ -amino esters. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2895-98.
109. Bott K. Neue anwendungsmöglichkeiten des Reformatsky-reagenz zur syntheses substituierter essigsäureethylester. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 555-56.
110. Syed J., Forster S., Effenberger F. Application of the Blaise reaction: stereoselective synthesis of (4R)-tert-butyl 3-amino-4-trimethylsilyloxy-2-alkenoates from (R)-cyanohydrins. *Tetrahedron-Asymmetr.* **1998**, *9*, 805-15.
111. Latouche R., Texier-Boullet F., Hamelin, J. Alkali metal fluoride mediated silyl-Reformatsky reaction in solid-liquid media; activation by microwaves. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1179-82.
112. Gholap A.R., Chavan A.P. Microwave-promoted synthesis of  $\beta$ -hydroxyesters by the Reformatsky reaction in the absence of solvent. *J. Chem. Res.* **2003**, *6*, 374-76.

113. Salman M., Babasaheb B.P., Rafik S.U., Shriram G.D., Hemant C.V. Synthesis of novel  $\alpha,\alpha$ -difluoro- $\beta$ -hydroxycarbonyl pyrazole derivatives as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer agents. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 262-73.
114. Zhao J.-C., Li X.-M., Gloer J.B., Wang B.-G. First total syntheses and antimicrobial evaluation of penicil monoterpene, a marine-derived monoterpene, and its various derivatives. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 3352-70.
115. Baldoli C., Del Buttero P., Licandro E., Papagni A. Tricarbonyl( $\eta^6$ arene)Chromium(0) complexes as chiral auxiliaries: Asymmetric synthesis of  $\beta$ -aminoesters and  $\beta$ -lactams by Reformatsky condensation. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4849-56.
116. Fukuzawa S., Matsuzawa H., Yoshimitsu S. Asymmetric samarium-Reformatsky reaction of chiral  $\alpha$ -bromoacetyl-2-oxazolidinones with aldehydes. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1702-06.
117. Van Summeren R., Vaessen H., Mink D., Waser M. Process for the manufacture of isavuconazole or ravuconazole. U.S. Pat. Appl. Publ. US 20150239852 A1 20150827, **2015**.
118. De Munck L., Carlos V., Carmen M.M., Jose P.R. Catalytic enantioselective aza-Reformatsky reaction with cyclic imines. *Chem. Asian. J.* **2016**, *22*, 17590-94.
119. Obringer M., Colobert F., Neugnot B., Solladie G. Reformatsky-type reaction of chiral nonracemic  $\alpha$ -bromo- $\alpha'$ -sulfinyl ketones with aldehydes. Synthesis of enantiomerically pure 2-methyl-1,3-diol moieties. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 629-32.
120. Katritzky A.R., Hong Q., Yang Z. Preparations of secondary amines and beta-amino esters via additions of Grignard and Reformatsky reagents to imines and by one-pot reactions of primary amines, aldehydes, and Grignards. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3405-08.
121. Dener J.M., Zhang L.H., Rapoport H. An effective chiro specific synthesis of (+)-pilocarpine from L-aspartic acid. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1159-66.
122. Mastalerz H., Menard M. Synthesis of a 4-beta-(hydroxymethyl)carbapenam. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3223-26.

123. Yadav J.S., Praveen Kumar T.K., Maniyan P.P. Stereoconvergent synthesis of C-9 to C-16 fragment of trienomycin based on the regioselective opening of  $\gamma$ - $\delta$ -poxy acrylates with Trimethylaluminium. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2969-72.
124. Ichikawa S., Shuto S, Minakawa N., Matsuda A. Nucleosides and nucleotides. 163. synthesis of 3'- $\beta$ -branched uridine derivatives via intramolecular Reformatsky-type reaction promoted by samarium diiodide. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1368-75.
125. Manallack D.T. The  $pK_a$  distribution of drugs: application to drug discovery. *Prspect. Med. Chem.* **2007**, *1*, 25-38.
126. Avdeef A. Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability and Charge State, 2nd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2012**.
127. Pagliara A, Carrupt P.A., Caron G., Gaillard P., Testa B. Lipophilicity profiles of ampholytes. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3385-400.
128. Andrews P.R., Craik D.J., Martin J.L. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1648-57.
129. Gómez-Zaleta B., Ramírez-Silva M., Gutiérrez A., González-Vergarab E., Güizado-Rodríguez M., Rojas-Hernández A. UV/vis,  $^1\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic studies to determine mangiferin  $pK_a$  values. *Spectrochim. Acta Part A.* **2006**, *64*, 1002-09.
130. Benzecon J., Wittwer M.B., Cutting B., Smiesko M., Wagner B., Kansy M., Ernst B.  $pK_a$  determination by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy – an old methodology revisited. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *93*, 147-55.
131. Babić S., Horvat A., Mutavdžić Pavlović D., Kaštelan-Macan M. Determination of  $pK_a$  values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trend. Anal. Chem.* **2007**, *26*, 1043-67.
132. Vojic M.P., Popovic G.V., Sladic D.M., Pfendt L.B. Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets. *J. Ser. Chem. Soc.* **2005**, *70*, 67-78.

133. Pfenndt L.B., Popović G.V. A spectrophotometric method for the determination of equilibrium constants of the reversible 1,4-benzodiazepine ring-opening reaction. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1994**, 2, 1845-48.
134. Foulon C., Duhal N., Lacroix-Callens B., Vaccher C., Bonte J.P., Goossens J.F. Determination of pK<sub>a</sub> values of benzoxa-, benzothia- and benzoselena-zolinone derivatives by capillary electrophoresis. Comparison with potentiometric titration and spectrometric data. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, 31, 165-71.
135. Caliaro G.A., Herbots C.A. Determination of pK<sub>a</sub> values of basic new substances by CE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 26, 427-34.
136. Ishihama Y., Nakamura M., Miwa T., Kajima T., Asakawa N. A rapid method for pK<sub>a</sub> determination of drugs using pressure-assisted capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug discovery. *J. Pharm. Sci.* **2002**, 91, 933-42.
137. Mandersheid M., Eschinger T. Determination of pK<sub>a</sub> values by liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **2003**, 41, 323-26.
138. Wiczling P., Markuszewski M., Kaliszan R. Determination of pK<sub>a</sub> by pH gradient reversed-phase HPLC. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3069-77.
139. Bartolini M., Bertucci C., Gotti R., Tumiatti V., Cavalli A., Recanatini M., Andrisano V. Determination of the dissociation constants (pK<sub>a</sub>) of basic acetylcholinesterase inhibitors by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, 958, 59-67.
140. Ráfols C., Rosés M., Bosch E. A comparison between different approaches to estimate the aqueous pK<sub>a</sub> values of several non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 350, 249-55.
141. Melouna M., Bordovská S., Galla L. The thermodynamic dissociation constants of four non-steroidal anti-inflammatory drugs by the least-squares nonlinear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2007**, 45, 552-64.

142. Oumada F., Ràfols C., Rosés M., Bosch E. Chromatographic determination of aqueous dissociation constants of some water-insoluble nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 991-99.
143. Liao C., Nicklaus M. Comparison of nine programs predicting  $pK_a$  values of pharmaceutical substances. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2801-12.
144. Zhang J., Kleinoder T., Gasteiger J. Prediction of  $pK_a$  values for aliphatic carboxylic acids and alcohols with empirical atomic charge descriptors. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 2256-66.
145. Milleti F., Storchi L., Sforza G., Cruciani G. New and original  $pK_a$  prediction method using grid molecular interaction fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2172-81.
146. Jelfs S., Ertl P., Selzer P. Estimation of  $pK_a$  for druglike compounds using semiempirical and information-based descriptors. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 450-59.
147. Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A. Alternative measures of lipophilicity: From octanol-water partitioning to IAM retention. *J Pharm Sci.* **2008**, *97*, 2984-3004.
148. Smith D.A., Jones B., Walker D.K. Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 243-66.
149. Fujita T., Iwasa J., Hansch C. A new substituent constant,  $\pi$ , derived from partition coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5175-80.
150. Winiwarter S., Bonham N.M., Ax F., Hallberg A., Lennernäs H., Karlén A. Correlation of human jejunal permeability (*in vivo*) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4939-49.
151. Katritzky A.R., Kuanar M., Slavov S., Dobchev D.A., Fara D.C., Karelson M., Varnek, A. Correlation of blood-brain penetration using structural descriptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4888-917.
152. Testa B., Crivori P., Reist M., Carrupt P.A. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples. *Persp. Drug Discov.* **2000**, *19*, 179-211.

153. Gocan S., Cimpan G., Comer J. Lipophilicity measurements by liquid chromatography. *Adv. Chromatogr.* **2006**, *44*, 79-176.
154. Kaliszan R., Nasal A., Markuszewski M.J. New approaches to chromatographic determination of lipophilicity of xenobiotics *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 803-11.
155. Benhaim D., Grushka E. Effect of n-octanol in the mobile phase on lipophilicity determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a modified silica column. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1209*, 111-19.
156. Meng Q.C., Zou H., Johansson J.S., Eckenhoff R.G. Determination of the hydrophobicity of local anesthetic agents. *Anal. Biochem.* **2001**, *292*, 102-06.
157. Leucuta S.E. Selecting oral bioavailability enhancing formulations during drug discovery and development. *Expert. Opin. Drug Discov.* **2001**, *9*, 139-50.
158. Kansy M., Senner F., Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007-10.
159. Wohnsland F., Faller B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 923-30.
160. Mandagere A.K., Thompson T.N., Hwang K.K. Graphical model for estimating oral bioavailability of drugs in humans and other species from their Caco-2 permeability and in vitro liver enzyme metabolic stability rates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 304-11.
161. Zhu C., Jiang L., Chen T. M., Hwang K. K. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 399-407.
162. Masungi C., Mensch J., A. Dijck V., Borremans C., Willems B., Mackie C., Noppe M., Brewster M. E. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combine with a 10-day cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie* **2008**, *63*, 194-99.

163. Avdeef A. Absorption and Drug Development; Solubility, Permeability and the Charged State. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2003**, 116-246.
164. Galinis-Luciani D., Nguyen L., Yazdanian M. Is PAMPA a useful tool for discovery? *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2886-92.
165. Sugano K., Takata N., Machida M., Saitoh K., Terada K. Prediction of passive intestinal absorption using biomimetic artificial membrane permeation assay and the parallel pathway model. *Int. J. Pharm.* **2002**, *241*, 241-51.
166. Liu H., Sabus C., Carter G. T., Du C., Avdeef A., Tischler M. In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1820-26.
167. Bujard A., Voirol H., Carrupt P., Schappler J. Modification of a PAMPA model to predict passive gastrointestinal absorption and plasma protein binding. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 273-78.
168. Dobričić V., Marković B., Nikolic K., Vladimirov S., Čudina O. 17 $\beta$ -carboxamide steroids – in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *52*, 95-108.
169. Sinkó B., Garrigues T.M., Balogh G.T., Nagy Z.K., Tsinman O., Avdeef A., Takács-Novák K. Skin–PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45*, 698-707.
170. Jetzer W.E., Huq A.S., Ho N.F. M., Flynn G.L., Duraiswamy N., Condie L. Jr. Permeation of mouse skin and silicone rubber membranes by phenols: relationship to in vitro partitioning. *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 1098-103.
171. Vucicevic J., Nikolic K., Dobricic V., Agbaba D. Prediction of blood–brain barrier permeation of  $\alpha$ -adrenergic and imidazoline receptor ligands using PAMPA technique and quantitative-structure permeability relationship analysis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *68*, 94-105.



172. Mensch J., Melis A., Mackie C., Verrecka G., Brewstera M., Augustijns P. Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 495-502.
173. Berthod A., Girard I., Gonnet C. Additive effects on surfactant adsorption and ionic solute retention in MLC. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1356-61.
174. Armstrong D.W., Nome F. Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1662-66.
175. Molero-Monfort M., Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camanás R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. Biopartitioning micellar chromatography: an *in vitro* technique for predicting human drug absorption. *J. Chromatogr. B* **2001**, *753*, 225-36.
176. Escuder-Gilabert L., Molero-Monfort M., Villanueva-Camanas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an *in vitro* technique for predicting drug penetration across the blood–brain barrier. *J. Chromatogr. B.* **2004**, *807*, 193-201.
177. Beigi F., Gottschalk I., Hägglund C.L., Haneskog L., Brekkan E., Zhang Y., Österberg T., Lundahl P. Immobilized liposome and biomembrane partitioning chromatography of drugs for prediction of drug transport. *Int. J. Pharm.* **1998**, *164*, 129-37.
178. Dobričić V., Nikolic K., Vladimirov S., Čudina O. Biopartitioning micellar chromatography as a predictive tool for skin and corneal permeability of newly synthesized 17 $\beta$ -carboxamide steroids. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *56*, 105-12.
179. Leach A. Molecular Modelling, 2<sup>nd</sup> edition, Pearson Education, Harlow, England, **2001**.
180. Roy K.K., Roy P.P. Comparative chemometric modeling of cytochrome 3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds using stepwise MLR, FAML, PLS, GFA, G/PLS and ANN techniques. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2913-22.

181. Riahi S., Beheshti A., Ganjali M.R., Norouzi P. A novel QSPR study of normalized migration time for drugs in capillary electrophoresis by new descriptors: Quantum chemical investigation. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 4027-35.
182. Jalali-Heravi M., Shen Y., Hassanisadi M., Khaledi M.G. Prediction of electrophoretic mobilities of peptides in capillary zone electrophoresis by quantitative structure-mobility relationships using the offord model and artificial neural networks. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1874-85.
183. Aschi M., D'Archivio A.A., Maggi M.A., Mazzeo P., Ruggieri F. Quantitative structure-retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *582*, 235-42.
184. Golbraikh A., Tropsha A. Beware of q<sup>2</sup>! *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *20*, 269-76.
185. Todeschini R., Consonni V. Handbook of Molecular Descriptors. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2000**.
186. Gupta V.K., Khani H., Ahmadi-Roudi B., Mirakhorli S., Fereyduni E., Agarwal S. Prediction of capillary gas chromatographic retention times of fatty acid methyl esters in human blood using MLR, PLS and back-propagation artificial neural networks. *Talanta* **2011**, *83*, 1014-22.
187. Zhang Y.X. Artificial neural networks based on principal component analysis input selection for clinical pattern recognition analysis. *Talanta* **2007**, *73*, 68-75.
188. Filipic S., Nikolic K., Vovk I., Krizman M., Agbaba D. Quantitative structure mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in CDs-mediated CE. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 471-82.
189. Gonzalez-Arjona D., Lopez-Perez G., Gustavo-Gonzalez A. Non-linear QSAR modeling by using multilayer perceptron feedforward neural networks trained by back-propagation. *Talanta* **2002**, *56*, 79-90.
190. Jalali-Heravi M., Garkani-Nejad Z. Prediction of electrophoretic mobilities of alkyland alkenylpyridines in capillary electrophoresis using artificial neural networks. *J. Chromatogr. A* **2002**, *971*, 207-15.
191. Umetrics AB, SIMCA P+ program, Version 12.0.0.0. Umea, Sweden, **2008**.

192. Wold S., Sjöström M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* **2001**, 58, 109-30.
193. Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikstrom C., Wold S. Multi-and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I, 2<sup>nd</sup> ed., Umetrics Academy, Umeå, **2001**.
194. Agatonovic-Kustrin S., Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2000**, 22, 717-27.
195. Vogel G. Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays, Second edition, Springer-Verlag, Berlin, Heilderberg, Germany, **2002**.
196. Winter C.A., Risley E.A., Nus G.N. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **1962**, 111, 544-47.
197. Morris C.J. Carrageenan-Induced paw edema in the rat and mouse. *Inflamm. Protoc.* **2003**, 255, 115-121.
198. Mastbergen S.C., Bijlsma J.W., Lafeber F.P. Selective COX-2 inhibition is favorable to human early and late-stage osteoarthritic cartilage: a human in vitro study. *Osteoarthr. Cartilage* **2005**, 13 (6), 519–26.
199. Patrignani P., Panara M.R., Sciulli M.G., Santini G., Renda G., Patrono C. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Physiol. Pharmacol.* **1997**, 48, 623-31.
200. Dannhardt G., Ulbrich H. *In-vitro* test system for the evaluation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors based on a single HPLC run with UV detection using bovine aortic coronary endothelial cells (BAECs). *Inflamm. Res.* **2001**, 50 (5), 262-69.
201. Unsal-Tan O., Ozadali K., Piskin K., Balkan A. Molecular modeling, synthesis and screening of some new 4-thiazolidinone derivatives with promising selective COX-2 inhibitory activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 57, 59-64.

202. Handler N., Jaeger W., Puschacher H., Leisser K., Erker T. Synthesis of novel curcumin analogues and their evaluation as selective cyclooxygenase-1 (COX-1) inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55(1)*, 64-71.
203. Migliara O., Raffa D., Plescia S., Cusimano M.G., Carbone A. Synthesis and COX inhibition of 7-R1-8-R2-1-ethyl-3,4-dimethyl-4,10-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-c][1,5]benzodiazocine-5,11-diones. *ARKIVOC* **2009**, *ii*, 1-10.
204. Amir M., Kumar H., Javed S.A. Condensed bridgehead nitrogen heterocyclic system: synthesis and pharmacological activities of 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazole derivatives of ibuprofen and biphenyl-4-yloxy acetic acid. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2056-66.
205. Amir M., Kumar H., Javed S.A. Non-carboxylic analogues of naproxen: design, synthesis, and pharmacological evaluation of some 1,3,4-oxadiazole/ thiadiazole and 1,2,4-triazole derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 577-585.
206. Cantoni L., Valaperta R., Ponsoda X., Castell J.V., Barelli D., Rizzardini M., Mangolini A., Hauri L., Villa P. Induction of hepatic heme oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity. *J. Hepatol.* **2003**, *38*, 776-83.
207. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS cation. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 277-85.
208. Pohle T., Brzozowski T., Becker J.C., Vander Voort I.R., Markmann A., Konturek J.A., Moniczewski A., Domschke W., Konturek J.W. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. *Aliment. Pharm. Ther.* **2001**, *15*, 677-87.
209. Fornai M., Colucci R., Antonioli L., Awwad O., Ugolini C., Tuccori, M., Fulcerib F., Nataleb G., Basoloc F., Blandiz C., Blandizzi C. Effects of esomeprazole on healing of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers in the presence of a continued NSAID treatment: Characterization of molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* **2011**, *63*, 59-67.

210. Hirota M., Inoue M., Ando Y., Hirayama K., Murino Y., Sakamoto K., Mori K., Akagi M. Inhibition of stress-induced gastric injury in the rat by glutathione. *Gastroenterology* **1989**, *97*, 853-59.
211. Ottaviani G., Martel S., Carrupt P.-A. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3948-54.
212. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Zakrzewski V.G., Montgomery Jr J.A., Stratmann R.E., Burant J.C., Dapprich S., Millam J.M., Daniels A.D., Kudin K.N., Strain M.C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G.A., Ayala P.Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Cioslowski J., Ortiz J.V., Baboul A.G., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Gonzalez C., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B.G., Chen W., Wong M.W., Andres J.L., Head-Gordon M., Replogle E.S., Pople J.A., Gaussian 98 (Revision A.7), Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.
213. Umetrics AB, SIMCA P+ program, Version 12.0.0.0. Umea, Sweden, **2008**.
214. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inf.* **2010**, *29*, 476-88.
215. Ojha P.K., Roy K. Comparative QSARs for antimalarial endochins: Importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemometr. Intell. Lab.* **2011**, *109*, 146-61.
216. Snedecor G.W., Cochran W.G. Statistical Methods. Oxford & IBH, New Delhi, **1967**.
217. Adami E., Marazzi-Uberti E., Turba C. Pharmacological research on gefarnate, a new synthetic isoprenoid with an anti-ulcer action. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1963**, *147*, 113-45.
218. Xueting M., Donghui X., Sika X., Yanping Z., Shibo X. Novel role of Zn(II)-curcumin in enhancing cell proliferation and adjusting proinflammatory cytokine-

mediated oxidative damage of ethanol-induced acute gastric ulcers, *Chem-Biol. Interact.* **2012**, *197*, 31-39.

219. Girotti M.J., Khan N., Mc Lellan B.A. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J. Trauma.* 1991, *31*, 32-35.
220. Jollow D.J., Mitchell J.R., Zampaglione N., Gillette J.R. Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* **1974**, *11*, 151-69.
221. Hamidi-Alamdari D.H., Ghayour-Mobarhan M., Tavallaie S., Parizadeh M.R., Moohebbati M., Ghafoori F., Kazemi-Bajestani S.M.R., Paletas K., Pegiou T., Koliakos G. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 375-80.
222. Richter R.J., Furlong C.E. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* **1999**, *9*, 745-53.
223. Savić J.S., Dilber S.P., Marković B.D., Milenković M.T., Vladimirov S.M., Juranić I.O. Docking studies and  $\alpha$ -substitution effects on the anti-inflammatory activity of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylpropanoic acids. *Molecules* **2011**, *16*, 6645-55.
224. Savić J., Dilber S., Milenković M., Kotur-Stevuljević J., Vladimirov S., Brborić J. Docking studies, synthesis and biological evaluation of  $\beta$ -aryl- $\beta$ -hydroxy propanoic acids for anti-inflammatory activity. *Med. Chem.* **2017**, *13*, 186-95.
225. Charlesworth E.H. Charleson P. Reformatsky reactions with o- and p-substituted benzophenones. *Can. J. Chem.* **1967**, *46*, 1843-47.
226. Sisido K., Kumazawa K., Nozaki H. Asymmetric synthesis in an aldol type condensation of ketone with ester. *J. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 125-29.
227. Burkhardt E., Rieke R.D. The direct preparation of organocadmium compounds from highly reactive cadmium metal powders. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 416-17.
228. Inaba S.-I., Rieke R.D. Reformatsky type additions of haloacetonitriles to aldehydes mediated by metallic nickel. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 155-56.

229. Imamoto T., Kusumoto T., Tawarayama Y., Sugiura Y., Mita, T., Hatanaka Y., Yokoyama M. Carbon-carbon bond-forming reactions using cerium metal or organocerium(III) reagents. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3904-12.
230. Borno A., Bigley D.B. Studies in decarboxylation. Part 16. Steric inhibition of resonance in a 1,5-sigmatropic reaction. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1983**, 1311-12.
231. Babu S.A., Yasuda M., Shibata I., Baba A. In- or In(I)-employed diastereoselective Reformatsky-type reactions with ketones: <sup>1</sup>H NMR investigations on the active species. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4475-78.
232. Babu S.A., Yasuda M., Shibata I., Baba A. In- or In(I)-employed tailoring of the stereogenic centers in the Reformatsky-type reactions of simple ketones,  $\alpha$ -Alkoxy ketones, and  $\beta$ -keto esters. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10408-19.
233. Knochel P., Almena Perea J., Jones P. Organozinc mediated reactions. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8275-319.
234. Lamparczyk H., Atomura M., Jinno K. Qualitative description of dispersive and inductive electrostatic interactions in reversed-phase liquid chromatography. *Chromatographia* **1987**, *23*, 752-59.
235. Avdeef A., Box K.J., Comer J.E.A., Hibbert C., Tam K.Y. pH-metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 209-15.
236. Wan H., Holmen A.G., Wang Y., Lindberg W., Englund M., Nagard M.B., Thompson R.A., High throughput screening of pK<sub>a</sub> values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2639-48.
237. Tam K.Y., Takacs-Novak K. Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *434*, 157-67.
238. Takacs-Novak K., Box K.J., Avdeef A. Potentiometric pK<sub>a</sub> determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures. *Int. J. Pharm.* **1997**, *151*, 235-48.

239. Ueda H., Pereira-Rosario R., Riley C.M. Perrin J.H. Some pharmaceutical applications of diode array spectrophotometers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1985**, *11*, 833-34.
240. Pranker R. Critical Compilation of  $pK_a$  Values for Pharmaceutical Substances in Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, volume 33, Elsevier, **2007**.
241. Adams S.S., Bough R.G., Cliffe E.E, Lessel B., Mills R.F.N. Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1969**, *15*, 310-30.
242. Hajare A., Mali M., Sarvagod S., Kurane S., Patwardahn S., Dange A. Adsorption and partition studies of fluconazole. *Asian J. Research Chem.* **2009**, *2*, 213-19.
243. Bašić J., Ivković B., Stevanović S., Lazarević A., Vujić Z. Određivanje lipofilnosti 2' hidroksi halkona primenom RP-HPLC metode. **2016**, DOI:10.2298/HEMIND150426057
244. Savić J., Dobričić V., Nikolic K., Vladimirov S., Dilber S., Brborić J. *In vitro* prediction of gastrointestinal absorption of novel  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids using PAMPA technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *100*, 36-41.
245. Kansy M., Avdeef A., Fischer H. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 349-55.
246. Teksin Z.S., Seo P.R., Polli, J.E. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: Three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *AAPS J.* **2010**, *12*, 238-41.
247. Chen X., Murawski A., Patel K., Crespi C. L., Balimane P. V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm. Res.* **2008**, *25*(7), 1511-20.
248. Yu H., Wang Q., Sun Y., Shen M., Li H., Duan Y. A new PAMPA model proposed on the basis of a synthetic phospholipid membrane. *PloS One* **2015**, *10*, e0116502.
249. Vizserálek G., Balogh T., Takács-Novák K., Sinkó B. PAMPA study of the temperature effect on permeability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *53*, 45-49.



250. Lucas M.L., Whitehead R.R. A re-evaluation of the properties of the three-compartment model of intestinal weak-electrolyte absorption. *J. Theor. Biol.* **1994**, *167*, 147-59.
251. Avdeef A. The rise of PAMPA. *Expert. Opin. Drug. Met.* **2005**, *1*, 325-342.
252. Hidalgo I.J. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr. Top. in Med. Chem.* **2001**, *1*(5), 385-401.
253. TALETE srl, 2013. Molecular descriptors, QSAR, chemometrics and chemoinformatics-dragon molecular descriptor list. <[www.talete.mi.it/products/dragon\\_molecular\\_descriptor\\_list.pdf](http://www.talete.mi.it/products/dragon_molecular_descriptor_list.pdf)>
254. Katritzky A.R., Lobanov V.S., Karelson M. QSPR: the correlation and quantitative prediction of chemical and physical properties from structure. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*(4), 279-287.
255. Puri N., Prakash O., Manoharlal R., Sharma M., Ghosh I., Prasad R. Analysis of physico-chemical properties of substrates of ABC and MFS multidrug transporters of pathogenic *Candida albicans*. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4813-26.
256. Marshall G.R. Binding-site modeling of unknown receptors. In: Kubinyi, H. (Ed.), *3D QSAR in Drug Design – Theory, Methods and Applications*. ESCOM, Leiden, 80-116, **1994**.
257. Duchowicz P.R., Fernandez M., Caballero J., Castro E.A, Fernandez F.M. QSAR for non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5876-89.
258. Hancock T., Put R., Coomans D., Heyden Y.V., Everingham Y. A performance comparison of modern statistical techniques for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic QSRR studies. *Chemometr. Intell. Lab.* **2005**, *76*, 185-96.
259. Dobričić V., Savić J., Nikolic K., Vladimirov S., Vujić Z., Brborić J. Application of biopartitioning micellar chromatography and QSRR modeling for prediction of gastrointestinal absorption and design of novel  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *100*, 280-84.

260. Labute P. A widely applicable set of descriptors. *J. Mol. Graph. Model.* **2000**, *18*, 464-77.
261. Hamidi-Alamdari D., Paletas K., Pegiou T., Sarigianni M., Befani C., Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type 2 diabetes mellitus. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 248-54.
262. Pellock J.M. Felbamate. *Epilepsia* **1999**, *40*, 57-62.
263. Sevilla-Mantilla C., Ortega L., Agúndez J.A.G., Fernandez-Gutierrez B., Ladero J. M., Díaz-Rubio M. Leflunomide-induced acute hepatitis. *Dig. Liv. Dis.* **2004**, *36*, 82-84.
264. Dikensoy E., Balat O., Pence S., Akcali C., Cicek H. The risk of hepatotoxicity during long-term and low-dose flutamide treatment in hirsutism. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2009**, *279(3)*, 321-27.
265. Brideau C., Kargman S., Liu, S., Dallob A.L., Ehrich E.W., Rodger I.W., Chan, C.C. A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm. Res.* **1996**, *45(2)*, 68-74.

# 7. PRILOZI

## PRILOG 1

### Spisak publikovanih radova i saopštenja koji čine deo ove doktorske disertacije

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. **Savić J.S.**, Dilber S.P., Marković B.D., Milenković M.T., Vladimirov S.M., Juranić I.O. Docking studies and  $\alpha$ -substitution effects on the anti-inflammatory activity of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylpropanoic acids. *Molecules* **2011**, *16*, 6645-6655. **(M22)**
2. **Savić J.**, Dilber S., Milenković M., Kotur-Stevuljević J., Vladimirov S., Brborić J. Docking studies, synthesis and biological evaluation of  $\beta$ -aryl- $\beta$ -hydroxypropanoic acids for anti-inflammatory activity. *Med. Chem.* **2017**, *13*, 186-195. **(M23)**
3. **Savić J.**, Dobričić V., Nikolic K., Vladimirov S., Dilber S., Brborić J. *In vitro* prediction of gastrointestinal absorption of novel  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids using PAMPA technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *100*, 36-41. **(M21)**
4. Dobričić V., **Savić J.**, Nikolic K., Vladimirov S., Vujić Z., Brborić J. Application of biopartitioning micellar chromatography and QSRR modeling for prediction of gastrointestinal absorption and design of novel  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *100*, 280-284. **(M21)**

### Usmena saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u izvodu (M32):

1. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Vladimirov S. Docking studies of 3-hydroxy-3-arylpropionic acids as potentially selective COX-2 inhibitors. 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Belgrade, Serbia, 27-29 June 2013.

**Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u celini (M33):**

1. Dobričić V., **Savić J.**, Vladimirov S., Brborić J. Prediction of gastrointestinal absorption of novel  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids by the use of biopartitioning micellar chromatography, 13<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, 26-30 September, 2016.
2. Dobričić V., **Savić J.**, Nikolic K., Vladimirov S., Brborić J. *In vitro* prediction of gastrointestinal absorption of novel  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids using parallel artificial membrane permeability assay. 11<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Belgrade, Serbia, 22-24 September, 2016.
3. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Vladimirov S. Determination of logP of newly synthesized  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids using RP-HPLC method, 12<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, 22-26 September, 2014.

**Radovi saopšteni na naučnim skupovima međunarodnog (M34) i nacionalnog značaja (M64) štampani u izvodu:**

1. **Savić J.**, Milenković M., Kotur-Stevuljević J., Vujić Z., Vladimirov S., Brborić J. Oxidative stress index in rat stomach as a measure of gastric tolerability of newly synthesized anti-inflammatory compounds, 6<sup>th</sup> Congress of pharmacy in Macedonia with international participation, Ohrid, Macedonia 1-5 June, 2016.
2. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Milenković M., Vladimirov S. Design, synthesis and evaluation of anti-inflammatory activity of  $\beta$ -aryl- $\beta$ -hydroxypropanoic acids. VI Serbian Congress of Pharmacy, Belgrade, Serbia, 15-19 October, 2014.

3. **Savić J.**, Brborić J., Dilber S., Vladimirov S. Design and synthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylpropanoic acid. 2<sup>nd</sup> Meeting of the Paul Erlich MedChem Euro-PhD Network, Ljubljana, Slovenia, 9-11 September 2012..
4. **Savić J.**, Kljajić N., Dilber S., Brborić J., Juranić I., Vladimirov S. RP-HPLC determination of dissociation constants of some novel  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylalkanoic acids as potential anti-inflammatory agents. V Congress of Pharmacists of Serbia, Belgrade, Serbia, 13-17 October, 2010.
5. **Savić J.**, Marković B., Dilber S., Milenković M., Jovčić M., Đorđević B. Anti-inflammatory activity and docking studies of some  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -arylpropanoic acids. 5<sup>th</sup> Congress of Pharmacy of Macedonia, Ohrid, 21-25 September 2011.
6. Čalija B., Cekić N., Savić S., Marković B., **Savić J.**, Milić J. Swelling and drug release properties of naproxen-loaded Ca-alginate microparticles reinforced with chitosan oligosaccharide. 5<sup>th</sup> Congress of Pharmacy of Macedonia, Ohrid, Macedonia, 21-25 September, 2011.

## PRILOG 2

### BIOGRAFIJA

Jelena Savić je rođena 3.10.1983. godine u Smederevu gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju. Školske 2002/2003. je upisala Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu na kome je diplomirala 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,61. Od 2008. godine je zaposlena na Katedri za farmaceutsku hemiju kao stručni saradnik, a 2010. godine je izabrana u zvanje asistenta. Doktorske studije, modul farmaceutska hemija je upisala 2009/2010. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

U toku naučno-istraživačkog rada bila je saradnik na dva projekta iz oblasti hemije koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i učesnik je međunarodne COST akcije „Multi-target paradigm for innovative ligand identification in the drug discovery process (MuTaLig)“ (CA15135; 2016-2020). Doktorsku disertaciju pod nazivom: „Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke karakteristike derivata  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -arilalkanskih kiselina“ uradila je pod rukovodstvom prof. dr Jasmine Brborić i doc. dr Sande Dilber na Katedri za farmaceutsku hemiju. Deo doktorske disertacije je urađen i na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju i Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Autor i koautor je 4 rada štampana u časopisima od međunarodnog značaja koji čine deo doktorske disertacije i 10 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Савић

број индекса 20/09

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Дизајнирање, синтеза, физичко-хемијске и биолошке  
карактеристике деривата  $\beta$ -хидрокси- $\beta$ -арилалканских киселина"

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

Потпис докторанда

У Београду, 21. 6. 2017.

Јелена Савић



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Савић

Број индекса 20/09

Студијски програм фармацеутска хемија

Наслов рада "Дизајнирање, синтеза, физичко-хемијске и биолошке  
карактеристике деривата  $\beta$ -хидрокси- $\beta$ -арилалканских киселина"

Ментор др сц. Јасмина Брборић, ванредни професор

Потписани/а Јелена Савић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 21. 6. 2017.

Јелена Савић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

"Дизајнирање, синтеза, физичко-хемијске и биолошке  
карактеристике деривата  $\beta$ -хидрокси- $\beta$ -арилалканских киселина"

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 21. 06. 2017.

Јелена Ганд

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.