

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
Технолошко-металуршки факултет

Немања П. Тришовић, дипл. инж.

**ПРОУЧАВАЊЕ УТИЦАЈА СТРУКТУРЕ
НА АНТИКОНВУЛЗИВНУ АКТИВНОСТ
3,5-ДИСУПСТИТУИСАНИХ-5-ФЕНИЛХИДАНТОИНА
МЕТОДОМ ЛИНЕАРНЕ КОРЕЛАЦИЈЕ ЕНЕРГИЈЕ СОЛВАТАЦИЈЕ**

–докторска дисертација–



Београд, 2012. године

МЕНТОР

*Др Гордана Ушћумлић, редовни професор
Технолошко-металушки факултет, Београд*

КОМИСИЈА

*Др Слободан Петровић, редовни професор
Технолошко-металушки факултет, Београд*

*Др Соте Владимиров, редовни професор
Фармацеутски факултет, Београд*

*Др Наташа Валентић, доцент
Технолошко-металушки факултет, Београд*

Датум одбране докторске дисертације: 13.1.2012.

Докторат техничких наука

Експериментални део ове дисертације је реализован на Катедри за органску хемију Технолошко-металуршког факултета у Београду, на Катедри за фармакологију Фармацеутског факултета у Београду и у Центру за предклиничко испитивање активних супстанци Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Идеја о истраживању је потекла од професорке др Гордане Ушћумлић. Драгој професорки сам неизрециво захвалан за разумевање, безрезервну подршку и помоћ у току вишегодишње сарадње.

За савете и сугестије у обради и тумачењу резултата током писања научних радова и ове дисертације захвалност дугујем др Наташи Валентић.

Захваљујем се и професорима др Слободану Петровићу и др Сотеу Владимирову, који су својим стручним примедбама утицали на побољшање свеукупног квалитета дисертације.

Професору др Ивану Јуранићу се захваљујем за квантохемијска израчунавања, као и за помоћ у тумачењу добијених резултата.

Професору др Мирославу Савићу и његовим сарадницама Тамари Тимић, Јовани Дивљаковић и Марији Милинковић желим да се захвалим за велики напор који су уложили да се одреди антиконвулзивна активност проучаваних једињења, као и за помоћ у отклањању недоумица које су се тичале биолошког аспекта истраживања.

Захваљујем се др Јелени Роган и професору др Дејану Полетију, који су спровели испитивања кристалне структуре проучаваних једињења и на тај начин омогућили да се истраживање издигне на виши ниво.

Професорки др Биљани Божић се захваљујем за залагање да се одреде антипролиферативна и антибактеријска активност проучаваних једињења, као и за помоћ у интерпретацији добијених резултата.

На крају, изражавам дубоку захвалност свима који су дали немерљив допринос настанку ове дисертације, а нису поменути.

Немања Тришовић

САДРЖАЈ

ИЗВОД	3
АВСТРАСТ	5
ЛИСТА ВАЖНИЈИХ ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА.....	7
УВОД.....	8
1. ТЕОРИЈСКИ ДЕО.....	10
1.1. ХИДАНТОИНИ – СТРУКТУРА, СВОЈСТВА И СИНТЕЗА.....	11
1.1.1. Структура хидантоина.....	12
1.1.2. Физичка својства хидантоина	12
1.1.3. Хемијска својства хидантоина	13
1.1.3.1. Киселост	13
1.1.3.2. Хидролиза	13
1.1.3.3. Супституција у положајима 1 и 3	14
1.1.3.4. Реакције на C5	16
1.1.3.5. Редукција хидантоина	17
1.1.4. Синтеза хидантоина.....	18
1.1.4.1. Добијање хидантоина из α -аминокиселина.....	18
1.1.4.2. Добијање хидантоина из алдехида и кетона	20
1.1.4.3. Добијање хидантоина из тиохидантоина	22
1.1.4.4. Добијање 1,3,5-трисупституисаних хидантоина из α,β -незасићених карбоксилних киселина	23
1.1.5. Антиконвулзиви из групе хидантоина	25
1.1.5.1. Фенитоин.....	29
1.1.5.2. Етотоин	30
1.2. КВАНТИТАТИВНА КОРЕЛАЦИЈА СТРУКТУРЕ И АКТИВНОСТИ ОРГАНСКИХ МОЛЕКУЛА	31
1.2.1. Утицај електронских својстава на фармаколошку активност	32
1.2.2. Стерни утицаји на физиолошку активност.....	35
1.2.3. Утицај липофилности на фармаколошку активност	36
1.2.4. Вишепараметарски модели корелације структуре и активности	40
1.2.5. Утицај структуре на антиконвулзивну активност деривата хидантоина	41
1.2.5.1. Липофилност као карактеристика односа структуре и активности деривата хидантоина	41
1.2.5.2. Способност грађења водоничних веза као карактеристика односа структуре и активности деривата хидантоина	42
1.2.5.3. Конформација молекула као карактеристика односа структуре и активности деривата хидантоина	45
1.3. УТИЦАЈ РАСТВОРАЧА НА АПСОРПЦИОНЕ СПЕКТРЕ ОРГАНСКИХ МОЛЕКУЛА	48
1.3.1. Солватохромна једињења.....	49
1.4. ВИШЕПАРАМЕТАРСКИ ПРИСТУП У ОЦЕНИ ЕФЕКТА СОЛВАТАЦИЈЕ.....	52

1.4.1. Примена солватационих једначина у анализи својстава лекова	58
1.4.1.1. Корелација липофилности и ефеката солватације	59
1.4.1.2. Пенетрација кроз крвно–мождану баријеру	60
1.4.1.3. Корелација интестиналне апсорпције и ефеката солватације.....	64
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	67
2.1. Општи поступак синтезе 5-супституисаних-5-фенилхидантоина	69
2.2. Општи поступак алкиловања 5-супституисаних-5-фенилхидантоина	72
2.3. Општи поступак микроталасне синтезе 3-алкил- и 3-циклоалкил-5,5-дифенилхидантоина	77
2.4. Спектроскопска мерења	78
2.5. Одређивање кристалне структуре	79
2.6. Методи израчунавања	79
2.7. Одређивање антиконвулзивне активности и потенцијала изазивања седације	
3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина	80
2.7.1. Хемијски индуковани напади (s.c. PTZ тест)	80
2.7.2. Праг клоничних напада у PTZ тесту	80
2.7.3. Мерење локомоторне активности	81
2.8. Одређивање антипролиферативне активности 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина	81
2.9. Одређивање антибактеријске активности 3-супституисаних- 5,5-дифенилхидантоина.....	82
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	84
3.1. Утицај растварача на корелацију структуре и антиконвулзивне активности 5-супституисаних-5-фенилхидантоина.....	85
3.2. Утицај растварача на корелацију структуре и ADMET својстава 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина.....	93
3.3. Однос структуре и антиконвулзивне активности 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина ...	104
3.4. Утицај структуре на антипролиферативну и антибактеријску активност 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина.....	112
4. ЗАКЉУЧАК	117
5. ЛИТЕРАТУРА	122
6. ПРИЛОГ	132
6.1. РЕЗУЛТАТИ ИЗРАЧУНАВАЊА ЕНЕРГЕТСКИХ НИВОА 5-МЕТИЛ-5-ФЕНИЛХИДАНТОИНА ПОМОЋУ ПАКЕТА GAUSSIAN03	133
6.2. РЕЗУЛТАТИ ИЗРАЧУНАВАЊА ЕНЕРГЕТСКИХ НИВОА 5-МЕТИЛ-5-ФЕНИЛХИДАНТОИНА ПОМОЋУ ПАКЕТА MORAS 2009.....	137
БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ	142

ПРОУЧАВАЊЕ УТИЦАЈА СТРУКТУРЕ НА АНТИКОНВУЛЗИВНУ АКТИВНОСТ

3,5-ДИСУПСТИТУИСАНИХ-5-ФЕНИЛХИДАНТОИНА

МЕТОДОМ ЛИНЕАРНЕ КОРЕЛАЦИЈЕ ЕНЕРГИЈЕ СОЛВАТАЦИЈЕ

ИЗВОД

У циљу проучавања ефеката солватације на фармаколошка својства деривата хидантоина у овом раду су синтетисане две серије једињења:

а) 5-супституисани-5-фенилхидантоини, коју чини 11 деривата, код којих су различите алкил-, циклоалкил- и арил-групе (метил, етил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *tert*-бутил, циклопентил, циклохексил, фенил и бензил) уведене у положај 5 хидантоинског прстена;

б) 3,5-дисупституисани-5-фенилхидантоини, коју чини 25 деривата, код којих су различите алкил-, циклоалкил-, алкенил- и арил-групе (метил, етил, *n*-пропил, изопропил, алил, *n*-бутил, изобутил, *tert*-бутил, циклопентил, циклохексил, фенил и бензил) уведене у положаје 3 и 5 хидантоинског прстена.

Сва једињења су синтетисана према поступцима описаним у литератури или њиховим модификацијама и окарактерисана одређивањем температуре топљења, као и UV, FTIR, ¹H и ¹³C NMR спектроскопијом, а њихова чистоћа је утврђена помоћу HPLC-а. Апсорпциони максимуми проучаваних деривата хидантоина одређени су у 15 растварача различите поларности у опсегу таласних дужина од 200 до 400 nm. Да би се идентификовали електронски прелази који се одигравају при апсорпцији зрачења, извршена су квантнохемијска израчунавања: *ab initio*, помоћу програмског пакета Gaussian03, и семиемпиријски прорачун, помоћу програмског пакета MOPAC 2009. Квантитативна процена утицаја растварача на померање апсорпционих максимума извршена је применом метода линеарне корелације енергије солватације (LSER), односно Камлет–Тафтовом једначином.

Основа за разумевање ефеката солватације на фармаколошка својства проучаваних деривата хидантоина постављена је корелисањем података, који изражавају утицај растварача на померање апсорпционих максимума, и параметра липофилности ($\log P$), као и молекулских дескриптора, који описују интестиналну апсорпцију ($\%Abs.$), способност продирања кроз крвно–мождану баријеру ($\log BB$) и везивање за протеине плазме ($\log k_A$). Вредности $\log P$ су израчунате применом програмског пакета ACD Solaris v. 4.67, а молекулски дескриптори, који описују одговарајућа ADMET својства, применом

програмског пакета ChemSilico. Ослањајући се на Абрахамов приступ у процени ефеката солватације, приказана је и дискутована веза између фармаколошки релевантних својстава и различитих типова интеракција између молекула растварача и растворене супстанце. Добијени резултати су показали да су проучавани деривати хидантоина испунили фармакокинетичке услове да буду кандидати за лекове и квалификовали се за фармакодинамичку фазу испитивања.

Антиконвулзивна активност четири 3,5-дисупституисана-5-фенилхидантоина, чије су липофилности сличне липофилности фенитоина, одређена је на пацовима Вистар соја у s.c. PTZ и i.v. PTZ тестовима. Рендгенска структурна анализа три једињења показала је да постоји квалитативна корелација између међумолекулских интеракција у кристалном стању и интеракција са биолошким рецептором, које су одговорне за њихову антиконвулзивну активност. Једино код 3-*n*-пропил-5-етил-5-фенилхидантоина, величина торзионог угла између фенил-групе и хидантоинског језгра налази се у опсегу вредности који је карактеристичан за најактивније деривате хидантоина и ово једињење испољава антиконвулзивну активност која се може поредити са фенитоином и, при томе, изазива мање седације.

Проучавана је и антипролиферативна активност дванаест 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина према ћелијској линији хуманог карцинома колоне НСТ-116. Утврђено је да увођење супституената у положај 3 производи тренд промене антипролиферативних учинака проучаваних једињења, који је аналоган променама њихове антиконвулзивне активности у односу на фенитоин. Додатно је одређена и њихова антибактеријска активност према *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и клиничким изолатима *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*. Показано је да једино 3-изопропил и 3-бензил деривати поседују слабу антибактеријску активност према грам-позитивној бактерији *E. faecalis* и грам-негативним бактеријама *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli*.

Кључне речи: Хидантоини · Солватохромизам · Липофилност · ADMET својства · Антиконвулзивна активност · Кристална структура · Антипролиферативна активност · Антибактеријска активност

Научна област: Хемија. Ужа научна област: Органска хемија.

**INVESTIGATION OF STRUCTURAL EFFECTS ON THE ANTICONVULSANT ACTIVITY
OF 3,5-DISUBSTITUTED-5-PHENYLHYDANTOINS
BY THE LINEAR SOLVATION ENERGY RELATIONSHIP METHOD**

ABSTRACT

In order to examine solvation effects on the pharmacological properties of hydantoin derivatives, two series of compounds have been synthesized:

a) 5-substituted-5-phenylhydantoins include 11 compounds with different alkyl, cycloalkyl and aryl groups (methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, cyclopentyl, cyclohexyl, phenyl and benzyl) in position 5 of the hydantoin ring;

b) 3,5-disubstituted-5-phenylhydantoins include 25 compounds with different alkyl, cycloalkyl, alkenyl and aryl groups (methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, allyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, cyclopentyl, cycloheksyl, phenyl and benzyl) in positions 3 and 5 of the hydantoin ring.

All compounds have been synthesized according to procedures given in the literature or their modifications and characterized by UV, FTIR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and their purity has been confirmed by HPLC. The absorption spectra of the investigated hydantoin derivatives have been recorded in fifteen solvents of different polarities in the range from 200 to 400 nm. In order to determine a spectroscopic assignment of the absorption bands, the quantum chemical calculations have been performed using Gaussian03 for DFT calculations and MOPAC 2009 for semiempirical calculations. The quantitative assessment of solvent effects on the absorption maxima shifts of the investigated molecules has been carried out by means of the linear solvation energy relationship (LSER) using the Kamlet–Taft equation.

To provide a framework for an analyze of solvation effects on the pharmacological properties of the investigated hydantoin derivatives, the data, which interpret solvent effects on the absorption maxima shifts, have been correlated with the lipophilicity parameter ($\log P$) and the *in silico* calculated bioactivity descriptors, in particular %*Abs.* (human intestinal absorption), $\log BB$ (blood–brain barrier permeation) and $\log k_A$ (protein binding affinities) parameters. The $\log P$ values have been estimated with the ACD Solaris v. 4.67 and molecular descriptors for predicting ADMET properties have been obtained with the ChemSilico program. Drawing on Abraham's approach in assessing solvation effects, the relationship between pharmacologically relevant properties and different types of solvent–solute interactions has been presented and discussed. In view of the results of this study, the investigated hydantoin derivatives have met

the pharmacokinetic criteria for pre-selection as drug candidates and qualified them for the pharmacodynamic phase of antiepileptic drug development.

The anticonvulsant activities of four 3,5-disubstituted-5-phenylhydantoins, the lipophilicities of which have been estimated to be similar to the lipophilicity of phenytoin, have been evaluated on male Wistar rats by the s.c. pentylenetetrazol (PTZ) seizure test and i.v. PTZ threshold test and the spontaneous locomotor activity test was used to assess the possible sedative effects. The X-ray analysis of three compounds has suggested that certain analogies might be drawn between interactions in crystal packing and biological interactions, which are responsible for their anticonvulsant activity. Only the value of the torsion angle of the phenyl ring in 3-*n*-propyl-5-ethyl-5-phenylhydantoin is in the range, which is characteristic for the most active hydantoin derivatives, and it exerts anticonvulsant activity comparable to phenytoin with lower liability for the induction of sedation in rats.

The antiproliferative effects of a series of eleven 3-substituted-5,5-diphenylhydantoins, including some whose anticonvulsant activities have already been reported in the literature, against HCT-116 human colon carcinoma cells have been evaluated. It has been found that the introduction of a substituent at position 3 produces a trend of changes in the antiproliferative potencies of compounds analogous to that in their anticonvulsant activities. Moreover, their antibacterial activities *in vitro* against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and clinical isolates of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* have been evaluated. Only the 3-isopropyl and 3-benzyl derivatives show weak antibacterial activities against the Gram-positive bacterium *E. faecalis* and the Gram-negative bacteria *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli*.

Keywords: Hydantoins · Solvatochromism · Lipophilicity · ADMET properties · Anticonvulsant activity · Crystal structure · Antiproliferative activity · Antibacterial activity

Листа важнијих ознака и скраћеница

ADMET	апсорпција, дистрибуција, метаболизам, екскреција и токсичност фармаколошки активне супстанце
E_s	Тафтов стерни параметар супституента
HBA	атом или атомска група која прима протон при успостављању водоничне везе (енг. hydrogen-bonding acceptor)
HBD	атомска група која даје протон при успостављању водоничне везе (енг. hydrogen-bonding donor)
HAS	хумани серум албумин (енг. human serum albumin)
IZ	зона инхибиције раста бактерија
$\log k_A$	молекулски дескриптор који описује афинитет везивања лека за серум албумин у крви
$\log BB$	молекулски дескриптор који описује пенетрацију лека кроз крвно-мождану баријеру
$\log P$	параметар липофилности који описује расподелу супстанци у систему <i>n</i> -октанол/вода
MBC	минимална бактерицидна концентрација
MES	тест за одређивање антиконвулзивне активности супстанци у коме се конвулзије код експерименталних животиња изазивају електрошоковима (енг. maximal electroshock seizure test)
MIC	минимална инхибирајућа концентрација
MTT	тест за одређивање антипролиферативне активности супстанци
s.c. PTZ	тест за одређивање антиконвулзивне активности супстанци у коме се конвулзије код експерименталних животиња изазивају хемијским путем тако што се пентилентетразол примењује субкутано
i.v. PTZ	тест за одређивање антиконвулзивне активности супстанци у коме се конвулзије код експерименталних животиња изазивају хемијским путем тако што се пентилентетразол примењује интравенски
SLA	тест спонтане локомоторне активности (енг. spontaneous locomotor activity)
VEN	стандардни растварач (85 % дестилована вода, 14% пропилен-гликол, 1 % Tween 80) у коме су испитивана једињења растворена пре администрације у s.c. PTZ тесту
КМБ	крвно-мождана баријера
%Abs.	молекулски дескриптор који описује интестиналну апсорпцију лека
σ^*	Тафтов електронски параметар супституента

УВОД

Деривати хидантоина (имидазолидин-2,4-дион) се широко примењују у лечењу епилепсије и срчане аритмије. Фенитоин (5,5-дифенилхидантоин, Dilantin®) је један од најстаријих неседативних антиконвулзива који се примењује за контролу тонично-клоничних напада, неких облика парцијалних напада или њихових комбинација. Мефенитоин (3-метил-5-етил-5-фенилхидантоин, Mesantoin®) је по свом фармаколошком деловању сличан фенитоину и примењује се код пацијената који не могу да толеришу друге лекове. Његов деметиловани метаболит нирванол (5-етил-5-фенилхидантоин) је први дериват хидантоина који се примењивао у лечењу хорее. Међутим, релативно брзо је повучен из употребе, пошто је установљено да има седативно-хипнотичко дејство.

Терапијски ефекти деривата хидантоина представљају резултат селективне инхибиције нервних волтажних-зависних натријумских канала. Пренос *in vivo* и способност пенетрације кроз крвно-мождану баријеру зависе од удела и оријентације липофилних елемената структуре молекула. Такође, њихово везивање за рецепторе или делове рецептора може да се објасни липофилним интеракцијама. Подеони коефицијент у систему *n*-октанол/вода ($\log P$) традиционално се користи за описивање преноса *in vivo* и пенетрације кроз биолошке мембране и показао се као једноставан модел за проучавање липофилно-хидрофилне равнотеже и водоничног везивања.

Однос структуре и биолошких својстава деривата хидантоина интензивно се проучава са циљем да се идентификују они структурни елементи који су одговорни за корисну активност, али и нежељена дејства. Успостављање водоничних веза са циљним местима налази се у основи механизма њиховог антиконвулзивног деловања. Кристалографска анализа антиконвулзива је показала да међусобна оријентација ароматичне групе и дела молекула који гради водоничне везе значајно утиче на ефикасност њиховог деловања. У новијој литератури је наговештено да постоји веза између спектралних карактеристика различитих антиконвулзивних лекова и њихове активности. Основни циљ овог рада је да се назначена веза детаљније објасни и квантитативно дефинише.

У оквиру проучавања утицаја структуре на биолошку активност деривата хидантоина у овом раду су синтетисане две репрезентативне серије 5-супституисаних- и 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина. Апсорпциони максимуми проучаваних једињења су одређени у 15 растварача различите поларности. Корелацијом апсорпционих

фреквенција Камлет-Тафтовом једначином извршена је квантитативна процена њихових протон-донорских и протон-акцепторских својстава. Параметри, који су одређени методом линеарне корелације енергије солватације (LSER), корелисани су са вредностима $\log P$ и молекулским дескрипторима који описују одговарајућа ADMET својства. Добијене корелационе једначине су комбиноване са електронским и стерним параметрима супституената у циљу постављања модела који омогућавају процену фармаколошке активности проучаваних деривата хидантоина.

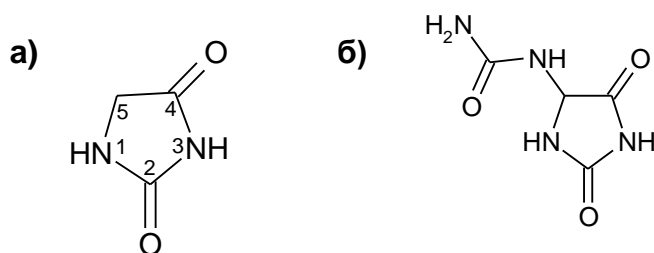
Антиконвулзивна активност четири 3,5-дисупституисана-5-фенилхидантоина, чије су липофилности блиске липофилности фенитоина, одређена је на пацовима Вистар соја у s. c. PTZ и i.v. PTZ тестовима. На основу резултата рендгенске структурне анализе три једињења, дискутована је аналогија између међумолекулских интеракција у кристалном стању и интеракција са биолошким рецепторима, које су одговорне за антиконвулзивну активност. У новије време се испитује могућност примене деривата хидантоина у лечењу канцера. У овом раду су проучавани антипролиферативни ефекти дванаест 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина, за које су подаци о антиконвулзивној активности преузети из литературе, према ћелијској линији хуманог карцинома колона НСТ-116 и упоређене су промене које увођење супституената у положај 3 производи код ових облика активности. Додатно је одређена и њихова антибактеријска активност према *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и клиничким изолатима *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*. Показано је да једино 3-изопропил и 3-бензил деривати поседују слабу антибактеријску активност према грам-позитивној бактерији *E. faecalis* и грам-негативним бактеријама *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli*.

Систематско проучавање утицаја структуре на биолошку активност деривата хидантоина у овом раду ће дати јаснију слику о механизмима њиховог деловања и омогућити да се фармаколошка својства нових деривата објасне и предвиде.

1. Теоријски део

1.1. Хидантоини – структура, својства и синтеза

Хидантоин (имидазолидин-2,4-дион, слика 1.1) је открио Бајер (Bayer) 1861. године као производ хидрогеновања алантоина [1]. Алантоин (слика 1.1), један од неколико деривата хидантоина који се јављају у природи, производ је метаболизма пурина и налази се у урину већине животиња, али не и човека. Бајер је синтетисао хидантоин из бромацетилуреа неколико година пре него што је Штрекер (Strecker) [2] утврдио његову структуру.



Слика 1.1 Хемијске структуре хидантоина (а) и алантоина (б)

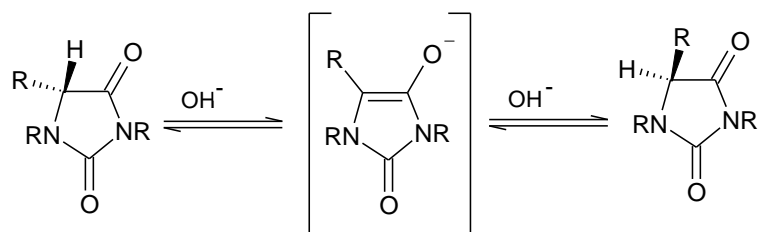
Хидантоин може да се изолује из пупољака платана, из младице шећерне репе и трулог китовог меса.

Деривати хидантоина су важни интермедијери у синтези неколико аминокиселина. Данас се највише примењују у медицини као антиконвулзиви у лечењу епилепсије [3, 4] и срчане аритмије [5, 6], али и као бактерициди [7], фунгициди [7] и у терапији неоплазми [8]. Нирванол, 5-етил-5-фенилхидантоин, је први хидантоин који се примењивао у медицини [9]; синтетисан је 1916. и употребљавао се до 1932. када је установљено да је токсичан при редовној употреби. Заменио га је фенитоин, 5,5-дифенилхидантоин, за који је утврђено да је најефикаснији антиконвулзив са најслабије израженим седативно-хипнотичким ефектом [10].

У хемијској индустрији различити 5,5-дисупституисани хидантоини се користе за добијање водоотпорних и термички стабилних епокси смола [11]. Остали деривати су компоненте у многим производима широке потрошње, као што су лакови за косу, козметика и фотографски филм.

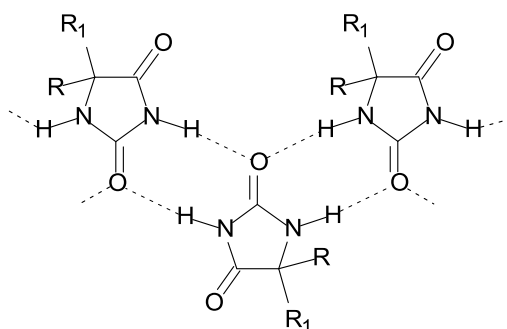
1.1.1. Структура хидантоина

Иако у хидантоинском прстену постоје две карбонилне групе, удео енол облика је безначајан. У алкалној средини оптички активни хидантоини лако таутомеризују што указује на постојање енол структуре (шема 1.1) [12]:



Шема 1.1 Таутомеризација оптички активних хидантоина у алкалној средини

Атом C5 у хидантоинском прстену је sp^3 хибридизован, услед чега углови између веза износе: $(N^1C^5C^4) \approx 99-100^\circ$, $(C^6C^5C^6) \approx 111,5-112,5^\circ$ [7]. Код фенитоина и његових деривата, фенил-групе су извијене у односу на раван хидантоинског прстена за угао од $104-114^\circ$, а међусобно заклапају угао од $90-105^\circ$. У чврстом стању молекули хидантоина граде водоничне везе са по два суседна молекула. Растојање између молекула повезаних водоничном везом ($N-H \cdots O=C$) је мање од $28,7 \text{ nm}$, а углови ($N-H \cdots C=O$) су већи од 169° . Карбонилна група у положају 4 не учествује у водоничном везивању.



Слика 1.2 Водоничне везе између молекула 5,5-дисупституисаних хидантоина

1.1.2. Физичка својства хидантоина

Хидантоин је бела, кристална супстанца високе температуре топљења ($217-218^\circ\text{C}$). Хидантоини са супституентима на атомима азота топе се на нижим температурама од

несупституисаних аналога, што је последица мање поларности молекула и смањене могућности грађења интермолекулских водоничних веза.

Хидантоини су хидрофилни услед велике концентрације хетероатома и карбонилних група у прстену; добро се растварају у топлој води, етанолу, сирћетној киселини и алкалијама.

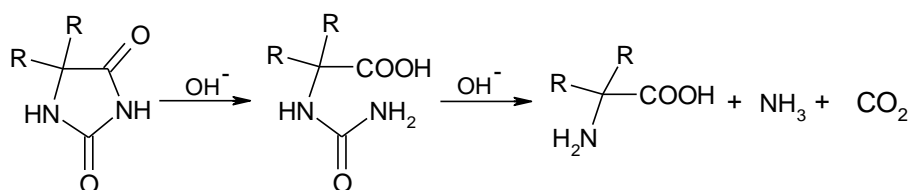
1.1.3. Хемијска својства хидантоина

1.1.3.1. Киселост

Хидантоини су слабе киселине. Киселост потиче од NH групе у положају 3, која се налази између две електрон-акцепторске карбонилне групе. Супституцијом у положају 3 киселост хидантоина се смањује и постаје блиска киселости амида. Алкил-групе у положајима 1 и 5 не утичу на јонизацију; pK_a вредност хидантоина је 9,0, а 1-метил хидантоина 9,1 [13]. Међутим, арил- и други електрон-акцепторски супституенти повећавају киселост хидантоина, тако да вредност pK_a фенитоина износи 8,12, а 1-бензенсулфонил-5,5-дифенилхидантоина 4,89 [14]. Увођењем арилиден-групе у положај 5 киселост водониковог атома у положају 1 се повећава [15]. То је последица коњугационе стабилизације негативног наелектрисања на N1.

1.1.3.2. Хидролиза

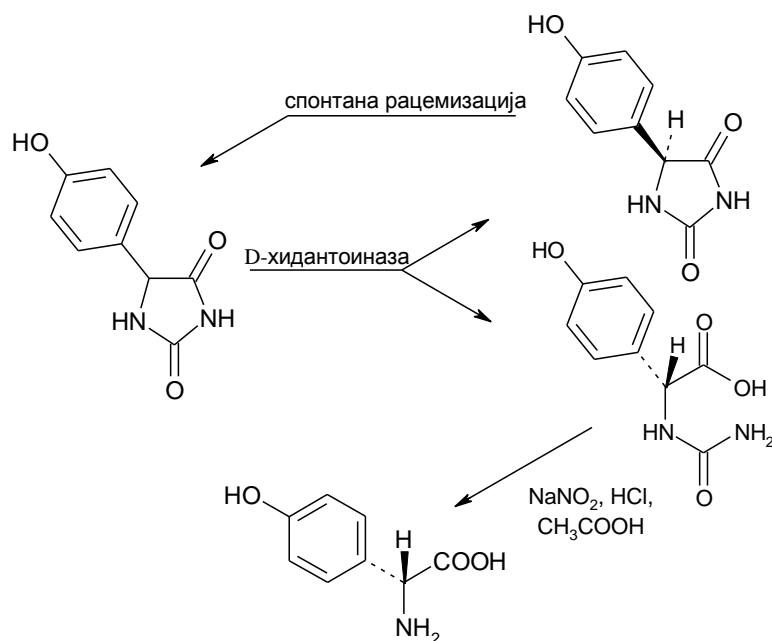
Већина уобичајених поступака хидролизе се састоји у загревању у алкалној средини, при чему настаје интермедијерна тзв. хидантоинска киселина, која на крају хидролизује до одговарајуће α -аминокиселине (шема 1.2).



Шема 1.2 Хидролиза хидантоина у алкалној средини

Главни недостатак овог поступка је што се добијају рацемске смеше аминокиселина. D-специфичне и L-специфичне хидантоиназе (ензими способни да хидролизују хидантоине) се примењују за добијање D- и L-аминокиселина. Коришћење

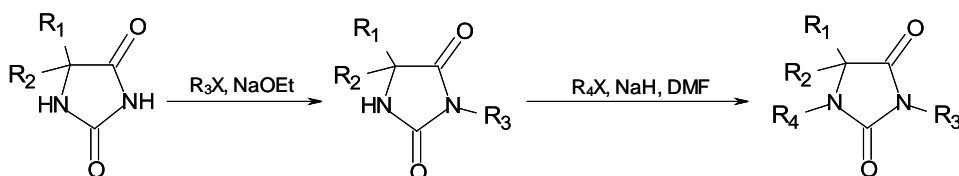
ових ензима је приказано на примеру добијања D-тирозина, структуралног фрагмента Amoxicilin® антибиотика (шема 1.3) [16].



Шема 1.3 Ензимска синтеза D-тирозина из (±)5-(4-хидроксифенил)хидантоина

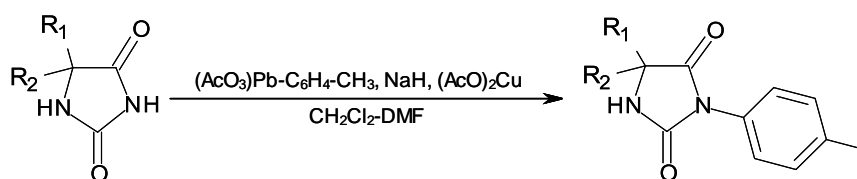
1.1.3.3. Супституција у положајима 1 и 3

Имидни протон у положају 3 је киселији од протона у положају 1, па је и реактивнији према електрофилима у базној средини. Према томе, хидантоини могу да се селективно алкилују на N3 дејством алкил-халогенида у присуству алкоксида [17]. Моно-N-супституисани деривати могу да се добију алкиловањем на N1 у специјалним условима, нпр. уз натријум-хидрид у диметилформамиду [18]. За добијање N1 моноалкил деривата потребно је да се имидни азот претходно заштити у облику аминометил деривата [19]. Хидантоини са повећаном киселашћу на N1, као што су 5-арилиден деривати, могу лако да се моноалкилују на N3, а и диалкиловање је могуће под благим условима (шема 1.4).



Шема 1.4 Алкиловање хидантоина у положајима 1 и 3

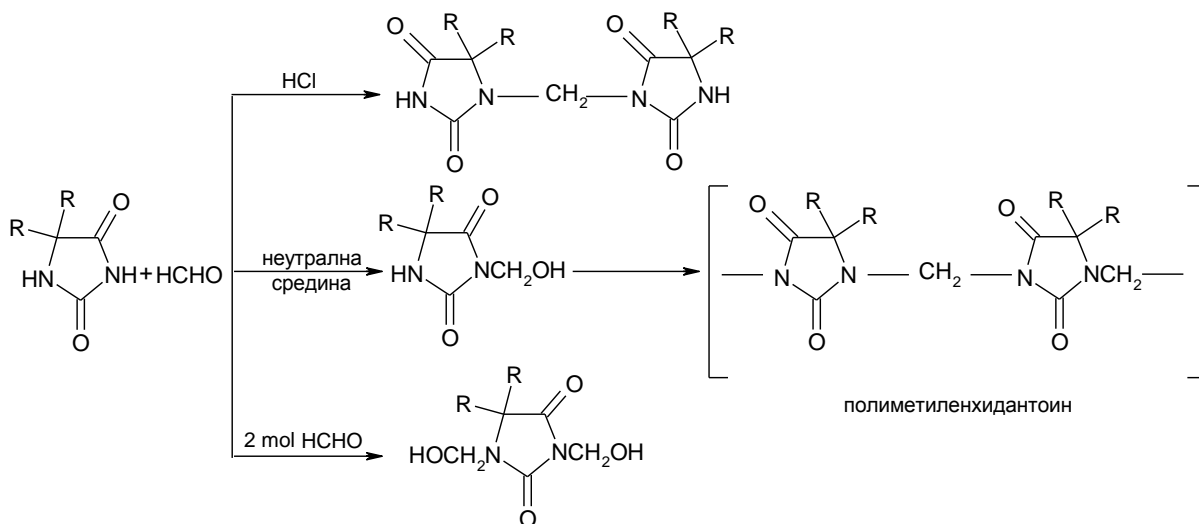
Хидантоини могу да се арилују у положају 3. На пример, третирањем фенитоина са *p*-Pb-ксилен-триацетатом у присуству натријум-хидрида и каталитичке количине бакар(II)-ацетата добија се одговарајући производ (шема 1.5) [20].



Шема 1.5 Ариловање хидантоина у положају 3

Хидантоини могу да се ацетиљују у положајима 1 и/или 3 што зависи од реакционих услова [21]. Најчешће се добија N1 ацетил дериват. 3-Ацетилхидантоин лако хидролизује и подлеже интрамолекулском премештању при чему настаје термодинамички стабилнији N1 дериват [22]. Неки 3-ацетилхидантоини се примењују као селективни ацилујући агенси.

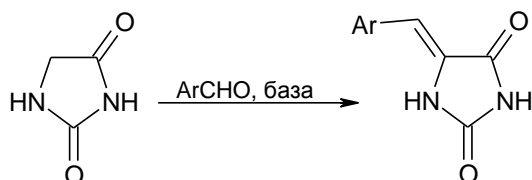
У реакцији са формалдехидом у киселој средини настаје 1,1-метиленбисхидантоин. У неутралној и базној средини производ реакције је 3-(хидроксиметил)хидантоин, који загревањем даје поли(метиленхидантоин) мале молекулске масе. Реакција са два мола формалдехида у неутралној средини даје ди(хидроксиметил) деривате. Када се волуминозни супституенти налазе у положају 5, као производ се добијају 1-(хидроксиметил)хидантоини (шема 1.6) [23].



Шема 1.6 Реакције хидантоина са формалдехидом

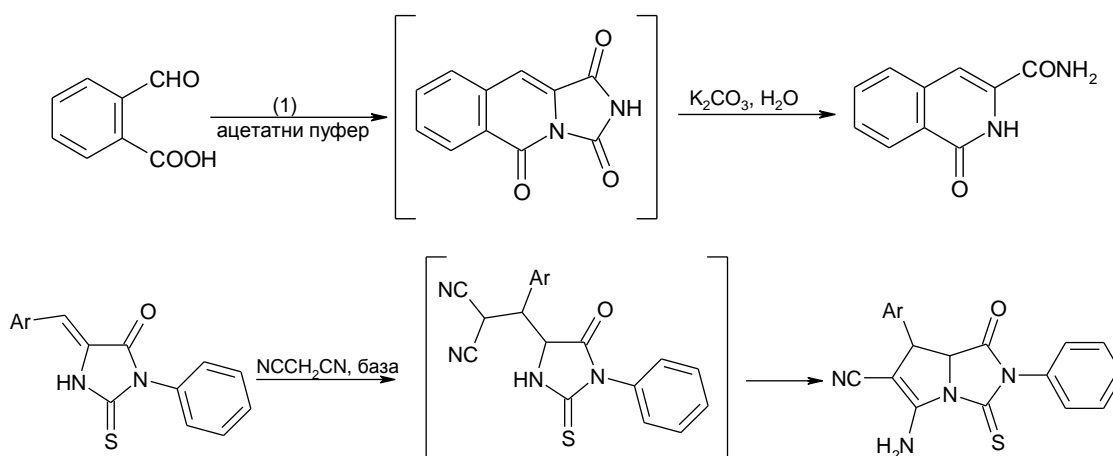
1.1.3.4. Реакције на C5

Реактивни центар у положају 5 хидантоинског прстена понаша се као активна метиленска група. Према томе, у овом положају може да се одиграва базно катализована реакција кондензације са алдехидима (шема 1.7) [24].



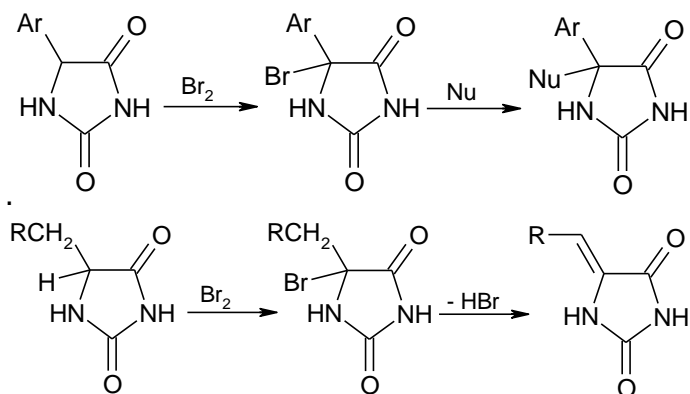
Шема 1.7 Базно катализована реакција кондензације хидантоина са алдехидима

Неки 5-арилиден деривати се примењују као корисни синтетички интермедијери (шеме 1.8 и 1.9) [25, 26].



Шеме 1.8 и 1.9 5-Супституисани хидантоини као синтетички интермедијери

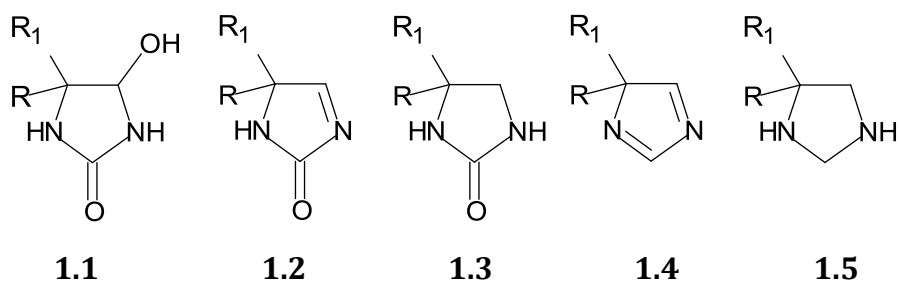
Аналогно, у реакцији са бромом се добијају одговарајући 5-бром деривати који су погодни супстрати у реакцијама нуклеофилне супституције и дехидрохалогеновања. Типични нуклеофили (Nu) су H₂O, NH₃, RNH₂ и натријум-барбитурат (шеме 1.10 и 1.11).



Шеме 1.10 и 1.11 Добијање и реактивност 5-бром деривата хидантоина

1.1.3.5. Редукција хидантоина

Литијум-алуминијумхидрид се најчешће примењује за редукцију хидантоина. Структура производа редукције зависи од реакционих услова и природе супституената у положајима 1, 3 и 5. На собној температури се обично добијају 4-хидрокси-2-имидазолидинони (**1.1**) или одговарајући производи дехидратације (**1.2**) [27]. Ако се редукција изводи уз рефлукс, добијају се 2-имидазолидинони (**1.3**), 4Н-имидазоли (**1.4**) или имидазолидини (**1.5**) (слика 1.3)[28].



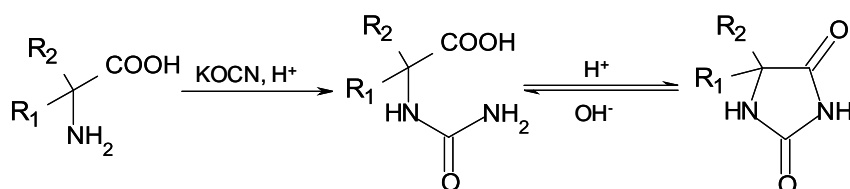
Слика 1.3 Производи редукције хидантоина: 4-хидрокси-2-имидазолидинони (**1.1**); 1,5-дихидро-2-имидазолони (**1.2**); 2-имидазолидинони (**1.3**); 4Н-имидазоли (**1.4**); имидазолидини (**1.5**).

1.1.4. Синтеза хидантоина

Развијени су различити поступци за добијање деривата хидантоина, али већина је само од научног значаја.

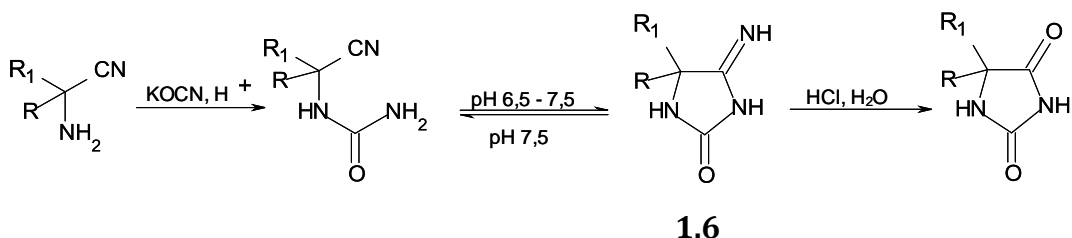
1.1.4.1. Добијање хидантоина из α -аминокиселина

Адицијом цијаната, изоцијаната и деривата уреје на α -аминокиселине добијају се прекурсори у синтези хидантоина. Овај поступак се назива Ридова (Read) синтеза [29] и супротан је хидролизи хидантоина. У реакцији α -аминокиселина са алкалним цијанатима настаје одговарајућа хидантоинска киселина која у киселој средини циклизацијом даје хидантоине (шема 1.14).



Шема 1.14 Ридова синтеза хидантоина из α -аминокиселина

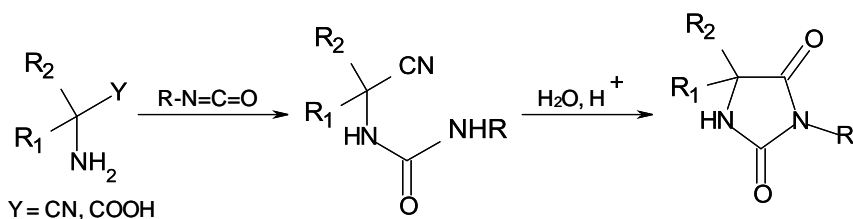
У модификованом поступку α -аминокиселине су замењене α -аминонитрилима (шема 1.15) [30]. Ова реакција је позната као Штрекорова (Strecker) синтеза хидантоина, јер упућује на реакцију која се примењује за добијање α -аминонитрила из алдехида и кетона [2]. Циклични интермедијер (**1.6**) је изолован у неким случајевима [31], пошто је у равнотежи са одговарајућим уреидом; на положај равнотеже може да се утиче променом вредности рН система.



Шема 1.15 Модификована Ридова синтеза хидантоина из α -аминонитрила

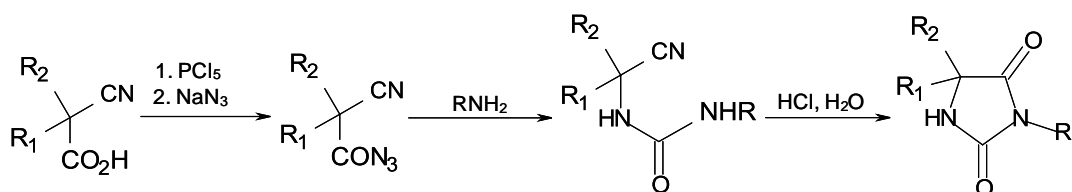
Хлорсулфонил-изоцијанат је одлична алтернатива за алкалне цијанате у синтези хидантоина из стерно заклоњених или нестабилних аминонитрила [32].

Коришћењем изоцијаната уместо алкалних цијаната добијају се 3-супституисани-хидантоини било из аминокиселина [33] или аминонитрила [34] (шема 1.16). Аналогна реакција α -аминокиселина и фенилизоцијаната, у којој се добијају 5-супституисани-3-фенил-2-тиохидантоини, користи се за карактерисање аминокиселина и представља основу Едманове (Edman) методе секвенцијалне деградације пептида.



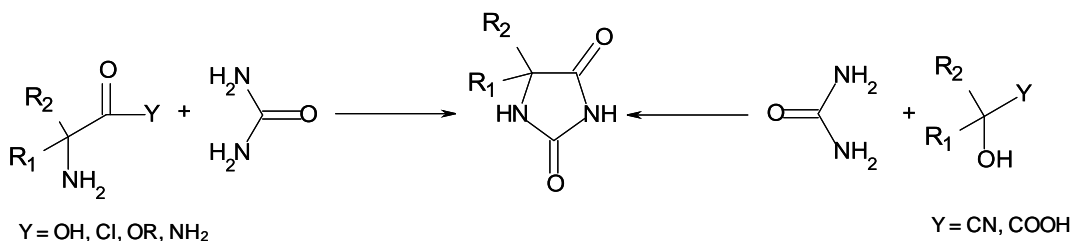
Шема 1.16 Синтеза 3-супституисаних хидантоина из одговарајућих изоцијаната

Слична реакција, која се одиграва уз Куртијусово (Curtius) премештање, води трансформисању α -цијанокиселина у одговарајуће хидантоине (шема 1.17) [35].



Шема 1.17 Синтеза хидантоина из α -цијанокиселина

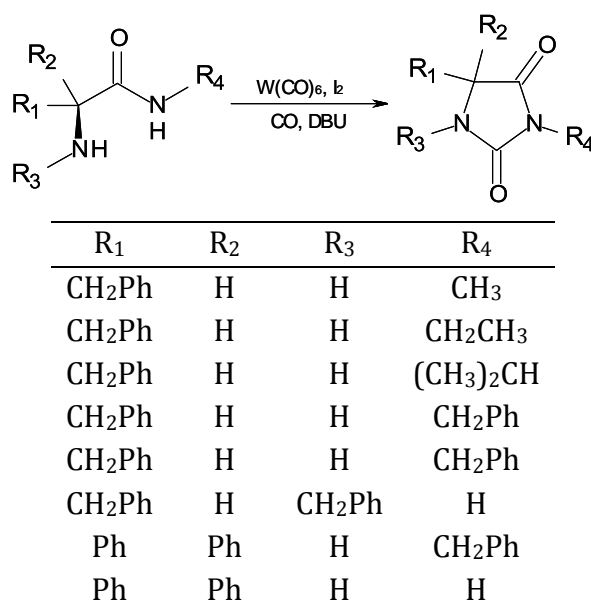
Различити деривати α -аминокиселина (хлориди, амиди, естри) могу да се трансформишу у одговарајуће хидантоине кондензацијом са уреом [36]. α -Хидроксикиселине и њихови нитрили реагују на сличан начин (шема 1.18) [37].



Шема 1.18 Синтеза хидантоина из деривата α -амино- и α -хидроксикиселина

Хидантоини могу да се синтетишу из одговарајућих 2-аминоацетамида оксидативним каталитичким карбониловањем користећи $W(CO)_6$ као катализатор, I_2 као

оксидујуће средство, CO као извор карбонила и ДБУ (1,8-диазабицикло[5, 4, 0]ундек-7-ен) као базу (шема 1.19) [38]. Хидантоини се добијају из одговарајућих секундарних амида у одличном приносу, који се смањује са повећањем величине *N*-алкил-групе.

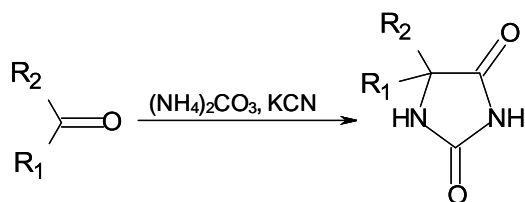


Шема 1.19 Добијање хидантоина према [38]

Иако је нуклеофилност атома азота амидне групе мања у поређењу са аминима, цикличне урее нису детектоване у реакционој смеси. Механизам карбониловања *R*-амино амида још увек није утврђен. Радови о катализи волфрамом у вишим оксидационим стањима упућују на настајање слободних или координисаних диизоцијаната као интермедијера [39], што је могуће за већину испитиваних једињења. Међутим, и у случају ($R_1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $R_4 = \text{H}$), када изоцијанатни интермедијер не може да се формира, одговарајући хидантоин се ипак добија, што искључује настајање анизоцијаната из датог супстрата.

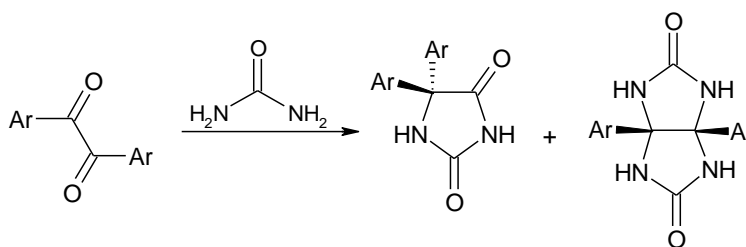
1.1.4.2. Добијање хидантоина из алдехида и кетона

Хидантоини се добијају дејством калијум-цијанида и амонијум-карбоната на алдехиде и кетоне (Бучерер-Бергсова реакција) (Bucherer-Bergs, [40]). И друга једињења, као нпр. оксими, семикарбазони, тиосемикарбазони могу да се користе као полазна једињења. Бучерер-Бергсова и Ридова синтеза хидантоина из циклоалканона дају епимерне производе што је значајно за стереоселективно добијање аминокиселина [41] (шема 1.20).



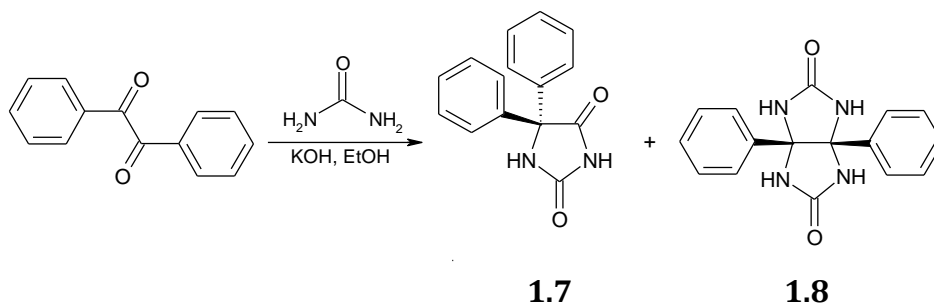
Шема 1.20 Бучерер-Бергсова синтеза хидантоина

У реакцији α -дикарбонилних једињења са уреом у базној средини настају 5,5-дисупституисани хидантоини. Ова реакција је корисна за добијање 5,5-диарилхидантоина који не могу да се добију Бучерер-Бергсовом синтезом (шема 1.21).



Шема 1.21 Синтеза 5,5-диарилхидантоина

Билцова (Biltz) синтеза је уобичајени поступак за добијање фенитоина из бензила и уреје у алкохолном раствору КОН [42] (шема 1.22). Њено главно ограничење је истовремено настајање производа (1.7) и (1.8). У хомогеном систему, производ (1.7) се добија у приносу од 50–55 %, а једињење (1.8) у приносу до 20 %. Коришћењем база различите јачине однос производа (1.7) и (1.8) се значајно не мења, али се мења кинетика реакције [43].



Шема 1.22 Билцова синтеза фенитоина

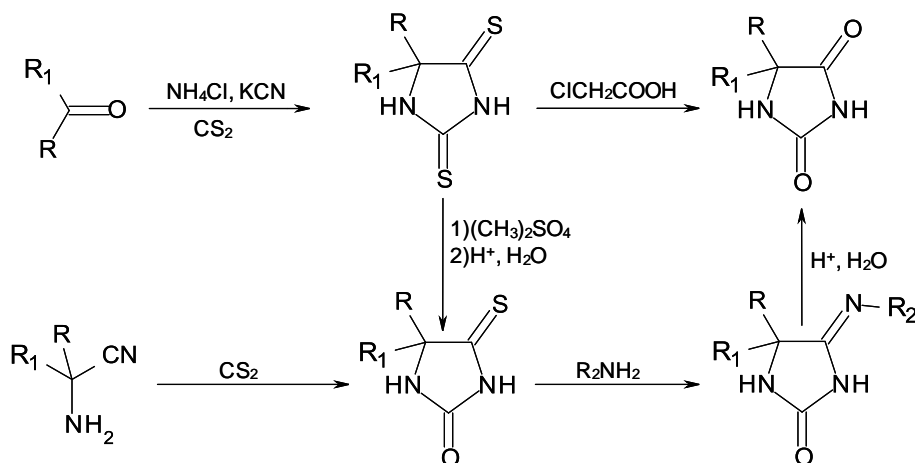
Пупер (Poupaert) и сарадници су поредили исход Билцове синтезе када се изводи класичним и микроталасним поступком [44]. Поларни растварачи високе тачке кључања и њихове смеше су погодни за синтезу уз озрачивање микроталасима. У систему

ДМСО/вода као реакционом медијуму класичним поступком је остварен принос фенитоина од 62 %. Када се синтеза изводи у истим условима уз озрачивање микроталасима, принос се побољшава (72 %), а споредни производ се добија у мањој количини. Време трајања реакције је значајно скраћено – са 2 h у класичном поступку на 30 min у микроталасном. Слични резултати добијају се са сулфоланом и диоксаном. Међутим, у ДМФ-у се добијају много нижи приноси, што може да се објасни хидролизом ДМФ-а у базној средини и на повишеној температури, услед чега се концентрација КОН у систему смањује.

Синтеза 3-алкилфенитоина из бензила и алкил-уреа је праћена настајањем споредних 1-алкил- и О-алкилфенитоина [45]. У микроталасном поступку, полазећи од бензила и различитих алкил-уреа, добијају су 3-алкилфенитоини у високим приносима.

1.1.4.3. Добијање хидантоина из тиохидантоина

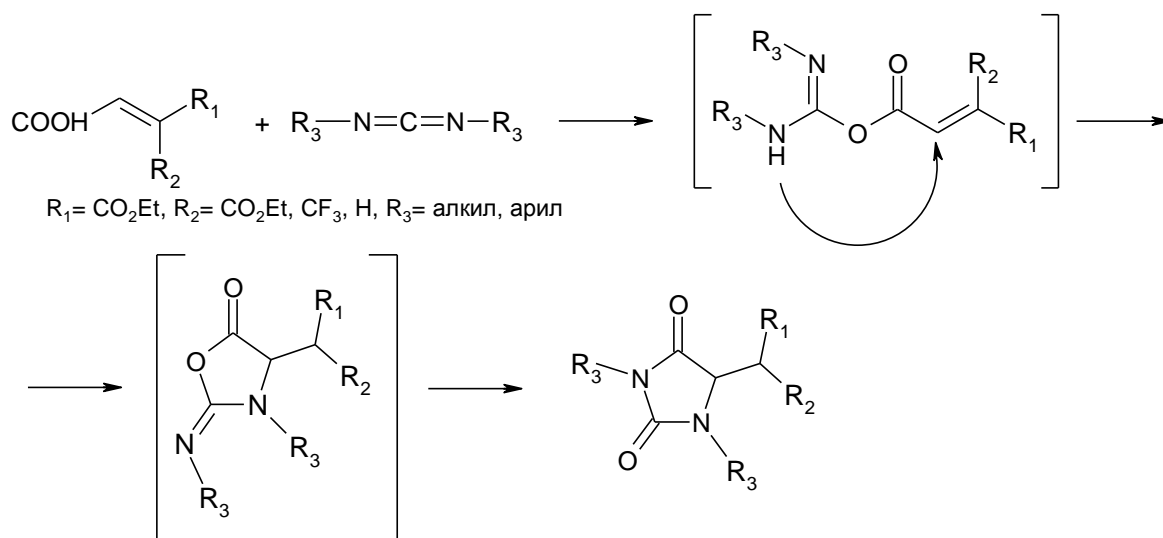
Модификација Бучерер-Бергсове синтезе састоји се у третирању алдехида или кетона угљен-дисулфидом, амонијум-хлоридом и калијум-цијанидом при чему настају 2,4-дитиохидантоини [46]. 4-Тиохидантоини се добијају у реакцији аминонитрила се угљен-дисулфидом. Тиохидантоини се потом трансформишу у одговарајуће хидантоине (шема 1.23).



Шема 1.23 Синтеза хидантоина из одговарајућих тиохидантоина

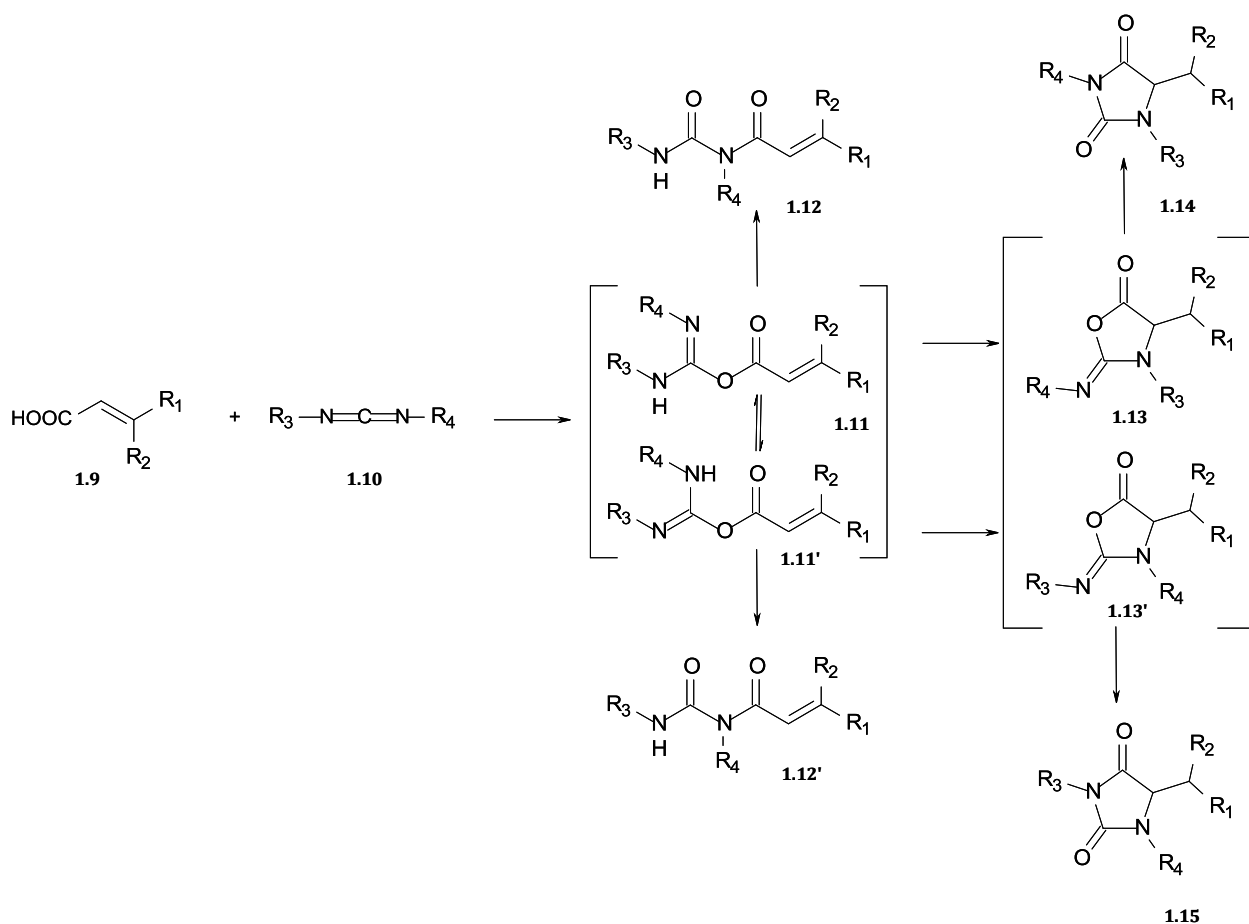
1.1.4.4. Добијање 1,3,5-трисупституисаних хидантоина из α,β -незасићених карбоксилних киселина

У реакцији карбодимида и одговарајућих активираних α,β -незасићених карбоксилних киселина добијају се различити 1,3,5-трисупституисани хидантоини путем региоспецифичне домино-кондензације/аза-Мајкл (Michael) /N–O ацилне миграције (шема 1.24) [47]. Реакција се одиграва под врло благим условима (20 °C, дихлорметан) са дериватима фумарне киселине, који имају електрон-акцепторску групу у β -положају. Добри приноси су остварени и са мање активираним супстратима, који имају само једну електрон-акцепторску групу у β -положају, уз коришћење поларнијих растварача (ацетонитрил, ДМФ) и у присуству базе (2,4,6-триметилпиридин).



Шема 1.24 Реакција добијања 1,3,5-трисупституисаних хидантоина, која се одиграва кроз сукцесивне домино кондензације/аза-Мајклове адиције/O–N ацилне миграције симетричних карбодимида и α,β -незасићених карбоксилних киселина

Реакције са асиметричним карбодимидима су веома хемо- и региоселективне и добија се само један изомерни хидантоин. Међутим, асиметрични карбодимиди, који имају једну алкил- и једну арил-групу, могу да дају *N*-ацилурее, као споредне производе, у различитим количинама.



Шема 1.25 Реакциона секвенца са асиметричним карбодиимидима

У првом ступњу реакције, карбоксилна киселина **1.9** се адирала на карбодиимид **1.10**, при чему настаје реактивни интермедијер *O*-ацилизоуреа, која постоји у два таутомерна облика **1.11** и **1.11'**. *O*–*N* миграцијом ацил-групе се добијају одговарајуће *N*-ацилуреа, **1.12** и **1.12'**, које се често јављају као споредни производи у реакцијама кондензације карбоксилних киселина, које се одигравају у присуству карбодиимида. Иако се мало зна о механизму *O*–*N* ацилних миграција и о региоселективности реакција добијања *N*-ацилуреа, Корана (Khorana) је предложио премештање које укључује *C=N* везу интермедијерне *O*-ацилизоуреа [48]. У случају несиметричних *O*-ацилизоуреа, ово би довело до настајања **1.12** из **1.11** и **1.12'** из **1.11'**. Пошто је настајање *N*-ацилуреа и хидантоина кинетички контролисано, што потврђује чињеница да ова једињења не прелазе једно у друго ни у реактанте, предложени механизам омогућава адекватну интерпретацију експерименталних резултата.

Региоселективност реакције је одређена у другом ступњу, тј. интрамолекуларном аза-Мајкловом реакцијом у којој настају 2-иминооксазолидин-2-они. Иако су

2-иминооксазолидин-2-они изоловани, познато је да ова једињења подлежу реакцији O—N миграције ацил-групе, у којој се добијају хидантоини. Региоселективност реакције настајања хидантоина углавном зависи од разлике нуклеофилности између почетних амино-група N-R₃ и N-R₄ код карбодимида – што је ова разлика већа, већа је и региоселективност. У том погледу, значајна су електронска и стерна својства R₃ и R₄.

1.1.5. Антиконвулзиви из групе хидантоина

Епилепсија је хроничан и често прогресиван поремећај, који карактеришу периодични и непредвидљиви напади праћени епизодним високофреквентним пражњењима импулса које врши група неурона у мозгу. Место примарног пражњења и опсег његовог ширења одређују симптоме који настају приликом напада.

Клиничка класификација епилепсије дефинише две основне категорије напада– парцијалне и генерализоване [49]. У парцијалним нападима пражњење почиње локално и често остаје локализовано. Генерализовани напади захватају цео мозак, укључујући ретикуларни систем, и зато производе поремећену активност у обе хемисфере.

Терапија епилепсије лековима мора да буде усмерена на контролу симптома, тј. на сузбијање напада. Сви актуелно доступни лекови су антиконвулзиви (иако епилепсија не изазива обавезно конвулзије). Антиконвулзиви су потпуно ефикасни у контролисању напада код око 50–80 % пацијената, иако су нежељена дејства ових лекова честа. Пацијенти, који болују од епилепсије, су на дуготрајној терапији, тако да је веома значајно да ови лекови имају што мање споредних нежељених дејстава. Зато и даље постоји потреба за ефикаснијим лековима са мање споредних дејстава, па је у последње време неколико нових уведено у клиничку употребу [50]. Лекови који се већ дуго примењују су: фенитоин, карбамазепин, валпроат, етосуксимид и фенобарбитал, заједно са различитим бензодиазепинима, као што су диазепам, клоназепам и клобазам (антиконвулзиви прве генерације). Новији лекови, чије се место у терапији епилепсије још увек одређује, су: вигабатрин, габапентин, ламотригин, фелбамат, тиагабин и топирамат (антиконвулзиви друге генерације) (табела 1.1).

Табела 1.1 Антиконвулзивна ефикасност агенаса прве и друге генерације против различитих врста епилептичних напада [49]

агенс	ефикасност			
	парцијални напади	генерализовани напади		
		тонично-клонични	абсенсни	миоклонични
<i>прва генерација</i>				
карбамазепин	+	+	не	не
фенитоин	+	+	не	не
фенобарбитал	+	+	не	+
примидон	+	+	+	+
валпроат	+	+	+	+
бензодиазепини	+	+	+	±
етосуксинимид	не	не	+	±
<i>друга генерација</i>				
ламотригин	+	+	+	+
топирамат	+	+	±	+
окскарбазепин	+	?	не	не
фелбамат	+	+	±	+
вигабатрин	+	?	не	не
тиагабин	+	?	?	не
габапентин	+	?	не	не

+ – ефикасан; ± – непоздани подаци; не – неефикасан; ? – подаци нису доступни (или нађени)

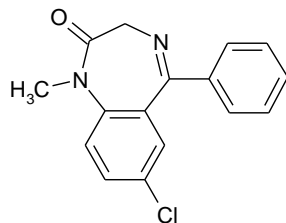
Антиконвулзивна активност хидантоина се изучава још од 1938. године [10]. Учињено је неколико покушаја да се постави општи фармакофорни модел антиконвулзива на основу разматрања структурно различитих једињења сличне антиконвулзивне активности. За деловање потенцијално фармаколошки активне супстанце су у основи битне две ствари:

1. транспорт лека од места примене до места деловања
2. интеракција молекула лека са рецептором

и обе зависе од структуре молекула.

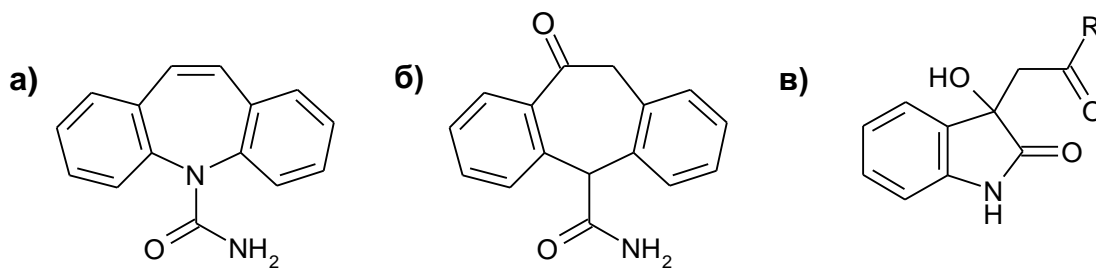
Значајан допринос разумевању антиконвулзивних ефеката фенитоина заснивао се на кристалографским проучавањима Камермана (Camerman) и Камермана (Camerman) [51–53], који су испитивали структурна својства неколико антиконвулзивних лекова, посебно фенитоина и диазепам (слика 1.4) и закључили: (1) оба молекула имају велике хидрофобне групе (тј. две фенил-групе код фенитоина и фенил- и хлорфенил-група код диазепам) које су слично оријентисане у простору; (2) када се два једињења поклопе, тако да им се хидрофобне групе преклопе, електрон-донорски атоми код сваког од њих (два атома кисеоника карбонилних група код фенитоина и тригонални атоми азота код

дiazепама) такође заузимају сличне просторне положаје и оријентације. Камерман и Камерман су уочили да су у оба случаја две хидрофобне групе и две електрон-донорске групе на растојању од 2,4 до 4,6 10^{-4} nm. На основу овога, поставили су модел антиконвулзива, који је веома утицао на даља проучавања механизма контроле напада.



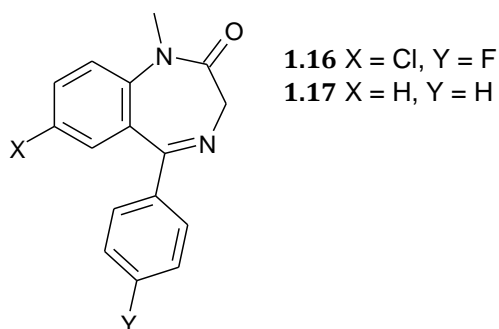
Слика 1.4 Хемијска структура diaзепама

Међутим, како су уочили Кодинг (Coddington) и сарадници [54], овај модел лоше објашњава разлику између лекова против абсенских напада и лекова који су ефикасни против тонично-клоничних напада. Наиме, лекови, који су неактивни у s.c. PTZ тесту, имају растојања између електрон-донорских атома, која се налазе у опсегу модела [55]. Са друге стране, новији антиконвулзиви немају функционалне групе или међуатомска растојања, која модел предвиђа, али су ипак активни. Репрезентативне примере представљају карбамазепин и цихептаמיד (слика 1.5). Проучивши два MES-активна деривата 3-хидроксииндола (слика 1.5) (конвулзије се индукују максималним електрошоком, енг. maximal electroshock seizure), Кодинг је предложио алтернативно објашњење модела Камермана и Камермана, које би обухватило карбамазепин, цихептаמיד и деривате 3-хидроксииндола [56]. За њихове структуре карактеристична је конформација коверте за амидну групу и једну од ароматичних група, док се остале ароматичне групе делимично поклапају. Кодингов модел садржи једну амидну групу са делокализованим електронима и планаран атом азота, а само би једна фенил-група требало да учествује у везивању за рецепторе. Када би обе хидрофобне групе учествовале у везивању, било би потребно велико хидрофобно место на рецептору за њихово смештање. Поређење фенитоина са осталим антиконвулзивима указује да се ови просторни захтеви односе на само једну фенил-групу. Може се претпоставити да је основна функција хидрофобних група да обезбеде биорасположивост.



Слика 1.5 Хемијске структуре карбамазепина (а), цихептамида (б) и 3-хидроксииндола које је проучавао Кодинг (в; R = C₆H₅, CH₃)

Ендрјуз (Andrews) и сарадници су проучавали MES–активна једињења, укључујући фенитоин и диазепам, и предложили општи модел антиконвулзива на основу прорачуна потенцијалне енергије [56]. Овај модел се састоји из два ароматична прстена или њихових еквивалената у најстабилнијим конформацијама и треће фармакофоре, која је обично циклични уреид и обухвата одређен број функционалних група способних да граде водоничне везе. Међутим, према овом моделу, атом азота код карбамазепина и атоми азота и/или кисеоника амидне групе требало би да учествују у везивању за рецепторе, што је у супротности са Кодинговим моделом [58]. Овај модел није потпуно применљив на имидне системе код уреида или амидне системе код бензодиазепина. Штернбахово (Sternbach) проучавање кристалне структуре два 1,4-бензодиазепина, који су структурно слични са диазепамом, али испољавају минималну биолошку активност, елиминисало је претходне моделе [59]. Подаци су приказани на слици 1.6. Може се закључити да молекули који се налазе у сличним конформацијама у чврстом стању нужно не испољавају слична биолошка својства. И други фактори, од којих су многи још увек непознати, значајно утичу на активност.



једињење	MES ED ₅₀ , mg kg ⁻¹
фенитоин	10,5
дiazепам	6,4
1.15	83
1.16	50

Слика 1.6 Хемијске структуре 1,4-бензодиазепина који су слабо активни, иако поседују структурна својства потребна да се антиконвулзивну активност испољи.

1.1.5.1. Фенитоин

Фенитоин (5,5-дифенилхидантоин, Dilantin®) је најважнији антиконвулзив из групе хидантоина. Утиче на екситабилност мембране путем деловања на волтажну зависне натријумске канале који носе улазну мембранску струју потребну за настанак акционог потенцијала [58]. Фенитоин делује и на друге аспекте функције мембране, укључујући калцијумске канале и посттетаничку потенцијацију, као и на интрацелуларну фосфорилацију протеина путем калмодулин-активирајућих киназа које такође могу да утичу на екситабилност мембране и синаптичке функције [49]. Упркос појави многих нежељених дејстава и непредвидљивог фармакокинетичког понашања, фенитоин је лек који се широко примењује, јер је ефикасан у терапији различитих форми парцијалних и генерализованих напада (није препоручљив у терапији чистих абсенских напада пошто може утицати на повећање њихове учестаности).

Фенитоин се примењује и у терапији вентикларне и пароксизмалне атријалне тахикардије, нарочито код пацијената који не реагују на конвенционалне антиаритмике.

Комерцијално је доступан и динатријум фосфатни естар 3-хидроксиметилфенитоина (Phenytoin Sodium®), предлек растворан у води, који се у организму брзо конвертује у фенитоин.

Фенитоин се метаболише у јетри преко система оксидаза мешовите функције до неактивног метаболита 5-(*p*-хидроксифенил)-5-фенилхидантоина и излучује највећим делом преко урина у облику глукуронида [59]. Он изазива ензимску индукцију и тако повећава брзину метаболисања других лекова (као што су нпр. орални антикоагуланси). Метаболизам фенитоина може да се повећа или компетитивно инхибира различитим лековима који представљају супстрате за идентичне ензиме у јетри. Барбитурати производе оба дејства и, пошто компетитивна инхибиција наступа одмах, док је за индукцију потребно више времена, они у почетку повећавају, а касније смањују фармаколошку активност фенитоина. Етанол има слично двојако дејство.

Интервал концентрација у плазми, у којем је фенитоин ефикасан и при томе не изазива нежељена дејства, прилично је узак (приближно 7,5–20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) [59]. Метаболизам фенитоина показује кинетику сатурације, што значи да се у опсегу терапијских концентрација брзина инактивације не повећава пропорционално са концентрацијама у плазми.

У овом контексту, експерименти на мишевима су показали да 3-метилфенитоин (3-МФ) и 1,3-диметилфенитоин (1,3-ДМФ) испољавају максималну антиконвулзивну активност након 3 h од интраперитонеалне администрације једињења растворених у ДМСО-у [60], док се максимална активност фенитоина испољава након 15 min. Концентрације сва три једињења у плазми одређиване су помоћу HPLC-а у различитим временским интервалима након инјектовања 3-МФ-а и 1,3-ДМФ-а. У оба случаја, фенитоин се појављује у плазми постепено достижући 14–15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ у току 3 h. Тренд повећања концентрације фенитоина у плазми у току времена добро корелише са антиконвулзивном активношћу проучаваних деривата, што указује да је антиконвулзивна активност резултат његовог настајања путем *N*-деметиловања. Уочено је да 1,3-ДМФ доводи до повећања концентрације главног метаболита, чија структура није утврђена. Различити облици епилепсије су се јавили код мишева, којима је 3-МФ инјектован у великим дозама (100 mg kg⁻¹) у ДМСО-у. Фенобарбитал, диазепам, клоназепам су се показали као ефикасни против оваквих напада, за разлику од фенитоина, карбамазепина и валпроинске киселине. Ово указује да 3-МФ испољава проконвулзивно дејство, при чему је могуће да ДМСО утиче на повећање оваквог ефекта.

1.1.5.2. Етотоин

Етотоин (3-етил-5-фенилхидантоин, Reganone®) се користи у терапији различитих форми парцијалних и генерализованих напада, али је мање ефикасан и токсичан од фенитоина. Лек се примењује у комбинацији са другим антиконвулзивима као што су фенитоин или фенобарбитал. Пре него што се почне са узимањем токсичнијих антиконвулзива, етотоин се примењује код пацијената чији напади не могу да се контролишу примарним антиконвулзивима.

Терапеутски интервал концентрација етотоина у плазми није прецизно утврђен (препоручује се 15–50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) [59]. Етотоин се метаболише у јетри до *m*- и *p*-хидроксилованих деривата што је праћено *N*-деетиловањем и метаболити се излучују као глукрониди углавном преко урина. Веома мали удео се елиминише непромењен. Метаболизам етотоина такође показује кинетику сатурације.

1.2. Квантитативна корелација структуре и активности органских молекула

Од када се физичко–хемијска и биолошка својства супстанци мере и квантификују, постоји тенденција да се формулишу везе које међу њима постоје. Године 1950. Ханш (Hansch) је дефинисао хидрофобни параметар и применио регресиону анализу на корелацију биолошке активност са физичко–хемијским својствима молекула. Од тада се примењују префињеније статистичке методе у циљу постављања различитих математичких модела који повезују биолошке и физичко–хемијске параметре.

Скуп математичких техника које се примењују за утврђивање зависности између физичко–хемијских и биолошких података означен је као QSAR (енгл. Quantitative Structure–Activity Relationship). Њихов циљ је да успоставе корелацију између неког својства или облика активности и физичко–хемијских својстава групе сродних молекула:

$$\text{биолошка активност} = \Phi (\text{физичко–хемијска својства})$$

Биолошка активност се може изразити мерењем величина као што су: c (концентрација лека у организму), K_i (афинитет везивања за рецептор), IC_{50} (концентрација при којој се испољава 50 % максималног инхибиторног дејства лека), ED_{50} (доза која производи 50 % максималног ефекта лека) и др. Физичко–хемијска својства се грубо класификују у три групе:

- 1) електронска својства;
- 2) стерни утицаји;
- 3) липофилност/хидрофобност;

и могу се описати преко великог броја параметара.

Однос физичко–хемијских својстава и биолошке активности се најчешће приказује као математички израз који је добијен применом статистичких или сродних метода (нпр. вишеструка линеарна регресија). Параметри који описују физичко–хемијска својства су независне променљиве, док је биолошка активност зависна променљива. У појединим случајевима ова зависност не може да се дефинише, што је последица њене комплексности и нелинеарности.

Предности примене QSAR техника су следеће:

а) квантификовањем се омогућава лакше разумевање утицаја структуре на биолошку активност, тј. идентификовање структурних елемената проучаваних једињења

који доприносе њиховој биолошкој активности и утврђивање промена јачине биолошког дејства које су резултат структурних промена;

б) може се предвидети синтеза нових аналога фармаколошки активне супстанце. Примењује се интерполација, док се са екстраполацијом изван опсега добијених експерименталних података мора бити обазрив;

в) омогућава се разумевање интеракција фармаколошки активних супстанци и биолошких рецептора.

Резултати добијени неком од QSAR техника интерпретирају се у складу са фундаменталним знањима о својствима дате групе једињења.

Недостаци QSAR техника су:

а) могу се добити корелације које нису валидне, јер су биолошки подаци по својој природи веома подложни експерименталним грешкама;

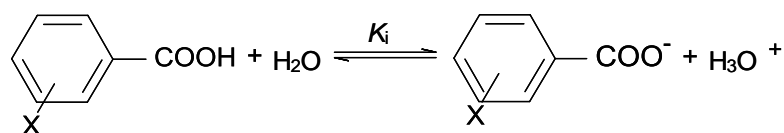
б) број експерименталних података је често мањи него што математичке (статистичке) методе захтевају. Због тога, многи резултати добијени неком од QSAR техника се не могу примењивати за поуздано предвиђање једињења са најбољом биолошком активношћу;

в) различити физичко-хемијски параметри се делимично преклапају у описивању одређеног својства супстанце. Стога се користе само оне њихове комбинације које имају малу коваријансу.

1.2.1. Утицај електронских својстава на фармаколошку активност

Електронска својства молекула могу да се опишу помоћу многобројних параметара, као што су: Хаметове (Hammett) σ константе, Тафтове (Taft) σ^* константа, Свен-Лаптонови (Swain-Lupton) параметар поља F и резонанциони параметар R , вредности pK_a , параметри изведени из спектроскопских мерења, диполни момент, параметри водоничног везивања и параметри изведени помоћу квантохемијских прорачуна (нпр. енергије орбитала и парцијална наелектрисања).

Електронска својства су се најпре разматрала преко утицаја супституената на реактивност ароматичних једињења. Хамет (Hammett) [61] је анализирао вредности константи јонизације m - и p - супституисаних бензоевих киселина у води на 25 °C.



Шема 1.26 Јонизација супституисаних бензоевих киселина у води

На основу овога се може закључити на који начин електронска својства супституента X утичу на положај равнотеже, односно киселост дате киселине. Електрон-акцепторски супституенти повећавају вредност константе равнотеже K_a , јер стабилишу карбоксилатни анјон. Киселина у молекулском облику је стабилизована, ако је X електрон-донорски супституент; фаворизована је повратна реакција.

Електронска својства могу да се квантификују преко константи дисоцијације K_a (једначина 1.1):

$$\begin{aligned} \log K_a (\text{супституисана киселина}) - \log K_a (\text{несупституисана киселина}) &= \log K_a (\text{RX}) - \log K_a (\text{RH}) = \\ &= \log (K_a (\text{RX}) / K_a (\text{RH})) = \sigma \end{aligned} \quad (1.1)$$

где је σ константа супституента. Њена вредност зависи од врсте и положаја супституента на ароматичном прстену. Електрон-акцепторски супституенти повећавају вредност константе равнотеже реакције, па су њихове вредности σ позитивне. Електрон-донорски супституенти имају негативне вредности σ .

Табела 1.2 Вредности константе супституента за различите супституенте и њихове положаје на ароматском прстену

Супституент	σ		Супституент	σ	
	<i>meta</i>	<i>para</i>		<i>meta</i>	<i>para</i>
O ⁻	-0,708	-1,00	F	0,337	0,062
OH	0,121	-0,37	Cl	0,373	0,227
OCH ₃	0,115	-0,268	COOH	0,355	0,406
NH ₂	-0,161	-0,660	COCH ₃	0,376	0,502
CH ₃	-0,069	-0,170	CF ₃	0,43	0,54
(CH ₃) ₃ Si	-0,121	-0,072	NO ₂	0,710	0,778
C ₆ H ₅	0,060	-0,01	⁺ N(CH ₃) ₃	0,88	0,82
H	0,000	0,000	N ₂ ⁺	1,76	1,91
SH	0,250	0,15	SO ₂ Ph	0,61	0,70

Величина σ може да се примени на различите реакције ароматичних једињења, што је довело до уопштавања Хаметове једначине (једначина 1.2):

$$\rho \sigma = \log (K_{(X)} / K_{(H)}) \quad (1.2)$$

где је ρ константа реакције, σ константа супституента, K је константа равнотеже (или k , константа брзине хемијске реакције) за посматрану реакцију.

Реакциона константа ρ је мерило осетљивости реакције или равнотеже на ефекте супституената. Њене велике вредности, било позитивне или негативне, указују на значајне промене наелектрисања на централном атому функционалне групе, односно да је утицај супституената велики. Када у прелазном стању долази до повећања негативног наелектрисања, вредност ρ је позитивна. Реакцију убрзава присуство електрон-акцепторских, а успорава присуство електрон-донорских супституената на ароматском прстену. Вредност ρ је негативна за реакције код којих се у прелазном стању јавља позитивно наелектрисање, тј. код којих долази до смањења електронске густине на реакционом центру. Тада ће их убрзавати присуство електрон-донорских, а успоравати присуство електрон-акцепторских супституената на ароматском прстену.

Хаметова једначина не може да се примењује на системе у којима се супституент на језгру налази у *ortho*- положају у односу на реакциони центар. Узрок су стерне сметње које могу делимично или потпуно да онемогуће утицај електронских својстава супституената на реакциони центар. Такође, ни алифатски системи не могу да се третирају овом једначином због појаве слободне ротације, која узрокује читав низ могућих конформација, а тиме и потенцијалне стерне ефекте остатка молекула на реакциони центар.

Алифатичне константе, σ^* , су дефинисане једначином (1.3) у којој су $\log k$ и $\log k_0$ константе брзине кисело (А у супскрипту) и базно (В у супскрипту) катализоване хидролизе RCOOR' и CH₃COOR', респективно [62].

$$\sigma^* = (\log (k/k_0)_B - \log (k/k_0)_A) / 2,48 \quad (1.3)$$

И вредности pK_a могу непосредно да одражавају електронска својства, пошто су вредности Хаметове константе σ изведене из вредности константи јонизације бензоевих киселина. Због тога, могу да се користе и као њихова замена. Са друге стране, вредности pK_a не могу да се примењују за описивање односа количина нејонизованих облика

различитих лекова. Један од ретких изузетака је нпр. једначина (1.4), која описује антибактеријску активност сулфонамида на *E. coli* [63].

$$\log 1/C = 1,044(\pm 0,13) pK_a - 1,640(\pm 0,18) \log (\beta 10^{pK_a} + 1) + 0,275(\pm 0,65) \quad (1.4)$$

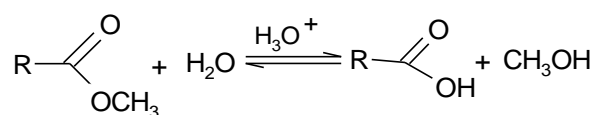
($n = 39$; $R = 0,956$; $sd = 0,275$; $F = 124,1$)

Коришћење диполног момента, μ , за описивање електронских својстава молекула у QSAR студијама предложио је Лиен (Lien); подаци о диполним моментима 311 ароматичних [64] и 214 алифатичних [65] супституената сакупљени су у литератури. Известан проблем представља усмереност диполних момената у простору, па је потребно да се примени сабирање вектора за процену резултујућег диполног момента једињења, које има више супституисаних положаја.

Параметре водоничног везивања су извели Зајлер (Seiler) [66], Ханш (Hansch) и Лео (Leo) [67] (одређујући донорске, акцепторске и неутралне супституенте) и Тафт (вредности ρ_{HNB} , које се изводе из настајања комплекса између базе и *p*-флуорофенола у CCl_4) [68].

1.2.2. Стерни утицаји на физиолошку активност

Тафт [69] је квантификовао стерне ефекте користећи кисело катализовану хидролизу естара, полазећи од претпоставке да ова реакција није осетљива на поларне ефекте супституената, пошто се они потиру у првом и другом ступњу реакције.



Шема 1.27 Кисело катализована хидролиза естара.

Супституент R омета нуклеофилни напад молекула воде, па се са повећањем његове величине смањује вредност константе брзине реакције k_a и фаворизује се повратна реакција.

Стерни ефекти се квантификују преко Тафтовог параметра, E_s , који се дефинише једначином (1.5).

$$E_s = \log k_{a(\text{RCO}_2\text{CH}_3)} - \log k_{a(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_3)} = \log (k_{a(\text{RCO}_2\text{CH}_3)} / k_{a(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_3)}) \quad (1.5)$$

где је k_a константа брзине реакције. Референтни супституент у Тафтовој једначини је метил-група.

Табела 1.3 Вредности Тафтовог параметра за различите супституенте

H	Me	Pr	<i>t</i> -Bu	F	Cl	Br	OH	SH	NO ₂	C ₆ H ₅	CN	NH ₂
1,24	0,00	-0,36	-1,54	0,78	0,27	0,08	0,69	0,17	-1,28	-2,58	0,73	0,63

Вредност Тафтовог параметра за водоник је $E_s(\text{H}) = 1,24$, што указује на мали стерни отпор хидролизи. Вредност Тафтовог параметра за *t*-Bu $E_s(\text{t-Bu}) = -1,54$ што указује на велике стерне сметње при хидролизи (табела 1.3).

Користе се и други стерни параметри, као што су STERIMOL параметар величине и моларна рефракција. Моларна рефракција одражава поларизабилност електронског омотача молекула и дефинише се (једначина 1.6):

$$R_m = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} V_m \quad (1.6)$$

где је: n - индекс преламања, V_m - моларна запремина дате супстанце.

1.2.3. Утицај липофилности на фармаколошку активност

Апсорпција и дистрибуција лека у биолошким системима зависе од његове липофилности. Липофилност се изражава преко подеоног коефицијента, P , који се дефинише као однос равнотежних концентрација растворене супстанце расподељене између водене и органске фазе (једначина 1.7).

$$P = \frac{[\text{лек}]_{n\text{-октанол}}}{[\text{лек}]_{\text{вода}}} \quad (1.7)$$

Услед могуће асоцијације молекула растворене супстанце у органској фази (нпр. димери карбоксилних киселина), коефицијент расподеле се одређује при нижим концентрацијама или се вредности P одређују екстраполацијом за бесконачно разблажене растворе. Као референтни систем за испитивање липофилности се користи систем

n-октанол/вода који представља апроксимацију биолошких мембрана. Систем *n*-октанол/вода има многе предности у односу на друге системе [70]:

а) То је погодан модел за липидне конституенте биолошких мембрана, због својих дугачких алкил-ланаца и поларних хидрокси-група.

б) Хидрокси-групе могу да буду донори и акцептори водоничне везе и на тај начин интереагују са поларним групама различитих растворених супстанци.

в) И поред своје липофилне природе, овај систем раствара много више органских једињења него алкани, циклоалкани или ароматични растварачи.

г) Док водена фаза овог система скоро да и не садржи *n*-октанол у равнотежном стању, органска фаза раствара значајнију количину воде ($2,3 \text{ mol dm}^{-3}$, што одговара молском односу *n*-октанола и воде $\approx 4:1$). Према томе, није потребно да се поларне групе дехидратишу при преласку из водене у органску фазу.

д) *n*-Октанол има мали напон паре, што омогућава репродуктивна мерења. Са друге стране, његов напон паре је довољно велики да омогућава његово уклањање под благим условима.

ђ) *n*-Октанол је UV-транспарентан у широком опсегу, што омогућава релативно лако квантитативно одређивање бројних једињења.

е) У литератури, коефицијент расподеле се експериментално најчешће одређује у систему *n*-октанол/вода, а и његове израчунате вредности се односе на овај систем.

ж) Проучавање односа структуре и биолошке активности многобројних супстанци, који се заснивају на коришћењу коефицијента расподеле у систему *n*-октанол/вода, једнозначно упућују на значај овог система.

Ако супстанца има велику вредност подеоног коефицијента, сматра се липофилном. Супстанца са малом вредношћу подеоног коефицијента је хидрофилна. Логаритмовањем *P* постаје адитивна величина (једначина 1.8).

$$\log P = \log [\text{лек}]_{\text{октанол}} - \log [\text{лек}]_{\text{вода}} \quad (1.8)$$

Допринос супституента X вредности $\log P$ се дефинише на следећи начин (једначина 1.9):

$$\pi_x = \log P_{\text{супституисаног } j} - \log P_{\text{полазног } j} = \log (P_{RX} / P_{RH}) \quad (1.9)$$

где је π_x хидрофобни (липофилни) параметар супституента X. Његове типичне вредности су приказане у табели 1.4.

Табела 1.4 Вредности хидрофобног параметра за различите супституенте

Липофилни супституенти	$\pi_x > 0$	Липофобни супституенти	$\pi_x < 0$
CH ₃	0,56	NO ₂	-0,28
C(CH ₃) ₃	1,98	OH	-0,67
C ₆ H ₅	1,96	COOH	-0,32
C ₆ H ₁₁	2,51	NH ₂	-1,93
CF ₃	0,88	CHO	-0,65

Вредности $\log P$ зависе од методе која је примењена за њихово одређивање. Постоји више метода мерења подеоног коефицијента, односно $\log P$:

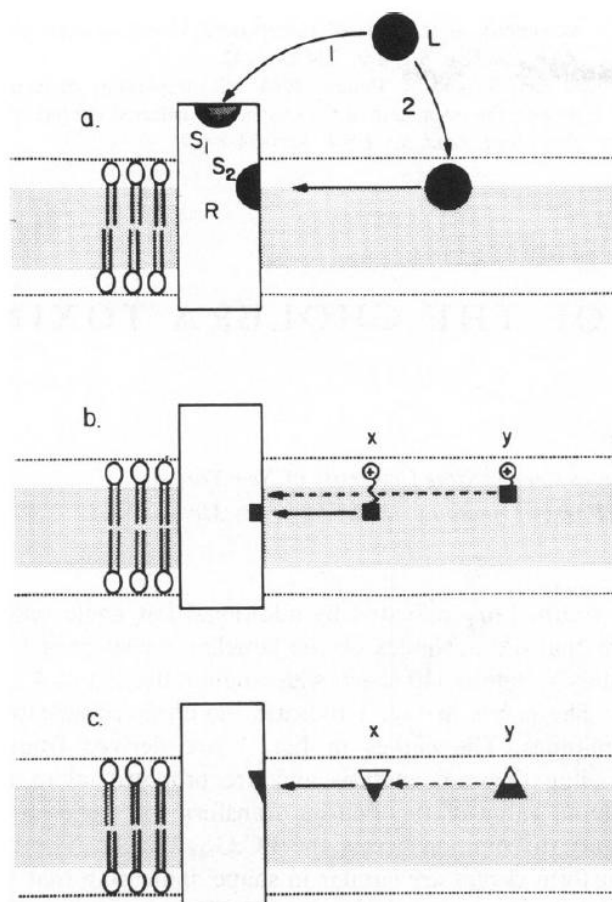
а) класична; мућкањем у систему два растварача који се слабо мешају, при чему се после успостављања равнотеже мери концентracија супстанце у једној од фаза. Вредности подеоних коефицијената, односно $\log P$, добијених овом методом, крећу се у интервалу од -2,5 до 4,5. Недостатак ове методе је споро успостављање равнотеже између две фазе;

б) метода колонског генератора која је изузетно сложена и скупа;

в) хроматографске методе; помоћу RP-HPLC (опсег $\log P$ је од 0 до 6) и RP-TLC (опсег $\log P$ је од 0 до 12), а у последње време и центрифугалном подеоном хроматографијом. Ове методе су индиректне, тј. потребно је коришћење референтних једињења познатог $\log P$. На основу корелације између теоријских и експериментално одређених вредности одређени су доприноси вредности $\log P$ за молекулске фрагменте. Тиме је омогућено да се примени својство адитивности. Вредност $\log P$ неког једињења се може израчунати ако је позната његова структурна формула. Својство адитивности се нарушава у случају када постоји узајамна интеракција супституената и њиховог директног контакта што је нарочито присутно када су у *ortho*- положају.

Систематично истраживање Хербета (Herbette) [71, 72], засновано на мерењима коефицијената расподеле између биолошких мембрана и воде, указало је да двофазни систем изотропних растварача не представља адекватан модел двослојних мембрана са унутрашњим хидрофобним делом и спољашњом поларном и негативно наелектрисаном фосфолипидном површином. Коефицијенти расподеле лекова између мембране и пуферских раствора се значајно разликују од вредности које су одређене у систему *n*-октанол/вода. Поред расподеле лекова у мембранама, за разумевање односа структуре и

активности потребно је да се узме у разматрање и оријентација молекула лека у односу на место везивања на површини рецептора, који је смештен у мембрани (слика 1.7).



Слика 1.7 Интеракције између лека и рецептора. *a)* Лиганд L може да допре до места везивања S_1 и S_2 на рецептору R дифундујући кроз водену фазу или (у случају места S_2) продирући у мембрану и дифундујући кроз њу. *b)* Веома уређена структура липидног двослоја може да ограничи дубину продирања липофилних и, нарочито, амфифиличних лекова, лек x ће одговарати месту везивања, пошто је постављен на одговарајућем растојању за оптималну интеракцију са рецептором, док ће лек y бити мање активан или неактиван. *c)* На оријентацију лиганда у односу на место везивања може да утиче мембрана ограничавајући његове ротационе степене слободe; лек x ће бити активан, а лек y неће. Мембрана може да стабилизује конформацију лека, која се разликује од конформације у воденој фази, и тако омогући или онемогући интеракцију са местом везивања на рецептору у мембрани.

Значај мембрана за деловање лека показао је и Зајдел (Seydel) [73, 74]. Мембрана може да утиче на молекуле лекова на следеће начине:

- Дифузија кроз мембране може да буде ступањ који одређује брзину деловања лека.
- Мембрана може да спречи дифузију до места деловања.

в) Мембрана може да везује или акумулира лекове.

г) Солватација молекула лека може да доведе до конформационих промена његове структуре.

Са друге стране, лек може да утиче на својства мембране на следеће начине:

а) Лек може да промени конформацију ацил-група.

б) Лек може да повећа површину мембране.

в) Лек може да утиче на промену дебљине мембране.

г) Лек може да промени потенцијал мембране и хидратацију поларних група.

Иако често занемаривани, сви ови утицаји су значајни за деловање лекова. Улогу биолошких мембрана у посредовању селективности рецепторских субтипова пептида проучавао је Швајцер (Schweizer) [75]. Постављена једначина (1.10) описује различите доприносе укупном међусобном деловању лека и мембране.

$$\Delta G_{\text{total}} = \Delta G_{\text{electrostatic}} - \Delta G_{\text{transfer}} + \Delta G_{\text{immobilization}} + \Delta G_{\text{amphiphilic}} + \Delta G_{\text{dipole}} \quad (1.10)$$

1.2.4. Вишепараметарски модели корелације структуре и активности

Претходно дефинисани физичко-хемијски параметри, тзв. молекулски дескриптори, представљају квантитативну меру електронских, стерних и липофилних својстава. Утицај молекулских својстава на биолошку активност може се објаснити комбинацијама више параметара.

Ханш је први применио вишепараметарску регресију да корелише биолошку активност и молекулска својства у следећем облику (једначина 1.11).

$$\log (1/C) = a (\log P)^2 + b \log P + c \sigma + d E_s + e + \dots \quad (1.11)$$

Коефицијенти од a до e су регресионе константе. Величине $\log P$, σ , E_s су независне променљиве чије су вредности одређене експериментално. И други параметри могу бити укључени у једначину. Ако се разматра n независних променљивих, постоји $2^n - 1$ њихових комбинација, које се могу искористити за објашњење добијених експерименталних резултата (узимају се у обзир само линеарни математички модели). Важно је да изабрани параметри буду ортогонални са што мањом коваријансом, односно да се не преклапају у

описивању молекулских својстава. Валидност добијене корелације се оцењује статистичким методама.

Табела 1.5 Молекулски дескриптори

Електронски параметри	Стерни параметри	Липофилни параметри
Хаметове константе – $\sigma, \sigma^+, \sigma^-$	Тафтов стерни параметар – E_s	Подеони коефицијент – $\log P$
Тафтове индуктивне константе – σ^*, σ_I	Молска запремина – V_m	Липофилни параметар супституента – π
Свен–Лаптонов параметар поља – F	Молска маса – M	Липофилне константе фрагмената – f, f'
Свен–Лаптонов параметар резонанције – R	Ван дер Валсов радијус – r	Дистрибуциони коефицијент – $\log D$
Константа дисоцијације – $pK_a, \Delta pK_a$	Ван дер Валсова запремина – V_w	Ретенциони фактор у HPLC – $\log k, \log k_w$
Хемијско померање – δ	Моларна рефракција – R_m STERIMOL – L, B_1	Параметар растворљивости – $\log S$

1.2.5. Утицај структуре на антиконвулзивну активност деривата хидантоина

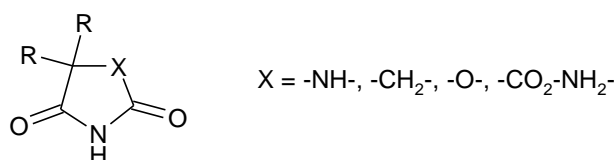
1.2.5.1. Липофилност као карактеристика односа структуре и активности деривата хидантоина

Значај липофилности за однос структуре и активности деривата хидантоина је одавно познат. Пренос *in vivo* и кроз ћелијске мембране зависе од њихове липофилности, односно удела и оријентације липофилних делова молекула. Подеони коефицијент представља квантитативну меру лакоће којом активна супстанца продире кроз ћелијску мембрану и везује се за хидрофобне површине. Као референтни медијум за оцену оваквог понашања изабран је равнотежни систем *n*-октанол/вода који представља апроксимацију ћелијске мембране.

Показало се да антиконвулзивна активност различитих серија лекова (слика 1.8) зависи од $\log P$ на следећи начин (једначина 1.12):

$$\log (1/C) = 0,73 \log P + 2,5 \quad (1.12)$$

где је C концентрација лека у организму. Једначина 1.12 показује да се антиконвулзивна активност лека неограничено повећава са повећањем његове липофилности. Међутим, постоји одређена граница, пошто липофилни молекули могу да буду заробљени у резервама масти у организму чиме се смањују њихова доступност и активност.



Слика 1.10 Општа структурна формула хетероцикличних антиконвулзива

Обухватањем и липофилнијих молекула добија се параболична зависност (једначина 1.8).

$$\log (1/C) = -0,40 (\log P)^2 + 1,4 \log P + 3,0 \quad (1.13)$$

Диференцирањем се добија оптимална вредност $\log P$ од око 1,75 која је карактеристична за већину лекова који делују на ЦНС.

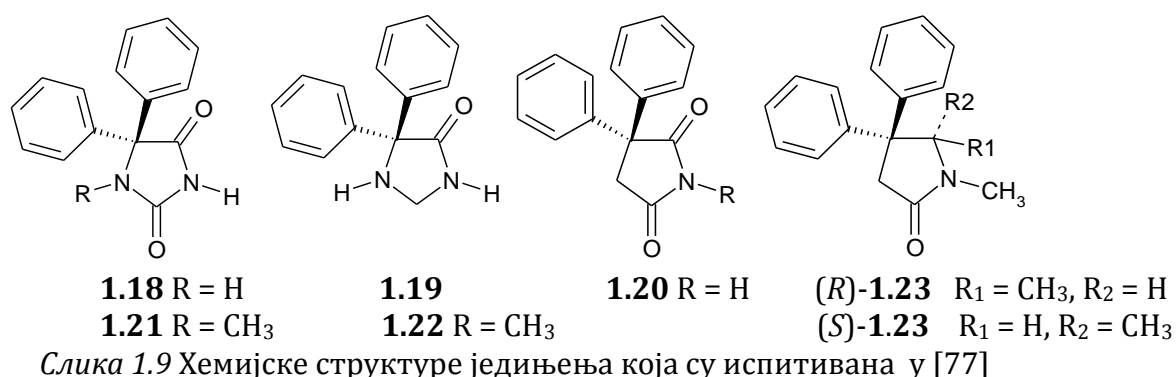
1.2.5.2. Способност грађења водоничних веза као карактеристика односа структуре и активности деривата хидантоина

Активност лека, када доспе до рецептора, зависи од интеракција са рецептором. Пошто су ове интеракције најчешће електростатичке природе, активност се може повезати са Хаметовим константама σ (електронски ефекти) и стерним ефектима.

Рендгенска структурна анализа је показала да многи антиконвулзивни лекови (фенитоин, диазепам, проциклидин, трихексилфенидил, етилфенацемид и дифенилсиландиол) имају сличне конформације у чврстом стању. Набројана једињења имају по две хидрофобне области и два центра богата електронима у сличним међусобним оријентацијама. Стога је претпостављено да оваква стереохемијска својства представљају главни предуслов за антиконвулзивну активност. Проучавајући механизам деловања, Смитис (Smythies [76]) је претпоставио да се фенитоин везује за β -спиралу

протеинског дела рецептора водоничним везама преко карбонилне групе у положају 2 и NH групе у положају 3. Међутим, пошто се и доксенитоин, 5,5-дифенилпириolidон, примењује као антиконвулзив, може се претпоставити да су и другачији начини успостављања водоничне везе могући. Пошто фенитоин има два наизменична C(=O)NH краја и две прохиралне фенил-групе у положају 5, постоји могућност да гради водоничне везе на различите начине.

Пупер и сарадници [77] су синтетисали неколико изостера фенитоина са различитом могућношћу да граде водоничне везе и поредили њихову активност у MES тесту (слика 1.9).



Смањивањем способности успостављања водоничних веза супституцијом карбонилне или NH групе метиленском групом добијају се једињења са смањеном антиконвулзивном активношћу у односу на фенитоин. То илуструју ED₅₀ вредности (табела 1.6).

Табела 1.6 Антиконвулзивна активност изостера фенитоина у MES тесту [77]

Бр. јед.	ED ₅₀ ^a , μmol kg ⁻¹
1.18	28 (24–32)
1.19	129 (71–244)
1.20	107 (73–158)
1.21	149 (120–185)
1.22	357 (267–481)
1.23	3834 (1253–11744)

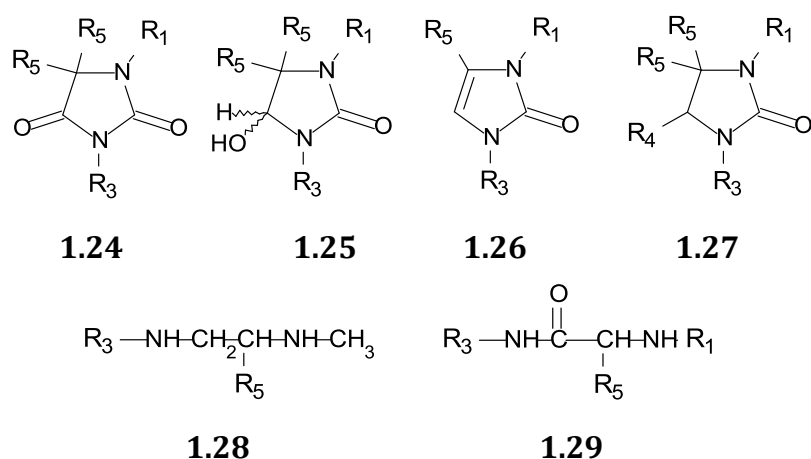
^aУ заградама су наведени интервали вредности са поузданошћу од 95%.

Постепено смањивање антиконвулзивне активности је последица трансформисања хидантоинског прстена у сукцинимид (**1.20**, **1.22**) и имидазолидинон (**1.19**). N-Метиловање (**1.21**) умањује способност успостављања водоничних веза што даље

резултује смањењем активности у MES тесту. *N*,5-диметил-4,4-дифенилпиролидин-2-он (1.23) не показује никакву активност у MES тесту.

У складу са претпостављеним механизмом деловања, хидрофобне фенил-групе штите водоничне везе, које се успостављају између имидног дела хидантоинског прстена и протеинског дела рецептора, од дејства воде. Још један доказ корелације између антиконвулзивне активности и способности успостављања водоничних веза је једнако дејство фенитоина и 3-амино-5,5-дифенилхидантоина у MES тесту [78]. Такође, циклизовани аналози фенитоина, који су добијени премошћавањем *ortho*-угљениковог атома фенил-групе и N1 положаја са две метиленске групе, поседују слабу антиконвулзивну активност [79]. Способност успостављања водоничних веза и изванредан степен слободе покретљивости фенил-група значајно утичу на антиконвулзивно деловање аналога фенитоина.

Кортес (Cortes) и сарадници су проучавали утицај модификовања хидантоинског скелета на биолошку активност [80]. Синтетисани су селективно супституисани хидантоини (1.24), 4-хидрокси-2-имидазолидинони (1.25), 2-имидазолони (1.26), 2-имидазолидинони (1.27), вицинални диамини (1.28) и деривати једноставних аминокиселина (1.29) и испитана је њихова активност у MES, пентилентетразолском (s.c. PTZ) и ротарод (Tox) тесту. Диференцијација међу серијама једињења (1.24–1.29) је постигнута мењањем њиховог оксидационог стања, базности и липофилности. Једињења поседују умерену антиконвулзивну активност и токсичност. Уопште, хидантоини (1.24) и аминокиселине (1.29) су најактивнији. У оквиру сваке серије, повећана антиконвулзивна активност је запажена код деривата који садрже ароматичну групу. Међу најактивнијим дериватима се истичу 2-ацетамидо-*N*-фенилпропанамид (MES ED₅₀ = 77 mg kg⁻¹, Tox TD = 454 mg kg⁻¹, неактиван у s.c. PTZ тесту) и два 2-имидазолонa: 4-метил-1-(фенилметил)-1,3-дихидро-2H-имидазол-2-он (MES ED₅₀ = 90 mg kg⁻¹, Tox TD = 268 mg kg⁻¹, неактиван у s.c. PTZ тесту) и 1-фенил-1,3-дихидро-2H-имидазол-2-он (MES ED₅₀ = 124 mg kg⁻¹, Tox TD = 211 mg kg⁻¹, s.c. PTZ ED₅₀ = 173 mg kg⁻¹).



Слика 1.10 Хемијске структуре једињења чија је антиконвулзивна активност испитивана у [80]

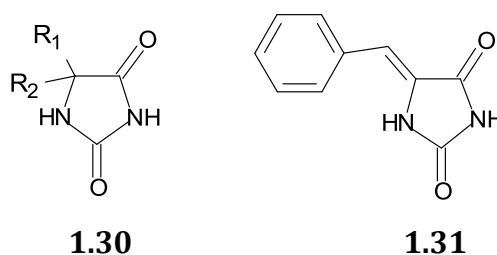
1.2.5.3 Конформација молекула као карактеристика односа структуре и активности деривата хидантоина

Када се проучавају фармаколошки релевантне особине једињења, посебан значај се придаје њиховој хиралности. Другим речима, потребно је познавати конформацију и начин везивања деривата хидантоина за рецепторе. Мелдрум (Meldrum) је утврдио да хидантоини циљају трансмембранске натријумске канале како би произвели нормални јонски потенцијал [58]. Мембранске интеракције се анализирају преко феномена преноса кроз крвно–мождану баријеру (КМБ) до места везивања на рецептору, а везивање се може објаснити липофилним интеракцијама.

У складу са механизмом деловања постављен је фармакофорни модел антиконвулзива који обухвата НВА групу (енгл. hydrogen-bond acceptor), НВД групу (енгл. hydrogen-bond donor) и електронегативну групу са великим хидрофобним делом молекула у одређеној оријентацији. Међусобна оријентација НВД или електрон-донорске групе и ароматичног прстена значајно утиче на ефикасност антиконвулзива. Овај модел је настао поређењем деривата хидантоина познате антиконвулзивне активности са посебним освртом на распоред липофилних и хидрофилних делова молекула. Сви активни деривати хидантоина нападају исте положаје псеудо-ригидних рецептора. Према томе, потенцијално фармаколошки активни деривати би требало да поседују сличан распоред круцијалних фармакофора као фенитоин, чија је структура релативно крута. Код деривата фенитоина, хидрофилни део је локализован на хидантоинском прстену, а липофилни део је одређен врстом и бројем супституената. Липофилни делови површине молекула могу да се израчунају преко Коноли површина (површине које су доступне

растварачу) и обележавањем молекулских липофилних потенцијала на њој (израчунатих на основу атомских липофилних константи).

Шол (Scholl) и сарадници [4] су анализирали однос структуре и антиконвулзивне активности деривата хидантоина применом различитих физичко-хемијских метода. На овај начин, за репрезентативан број деривата хидантоина (слика 1.11) мерили су RP-HPLC ретенционо време, одређивали $\log P$ вредности, као и хидрофилне и липофилне делове површине структуре молекула како би проценили њихове могућности преношења у организму и интеракције са рецепторима.



Слика 1.11 Хемијске структуре испитиваних деривата хидантоина у [4]:
5,5-дисупституисани хидантоин (**1.30**); 5-арилиденхидантоин (**1.31**).

На основу резултата експеримената дошли су до следећих закључака:

- а) исти супституенти се налазе у сличним конформацијама;
- б) код 5,5-дисупституисаних хидантоина, ароматичне групе су изврнуте у односу на раван хидантоинског језгра; *o*-супституција фенил-група условљава даљу дисторзију;
- в) алифатични ланци се налазе у издуженим *anti*-конформацијама;
- д) бензил-супституисани хидантоини се налазе у савијеној конформацији..

Проучавајући 5-бензилиденхидантоине, дошли су до аналогних закључака:

- а) ароматични прстен на метиленском угљенику је изврнут у односу на раван хидантоинског прстена ($\Phi = 46-51^\circ$);
- б) фенил-супституент у положају 3 показује сличну дисторзију због стерне ометености.

Мултифит експериментима пореде се релативно флексибилна једињења са циљем да се дефинишу положаји карактеристичних група. Активни деривати хидантоина имају сличан распоред фармакофорних група као *pro-S* изомер фенитоина. Потребна је мала енергија да активна једињења промене своју конформацију како би се окренули према рецептору. Њихова крајња потенцијална енергија је слична почетној (ΔE је мало). Неактивна једињења се у току експеримента веома деформишу, па се и њихова енергија повећава (ΔE је велико). Резултати мултифит експеримената показују да се деривати са

фенил-групом у положају 5 (S-енантиомери) или бензил-групом у положајима 3 или 5 поклапају са модел-молекулом фенитоином и имају потенцијално антиконвулзивно дејство.

Ограничење представља илуструје карбамазепин. Према овом моделу, он би требало да је неактиван, а познато је да је активан у неким случајевима када деривати хидантоина испољавјау слабију активност. Закључено је да карбамазепин и фенитоин нападају различите положаје рецептора.

1.3. Утицај растварача на апсорпционе спектре органских молекула

Када се кроз простор испуњен неком супстанцом пропусти сноп електромагнетних зрака, може доћи до апсорпције или пропуштања зрачења у зависности од његове фреквенције и структуре једињења. Апсорбовањем електромагнетног зрачења енергије $\Delta E = h\nu$, молекул прелази из основног у ексцитовано стање што се манифестује појачањем вибрација или ротација атомских језгара или прелазом електронског система на виши енергетски ниво. Када се систем враћа у основно стање, емитује се енергија која је карактеристична за дату супстанцу.

Ултраљубичаста спектроскопија проучава апсорпцију електромагнетног зрачења у области између 200 и 400 nm. Апсорпциони спектри вишеатомских молекула проучавају се са становишта прелаза електрона локализованих у везама или одређеним функционалним групама. Могући су следећи електронски прелаз:

- $n \rightarrow \pi^*$, када електрони слободног електронског пара прелазе у мање стабилну антивезивну π^* орбиталу;
- $\pi \rightarrow \pi^*$, када електрони везивне π орбитале прелазе у мање стабилну антивезивну π^* орбиталу;
- $\sigma \rightarrow \sigma^*$, када електрони везивне σ орбитале прелазе у мање стабилну антивезивну σ^* орбиталу.

Апсорпција енергије у ултраљубичастој и видљивој области одређена је присуством хромофорне групе или хромофоре – дела молекула у којем се дешава неки од описаних прелаза приликом апсорпције зрачења. Свака хромофора има карактеристичну вредност таласне дужине која одговара максимуму апсорпције и одређена је структуром молекула. Остатак молекула не апсорбује зрачење, али може утицати на положај апсорпционог максимума. Електрон-донорске групе изазивају померање апсорпционог максимума ка већим таласним дужинама, односно изазивају батохромни ефекат (алкил-, алкокси-, хидрокси-, амино-, итд). Електрон-акцепторске групе померају апсорпционе максимуме ка мањим таласним дужинама, односно изазивају хипсохромни ефекат (нитро-, карбоксилна-, сулфонска- и др).

Положај, интензитет и облик апсорпционих трака у UV/Vis спектрима зависе и од растварача у коме се одређују. Померање и промена интензитета апсорпционих трака је последица интермолекулских интеракција између растварача и растворене супстанце,

које могу да буду типа: јон-дипол, дипол-дипол, дипол-индуковани дипол, водоничне везе и др. Утицај растварача на UV/Vis спектре се назива солватохромизам. Солватохромни ефекат може да буде:

- хипсохромни, тзв. плаво померање, који означава померање апсорпционих максимума ка мањим таласним дужинама са повећањем поларности растварача (негативни солватохромизам);
- батохромни, тзв. црвено померање, који означава померање апсорпционих максимума ка већим таласним дужинама са повећањем поларности растварача (позитивни солватохромизам).

1.3.1. Солватохромна једињења

Утицај растварача на UV/Vis спектре превасходно зависи од врсте хромофоре и природе електронског прелаза ($\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ и трансфер наелектрисања (СТ, енгл. charge-transfer)). Електронски прелази од посебног интереса су $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ и СТ. Једињења, која садрже π -електроне, могу да се класификују у три различите групе према идеализованој структури: ароматична једињења, полиени (или полиини) и полиметини (слика 1.12) [81, 82].



Слика 1.12 Класификација органских једињења са π -електронским системима, према [80]

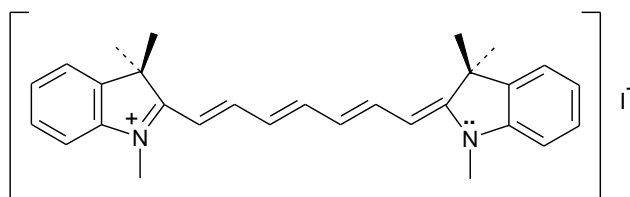
За разлику од једињења ароматичне или полиенске структуре, полиметини представљају коњуговане молекуле равног низа које карактеришу једнаке дужине веза и промена наелектрисања дуж метинског ланца. Они показују заједничка структурна својства:

$$\dots(n + 3)\pi \dots \quad n = 1, 3, 5, 7, \dots$$

$X-(CR)_n-X'$	R = H или супституенти
	X, X' = атоми (N, O, P, S) или атомске групе на крајевима ланца
$X = X'$	полиметинске боје (X = X' = N: цијанини, X = X' = O: оксоноли)
$X \neq X'$	мерополиметинске боје (X = N и X' = O: мероцијанини)

Посебно су занимљиве мерополиметинске боје (нарочито мероцијанини), чија се електронска структура налази између полиенске и полиметинске у зависности од природе X и X' и поларности растварача [83]. Ово су системи у којима је електрон-донорска група, D, повезана са електрон-акцепторском групом, A, преко система коњугованих веза. Њихове π -електронске структуре могу да се објасне помоћу две резонантне структуре, $D-R-A \longleftrightarrow D^+-R-A^-$. Електронски прелаз је праћен интрамолекулским трансфером наелектрисања између донорске и акцепторске групе тако да се диполни момент (μ_e) значајно разликује од диполног момента молекула у основном стању (μ_g).

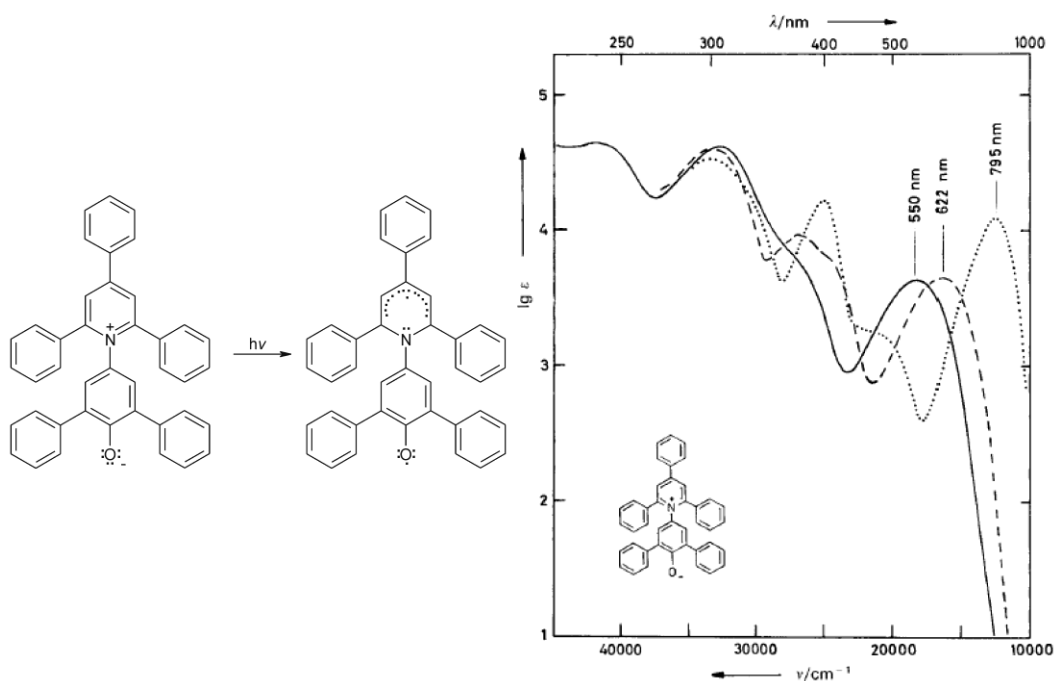
Једино молекули са π -електронима, код којих се расподела наелектрисања значајно разликује у основном и побуђеном стању, имају изражена солватохромна својства. Релативно мала зависност UV/Vis спектра од растварача запажа се код следећих једињења: ароматична једињења (без електрон-донорских и/или акцепторских група, нпр. бензен), полиени (нпр. ликопен, каротиноиди), полиини (нпр. полиацетилени) и симетричне полиметинске боје. Ароматично једињење са великом тродимензионалном π -електронском мрежом, које завређује посебну пажњу, је фулерен C_{60} . Енергија његовог A_0 електронског прелаза на око $\lambda_{max} = 405 \text{ nm}$ се промени за само $\Delta\nu = 360 \text{ cm}^{-1}$ при промени растварача од *n*-хексана до угљен-дисулфида [84]. Репрезентативан пример за полиенске π -системе је β -каротен. Његова $\pi-\pi^*$ апсорпција на око $\lambda_{max} = 454 \text{ nm}$ помери се за само $\Delta\nu = 239 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\lambda_{max} = 5 \text{ nm}$) при промени растварача од циклохексана до метанола [85]. Пример за полиметински π -систем је хептаметинијумска цијанинска боја (слика 1.13), чија се $\pi-\pi^*$ апсорпциона трака батохромно помери за $\Delta\nu = 304 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\lambda_{max} = 17 \text{ nm}$) при промени растварача од метанола до хлороформа [86].



Слика 1.13 Структурна формула хептаметинијум цијанинске боје, чија је солватохромно понашање проучавано у [86]

Велики утицај растварача на UV/Vis спектре уочава се код диполарних мерополиметинских боја, нарочито мероцијанина, углавном услед промене диполног момента у току електронског прелаза. За илустрацију може да послужи бетаинска боја 2,6-дифенил-4-(2,4,6-трифенилпиридинијум-1-ил)фенолат, која испољава најизраженија солватохромна својства [87].

Апсорпциона трака овог једињења се помери за $\Delta\nu = 9730 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 357 \text{ nm}$) са променом растварача од дифенил-етра до воде. Раствор ове бетаинске боје у метанолу је црвен, у етанолу љубичаст, у изоамил-алкохолу плав, у ацетону зелен, а у анизолу жут (слика 1.14). Његова $\pi-\pi^*$ апсорпциона трака потиче од интрамолекуларног трансфера наелектрисања од фенолат- ка пиридинијум-језгру. Разлика у солватацији веома диполарног, цвитерјонског основног стања и мање поларног првог побуђеног стања доводи до великог негативног солватохромизма. Постоји и непосредан експериментални доказ за овај интрамолекуларски трансфер наелектрисања – измерено је електромагнетно зрачење, које емитују оријентисани бетаински молекули у току фотоексцитације. Диполни момент се смањује и мења правац у току фотоексцитације од око 15 D у основном стању до око -6 D у побуђеном стању.



Слика 1.14 UV/Vis апсорпциони спектри 2,6-дифенил-4-(2,4,6-трифенилпиридинијум-1-ил)фенолата у етанолу (-), ацетонитрилу (- -) и 1,4-диоксану (· ·) на 25 °C [87]

Померање $\pi-\pi^*$ апсорпционе траке ове бетаинске боје у различитим растварачима примењено је за дефинисање емпиријског параметра поларности растварача, $E_T(30)$. Може да се користи и за UV/Vis спектроскопско одређивање удела воде или других поларних растварача у бинарним смешама растварача различите поларности. Примена солватохромизма у аналитичкој хемији је детаљно приказана у литератури [88].

1.4. Вишепараметарски приступ у оцени ефекта солватације

Утицаји растварача на реактивност органских једињења и њихове апсорпционе спектре су сложенији и често специфичнији у поређењу са утицајима супституената. Својство поларности растварача омогућава да се ти утицаји сагледају само квалитативно. Међутим, немогућност да се утицаји растварача и квантитативно изразе, преко физичких константи, подстакла је увођење емпиријских скала. Емпиријске скале поларности растварача се заснивају на познатим реакцијама, које су осетљиве на раствараче. Њима се изражава емпиријска мера поларности растварача, односно емпиријска мера његове солватационе моћи у датој модел реакцији. Емпиријски параметри поларности који су одређени на основу једне реакције нису универзални и не могу да се примене на све остале.

Ако се ефекти растварача раздвоје на различите типове интеракција између молекула растварача и растворене супстанце, резултујући параметри могу да објасне њихову величину. Да би се размотрила два или више аспекта солватације, прибегло се вишепараметарском приступу (једначина 1.14).

$$A = A_0 + b B + c C + d D + \dots \quad (1.14)$$

Величина A представља физичко-хемијско својство, које зависи од растварача: логаритам константе брзине или равнотеже или положај апсорпционог максимума у UV/Vis, IR, NMR и ESR спектру. A_0 је екстраполисана вредност својства у гасовитој фази или инертном растварачу. B , C , D ,... су независни, али комплементарни параметри растварача који описују различите типове интеракција између молекула растварача и растворене супстанце. Коефицијенти b , c , d ,... описују осетљивост својства A на различите

типове интеракција између молекула растварача и растворене супстанце; одређују се вишеструком линеарном регресијом.

Вишепараметарски модел омогућава предвиђање вредности зависно променљиве на основу вредности независно променљивих и може да се примени само на сет података добијених за велики број добро одабраних растварача. Његова валидност се испитује одговарајућим статистичким методама. Међутим, раздвајање поларности растварача на различите типове интеракција је чисто формалне природе и понекад није теоритски валидно, пошто њихово деловање не може увек да се раздвоји.

Уопштено, ефекти растварача могу да се поделе у две различите врсте доприноса:

(а) *Специфичне интеракције*, које су описали Драго (Drago) и сарадници [89] као локализоване интеракције типа донор–акцептор, које укључују специфичне орбитале, и које су квантификоване преко Гутманове (Gutman) AN и DN скале [90] и Драгове E_B и C_B скале [91] или се интерпретирају као кисело–базне интеракције које укључују водонично везивање и квантификоване су преко Копел–Палмове (Koppel–Palm) $B(\text{MeOD})$ [92], Арнетове (Arnett) ΔH_r [93], Марија–Галове (Maria–Gal) $\Delta H(\text{BF}_3)$ [94] скале и Камлет–Тафтових (Kamlet–Taft) α и β [95, 96] и Каталанових (Catalán) SA и SB скала [97].

(б) *Неспецифичне интеракције*, које потичу од деловања растварача као диелектричног континуума, а које су моделовали Кирквуд (Kirkwood) [98] и Онзагер (Onsager) [99], а квантификоване су преко Козоуерове (Kosower) Z [100], Брукерове (Brooker) χ_R [101], Донг–Виникове (Dong–Winnick) P_u [102], Камлет–Тафтове π^* [103], Драгове S' [104] и Каталанове SPP скале [105].

Камлет и Тафт су поставили тоталну солватохромну једначину (једначина 1.15) [106]:

$$A = A_0 + s(\pi_1^* + d\delta) + a \alpha_1 + b \beta_1 \quad (1.15)$$

која представља линеарну корелацију енергије солватације (LSER, од енгл. linear solvation energy relationship). Величина A представља физичко–хемијско својство растворене супстанце чија се зависност од растварача испитује; A_0 је екстраполисана вредност својства у циклохексану као референтном растварачу.

Параметар π_1^* је мера поларности/поларизабилности растварача и функција је његовог диполног момента $\mu = -0,1 + 4,3\pi_1^*$. Његове вредности се крећу од 0,00 за циклохексан до 1,00 за диметил-сулфоксид.

Параметар $d\delta$ служи за корекцију поларизабилности; његова вредност је 0 за нехлороване алифатичне раствараче, 0,5 за полихлорсупституисане алифатичне раствараче и 1,00 за аромате. Увођење овог параметра је последица запажања да су разлике у поларизабилности растварача највеће између три наведене групе растварача.

Параметар α_1 описује способност растварача да буде донор протона (односно акцептор електронског пара) у водоничној вези. Његове вредности се крећу од 0,00 за неполарне апротичне раствараче (као *n*-хексан) до 1,00 за метанол.

Параметар β_1 описује способност растварача да прими протон (односно да преда електронски пар) у водоничној вези. Његове вредности се крећу од 0,00 за неполарне апротичне раствараче (као *n*-хексан) до 1,00 за триамид хексаметилфосфорне киселине.

Коефицијенти s , d , a и b представљају квантитативну меру утицаја одговарајућих параметара растварача. Пошто су α , β и π^* скале нормализоване, узима се да количници a/s , b/s или a/b говоре о квантитативној мери релативног доприноса једног одређеног параметра у односу на други.

Солватохромна својства неполарних супстанци, које не успостављају водоничне везе са растварачем, не могу да се адекватно опишу коришћењем Камлет–Тафтове скале, пошто су диполарност и поларизабилност растварача представљене само једним параметром π^* . Коришћење члана $d\delta$, који коригује поларизабилност, није погодно решење проблема, пошто не омогућава разликовање ефеката поларизабилности између два сродна растварача, као што су нпр. ароматични и халогеновани угљоводоници. Додатни недостатак Камлет–Тафтових параметара је што се њихово одређивање не заснива на дефинисаном референтном процесу, већ су изведени усредњавањем резултата мерења различитих референтних једињења.

У новије време, Каталан и сарадници су увели три алтернативне скале поларности SA, SB и SPP, које се формално могу довести у везу са Камлет–Тафтовим параметрима α_1 , β_1 и π_1^* . Предност Каталановог концепта је што се одређивање сваког солватохромног параметра растварача заснива на пару добро дефинисаних хомоморфних референтних једињења. Каталан и Хопф (Hopf) су показали да је једињење означено као ttbP9 (3,20-ди-*terc*-бутил-2,2,21,21-тетраметил-5,7,9,11,13,15,17,19-докозаноен) осетљиво на промене у поларизабилности медијума и неосетљиво је на киселост, базност и диполарност растварача, па су извели четврту скалу SP, која се заснива на одређивању компоненте 0–0 његовог интензивног $^1A_g \rightarrow ^1B_u$ електронског прелаза [107]. Нова скала је омогућила да се постепене промене у поларизабилности мере солватохромним методом.

Међутим, указано је да скале SPP и SP нису независне једна од друге и оправдано је да се користи само један од ових параметара. Због тога је уведена и допунска скала SdP, која описује диполарност растварача, а изведена је из скале SP и апсорпционих фреквенција DMANF-а (2-N,N-диметиламино-7-нитрофлуорен) [108]. На основу овога, формулисана је вишепараметарска једначина која обухвата по два параметра за специфичне и неспецифичне интеракције (једначина 1.16):

$$A = A_0 + bSA + cSB + dSP + eSdP \quad (1.16)$$

у којој A представља физичко-хемијско својство које зависи од растварача; A_0 је статистичка величина која одговара вредности проучаваног својства у гасној фази; SA, SB, SP и SdP представљају независне и комплементарне параметре растварача који описују различите типове интеракција између молекула растворене супстанце и растварача; b , c , d и e су регресиони коефицијенти који описују осетљивост својства A на различите типове интеракција између молекула растворене супстанце и растварача.

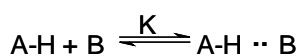
Анализа Камлет-Тафтовог параметра π_1^* Каталановим приступом показала је да он збирно одражава диполарност и поларизабилност растварача, али на његове вредности слабо утичу и киселост и базност растварача (једначина 1.17) ($n = 78$, $R = 0,9798$).

$$\pi_1^* = -0,89(\pm 0,06) + 1,48(\pm 0,09)SP + 0,74(\pm 0,03)SdP - 0,11(\pm 0,03)SB + 0,08(\pm 0,04)SA \quad (1.17)$$

Са друге стране, увођењем фактора $d\delta$ скала π_1^* се преводи у виртуелно чисту скалу поларизабилности (једначина 1.18).

$$\pi_1^* + d\delta = -2,66(\pm 0,29) + 4,68(\pm 0,42)SP + 0,50(\pm 0,13)SdP - 0,53(\pm 0,14)SB + 0,24(\pm 0,18)SA \quad (1.18)$$

Абрахам (Abraham) [109, 110] је извео скале киселости, α_2^H , и базности, β_2^H , користећи константе равнотеже настајања комплекса типа 1:1 у тетрахлорметану на 298 K (шема 1.29).



Шема 1.29 Реакција настајања водонично везаних комплекса типа 1:1

Иако су ово најобухватније скале, које описују способност супстанци да граде водоничне везе, оне не могу да се једноставно примене у случајевима када више молекула растварача окружује један молекул растворене супстанце. То се дешава у процесима, као што су растварање гасова и пара у течностима или расподељивање супстанце између две течне фазе. Зато су скале параметара α_2^H и β_2^H подешене на тзв. ефективне или збирне скале киселости и базности. Дескриптори α_2^H и β_2^H се уносе у линеарне зависности енергија солватације, из којих се збирни дескриптори $\Sigma\alpha_2^H$ и $\Sigma\beta_2^H$ повратно израчунавају. Код једноставнијих једињења, постоји добро поклапање вредности β_2^H и $\Sigma\beta_2^H$. Код једињења сложеније структуре, вредности $\Sigma\beta_2^H$ су обично веће од вредности β_2^H . Такав је случај код нпр. активираних ароматичних једињења – фенола и анилина, код којих и функционална група и ароматично језгро могу да приме протон при успостављању водоничне везе, па и веће вредности $\Sigma\beta_2^H$ могу да се очекују.

Абрахамове скале растворених супстанци се значајно разликују од Камлет–Тафтових скала растварача. Камлет–Тафтове скале се односе на својства масе течности, док се скале параметара $\Sigma\alpha_2^H$ и $\Sigma\beta_2^H$ односе на мономере растворене супстанце у разблаженом раствору у тетраклорметану. Друго, Камлет–Тафтове скале су углавном изведене из спектроскопских мерења и нису у вези ни са једним термодинамичким својством, док су скале $\Sigma\alpha_2^H$ и $\Sigma\beta_2^H$ строго повезане са променом Гибсове енергијом растварања. Нажалост, у литератури постоји велика збрка између ове две скале и оне се често примењују заједно. Међутим, показано је да вредности β_1 и $\Sigma\beta_2^H$ међусобно не корелишу.

Абрахамова линеарна зависност енергије солватације укључује серију супстанци у фиксном растварачу или растварачима. Својства растварача се сматрају константним, а различите интеракције се описују преко параметара појединачних растворених супстанци, који су изведени на основу теоретског модела шупљина (слика 1.17). Постављена је следећа једначина (1.19).

$$\log SP = c + r R_2 + s \pi_2^H + a \Sigma\alpha_2^H + b \Sigma\beta_2^H + v V_x \quad (1.19)$$

SP је својство серије једињења у датој фази, нпр. подеони коефицијент између гасне и течне фазе или неко биолошко својство.

R_2 је вишак моларне рефракције, који може да се једноставно одреди на основу индекса рефракције једињења. Овај дескриптор представља тенденцију једињења да интереагује са растварачем преко π или n електронских парова.

π_2^H описује поларност/поларизабилност једињења. Овај дескриптор се експериментално одређује помоћу подеоне хроматографије за супстанце које нису испарљиве, или, у општем случају, на основу коефицијента расподеле између воде и органског растварача.

$\Sigma\alpha_2^H$ описује способност једињења да буде донор протона при успостављању водоничне везе. За монокиселине, овај дескриптор се добија на основу константи настајања водонично везаних комплекса и на овај начин су одређене његове вредности за многе типове једињења, као нпр. карбоксилне киселине и алкохоле. Пошто је скала киселости утврђена, вредности за нова једињења се одређују хроматографски или мерењем расподеле између растварача.

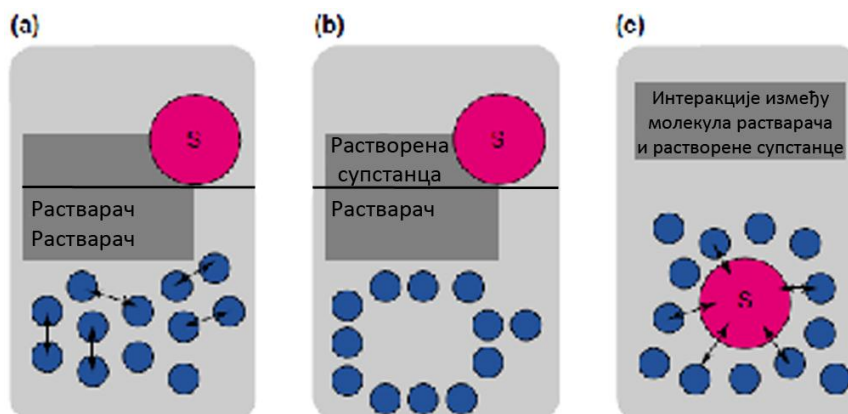
$\Sigma\beta_2^H$ описује способност једињења да буде акцетор протона при грађењу водоничне везе. Вредност овог дескриптора се одређује аналогно дескриптору $\Sigma\alpha_2^H$.

V_x је Мекгоуанова (McGowan) карактеристична запремина и може да се једноставно израчуна за било које једињење на основу његове молекулске структуре.

Опсег супстанци, чији су параметри данас доступни, прилично је широк и обухвата од једноставних гасова (нпр. водоник, азот) до сложених лекова и пестицида. За засићене угљоводонике, вредности R_2 , π_2^H , $\Sigma\alpha_2^H$ и $\Sigma\beta_2^H$ су једнаке нули. За већину осталих класа једињења, вредности ових параметара су позитивне. Међутим, неколико типова, као што су флуоровани алкани, имају негативне вредности за π_2^H и R_2 и понашају се као мање поларни и више хидрофобни у односу на одговарајуће угљоводонике.

Концепт шупљина, који је развио Абрахам, описује процес солватације у три ступња (слика 1.18). Интермолекулске силе које држе на окупу молекуле растварача треба најпре да се раскину да би се образовала шупљина величине молекула растворене супстанце, што је енергетски неповољно (ступањ *a*). У ступњу (*b*), молекули растварача треба да се реорганизују око настале шупљине. Пошто се молекул растворене супстанце у њу уметне (ступањ *v*), успостављају се интеракције између молекула растварача и растворене супстанце, што је енергетски повољно (ступањ *c*). Рад потребан да се образује шупљина у ступњу (*a*) је пропорционалан величини молекула растворене супстанце, као и величина дисперзионих сила у ступњу (*c*). Према томе, члан V_x у солватационој једначини обухвата ефекат стварања шупљине и супротан ефекат дисперзионих сила. Друге интеракције

између молекула растварача и растворене супстанце у ступњу (c) су описане преосталим члановима у једначини (1.15).



Слика 1.15 Приказ концепта шупљина

Укратко, вишепараметарски приступ у процени ефеката растварача има бројне недостатке. Раздвајање ефеката растварача на различите адитивне доприносе је понекад произвољно, пошто различити типови интеракција између молекула растварача и растворене супстанце не делују увек независно једни од других. Мора се бити обазрив при избору најбољег параметра за сваки тип интеракција због њихове осетљивости. Да би се установила одговарајућа вишепараметарска једначина потребан је велики број експерименталних података и често је немогуће предвидети ефекте растварача екстраполацијом или интерполацијом. Због тога, њихова примена је ограничена.

1.4.1. Примена солватационих једначина у анализи својстава лекова

Превести једињење, које има висок афинитет везивања за биолошке рецепторе, у лек, који се пласира на тржишту, један је од главних изазова фармацеутске индустрије. Материјални трошкови у процесу развоја лека представљају озбиљан економски проблем и често су последица неодговарајућих физичко–хемијских својстава једињења, односно слабе апсорпције и неадекватне фармакокинетице, које су у вези са тим. Опште је прихваћено да је потребно да се у раној фази откривања лека узима у разматрање не само потенцијал деловања (у односу на примарни рецептор), већ и друга биолошка (селективност), токсиколошка и физичко–хемијска својства.

Растворљивост лека и способност молекула да продиру кроз биолошке мембране представљају два основна својства која се доводе у везу са липофилношћу. Велика

липофилност је често узрок лоше растворљивости и даље води непотпуној апсорпцији након оралне примене лека. Предложена је биофармацеутска класификациона шема према којој лекови могу да се поделе у четири групе на основу своје растворљивости и липофилности. Међутим, у литератури постоји расправа према којој липофилност и растворљивост нису главна својства, већ величина молекула и водонично везивање као компоненте које се налазе у њиховој основи. Коефицијенти расподеле у систему *n*-октанол/вода ($\log P$) и дистрибуције ($\log D$) се најчешће примењују као мера липофилности и неколико различитих приступа је предложено да се $\log P$ квантитативно објасни са аспекта величине молекула и поларних параметара.

Сматра се да процеси који укључују пасивну дифузију (нпр. пенетрација кроз мембране, интестинална апсорпција) примарно зависе од капацитета водоничног везивања или области поларне површине молекула лека. Експериментална одређивања јачине водоничних веза се изводе из мерења расподеле у различитим органским растварачима, а у новије време се примењују и рачунарски приступи. Нека израчунавања су једноставна и доприноси водоничног везивања се грубо процењују на основу једноставних параметара као што су број донора и акцептора водоничне везе. На пример, познато правило петице Липинског указује на могуће проблеме у апсорпцији, ако су испуњена било која два од наведених услова:

- 1) молекулска маса >500 ;
- 2) број донора водоничне везе >5 ;
- 3) број акцептора водоничне везе >10 ;
- 4) израчуната вредност коефицијента расподеле у систему *n*-октанол/вода $\log P >5$.

Очигледно је да је ово правило квалитативно и да је за квантитативно предвиђање потребна боља процена јачине водоничних веза.

1.4.1.1. Корелација липофилности и ефеката солватације

Према Абрахамовом концепту, преношење лека из једне фазе у другу може да се објасни са аспекта разлике у солватацији лека у тим фазама. За расподелу супстанце између воде и *n*-октанола се добија [111] (једначина 1.20).

$$\log P = 0,088 + 0,562R_2 - 1,054\pi_2^H + 0,032\Sigma\alpha_2^H - 3,460\Sigma\beta_2^H + 3,814V_x \quad (1.20)$$

($n = 613$; $R = 0,997$; $sd = 0,116$; $F = 23161$)

Овакав модел даје информације о релативним својствима воде и *n*-октанола, односно, *n*-октанола засићеног водом и воде засићене *n*-октанолом. Поларност/поларизабилност растворене супстанце и њена базност фаворизују расподелу у води, а молекулска величина у *n*-октанолу. Може се закључити да је вода поларнија и јача НВ киселина од *n*-октанола, али је *n*-октанол липофилнији од воде. Вредност коефицијента *a*, која је блиска нули, указује да су НВ базност воде и *n*-октанола врло сличне. Велика позитивна вредност коефицијента *v* је делом последица веће енергије која је потребна да се формира шупљина одређене величине у води, а делом је резултат јачих дисперзионих сила између молекула растворене супстанце и *n*-октанола. Супстанце са π и *n*-електронским паровима су поларизабилније од одговарајућих угљоводоника, што има за последицу јаче дисперзионе силе са *n*-октанолом, као што и показује позитивна вредност коефицијента *r*.

1.4.1.2. Пенетрација кроз крвно–мождану баријеру

Да би успешно обављао најсуптилнију и најсавршенију улогу која му је додељена у организму, природа се побринула да мозак у извесној мери буде постављен изнад дешавања у организму и формиравши, између осталог, неку врсту баријере између крви и можданог ткива [112]. Структурно, крвно–мождана баријера (КМБ) је једнослојни низ специјализованих, нефенестрираних, микроваскуларних ендотелних ћелија, које су међусобно спојене чврстим везама и лишене трансцелуларних пора.

Да би били ефективни као терапеутски агенси, централно-делујући лекови треба да прођу кроз КМБ. Са друге стране, периферно-делујући лекови треба да имају ограничену способност проласка кроз КМБ, да би се избегли нежељени ефекти на ЦНС. Улазак у мозак је комплексан процес, који зависи од многих фактора. Познато је да релативно липофилни лекови пролазе кроз КМБ пасивном дифузијом, на шта утиче њихов капацитет водоничног везивања. Не само да је број водоничних веза значајан, већ и њихова усмереност у простору, због анизотропне природе биолошких мембрана [113]. Поларни молекули обично не пролазе кроз КМБ, али процес активног транспорта може да олакша њихову пенетрацију. Локална хидрофобност, профил јонизације, величина молекула, липофилност и флексибилност су нека од својстава која одређују могућност пролажења кроз КМБ. За неколико класа ЦНС-активних супстанци, утврђено је да је пенетрација кроз КМБ оптимална, када је вредност $\log P$ у опсегу од 1,5 до 2,7 [114]. Линеарна зависност од $\log P$ може да се очекује до тачке у којој су хидрофобни региони

рецептора попуњени, па активност опада, пошто су интеракцији између лиганда и рецептора стерно ометене.

Везивање за протеине плазме, активни ефлукс ЦНС-а и метаболизам такође утичу на пенетрацију кроз КМБ. Поуздани подаци се тешко проналазе, пошто су литературне вредности често контрадикторне. ЦНС-активни лекови пролазе кроз КМБ различитим механизмима. Код ЦНС-неактивних лекова, ситуација је компликованија, пошто неки једноставно не продиру, док се други брзо метаболишу или избацују процесом активног ефлука.

Расподела једињења у односу на КМБ – *BB* (енгл. blood-brain barrier) се експериментално одређује као однос концентрација у мозгу и у крви (једначина 1.21).

$$BB = [\text{лек}]_{\text{мозак}} / [\text{лек}]_{\text{крв}} \quad (1.21)$$

Многи аутори су покушали да предвиде транспорт различитих молекула кроз КМБ користећи липофилност ($\log P$), солватохромне параметре, тополошке индексе или њихове комбинације. Јанг (Young) је први публикувао анализу централно-делујућих хистаминских H_2 антагониста, у којој су детаљно проучена физичко-хемијска својства од значаја за њихову пенетрацију у мозак [115]. Добре корелације су добијене између логаритма односа равнотежних концентрација у мозгу и крви и параметра расподеле $\Delta \log P$. Зајлер (Seiler) је увео параметар $\Delta \log P$ као разлику између вредности $\log P$ у системима *n*-октанол/вода и хлороформ/вода, и који је у вези са укупним капацитетом водоничног везивања једињења [116]:

$$\Delta \log P = \log P_{\text{oct}} - \log P_{\text{cyh}} = \Sigma I_H - 0,16 \quad (1.22)$$

($n = 195$; $R = 0,97$; $sd = 0,33$; $F = 107$)

где је I_H капацитет водоничног везивања датог супституента. Што је I_H вредност већа, супституент има већу способност да гради водоничне везе, нпр. 2,60 за Ar-OH , 1,18 за Ar-NH_2 , 0,45 за $-\text{NO}_2$ и 0,11 за етарску везу $-\text{O}-$.

Ова рана студија је указала да продирање кроз КМБ може да се повећа смањивањем способности једињења да гради водоничне везе са окружењем нпр. фаворизовањем интрамолекулског водоничног везивања, заклањањем неполарним групама или дефинисањем мање поларних предлекова (једначина 1.23).

$$\log BB = 0,89 - 0,48 \Delta \log P \quad (1.23)$$

$$(n = 20; R = 0,69; sd = 0,49; F = 40,2)$$

На овај начин постављена је хипотеза према којој параметри $\log P_{\text{oct}}$ и $\log P_{\text{cyh}}$ описују два различита процеса која су укључена у расподелу једињења између крви и мозга. Прва променљива описује процес расподеле у неполарне области мозга, док друга одговара везивању за протеине у крви.

Анализа тзв. "Јанговог сета података", којима је придодато десет једињења из литературе [117] Абрахамовим приступом је показала да пенетрација 22 једињења може да се опише на следећи начин (једначина 1.24), при чему осам једињења одступа од постављеног модела.

$$\log BB = 0,088 + 0,246R_2 - 0,966\pi_2^H - 0,705\alpha_2^H - 0,756\beta_2^H + 1,189V_x \quad (1.24)$$

$$(n = 22; R = 0,89; sd = 0,27; F = 25,0)$$

Као узроци одступања од наведеног модела предложено је следеће:

- 1) конформационе промене или промене у интрамолекулском водоничном везивању између две фазе;
- 2) експерименталне потешкоће у одређивању вредности $\log BB$;
- 3) могућност да се једињење метаболише у некој од фаза.

Абрахам и сарадници су проширили "Јангов сет података" са додатних 35 једињења, што је резултовало "Абрахамовим сетом података" од 57 структура [118]. Увођење нових структура дало је нову димензију оригиналном "Јанговом сету података", пошто су допунска једињења била мали органски молекули или, у неким случајевима, чак и гасови. Овакав сет података обухвата лекове, али и једињења која не испољавају фармаколошку активност. Анализа "Абрахамовог сета података" је резултовала следећим моделом (једначина 1.25).

$$\log BB = -0,038 + 0,198R_2 - 0,687\pi_2^H - 0,715\alpha_2^H - 0,698\beta_2^H + 0,995V_x \quad (1.25)$$

$$(n = 57; R = 0,91; sd = 0,20; F = 99,2)$$

У новије време овај сет је проширен на 148 једињења и постављен је одговарајући модел (једначина 1.26).

$$\log BB = 0,044 + 0,511R_2 - 0,886\pi_2^H - 0,724\alpha_2^H - 0,666\beta_2^H + 0,861V_x \quad (1.26)$$

($n = 148$; $R = 0,843$; $sd = 0,37$; $F = 71,0$)

Задовољавајућа статистика је добијена за (1.26), али су уочена одступања за молекуле који садрже карбоксилне киселине, као што су нпр. салицилна киселина и индометацин. Побољшање модела је постигнуто увођењем одговарајуће индикаторске променљиве. Једначине (1.25) и (1.26) се значајно разликују од (1.20), која описује расподелу у систему *n*-октанол/вода и показују да величина молекула фаворизује пенетрацију кроз КМБ, док диполарност/поларизабилност, киселост, базност и присуство група делују супротно. Овај модел је у сагласности са моделима из литературе који се односе на мање сетове података.

Ломбардо (Lombardo) и сарадници су анализирали "Абрахамов сет података" нешто другачијим приступом [119]. На основу израчунавања промене слободне енергије солватације у води коришћењем AMSOL метода добијен је следећи модел (једначина 1.27).

$$\log BB = 0,43 + 0,054\Delta G_w^\ominus \quad (1.27)$$

($n = 55$; $R = 0,67$; $sd = 0,41$; $F = 108,3$)

Додатно су биле израчунате вредности промене слободне енергије солватације у хексадекану под претпоставком да овакав параметар боље одражава окружење молекула при проласку кроз мембрану. Међутим, укључивање додатног члана није довело до значајнијег побољшања корелације. Уопште, Ломбардов модел има мале могућности предвиђања, што је показао екстерни тест-сет од шест додатних једињења.

Када се сумирају корелације из литературе, долази се до закључка да је само неколико дескриптора значајно. Основа многих од њих је члан који описује водонично везивање. Модели који се базирају на експериментално одређеним параметрима ($\Delta \log P$, Абрахамови параметри) омогућавају боље разумевање механизма одигравања проучаваног процеса. Међутим, њихов недостатак је што не омогућавају виртуелно тестирање нових једињења, која још увек нису синтетисана без располагања физичким узорком испитиваног једињења. Методи који се базирају на промени слободне енергије солватације не указују како би нове структуре могле да се карактеришу. Вредност ΔG је сложена променљива која не даје експлицитан одговор на то која су структурна својства одговорна за расподелу између крви и мозга.

Брзу процену ове расподеле омогућавају два емпиријска правила: ако је $N+O$ (број атома азота и кисеоника) у молекулу мањи или једнак пет, једињење има велике шансе да прође кроз КМБ. Друго правило предвиђа да ако је вредност разлике $\log P - (N+O)$ позитивна, онда је и вредност $\log BB$ такође позитивна.

1.4.1.3. Корелација интестиналне апсорпције и ефеката солватације

Орална примена је најпогоднији и најекономичнији начин примене лекова. Већина лекова се апсорбује пасивном дифузијом и, осим дозе и времена проласка, главни фактори, који одређују степен апсорпције, су растворљивост и продирање кроз зид танког црева. У литератури постоје бројни покушаји да се апсорпција објасни и предвиди на основу различитих физичко-хемијских параметара. Лек треба да се раствори у гастроинтестиналном тракту да би био расположив за пролазак кроз зид танког црева. На дисолуцију утичу растворљивост у води, степен јонизације (pK_a) и липофилност ($\log P$). Иако постоје специјални механизми мембранског транспорта за мале поларне молекуле, већина органских једињења продире кроз ћелије ткива као да су границе липидне природе. Појединачна физичко-хемијска својства, као што је нпр. липофилност, грубо корелишу са пасивним транспортом лекова кроз ћелијске мембране, али само у случају хомологе серије једињења. Липофилност је кључни фактор који одређује расподелу кроз мембране; повећање вредности $\log P$ повећава пенетрацију, али смањује растворљивост.

Данас је познато да постоје 32 фамилије транспортера на ћелијској мембрани код људи, које обухватају фамилију митохондријалних транспортера (14 чланова), фамилију GABA транспортера (13 чланова), фамилију аминокиселинских пермеаза (8 чланова) и фамилију транспортера органских анјона/катјона (8 чланова) [120]. Интестинални олигопептидни транспортер (PepT-1) има главну улогу у синтези протеина и терапији лековима. Неки транспортерски протеини (као нпр. Pep T1) упумпавају раствор у ћелије, док други (као нпр. P-gr) делују у другом правцу. Проучавања везе између хемијске структуре лекова (електронска и стерна својства) и њиховог афинитета за мале интестиналне олигопептидне носаче су показале да је пропустљивост носача осетљива на промене састава, величине и хидрофобности лигананда [121].

In vivo студије на животињама се већ дуго примењују за предвиђање интестиналне апсорпције, али су ови модели скупи и експериментално захтевни, пружају мало информација и потребне су велике количине узорака. Такође се користе животињски и

људски *ex vivo* модели интестиналне апсорпције, али су и они експериментално врло захтевни и дају променљиве резултате за структурно различита једињења. Пенетрација лекова у ћелијским културама или интестиналним ткивима показала се као врло погодна за предвиђање апсорпције *in vivo*, чак и када се проучавају лекови различите структуре [122]. Највише се примењују ћелије CaCO-2, које се изолују из ћелијске линије рака колона. Мерење пенетрације се заснива на брзини појављивања испитиваног једињења у прихватном одељку. Апикална површина монослоја задржава многа својства интестиналне границе и описује функционалне транспортне протеине и метаболичке ензиме. Иако модели ћелијских култура и ткива боље предвиђају апсорпцију лекова у поређењу са појединачним физичко-хемијским параметрима, они се врло ограничено користе, пошто су такође експериментално захтевни, а потребно је да се једињење синтетише и његова апсорпција измери. Због тога се улажу велики напори да се развију теоретски методи за предвиђање интестиналне апсорпције са великом прецизношћу.

Палм и Кларк су развили теоријски метод, који се заснива на одређивању својстава динамичких површина - области поларних површина (PSA, енгл. polar surface area) [123]. Одлична сигмоидална зависност је успостављена између апсорбоване фракције после оралне примене код људи и PSA за 20 лекова ($R = 0,94$). Лекови који се потпуно апсорбују (>90 %) имају $PSA \leq 60 \text{ \AA}^2$, док лекови чија је апсорпција <10 % имају $PSA \geq 104 \text{ \AA}^2$. Међутим, овакво моделовање већег сета (74 лекова) није дало задовољавајуће резултате.

Подаци о апсорпцији 169 лекова анализирани су Абрахамовим приступом. Абрахам и Ле (Le) су претходно извели модификовану општу солватациону једначину за растворљивост у води, која садржи унакрсни члан $\Sigma\alpha_2^H \times \Sigma\beta_2^H$ (једначина 1.28) [124]. Способност једињења да гради водоничне везе увек повећава растворљивост, иако члан $\Sigma\alpha_2^H \times \Sigma\beta_2^H$ описује интеракције у чврстом и течном стању, које се супростављају растварању. Повећање диполарности/поларизабилности супстанци повећава растворљивост, док повећање вишка моларне рефракције и, нарочито, величине молекула делују на супротан начин.

$$\log S_w = 0,518 - 1,004R_2 + 0,771\pi_2^H + 2,168\alpha_2^H + 4,238\beta_2^H - 3,362 \Sigma\alpha_2^H \times \Sigma\beta_2^H - 11,2V_x \quad (1.28)$$

($n = 659$; $R = 0,92$; $sd = 0,557$; $F = 1256$)

У циљу моделовања интестиналне апсорпције одабран је сет од 169 лекова који се задовољавајуће апсорбују [125]. Да би се сваки ефекат строго проценио, у анализу

целокупног сета укључена је показна променљива (I) за јаке киселине, чије је $pK_a < 4,5$, и базе, чије је $pK_a > 8,5$. Узето је да I има вредност 1 за јаке киселине и јаке базе и 0 за остала једињења. Резултати корелације (једначина 1.29) показују да су статистички значајни параметри $\Sigma\alpha_2^H$, $\Sigma\beta_2^H$ и V_x што потврђује да су доноси и акцептори водоничне везе или поларна површина молекула добри параметри, којима интестинална апсорпција може да се моделује. Може се закључити да интестинална апсорпција може да се повећа повећањем запремине (хидрофобни део) и смањењем поларности једињења. Корелациони резултати се нису значајно побољшали увођењем растворљивости, коефицијента расподеле у систему n -октанол/вода и молекулске масе као додатних чланова.

$$\% Abs. = 94 + 2,90R_2 + 2,71\pi_2^H - 20,7\alpha_2^H - 20,9\beta_2^H + 11,2V_x - 3,14I \quad (1.29)$$

($n = 169$; $R = 0,74$; $sd = 0,14$; $F = 78$)

Чиу (Chiou) и Барв (Barve) су показали да процена *in vivo* апсорпције код пацова може да се користи као алтернативни метод за предвиђање степена апсорпције лекова код људи после оралне примене у раствору или брзо отпуштајућем облику дозирања [126]. Линеарна корелација апсорпције код људи и пацова добијена је за 64 једињења, која се значајно разликују по структури и пермеабилности (апсорпција од 0 до 1).

Абрахам је поредио моделе апсорпције код људи и пацова, да би потврдио могућност примене животињских модела за предвиђање апсорпције код људи [127]. Вредности апсорпције израчунате према моделу код пацова су биле блиске вредностима израчунатим према моделу апсорпције код људи. Ипак, модел апсорпције код пацова предвиђа вредности које су за 8 % више за 25 лекова, који се слабо апсорбују код људи. Ова разлика може да буде последица различитих облика дозирања. Скоро сви лекови су код људи примењени као таблете или капсуле уз 100 до 300 ml воде. Са друге стране, иста једињења су животињама дозирана у раствору или суспензији и, у већини случајева, уз одговарајућу количину органског растварача, нпр. етанола или метилцелулозе. Апсорпција лекова у раствору је обично једнака или већа (понекад и значајно већа) него у чврстом облику.

2. Експриментални део

У циљу проучавања односа структуре и фармаколошких својстава деривата хидантоина, у овом раду су синтетисане две серије једињења:

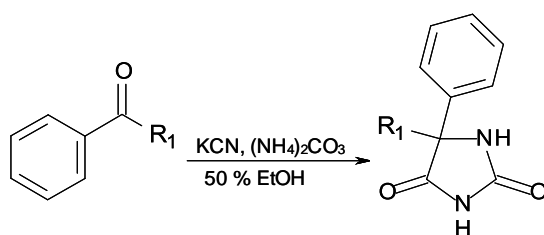
а) 5-супституисани-5-фенилхидантоини обухватају 11 деривата, код којих су различите алкил-, циклоалкил- и арил-групе (метил, етил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *tert*-бутил, циклопентил, циклохексил, фенил и бензил) уведене у положај 5 хидантоинског прстена;

б) 3,5-дисупституисани-5-фенилхидантоини обухватају 25 деривата, код којих су различите алкил-, циклоалкил-, алкенил- и арил-групе (метил, етил, *n*-пропил, изопропил, алил, *n*-бутил, изобутил, *tert*-бутил, циклопентил, циклохексил, фенил и бензил) уведене у положаје 3 и 5 хидантоинског прстена.

Сва једињења су синтетисана према поступцима из литературе или њиховим модификацијама и окарактерисани одређивањем температуре топљења и UV, FTIR, ¹H и ¹³C NMR спектроскопијом, а њихова чистоћа је утврђена помоћу HPLC-а. Апсорпциони максимуми проучаваних једињења одређени су у 15 ратварача различите поларности, а анализа ефеката солватације на њихово померање разматрана је за сваку серију посебно у поглављима 3.1. и 3.2. Антиконвулзивна активност четири деривата 5-фенилхидантоина, чије су липофилности сличне липофилности фенитоина, одређена је на пацовима у *s. c.* PTZ и *i.v.* PTZ тестовима, док је њихов потенцијал изазивања седације проучаван у тесту спонтане локомоторне активности (поглавље 3.3). Извршена је рендгенска структурна анализа три једињења да би се проучавала аналогија између међумолекулских интеракција у кристалном стању и интеракција са биолошким рецепторима. У наставку истраживања, одређена је и антипролиферативна активност према ћелијској линији хуманог карцинома колона НСТ-116 за серију коју чини дванаест 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина (поглавље 3.4). Додатно је одређен и антибактеријски учинак проучаваних једињења према *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и клиничким изолатима *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus* (поглавље 3.4).

2.1. Општи поступак синтезе 5-супституисаних-5-фенилхидантоина

Фенитоин (5,5-дифенилхидантоин) је комерцијално набављен (Fluka), док су остали 5-супституисани-5-фенилхидантоини синтетисани према Бучереровом поступку [40] (шема 2.1). У 60 ml 50 % етанола раствори се 0,020 mol одговарајућег алкил-фенил-кетона, 1,95 g (0,030 mol) калијум-цијанида и 5,76 g (0,060 mol) амонијм-карбоната. Реакциона смеша се загрева уз рефлукс током 6 h, потом се охлади до собне температуре, концентрише и закисели хлороводоничном киселином до вредности рН 4. Добијени талог се издваја цеђењем на вакууму, а једињење се пречишћава рекристализацијом из 95 % етанола.



Шема 2.1. Добијање 5-супституисаних-5-фенилхидантоина према Бучереровом поступку (R₁ = CH₃, C₂H₅, *n*-C₃H₇, *i*-C₃H₇, *n*-C₄H₉, *i*-C₄H₉, *t*-C₄H₉, *c*-C₅H₉, *c*-C₆H₁₁, C₆H₅, C₆H₅CH₂)

5-Метил-5-фенилхидантоин (C₁₀H₁₀N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 75 %; т. т.: 194–196 °C (196–198 °C [128]); IR (KBr): ν = 3283 (NH), 3206 (NH), 1770 (C=O), 1717 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,77 (s, 1H, N(3)H), 8,64 (s, 1H, N(1)H), 7,51–7,28 (m, 5H, Ph-H), 1,66 (s, 3H, Me) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 177,4 (C4), 156,6 (C2), 140,2, 128,8, 128,1, 125,6, 64,2 (C5), 25,2 ppm.

5-Етил-5-фенилхидантоин (C₁₁H₁₂N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 72%; т. т.: 196–199 °C (194–196 °C [128]); IR (KBr): ν = 3286 (NH), 3214 (NH), 1771 (C=O), 1714 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,74 (s, 1H, N(3)H), 8,66 (s, 1H, N(1)H), 7,53–7,27 (m, 5H, Ph-H), 2,16–1,80 (m, 2H, CH₂), 0,81 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176,6 (C4), 157,0 (C2), 139,4, 128,7, 128,0, 125,7, 68,3 (C5), 31,4, 8,3 ppm.

5-n-Пропил-5-фенилхидантоин (C₁₂H₁₄N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 70 %; т. т.: 163–165 °C (165–166 °C [129]); IR (KBr): ν = 3284 (NH), 3215 (NH), 1772 (C=O), 1713 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,84 (s, 1H, N(3)H), 8,63 (s, 1H, N(1)H), 7,60–7,20 (m, 5H, Ph-H), 2,13–1,73 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1,50–1,10 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0,87 (t, J = 7.6 Hz, 3H,

CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175,4 (C4), 155,8 (C2), 139,7, 128,8, 128,3, 125,6, 63,1 (C5), 41,4, 25,2 ppm.

5-Изопропил-5-фенилхидантоин (C₁₂H₁₄N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 80 %; т. т.: 209–211 °C (210–212 °C [130]); IR (KBr): ν = 3286 (NH), 3216 (NH), 1749 (C=O), 1716 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,77 (s, 1H, N(3)H), 8,75 (s, 1H, N(1)H), 7,55–7,28 (m, 5H, Ph-H), 2,53–2,40 (m, 1H, CH), 0,89 (d, *J* = 6 Hz, 3H, CH₃), 0,62 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176,7 (C4), 157,3 (C2), 138,9, 128,7, 128,0, 125,8, 71,6 (C5), 35,4, 16,9, 16,5 ppm.

*5-*n*-Бутил-5-фенилхидантоин* (C₁₃H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 68 %; т. т.: 203–204 °C (204–205 °C [129]); IR (KBr): ν = 3351 (NH), 3194 (NH), 1760 (C=O), 1705 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,76 (s, 1H, N(3)H), 8,76 (s, 1H, N(1)H), 7,57–7,26 (m, 5H, Ph-H), 2,82–2,66 (m, 2H, CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,55–1,14 (m, 7H, (CH₂)₂CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176,5 (C4), 157,4 (C2), 139,4, 128,7, 128,05, 125,8, 69,8 (C5), 46,6, 26,5, 25,6, 25,2 ppm.

5-Изобутил-5-фенилхидантоин (C₁₃H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 70 %; т. т.: 176–178 °C (177–178 °C [129]); IR (KBr): ν = 3298 (NH), 3214 (NH), 1769 (C=O), 1722 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,76 (s, 1H, N(3)H), 8,57 (s, 1H, N(1)H), 7,54–7,25 (m, 5H, Ph-H), 2,03–1,56 (m, 3H, CH₂CH), 0,86 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃), 0,79 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 178,0 (C4), 158,3 (C2), 140,8, 128,6, 127,8, 125,5, 67,6 (C5), 47,2, 24,5, 24,2, 23,5 ppm.

5-tert-Бутил-5-фенилхидантоин (C₁₃H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 48 %; т. т.: 271–273 °C (271–273 °C [131]); IR (KBr): ν = 3288 (NH), 3196 (NH), 1772 (C=O), 1724 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,64 (s, 1H, N(3)H), 8,97 (s, 1H, N(1)H), 7,68–7,26 (m, 5H, Ph-H), 0,91 (s, 9H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176,0 (C4), 157,0 (C2), 136,5, 127,9, 127,6, 127,6, 72,3 (C5), 38,1, 25,0 ppm.

5-Циклопентил-5-фенилхидантоин (C₁₄H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос 52 %; т. т.: 223–225 °C; IR (KBr): ν = 3269 (NH), 3194 (NH), 1773 (C=O), 1730 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,67 (s, 1H, N(3)H), 8,64 (s, 1H, N(1)H), 7,53–7,27 (m, 5H, Ph-H), 2,09–1,79 (m, 2H, cPe-H), 1,33–1,16 (m, 4H, cPe-H), 0,87–0,80 (m, 3H, cPe-H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176,7 (C4), 156,9 (C2), 139,6, 128,7, 128,0, 125,6, 67,7 (C5), 42,0, 25,7, 22,2 ppm.

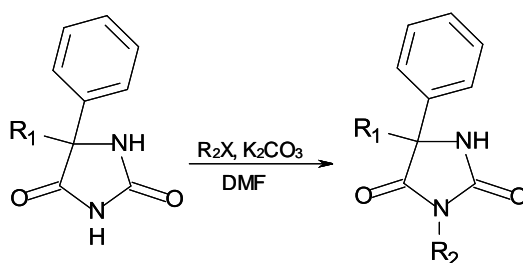
5-Циклохексил-5-фенилхидантоин (C₁₅H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 45 %; т. т.: 269–270 °C (270 °C [132]); IR (KBr): ν = 3266 (NH), 3190 (NH), 1774 (C=O), 1721 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,73 (s, 1H, N(3)H), 8,71 (s, 1H, N(1)H), 7,53–7,26 (m, 5H, Ph-H), 2,10–2,05 (m, 1H, cHx-H), 1,75–1,49 (m, 4H, cHx-H), 1,28–0,89 (m, 6H, cHx-H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176,5 (C4), 157,2 (C2), 138,5, 128,6, 127,9, 125,8, 71,4 (C5), 45,0, 26,8, 26,0, 25,9, 25,6 ppm.

5,5-Дифенилхидантоин (C₁₅H₁₂N₂O₂). Бела кристална супстанца; т. т.: 293–295 °C; IR (KBr): ν = 3274 (NH), 3209 (NH), 1774 (C=O), 1718 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11,14 (s, 1H, N(3)H), 9,34 (s, 1H, N(1)H), 7,44–7,24 (m, 10H, Ph-H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175,2 (C4), 156,3 (C2), 140,2, 128,89, 128,39, 126,9, 70,47 (C5) ppm.

5-Бензил-5-фенилхидантоин (C₁₆H₁₄N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 84 %; т. т.: 214–216 °C (214–215 °C [133]); IR (KBr): ν = 3266 (NH), 3198 (NH), 1772 (C=O), 1726 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10,47 (s, 1H, N(3)H), 8,69 (s, 1H, N(1)H), 7,67–7,21 (m, 10H, Ph-H), 3,49, 2,98 (ABq, J = 13.5 Hz, 2H, CH₂) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO): δ = 175,7 (C4), 156,27 (C2), 139,77, 135,17, 130,7, 128,8, 128,24, 127,3, 125,8, 68,6 (C5), 44,0 ppm.

2.2. Општи поступак алкиловања 5-супституисаних-5-фенилхидантоина

У 60 ml ДМФ-а раствори се 0,010 mol одговарајућег 5-супституисаног-5-фенилхидантоина и потом дода 12,0 g (0,12 mol) калијум-карбоната и 0,011 mol алкил-халогенида (метил-јодид, етил-бромид, *n*-пропил-бромид, изопропил-бромид, алил-бромид, *n*-бутил-хлорид, изобутил-бромид и бензил-бромид) (шема 2.2). Реакциона смеша се меша током 24 h на собној температури. Потом се излије у троструко већу запремину воде и врши се екстракција етил-ацетатом. Органски слој се испира 5 % раствором натријум-хидроксида и водом и суши преко ноћи магнезијум-сулфатом. Растварач се уклони дестилацијом, а издвојени чврсти производ се пречишћава рекристализациом из 95 % етанола.



Шема 2.2. Поступак алкиловања 5-супституисаних-5-фенилхидантоина
(R₁ = C₆H₅, C₂H₅, CH₃; R₂ = CH₃, C₂H₅, *n*-C₃H₇, *i*-C₃H₇, CH₂CH=CH₂, *n*-C₄H₉, *i*-C₄H₉, C₆H₅CH₂)

3-Метил-5,5-дифенилхидантоин (C₁₆H₁₄N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 68 %; т. т.: 211–213 °C (213–214 °C [134]); IR (KBr): ν = 3286 (NH), 1773 (C=O), 1701 (C=O) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,65 (s, 1H, NH), 7,38–7,26 (m, 10H, Ph-H), 2,94 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,6 (C4), 155,8 (C2), 139,9, 128,8, 128,4, 128,3, 127,4, 126,9, 69,5 (C5), 4,7 ppm.

3-Етил-5,5-дифенилхидантоин (C₁₇H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 42 %; т. т.: 152–154 °C (156 °C [134]); IR (KBr): ν = 3281 (NH), 1774 (C=O), 1696 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,65 (s, 1H, NH), 7,44–7,26 (10H, m, Ph-H), 3,48 (q, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂), 1,10 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,3 (C4), 155,5 (C2), 140,0, 128,8, 128,9, 128,4, 128,1, 126,9, 69,2 (C5), 33,3, 13,5 ppm.

3-n-Пропил-5,5-дифенилхидантоин (C₁₈H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 71 %; т. т.: 143–145 °C (144–147 °C [135]); IR (KBr): ν = 3170 (NH), 1772 (C=O), 1708 (C=O) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,65 (s, 1H, NH), 7,50–7,26 (m, 10H, Ph-H), 3,45–3,38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1,64–1,45 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0,78 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,3 (C4), 155,4 (C2), 140,1, 128,8, 126,3, 126,8, 68,4 (C5), 43,1, 19,6 ppm.

3-Изопропил-5,5-дифенилхидантоин (C₁₈H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 54 %; т. т.: 180–185 °C; IR (KBr): ν = 3209 (NH), 1772 (C=O), 1708 (C=O) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,59 (s, 1H, NH), 7,77–7,30 (m, 10H, Ph-H), 4,31–4,18 (m, 1H, CH), 1,33 (d, J = 6.8 Hz, 6H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,3 (C4), 155,4 (C2), 140,1, 128,8, 126,3, 126,8, 68,4 (C5), 43,1, 19,6 ppm.

3-Алил-5,5-дифенилхидантоин (C₁₈H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 68 %; т. т.: 114–117 °C; IR (KBr): ν = 3274 (NH), 1770 (C=O), 1704 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,73 (s, 1H, N-H), 7,39–7,22 (m, 10H, Ph-H), 5,91–5,72 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 5,08 (d, J = 10 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂), 4,98 (d, J = 17 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂), 4,06 (d, J = 5 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,1 (C4), 155,2 (C2), 139,9, 132,3, 128,8, 128,4, 126,9, 116,5, 69,4 (C5), 40,2 ppm.

3-n-Бутил-5,5-дифенилхидантоин (C₁₉H₂₀N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 62 %; т. т.: 134–136 °C (135–137 °C [136]); IR (KBr): ν = 3171 (NH), 1770 (C=O), 1705 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,64 (s, 1H, NH), 7,44–7,25 (m, 10H, Ph-H), 3,45 (t, J = 6,7 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,58–1,44 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,30–1,11 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 0,84 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,6 (C4), 155,8 (C2), 140,0, 128,4, 126,8, 69,2 (C5), 45,4, 27,1, 19,9 ppm.

3-Изобутил-5,5-дифенилхидантоин (C₁₉H₂₀N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 67 %; т. т.: 119–122 °C; IR (KBr): ν = 3293 (NH), 1705, 1775 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,66 (s, 1H, NH), 7,44–7,26 (m, 10H, Ph-H), 3,29–3,25 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 2,03–1,89 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0,78 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,6 (C4), 155,8 (C2), 140,0, 128,8, 128,3, 126,8, 69,2 (C5), 45,4, 27,1, 19,9 ppm.

3-Бензил-5,5-дифенилхидантоин (C₂₂H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 49 %; т. т.: 144–146 °C (145–146 °C [135]); IR (KBr): $\nu = 3275, 1760, 1715 \text{ cm}^{-1}$; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 9,82 \text{ (s, 1H, NH)}, 7,44\text{--}7,22 \text{ (m, 15H, Ph-H)}, 4,65 \text{ (s, 2H, CH}_2\text{-N)}$ ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173,3 \text{ (C}_4\text{)}, 155,5 \text{ (C}_2\text{)}, 139,8, 136,8, 128,88, 128,8, 128,5, 128,3, 127,8, 127,5, 126,8, 69,5 \text{ (C}_5\text{)}, 41,7$ ppm.

3-Метил-5-етил-5-фенилхидантоин (C₁₂H₁₄N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 74 %; т. т.: 134–136 °C (136–137 °C [137]); IR (KBr): $\nu = 3283 \text{ (NH)}, 1772 \text{ (C=O)}, 1698 \text{ (C=O)}$ cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 8,98 (s, 1H, N-H), 7,55–7,28 (m, 5H, Ph-H), 3,38 (s, 3H, CH₃), 2,18–1,89 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,74 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 174,0 (C₄), 156,4 (C₂), 140,0, 129,2, 128,7, 126,4, 70,5 (C₅), 40,5, 31,5, 7,7 ppm

3,5-Диетил-5-фенилхидантоин (C₁₃H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 56 %; т. т.: 86–88 °C (88–89 °C [137]); IR (KBr) $\nu = 3291 \text{ (NH)}, 1773 \text{ (C=O)}, 1699 \text{ (C=O)}$ cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,95 \text{ (s, 1H, NH)}, 7,55\text{--}7,29 \text{ (m, 5H, Ph-H)}, 3,45\text{--}3,42 \text{ (m, 2H, NCH}_2\text{CH}_3\text{)}, 2,21\text{--}1,84 \text{ (m, 2H, CCH}_2\text{CH}_3\text{)}, 1,05 \text{ (t, } J = 7,3 \text{ Hz, 3H, NCH}_2\text{CH}_3\text{)}, 0,80 \text{ (t, } J = 7,3 \text{ Hz, 3H, CCH}_2\text{CH}_3\text{)}$ ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 174,7 \text{ (C}_4\text{)}, 156,2 \text{ (C}_2\text{)}, 139,1, 128,8, 128,1, 125,7, 66,9 \text{ (C}_5\text{)}, 33,0, 31,5, 13,4, 8,1$ ppm.

*3-*n*-Пропил-5-етил-5-фенилхидантоин* (C₁₄H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 66 % ; т. т.: 83–85 °C (84–86 °C [137]). IR (KBr) $\nu = 3222 \text{ (NH)}, 1763 \text{ (C=O)}, 1703 \text{ (C=O)}$ cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,96 \text{ (s, 1H, N-H)}, 7,54\text{--}7,28 \text{ (m, 5H, Ph-H)}, 3,33 \text{ (t, } J = 7.0 \text{ Hz, 2H, CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{)}, 2,21\text{--}1,85 \text{ (m, 2H, CH}_2\text{CH}_3\text{)}, 1,59\text{--}1,41 \text{ (m, 2H, CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{)}, 0,80 \text{ (t, } J = 7.4 \text{ Hz, 3H, CH}_3\text{)}, 0,77 \text{ (t, } J = 7.2 \text{ Hz, 3H, CH}_3\text{)}$ сигнали на 0,80 и 0,77 се делимично преклапају, ppm. ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 174,3 \text{ (C}_4\text{)}, 156,4 \text{ (C}_2\text{)}, 139,2, 128,8, 128,1, 125,7, 66,9 \text{ (C}_5\text{)}, 39,6, 31,4, 21,1, 11,1, 8,2$,ppm.

*3-*n*-Изопропил-5-етил-5-фенилхидантоин* (C₁₄H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 48 %; т.т.: 96–98 °C ; IR (KBr) $\nu = 3241 \text{ (NH)}, 1766 \text{ (C=O)}, 1708 \text{ (C=O)}$ cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,89 \text{ (s, 1H, NH)}, 7,53\text{--}7,28 \text{ (m, 5H, Ph-H)}, 4,24\text{--}4,10 \text{ (m, 1H, NCH(CH}_3\text{)}_2\text{)}, 2,21\text{--}1,81 \text{ (m, 2H, CCH}_2\text{CH}_3\text{)}, 1,29 \text{ (t, } J = 6,4 \text{ Hz, 6H, NCH(CH}_3\text{)}_2\text{)}, 0,80 \text{ (t, } J = 7,3 \text{ Hz, 3H, CCH}_2\text{CH}_3\text{)}$ ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 174,7 \text{ (C}_5\text{)}, 56,2 \text{ (C}_2\text{)}, 139,3, 128,7, 128,1, 125,7, 66,1 \text{ (C}_5\text{)}, 42,8, 31,5, 19,6, 19,5, 8,0$ ppm.

3-Алил-5-етил-5-фенилхидантоин (C₁₄H₆₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 73 %; т.т: 87–89 °C (88–90 °C [137]); IR (KBr) ν = 3282 (NH), 1775 (C=O), 1707 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,04 (s, 1H, NH), 7,56–7,29 (m, 5H, Ph-H), 5,86–5,67 (m, 1H, NCH₂CH=CH₂), 5,09–4,94 (m, 2H, NCH₂CH=CH₂), 3,97 (d, J = 5,0 Hz, 2H, d, NCH₂CH=CH₂), 2,22–1,87 (m, 2H, CCH₂CH₃), 0,81 (t, J = 7,3 Hz, 3H, CCH₂CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174,5 (C4), 155,9 (C2), 132,4, 128,8, 128,2, 125,7, 116,5, 67,1 (C5), 49,9, 31,4, 8,2 ppm.

3-п-Бутил-5-етил-5-фенилхидантоин (C₁₅H₂₀N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 57 %; т.т: 70–72 °C (72–73 °C [137]); IR (KBr): ν = 3259 (NH), 1779 (C=O), 1704 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,95 (s, 1H, NH), 7,54–7,28 (m, 5H, Ph-H), 3,36 (t, J = 6,2 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 2,21–1,84 (m, 2H, CCH₂CH₃), 1,53–1,39 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,29–1,11 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₃), 0,84 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 0,80 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CCH₂CH₃) – сигнали на 0,84 и 0,80 се делимично преклапају, ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174,9 (C4), 156,4 (C2), 139,1, 128,2, 128,1, 125,7, 66,9 (C5), 37,6, 31,4, 29,8, 19,4, 13,6, 8,1 ppm.

3-Изобутил-5-етил-5-фенилхидантоин (C₁₅H₂₀N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 43 %; т.т: 110–112 °C; IR (KBr): ν = 3283 (NH), 1772 (C=O), 1698 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,97 (s, 1H, NH), 7,55–7,28 (m, 5H, Ph-H), 3,20–3,16 (d, J = 6,8 Hz, 2H, CH₂CH₂(CH₃)₂), 2,17–1,84 (m, 2H, CCH₂CH₃), 0,85–0,75 (m, 9H, CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175,06 (C5), 156,5 (C2), 139,2, 128,7, 128,1, 125,6, 66,9 (C5), 45,2, 31,3, 27,1, 19,9, 8,2 ppm.

3-Бензил-5-етил-5-фенилхидантоин (C₁₈H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 62 %; т.т: 138–140 °C (139–140 °C [137]); IR (KBr): ν = 3211 (NH), 1768 (C=O), 1706 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,10 (s, 1H, NH), 7,55–7,20 (m, 10H, Ph-H), 4,56 (s, 2H, CH₂Ph), 0,75 (t, J = 7,3 Hz, 3H, CCH₂CH₃) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174,8 (C4), 156,2 (C2), 138,9, 136,9, 128,8, 128,2, 127,7, 127,6, 125,7, 67,2 (C5), 41,4, 31,6, 8,1 ppm

3,5-Диметил-5-фенилхидантоин (C₁₁H₁₂N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 40 %; т.т: 189–191 °C (188–190 °C [138]); IR (KBr): ν = 3262 (NH), 1783 (C=O), 1710 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,90 (s, 1H, NH), 7,49–7,28 (m, 5H, Ph-H), 2,84 (s, 3H, NCH₃), 1,67 (s, 3H, CCH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173,2 (C4), 153,6 (C2), 137,5, 126,2, 125,7, 123,2, 60,7 (C5), 22,7, 22,1 ppm.

3-Этил-5-метил-5-фенилхидантоин (C₁₂H₁₄N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 62 %; т.т: 108–110 °C (109 °C [139]); IR (KBr): $\nu = 3259$ (NH), 1783 (C=O), 1704 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,89$ (s, 1H, NH), 7,48–7,29 (m, 5H, Ph-H), 3,38 (q, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1,66 (s, 3H, CCH₃), 1,05 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₂CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 172,9$ (C4), 153,3 (C2), 137,4, 126,3, 125,7, 123,2, 60,4 (C5), 30,6, 22,3, 11,0 ppm.

3-п-Пропил-5-метил-5-фенилхидантоин (C₁₃H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 53 %; т.т: 98–100 °C (100 °C [139]); IR (KBr): $\nu = 3261$ (NH), 1782 (C=O), 1705 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,89$ (s, 1H, NH), 7,48–7,27 (m, 5H, Ph-H), 3,36 (t, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1,67 (s, 3H, CCH₃), 1,56–1,44 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0,76 (t, J = 7,3 Hz, CH₂CH₂CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173,2$ (C4), 153,5 (C2), 137,5, 126,3, 125,7, 123,1, 60,4 (C5), 37,1, 22,7, 18,6, 8, 7 ppm.

3-Изопропил-5-метил-5-фенилхидантоин (C₁₃H₁₆N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 35 %; т.т: 107–109 °C; IR (KBr): $\nu = 3224$ (NH), 1769 (C=O), 1699 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,83$ (s, 1H, NH), 7,47–7,29 (m, 5H, Ph-H), 4,19–4,09 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,64 (s, 3H, CCH₃), 1,31–1,26 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173,0$ (C4), 153,3 (C2), 137,5, 126,3, 125,7, 123,1, 59,7 (C5), 40,3, 22,6, 17,2 ppm.

3-п-Бутил-5-метил-5-фенилхидантоин (C₁₄H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 66 %; т.т: 88–90 °C (91 °C [139]); IR (KBr): $\nu = 3258$ (NH), 1782 (C=O), 1705 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,89$ (s, 1H, NH), 7,48–7,30 (m, 5H, Ph-H), 3,38–3,32 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,67 (s, 3H, CCH₃), 1,48–1,41 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,25–1,33 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₃); 0,84 (t, J = 7,0 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₃) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173,1$ (C4), 153,5 (C2), 137,4, 126,3, 125,7, 123,1, 60,4 (C5), 35,2, 27,3, 22,7, 17,0, 11,2 ppm.

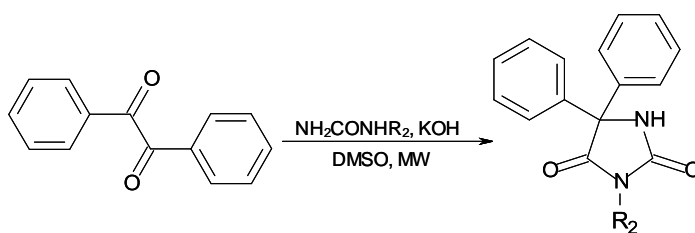
3-Изобутил-5-метил-5-фенилхидантоин (C₁₄H₁₈N₂O₂). Бела кристална супстанца; принос: 44 %; т.т: 70–72 °C; IR (KBr): $\nu = 3293$ (NH), 1777 (C=O), 1703 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,90$ (s, 1H, NH), 7,48–7,30 (m, 5H, Ph-H), 3,18–3,16 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1,97–1,84 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1,67 (s, 3H, CCH₃), 0,80–0,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H, CH₂CH₂(CH₃)₂) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 173,3$ (C4), 153,6 (C2), 137,5, 126,3, 125,7, 123,1, 60,4 (C5), 42,7, 24,7, 22,7, 17,5 ppm.

3-Алил-5-изопропил-5-фенилхидантоин ($C_{15}H_{18}N_2O_2$). Бела кристална супстанца; принос: 72 %; т.т.: 112–114 °C. IR (KBr): $\nu = 3308$ (NH), 1771 (C=O), 1711 (C=O) cm^{-1} . 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9,08$ (s, 1H, N-H), 7,55–7,29 (m, 5H, Ph-H), 5,78–5,66 (m, 1H, $CH_2CH=CH_2$), 5,04 (dd, $J = 1,5$ Hz, $J = 10,35$ Hz, 1H, $CH_2CH=CH_2$), 4,96 (dd, $J = 1,5$ Hz, $J = 17,10$ Hz, 1H, $CH_2CH=CH_2$), 3,93 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H, $CH_2CH=CH_2$), 2,59–2,45 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 0,84 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, $CH(CH_3)_2$), 0,64 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, $CH(CH_3)_2$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 172,1$ (C4), 153,8 (C2), 136,1, 129,8, 126,2, 125,6, 123,2, 114,3, 68,1 (C5), 37,5, 33,0, 14,4, 14,0 ppm.

2.3. Општи поступак микроталасне синтезе 3-алкил- и 3-циклоалкил-5,5-дифенилхидантоина

Пошто се реакција фенитоина са секундарним и терцијарним алкил-халогенидима не одиграва или се добијају мали приноси, одговарајући 3-алкил- и 3-циклоалкил-5,5-дифенилхидантоини су синтетисани према модификованом Билцовом поступку (шема 2.3) [44].

У смешу 10,1 g (48,1 mmol) бензила и 83,5 mmol одговарајуће урее, који су растворени у 20 ml ДМСО-а, дода се 12,5 ml воденог раствора калијум-хидроксида (1,2 M). Након иницијалног пулса од 750 W у трајању од 90 s, реакциона смеша се меша током 5 min. Пулсеви у трајању од 30 s се примењују на свака 3 min, тако да укупно време реакције износи 30 min, при чему се реакциона смеша меша између пулсева. По завршетку реакције, реакциона смеша се излије у 150 ml хладне воде. Настали талог се издваја цеђењем, а филтрат се закисели глацијалном сирћетном киселином. Издвојени талог се прикупља, суши и рекристалише из етанола.



Шема 2.3. Микроталасни поступак синтезе 3-алкил- и 3-циклоалкил-5,5-дифенилхидантоина ($R_2 = t-C_4H_9$, *сус*- C_3H_5 , *сус*- C_5H_9 , *сус*- C_6H_{11})

3-*terc*-Бутил-5,5-дифенилхидантоин ($C_{19}H_{20}N_2O_2$). Бела кристална супстанца; принос: 58 %; т. т.: 191–193 °C (193–193,5 °C [140]); IR (KBr): $\nu = 3220$ (NH), 1767 (C=O), 1712 (C=O) cm^{-1} ;

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9,46$ (s, 1H, NH), 7.44–7.17 (m, 10H, Ph-H), 1.54 (s, 9H, CH_3) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 174,3$ (C4), 156,4 (C2), 140,5, 128,8, 128,3, 126,9, 68,0 (C5), 57,2, 28,5 ppm.

3-Циклопентил-5,5-дифенилхидантоин ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$). Бела кристална супстанца; принос: 56 %; т. т.: 132–134 °C; IR (KBr): $\nu = 3206$ (NH), 1766 (C=O), 1707 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9,64$ (s, 1H, NH), 7.49–7.23 (m, 10H, Ph-H), 4.42–4.30 (m, 1H, CH-N), 1.85–1.80 (m, 6H, cPe-H), 1.53–1.50 (m, 2H, m, cPe-H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 173,3$ (C4), 155,5 (C2), 140,1, 128,8, 128,4, 126,8, 68,5 (C5), 51,0, 29,0, 25,0 ppm.

3-Циклохексил-5,5-дифенилхидантоин ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$). Бела кристална супстанца; принос: 53 %; т. т.: 179–181 °C (179–180 °C [46]); IR (KBr): $\nu = 3232$ (NH), 1772 (C=O), 1712 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 9,59$ (s, 1H, NH), 7.50–7.22 (m, 10H, Ph-H), 3.89–3.77 (m, 1H, CH-N), 2.14–1.96 (m, 2H, cHx-H), 1.78–1.55 (m, 5H, cHx-H), 1.78–1.03 (m, 2H, cHx-H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 173,4$ (C4), 155,5 (C2), 140,1, 128,8, 128,4, 126,9, 68,4 (C5), 50,8, 29,1, 25,5, 25,0 ppm.

2.4. Спектроскопска мерења

NMR спектри синтетисаних једињења су снимљени на апарату Bruker AC 250 уз тетраметилсилан (TMS) као интерни стандард. Хемијска померања (δ) су изражена у ppm у односу на TMS ($\delta_{\text{H}} = 0$ ppm) у ^1H NMR спектрима, односно резидуални сигнал растварача ($\delta_{\text{C}} = 39,5$ ppm) у ^{13}C NMR спектрима. FTIR спектри су снимљени на спектрофотометру Bomem MB 100. Апсорпциони спектри су снимљени на спектрофотометру Shimadzu 1700 у растварачима спектроскопске чистоће (Fluka) при фиксној концентрацији од 10^{-5} mol dm^{-3} . Коришћено је 16 растварача и то 9 протон-донорских (метанол, етанол, 1-пропанол, 2-пропанол, 1-бутанол, 2-метилпропанол, 2-метил-2-пропанол, етилен-гликол, хлороформ) и 8 протон-акцепторских (диизопропил-етар, диоксан, тетраhydroфуран, диметил-сулфоксид, метил-ацетат, етил-ацетат, *N,N*-диметилформаид, *N,N*-диметилацетаид).

2.5. Одређивање кристалне структуре

Кристалнографски подаци су прикупљени на дифрактометру Oxford Gemini S опремљеном са CCD детектором на 293 К. За снимање монокристала коришћено је зрачење $MoK\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) и мулти-скен корекција за апсорпцију. Структуре су решене директним методима (SIR92 [141]) и утачњаване методом најмањих квадрата (SHELXL97 [142] и WinGX [143]). Параметри померања свих атома, осим атома водоника, утачњени су анизотропно. Атоми водоника су смештани у геометријски израчунате положаје и утачњавани коришћењем модела "јашућег атома" примењеном на F^2 са утврђеним дужинама C–H и N–H веза.

2.6. Методи израчунавања

Геометрија 5-метил-5-фенилхидантоина је оптимизирана семиемпиријским PM6 методом. Као графички интерфејс коришћен је VegaZZ 2.2.0 [144]. Програмски пакет Gaussian03 [145] је коришћен уз основни сет: B3LYP/6-31G(d TD=NS,p) FCheck tates=15 cube=orbitals Pop=Full, а програмски пакет Морас 2009 [146] уз кључне речи: PM6 PRECISE C.I.=6 MECI vectors large 1SCF EPS=4.8 ММОК за оптимизацију геометрије, као и PM6 PRECISE C.I.=6 MECI vectors large 1SCF EPS=4.8 ММОК graph за израчунавање побуђених стања.

Корелациона анализа је извршена помоћу Microsoft Office Excel 2003. Валидност корелационих једначина је процењивана на основу коефицијента корелације (R), стандардне девијације (sd) и Фишеровог теста (F).

Липофилности једињења су процењене на основу вредности $\log P$, које су израчунате применом програмског пакета Advanced Chemistry Development (ACD) Software Solaris v. 4.67. Вредности молекулских дескриптора, који се односе на интестиналну апсорпцију ($\%Abs.$), пенетрацију кроз КМБ ($\log BB$) и везивање за протеине плазме (f_B), израчунате су применом програмског пакета ChemSilico [147].

2.7. Одређивање антиконвулзивне активности и потенцијала изазивања седације 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина

2.7.1. Хемијски индуковани напади (s.c. PTZ тест) [148]

Пентилентетразол (PTZ) у дози од 70 mg kg^{-1} је коришћен као стандард за хемијско изазивање епилептичних напада и даван је субкутано 20 min након примене испитиваног једињења. Сматра се да су животиње заштићене, ако се није развио II или виши ступањ епилепсије у току 30 min посматрања. Изабрани растварач није утицао на нападе индуковане PTZ-ом.

2.7.2. Праг клоничних напада у PTZ тесту [148]

Да би се испитао ефекат 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина на праг PTZ-индукованих напада, групе пацова су добијале различите дозе проучаваних једињења (40 и 80 mg kg^{-1}) и фенитоина (40 , 80 и 120 mg kg^{-1}) 20 min пре инфузије PTZ-а. Добијени резултати су упоређивани са контролном групом, која је третирана чистим растварачем. PTZ је убризгаван као раствор концентрације 100 mg ml^{-1} константном брзином од $0,2 \text{ ml min}^{-1}$.

Праг клоничних напада је одређен увлачењем игле (25 gauge) у латералну репну вену пацова у коју је раствор PTZ-а полако убризгаван помоћу инфузионе пумпе (NewEra-300). Инфузија је прекинута када је генерализовани клонус уочен. Минимална доза PTZ-а (mg kg^{-1}) потребна да се индукује генерализовани клонус је приказана као индекс прага клоничних напада. Подаци су представљени уз навођење стандардних грешака ($n = 6$) и анализирани коришћењем једнофакторске анализе варијансе (ANOVA) и post hoc Такијевог теста (Tukey).

2.7.3. Мерење локомоторне активности [149]

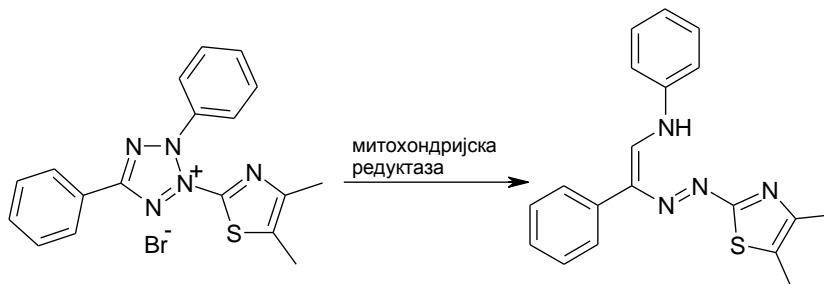
Двадесет минута након примања одговарајућег третмана (растварач, фенитоин или неки од испитиваних једињења у дози од 80 mg kg^{-1}), пацови су смештани у комору од плексигласа ($40 \times 25 \times 35 \text{ cm}$). Активност под дим црвеним светлом (20 lux) је праћена камером током 30 min , без претходне хабитуације. Поред укупно пређеног пута, понашање пацова је анализирано праћењем промена локомоторне активности у петоминутним интервалима (ANY-maze Video Tracking System software, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Подаци су представљени уз навођење стандардних грешака ($n = 6-8$) и анализирани коришћењем једнофакторске анализе варијансе (ANOVA) и post hoc Студент-Њуман-Којлсовог (Student-Newman-Keuls) теста.

2.8. Одређивање антипролиферативне активности 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина

Антипролиферативни потенцијал проучаваних једињења је одређен МТТ тестом према ћелијској линији хуманог карцинома колона НСТ-116. Релативни антипролиферативни потенцијал је изражен као проценат инхибиције пролиферације линија НСТ-116 које су култивисане без једињења у медијуму за култивацију ћелија. Ћелије НСТ-116 су одржаване у медијуму за култивацију ћелија (Dublecco's modified Eagle's medium DMEM), који је садржао 10 % феталног говеђег серума, под стандардним условима на температури од $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и у атмосфери ваздуха (95 %) и угљен-диоксида (5 %). Ћелије НСТ-116 су биле третиране растворима проучаваних једињења концентрација од 0,01, 0,1, 1, 10 и $100 \text{ }\mu\text{M}$ током 24 h. Нетретиране ћелије су служиле као контрола.

МТТ тест се заснива на способности вијабилних ћелија да помоћу митохондријалне дехидрогеназе редукују 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид (МТТ), жуту боју, која је растворљива у води, у ружичасте производ формазана, који је нерастворљив у води. Укратко, 10 ml раствора МТТ (5 mg ml^{-1}) се додаје након 24 h култивисања и културе се инкубирају још 3 h на $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Настали формазан се раствара преко ноћи у SDS-Cl (10 % SDS у 0,01 M HCl) и апсорпција је мерена на радној таласној дужини од 570 nm и референтној од 650 nm помоћу вишеканалног ELISA читача. Процент

вијабилних ћелија је израчунат као однос између апсорпције при свакој од концентрација проучаваних једињења и апсорпције контроле $\times 100$.



Шема 2.4. Редукција МТТ-а

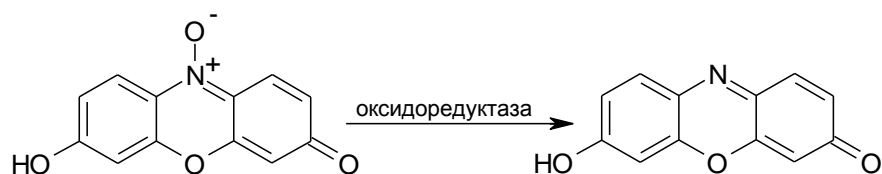
2.9. Одређивање антибактеријске активности 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина

Стандардни сојеви *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 и клиничких изолата *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* and *S. aureus* су коришћени за припремање бактеријских суспензија. Замућеност почетних бактеријских суспензија је коригована додавањем 0,5 Мекфарландовог (McFarland) стандарда, а потом су разблажени у односу 1:100 у стерилном 0,85 % раствору.

Дифузиони метод је квалитативан тест који омогућава класификацију микроорганизама као осетљивих или отпорних на проучаване супстанце на основу величине пречника зоне инхибиције [150]. Петри плоче са Милер–Хинтоновим (Müller–Hinton) агаром су инокулисане одговарајућим бактеријским суспензијама. Површина медијума је сушена 3–5 min на собној температури. Потом су стерилним металним цилиндром направљени отвори који су напуњени са по 100 μl раствора проучаваних једињења концентрације 1000 μM . Антибактеријска активност је процењена на основу мерења пречника зоне инхибиције (IZ). Сви тестови су поновљени по три пута, а резултати су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација. Негативна контрола је припремљена са истим растварачем који је коришћен за растварање проучаваних једињења (5 % ДМСО) да би се показало да растварач не утиче на раст бактерија. Сваки тест је вршен уз контролу раста и контролу стерилности.

Минимална инхибирајућа концентрација (MIC) и минимална бактерицидна концентрација (MBC) су одређене микродилутационим методом [151]. Раствори су

серијски разблаживани Милер–Хинтоновим бујоном, тако да је опсег концентрација износио од 1000 до 7,81 μM . Разблажене бактеријске суспензије (10 μl) су додаване сваком узорку да би се постигла концентрација од 5×10^5 CFU ml^{-1} . На крају је додато 10 μl индикаторског раствора ресазурина. Ресазурин (7-хидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксид) је оксидо–редукциони индикатор за процену раста микроба. То је плава нефлуоросцентна боја која постаје ружичаста и флуоресцира када се редукује до ресоруфина оксидоредуктазама живих ћелија. Инокулисане плоче се инкубирају на 37 $^{\circ}\text{C}$ током 24 h. МИС се дефинише као најнижа концентрација проучаване супстанце која спречава промену боје ресазурина из плаве у ружичасту. Сваки тест подразумева контролу раста и контролу стерилности. Сви тестови су поновљени по три пута и МИС вредности су биле константне. МВС је одређен додавањем по 10 μl узорака, код кога није дошло до промене боје индикатора, на хранљиви агарски медијум. На крају периода инкубације, најнижа концентрација без видљивог раста се дефинише као МВС.



Шема 2.5. Редукција ресазурина

3. Резултати и дискусија

3.1. Утицај растварача на корелацију структуре и антиконвулзивне активности

5-супституисаних-5-фенилхидантоина

За деловање лека су у основи битне две ствари:

- 1) транспорт лека од места примене до места деловања;
- 2) интеракција лека са рецептором;

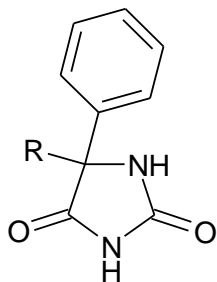
и обе зависе од структуре молекула. Транспорт антиконвулзивних лекова од места примене до места деловања обухвата пренос *in vivo*, који зависи од укупне липофилности, и продирање кроз крвно–мождану баријеру, које одређују удео и положај липофилних елемената структуре молекула. Хидантоини циљају нервне волтажне–зависне натријумске канале како би се успоставио нормалан јонски потенцијал. Смитис је сугерисао да молекули фенитоина формирају низове који се вероватно везују за β -спиралу протеинског дела рецептора водоничним везама преко карбонилне групе у положају 2 и NH групе у положају 3 [76]. Међутим, фенитоин има два алтернативна C(=O)NH краја и две прохиралне фенил-групе у положају 5, што указује да водоничне везе могу да се успостављају и на друге начине.

Способност органских молекула да успостављају водоничне везе значајно утиче на многа њихова својства, укључујући растворљивост у води, интестиналну апсорпцију, продирање кроз крвно–мождану баријеру, неспецифично везивање за протеине плазме и сл. Пупер је показао да се антиконвулзивна активност једињења, која су структурно слична са фенитоином, смањује када се групе које учествују у водоничном везивању (C=O и NH) уклоне [77]. Овај закључак су потврдили Кортес и сарадници, који су показали да се антиконвулзивна активност значајно смањује и када се хидантоинско језгро замени имидазолонским или имидазолидинонским [80].

У циљу проучавања доприноса водоничног везивања антиконвулзивној активности деривата хидантоина, у овом раду је синтетисана серија од једанаест 5-супституисаних-5-фенилхидантоина (табела 3.1), чије су активности одређене у MES тесту [131, 152].

Табела 3.1 Хемијске структуре проучаваних 5-супституисаних-5-фенилхидантоина

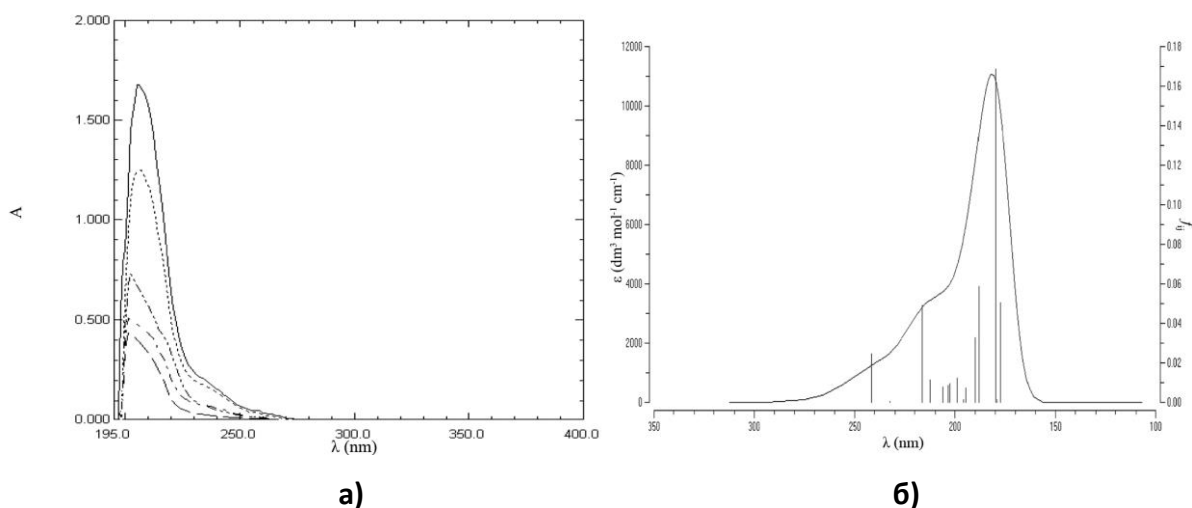
Бр. јед.	R
3.1	CH ₃
3.2	C ₂ H ₅
3.3	<i>n</i> -C ₃ H ₇
3.4	<i>i</i> -C ₃ H ₇
3.5	<i>n</i> -C ₄ H ₉
3.6	<i>i</i> -C ₄ H ₉
3.7	<i>t</i> -C ₄ H ₉
3.8	<i>c</i> -C ₅ H ₉
3.9	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁
3.10	C ₆ H ₅
3.11	C ₆ H ₅ CH ₂



Фокус истраживања је усмерен на анализу физичко–хемијског понашања 5-супституисаних-5-фенилхидантоина у различитим растварачима помоћу UV/Vis спектроскопије [153]. Њихови апсорпциони максимуми су одређени у области таласних дужина од 200 до 400 nm у 15 растварача различите поларности. Апсорпционе спектре проучаваних једињења карактерише једна трака са благим превојем на страни ниже енергије (слика 3.1a). Да би се идентификовали електронски прелази који се одигравају при апсорпцији UV зрачења, извршена су одговарајућа квантнохемијска израчунавања: *ab initio*, помоћу програмског пакета Gaussian03, и семиемпиријски прорачун, помоћу програмског пакета MOPAC 2009 (Прилог). Оваква анализа показује да најинтензивније апсорпције потичу од СТ прелаза, тј. интрамолекулског трансфера наелектрисања са хидантоинског језгра према фенил-групи. Као што је показано на сликама 3.1a) и б), израчунати и експериментално одређени апсорпциони спектри једињења **3.1** се подударају. Вредности апсорпционих максимума проучаваних деривата у петнаест растварача су приказане у табели 3.2.

Табела 3.2 Апсорпциони максимуми 5-супституисаних-5-фенилхидантоина (3.1–3.11)

Растварач	Бр. јед.	$\nu_{\max} \times 10^{-3} (\text{cm}^{-1})$										
		3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9	3.10	3.11
Метанол		47,80	47,44	47,57	47,71	47,89	47,48	48,08	47,89	47,85	45,33	47,35
Етанол		47,76	47,26	47,26	47,57	47,89	47,71	48,03	47,66	47,71	47,71	47,80
1-Пропанол		46,86	46,38	46,43	46,30	46,00	47,53	47,80	46,55	46,34	46,30	46,30
2-Пропанол		47,30	47,02	46,98	46,90	46,81	47,46	47,91	47,48	47,14	46,72	47,20
1-Бутанол		47,04	46,99	46,77	46,25	45,75	46,82	47,26	47,30	46,99	46,77	47,04
2-Метил-2-пропанол		46,69	46,51	46,51	46,51	46,51	46,78	47,38	47,30	46,64	46,21	46,82
Тетрахидрофуран		39,28	39,15	39,75	39,62	39,71	41,46	41,36	39,59	39,56	39,81	39,56
Диизопропил-етар		41,19	41,60	41,32	41,36	41,67	41,68	41,74	41,43	41,74	41,84	41,63
Метил-ацетат		39,57	38,88	39,82	39,76	40,16	39,62	39,74	39,70	40,92	40,11	39,94
Етил-ацетат		39,03	39,12	39,49	38,97	38,97	40,34	40,97	38,85	38,74	38,73	38,88
Диоксан		40,72	40,52	40,49	40,62	40,49	40,78	41,12	40,55	40,49	40,29	40,55
<i>N,N</i> -Диметилформаид		37,54	37,54	37,37	38,97	39,18	37,68	37,68	39,53	39,12	37,34	39,28
<i>N,N</i> -Диметилацетаид		38,76	38,40	38,49	38,11	38,11	39,75	39,60	37,40	38,46	38,37	38,43
Диметил-сулфоксид		39,78	39,59	37,85	38,26	37,79	38,70	39,49	39,59	39,71	38,46	37,91
Хлороформ		41,15	41,15	40,95	41,12	41,08	41,16	41,22	40,98	41,46	40,95	41,12



Слика 3.1 а) UV спектри једињења **3.1** (—), **3.3** (– –), **3.5** (– –), **3.9** (– ·) и **3.11** (– · ·) у етанолу; б) GausView интерпретација UV спектра једињења **3.1** који је израчунат помоћу програмског пакета Gaussian03

На основу поређења апсорпционих максимума проучаваних једињења може се закључити да постоји истоветан тренд промене њиховог положаја са променом поларности растварача. Аprotични растварачи значајније померају апсорпционе максимуме ка већим таласним дужинама, тј. потребна је мања енергија за побуђивање електрона у односу на протичне раствараче. Ефекти диполарности/поларизабилности растварача (неспецифичне интеракције) и водоничног везивања (специфичне интеракције) на померање апсорпционих максимума анализирани су применом Камлет–Тафтове једначине (једначина 3.1):

$$\nu = \nu_0 + s \pi_1^* + a \alpha_1 + b \beta_1 \quad (3.1)$$

у којој ν представља апсорпциону фреквенцију у датом растварачу; ν_0 је статистичка величина која одговара апсорпционој фреквенцији у циклохексану као референтном растварачу; π_1^* , α_1 и β_1 представљају независне и комплементарне параметре растварача који описују различите типове интеракција између молекула растворене супстанце и растварача (описано у поглављу 1.4.); s , a и b су регресиони коефицијенти који описују осетљивост апсорпционих фреквенција на различите типове интеракција између молекула растворене супстанце и растварача.

Молекули проучаваних хидантоина се понашају као НВ киселине и НВ базе, па је сасвим оправдано да се њихове апсорпционе фреквенције корелишу комплетном Камлет–

Тафтовом једначином у коју су укључена сва три параметра растварача. Корелација спектроскопских података са параметрима растварача је вршена применом метода вишепараметарске регресионе анализе. Параметри коришћених растварача су приказани у табели 3.3, а регресиони коефицијенти v_0 , s , b и a у табели 3.4.

Табела 3.3 Камлет–Тафтови параметри растварача [106]

Растварач	π_1^*	β_1	α_1
Метанол	0,6	0,62	0,93
Етанол	0,54	0,77	0,83
1-Пропанол	0,52	0,83	0,78
2-Пропанол	0,48	0,95	0,76
1-Бутанол	0,47	0,88	0,79
2-Бутанол	0,40	0,80	0,69
2-Метил-2-пропанол	0,41	1,01	0,68
Тетрахидрофуран	0,58	0,55	0
Диизопропил-етар	0,27	0,49	0
Метил-ацетат	0,60	0,42	0
Етил-ацетат	0,55	0,45	0
Диоксан	0,55	0,37	0
<i>N,N</i> -Диметилформаид	0,88	0,69	0
<i>N,N</i> -Диметилацетаид	0,88	0,76	0
Диметил-сулфоксид	1	0,76	0
Хлороформ	0,58	0	0,44

Негативне вредности коефицијента s показују да се апсорпциони максимуми батохромно померају са повећањем диполарности/поларизабилности растварача, што указује да класични ефекти солватације више стабилишу побуђено стање у односу на основно. Ово је карактеристично за процесе у којима се одиграва интрамолекулски трансфер наелектрисања. Позитивне вредности коефицијената b и a упућују на хипсохромно померање апсорпционих максимума са повећањем НВ киселости и НВ базности растварача и указују да специфичне интеракције између молекула растварача и растворене супстанце више стабилизују основно у односу на побуђено стање. Ово је последица интеракција између протон-донорских растварача и карбонилних група хидантоинског језгра, као и водоничног везивања НН група. Киселост хидантоина углавном потиче од НН групе у положају 3, која се налази између две електрон-акцепторске карбонилне групе.

Процентни удели солватохромних параметара (табела 3.5) показују да солватохромизам проучаваних једињења у већој мери потиче од водоничног везивања

него од неспецифичних интеракција између молекула растварача и растворене супстанце. Ови резултати додатно потврђују да проучавана једињења постоје у облику лактам-таутомера у раствору.

Табела 3.4 Резултати корелације апсорпционих фреквенци Камлет–Тафтовом једначином

Бр. јед.	$\nu_0 \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	$s \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	$b \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	$a \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	R^a	sd^b	F^c
3.1	40,69 ($\pm 0,91$)	-4,09 ($\pm 1,27$)	2,58 ($\pm 0,95$)	8,05 ($\pm 0,68$)	0,983	0,81	108
3.2	40,99 ($\pm 0,86$)	-4,70 ($\pm 1,21$)	2,55 ($\pm 0,90$)	7,72 ($\pm 0,64$)	0,985	0,77	115
3.3	41,99 ($\pm 0,68$)	-6,03 ($\pm 0,95$)	2,24 ($\pm 0,71$)	7,58 ($\pm 0,51$)	0,990	0,60	191
3.4	41,41 ($\pm 0,78$)	-4,82 ($\pm 1,08$)	2,09 ($\pm 0,80$)	7,65 ($\pm 0,58$)	0,987	0,70	138
3.5	41,81 ($\pm 0,97$)	-5,21 ($\pm 1,35$)	1,89 ($\pm 1,00$)	7,51 ($\pm 0,72$)	0,980	0,86	87
3.6	42,13 ($\pm 0,86$)	-5,76 ($\pm 1,20$)	2,90 ($\pm 0,89$)	7,03 ($\pm 0,64$)	0,984	0,76	110
3.7	42,13 ($\pm 0,92$)	-5,63 ($\pm 1,29$)	3,11 ($\pm 0,96$)	7,27 ($\pm 0,69$)	0,982	0,82	101
3.8	40,79 ($\pm 0,96$)	-4,46 ($\pm 1,34$)	3,02 ($\pm 0,99$)	7,84 ($\pm 0,72$)	0,982	0,85	98
3.9	40,14 ($\pm 0,92$)	-3,93 ($\pm 1,29$)	2,23 ($\pm 0,96$)	7,59 ($\pm 0,69$)	0,981	0,82	93
3.10	42,09 ($\pm 0,87$)	-6,57 ($\pm 1,24$)	2,88 ($\pm 0,92$)	6,63 ($\pm 0,66$)	0,982	0,79	100
3.11	41,60 ($\pm 0,72$)	-5,43 ($\pm 1,01$)	2,62 ($\pm 0,75$)	7,52 ($\pm 0,54$)	0,989	0,64	165

^aКоефицијент корелације; ^bСтандардна девијација; ^cФишеров тест

Табела 3.5 Процентни удели солватохромних параметара и вредности a/b

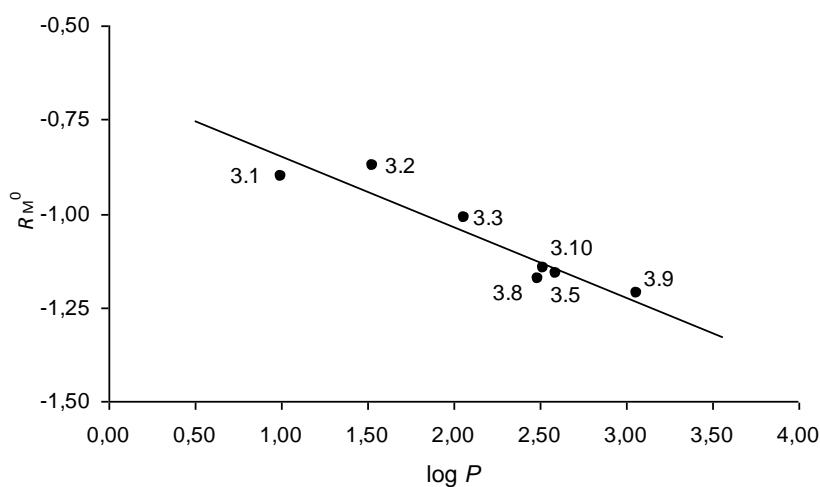
Бр. јед.	P_{π^*} (%)	P_{β} (%)	P_{α} (%)	a/b
3.1	28	18	55	3,12
3.2	31	17	52	3,03
3.3	38	14	48	3,38
3.4	33	14	53	3,66
3.5	36	13	51	3,97
3.6	37	18	45	2,42
3.7	35	19	45	2,34
3.8	29	20	51	2,60
3.9	29	16	55	3,40
3.10	41	18	41	2,30
3.11	35	17	48	2,87

Липофилности проучаваних једињења процењене су израчунавањем вредности $\log P$ применом програмског пакета Advanced Chemistry Development (ACD) Solaris v. 4.67 (табела 3.6). У ранијем раду [154], липофилности репрезентативне серије хидантоина су експериментално процењене помоћу HPLC-а. Експериментално процењене липофилности, које су изражене преко ретенционог коефицијента R_M^0 (силика гел као стационарна фаза, систем ацетонитрил–толуен као мобилна фаза) приказане су у табели 3.6. Задовољавајућа корелација вредности R_M^0 и $\log P$ потврђује да обе величине могу да се користе за изражавање липофилности проучаваних једињења ($R = 0,945$, $sd = 0,05$, $F = 42$) (слика 3.2).

Табела 3.6 Физичко–хемијска својства и подаци о активности за проучавана једињења

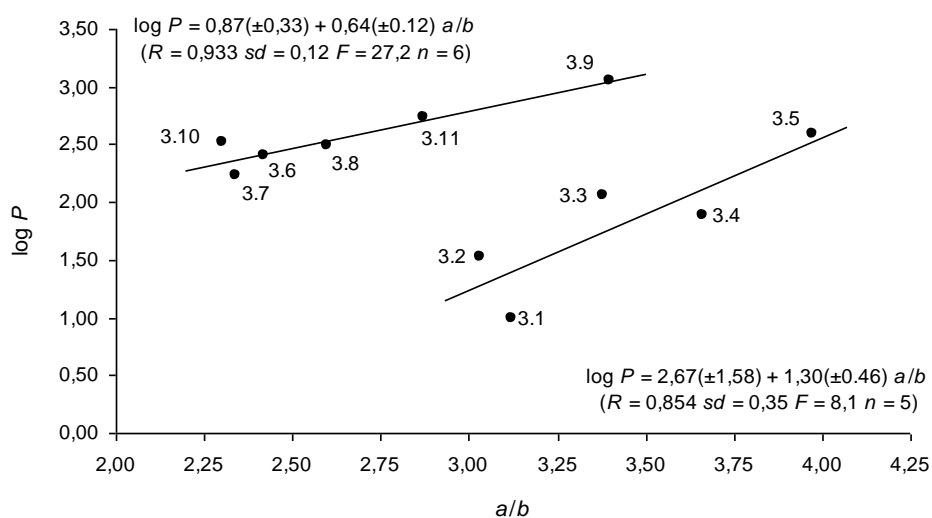
Бр. јед.	MW ^a	σ^{*b}	E _s ^c	$\log P^d$	R _M ^e	ED ₅₀ ^f (mg kg ⁻¹)
3.1	190,2	0	0	1,00	-0,9006	-
3.2	204,2	-0,1	-0,07	1,53	-0,8719	23
3.3	218,3	-0,115	-0,36	2,06	-1,0133	66
3.4	218,3	-0,19	-0,47	1,88	-	56
3.5	232,3	-0,13	-0,39	2,59	-1,1615	620
3.6	232,3	-0,125	-0,93	2,41	-	75
3.7	232,3	-0,3	-1,54	2,23	-	57
3.8	244,3	-0,2	-0,51	2,49	-1,1736	-
3.9	258,3	-0,15	-0,79	3,06	-1,2137	-
3.10	252,3	0,6	-2,55	2,52	-1,1476	18
3.11	266,3	0,215	-0,38	2,74	-	200

^aМолекулска маса; ^bТафтов електронски параметар [62]; ^cТафтов стерни параметар [62]; ^dИзрачунато помоћу ACD Solaris v. 4.67; ^eРетенциони коефицијент R_M^0 (силика гел као стационарна фаза, систем ацетонитрил–толуен као мобилна фаза) [154]



Слика 3.2 Корелација експериментално процењених (R_M^0) и израчунатих ($\log P$) липофилности 5-супституисаних-5-фенилхидантоина

Пошто параметри растварача у Камлет-Тафтовој једначини описују различите типове интеракција између молекула растварача и растворене супстанце, релативне вредности регресионих коефицијената могу да послуже за процену способности проучаваних једињења да интереагују са својим окружењем. Потврда ефеката солватације на однос структуре и својстава 5-супституисаних-5-фенилхидантоина добијена је корелисањем израчунатих вредности $\log P$ са односом доприноса специфичних интеракција a/b (слика 3.3). Параметар $\log P$ је солватационо својство, пошто је у директној вези са $\Delta_{\text{solv}}G^\theta$ растворене супстанце која је расподељена између два растварача. Абрахам је показао да НВ киселост растворене супстанце мање утиче на расподељивање између *n*-октанола и воде [112]. Иако је *n*-октанол јача НВ база од воде, разлика у НВ киселости између ова два растварача значајније утиче на расподелу проучаваних једињења. Корелисањем вредности $\log P$ и односа специфичних интеракција a/b добијене су две праволинијске зависности за деривате **3.6**, **3.7**, **3.8**, **3.9**, **3.10** и **3.11** са већим хидрофобним супституентима у положају 5 ($R = 0,935$) и деривате **3.1**, **3.2**, **3.3**, **3.4** и **3.5** са мањим алкил-групама у положају 5 ($R = 0,855$). У претходном раду [155], проучаван је утицај стуктуре осам 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина на вредности коефицијената расподеле у систему *n*-октанола/вода и добијена је јединствена праволинијска зависност између $\log P$ и a/b супротног нагиба у односу на праве добијене у овом раду. Ово може да се објасни смањеном способношћу 3-супституисаних деривата да успостављају водоничне везе. Добијене корелације потврђују хипотезу Пупера [77] да је водонично везивање важан фактор антиконвулзивног дејства једињења која су структурно слична са фенитоином.



Слика 3.3 Корелација $\log P$ и односа доприноса специфичних интеракција

Тропараметарска Ханшова једначина је примењена за анализу антиконвулзивне активности осам 5-супституисаних-5-фенилхидантоина, чије су MES-активности одређене у литератури (једначина 3.2).

$$\log ED_{50} = 1,09(\pm 0,23)\log P - 0,69(\pm 0,36)\sigma^* + 0,35(\pm 0,12)E_s - 2,66(\pm 0,42) \quad (3.2)$$

($R = 0,942$; $sd = 0,21$; $F = 11$; $n = 8$)

Негативна вредност коефицијента уз σ^* показује да се антиконвулзивна активност проучаваних 5-фенилхидантоина повећава увођењем електрон-акцепторских супституената у положај 5. Позитивна вредност коефицијента уз E_s указује да велики супституенти образују хидрофобни заклон, који штити водоничне везе између имидног дела хидантоинског прстена и β -спирале протеинског сегмента рецептора од екструзије воде. Ово даље наводи на закључак да рецептори поседују посебна стереохемијска и електронска својства. Са друге стране, идентификација циљних места на рецептору није могућа на овом нивоу, пошто већина антиконвулзива интерагује са више рецептора. Добијени резултати су у сагласности са Кординговим фармакофорним моделом према коме су главни структурни елементи који одређују антиконвулзивну активност: НВ киселе и базне групе, као и велика хидрофобна електронегативна група [54].

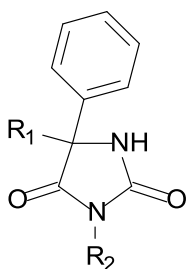
3.2. Утицај растварача на корелацију структуре и ADMET својстава 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина

Поред *in vitro* активности, потенцијално нови лек мора да поседује и одређена физичко-хемијска својства да би био применљив у организму. У последњој деценији, постављено је више QSAR модела који, осим биолошке активности, релативно успешно предвиђају апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам, елиминацију и токсичне ефекте лекова (тзв. ADMET својства). Имајући у виду фармаколошки значај хидантоина, у овом раду је синтетисана репрезентативна серија од 25 деривата фенитоина, нирванола и 5-метил-5-фенилхидантоина (табела 3.7), чије су липофилности постепено повећаване увођењем алкил-, циклоалкил- или алкенил-групе у положај 3 [156]. Својства проучаваних деривата, која су релевантна за њихову фармаколошку активност, процењена су емпиријски, помоћу UV/Vis спектроскопије, или израчуната коришћењем одговарајућих

програмских пакета (ACD Solaris v. 4.67; Chemsilico). Ослањајући се на Абрахамов приступ у процени ефеката солватације, квантитативне зависности између различитих типова интеракција између молекула растварача и растворене супстанце и ADMET својстава проучаваних деривата успостављене су применом метода линеарне корелације енергије солватације (LSER).

Табела 3.7 Структуре проучаваних 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина

Бр. јед.	R ₁	R ₂	Бр. јед.	R ₁	R ₂
3.12	C ₆ H ₅	CH ₃	3.25	C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₃ H ₇
3.13	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	3.26	C ₂ H ₅	<i>i</i> -C ₃ H ₇
3.14	C ₆ H ₅	<i>n</i> -C ₃ H ₇	3.27	C ₂ H ₅	CH ₂ =CHCH ₂
3.15	C ₆ H ₅	<i>i</i> -C ₃ H ₇	3.28	C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₄ H ₉
3.16	C ₆ H ₅	CH ₂ =CHCH ₂	3.29	C ₂ H ₅	<i>i</i> -C ₄ H ₉
3.17	C ₆ H ₅	<i>n</i> -C ₄ H ₉	3.30	C ₂ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂
3.18	C ₆ H ₅	<i>i</i> -C ₄ H ₉	3.31	CH ₃	CH ₃
3.19	C ₆ H ₅	<i>t</i> -C ₄ H ₉	3.32	CH ₃	C ₂ H ₅
3.20	C ₆ H ₅	<i>c</i> -C ₅ H ₉	3.33	CH ₃	<i>n</i> -C ₃ H ₇
3.21	C ₆ H ₅	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	3.34	CH ₃	<i>i</i> -C ₃ H ₇
3.22	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	3.35	CH ₃	<i>n</i> -C ₄ H ₉
3.23	C ₂ H ₅	CH ₃	3.36	CH ₃	<i>i</i> -C ₄ H ₉
3.24	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅			



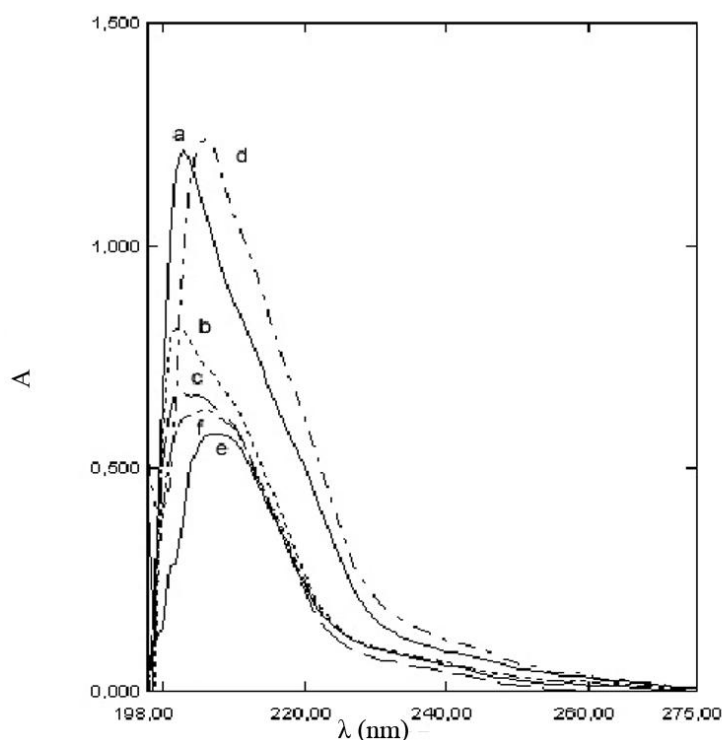
Апсорпциони максимуми проучаваних једињења одређени су у области таласних дужина од 200 до 400 nm у 15 растварача различите поларности (табела 3.8). Њихове апсорпционе спектре карактерише једна трака са благим превојем на страни ниже енергије (слика 3.4), што је карактеристично за деривате 5-фенилхидантоина [153]. Главна апсорпција потиче од интрамолекулског трансфера наелектрисања од хидантоинског језгра према фенил-групи. Ефекти диполарности/поларизабилности растварача (неспецифичне интеракције) и водоничног везивања (специфичне интеракције) на померање апсорпционих максимума проучаваних деривата квантификовани су Камлет-Тафтовом једначином (једначина 3.1). Корелација спектроскопских података са параметрима растварача (табела 3.3) извршена је применом метода вишепараметарске линеарне регресије. Регресионе вредности v_0 , s , b и a су приказане у табели 3.9.

Табела 3.8 Апсорпциони максимуми 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина (3.12–3.36)

Растварач	Бр. јед.	$\nu_{\max} \times 10^{-3} (\text{cm}^{-1})$														
		3.12	3.13	3.14	3.15	3.16	3.17	3.18	3.19	3.20	3.21	3.22	3.23	3.24	3.25	3.26
Метанол		48,26	47,79	47,35	48,12	47,53	46,95	47,21	47,43	47,76	47,46	47,30	48,06	47,66	47,89	47,76
Етанол		48,54	48,03	47,34	48,36	47,64	46,90	47,25	47,44	47,94	47,48	47,13	48,23	47,76	47,94	47,81
1-Пропанол		48,36	47,57	46,94	48,17	47,39	46,38	46,82	47,35	47,39	47,30	46,91	47,85	47,37	47,76	47,52
2-Пропанол		48,36	47,88	47,57	48,15	47,78	47,24	47,47	47,63	47,76	47,67	47,39	48,12	47,83	47,97	47,91
1-Бутанол		46,82	46,55	46,20	46,82	46,24	45,70	45,96	46,30	46,43	46,28	46,01	47,57	47,25	47,44	47,35
2- Бутанол		47,49	47,30	47,09	47,43	47,17	46,92	47,04	47,14	46,98	47,23	47,17	47,63	47,52	47,54	47,52
2-Метил-2-пропанол		44,96	45,72	46,37	45,14	46,00	47,06	46,64	46,02	45,71	46,16	46,30	45,72	46,71	45,87	46,28
Етилен-гликол		49,21	48,88	48,52	49,21	48,69	48,16	48,37	47,36	47,10	47,49	48,44	48,41	48,19	48,37	48,26
Изопропил-етар		43,99	43,96	43,88	43,99	43,90	43,86	43,88	43,90	43,93	43,92	43,88	44,40	44,21	44,36	44,29
Тетрахидрофуран		41,41	41,23	41,04	41,34	41,13	40,92	41,01	41,06	41,03	41,16	41,09	41,88	41,49	41,81	41,65
Диметил-сулфоксид		38,33	38,05	37,83	38,22	38,02	37,59	37,79	37,93	38,03	37,92	37,89	38,70	38,55	38,70	38,61
Метил-ацетат		42,12	41,85	41,57	42,05	41,70	41,36	41,51	41,47	41,58	41,50	41,58	42,45	41,91	42,35	42,13
Етил-ацетат		42,20	41,98	41,73	42,14	41,84	41,56	41,68	41,68	41,79	41,71	41,74	42,59	42,10	42,50	42,30
<i>N,N</i> -Диметилформаид		37,62	37,57	37,55	37,59	37,56	37,54	37,55	37,55	37,57	37,55	37,53	39,73	38,80	39,58	39,20
<i>N,N</i> -Диметилацетаид		38,52	38,11	37,75	38,31	37,88	37,49	37,70	37,77	38,04	37,91	37,57	37,59	37,52	37,58	37,55

Табела 3.8 Наставак

Растварач	$\nu_{\max} \times 10^{-3} (\text{cm}^{-1})$										
	Бр. јед.	3.27	3.28	3.29	3.30	3.31	3.32	3.33	3.34	3.35	3.36
Метанол		47,48	48,03	48,08	47,55	47,30	47,09	46,73	46,32	46,04	46,32
Етанол		47,61	48,03	48,17	47,62	48,31	48,21	48,08	47,89	47,76	47,94
1-Пропанол		47,17	47,80	47,89	47,26	48,08	48,03	48,01	47,94	47,89	47,94
2-Пропанол		47,76	48,05	48,08	47,80	48,17	48,08	48,03	47,92	47,88	47,94
1-Бутанол		47,07	47,52	47,53	47,08	47,85	47,80	47,76	47,62	47,55	47,62
2- Бутанол		47,44	47,58	47,60	47,44	47,95	47,93	47,90	47,85	47,81	47,85
2-Метил-2-пропанол		46,90	45,80	45,64	46,74	46,36	46,51	46,62	46,79	46,88	46,78
Етилен-гликол		48,12	48,40	48,43	48,17	47,81	47,80	47,66	47,44	47,32	47,50
Изопропил-етар		44,09	44,38	44,43	44,13	43,79	43,75	43,74	43,71	43,67	43,71
Тетрахидрофуран		41,35	41,85	41,92	41,45	41,22	41,17	41,14	41,06	41,00	41,08
Диметил-сулфоксид		38,40	38,68	38,76	38,44	38,64	38,55	38,48	38,28	38,17	38,37
Метил-ацетат		41,73	42,41	42,51	41,86	41,67	41,62	41,56	41,42	41,34	41,45
Етил-ацетат		41,94	42,56	42,65	42,06	41,86	41,81	41,77	41,66	41,58	41,68
<i>N,N</i> -Диметилформаид		38,63	39,68	39,81	38,94	37,82	37,79	37,77	37,72	37,71	37,74
<i>N,N</i> -Диметилацетаид		37,51	37,58	37,60	37,53	37,72	37,69	37,69	37,62	37,59	37,62



Слика 3.4 UV спектри једињења **3.12** (a), **3.24** (b) и **3.31** (c) у метанолу и **3.12** (d), **3.24** (e) и **3.31** (f) у 2-метил-2-пропанолу

Табела 3.9 Резултати корелације апсорпционих фреквенција Камлет-Тафтовом једначином

Бр. јед.	R ₁	R ₂	$\nu_0 \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	$s \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	$b \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	$a \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	R ^a	F ^b	sd ^c
3.12	C ₆ H ₅	CH ₃	48,07 (±0,94)	-5,49 (±1,13)	-6,34 (±0,96)	9,68 (±0,62)	0,980	107,4	0,89
3.13	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	47,82 (±1,18)	-5,92 (±1,09)	-5,74 (±1,42)	9,33 (±0,64)	0,983	103,3	0,85
3.14	C ₆ H ₅	<i>n</i> -C ₃ H ₇	47,44 (±1,21)	-6,26 (±1,12)	-5,04 (±1,45)	8,95 (±0,66)	0,981	94,5	0,87
3.15	C ₆ H ₅	<i>i</i> -C ₃ H ₇	48,08 (±1,28)	-5,60 (±1,18)	-6,34 (±1,53)	9,66 (±0,70)	0,980	90,7	0,92
3.16	C ₆ H ₅	CH ₂ CH=CH ₂	47,57 (±1,22)	-6,04 (±1,13)	-5,34 (±1,49)	9,12 (±0,67)	0,981	93,7	0,88
3.17	C ₆ H ₅	<i>n</i> -C ₄ H ₉	47,20 (±1,36)	-6,63 (±1,26)	-4,44 (±1,64)	8,57 (±0,75)	0,975	71,7	0,98
3.18	C ₆ H ₅	<i>i</i> -C ₄ H ₉	47,34 (±1,26)	-6,38 (±1,16)	-4,77 (±1,51)	8,80 (±0,69)	0,979	86,3	0,90
3.19	C ₆ H ₅	<i>t</i> -C ₄ H ₉	47,34 (±0,99)	-6,87 (±0,92)	-4,18 (±1,19)	8,54 (±0,54)	0,987	138,7	0,71
3.20	C ₆ H ₅	<i>c</i> -C ₅ H ₉	47,50 (±0,93)	-6,89 (±0,86)	-4,25 (±1,12)	8,54 (±0,51)	0,989	156,7	0,69

^aКоефицијент корелације; ^bСтандардна девијација; ^cФишеров тест

Табела 3.9 Наставак

Бр. јед.	R ₁	R ₂	$\nu_0 \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	$s \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	$b \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	$a \times 10^{-3}$ (cm ⁻¹)	R ^a	F ^b	sd ^c
3.21	C ₆ H ₅	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	47,34 (±1,00)	-6,81 (±0,93)	-4,18 (±1,20)	8,55 (±0,55)	0,987	135,2	0,72
3.22	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	47,52 (±1,22)	-6,25 (±1,13)	-5,21 (±1,47)	8,87 (±0,67)	0,980	90,4	0,88
3.23	C ₂ H ₅	CH ₃	48,33 (±1,08)	-6,09 (±1,00)	-5,31 (±1,29)	8,67 (±0,59)	0,984	110,9	0,77
3.24	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	47,56 (±1,02)	-6,47 (±0,95)	-4,21 (±1,23)	8,59 (±0,56)	0,986	127,8	0,73
3.25	C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₃ H ₇	48,16 (±1,06)	-6,09 (±0,98)	-5,12 (±1,27)	8,57 (±0,58)	0,984	113,1	0,76
3.26	C ₂ H ₅	<i>i</i> -C ₃ H ₇	47,85 (±1,02)	-6,29 (±0,94)	-4,65 (±1,22)	8,55 (±0,56)	0,986	124,6	0,73
3.27	C ₂ H ₅	CH ₂ CH=CH ₂	47,29 (±1,05)	-6,51 (±0,98)	-3,93 (±1,27)	8,55 (±0,58)	0,985	120,7	0,76
3.28	C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₄ H ₉	48,27 (±1,05)	-6,08 (±0,97)	-5,26 (±1,27)	8,63 (±0,58)	0,984	114,5	0,76
3.29	C ₂ H ₅	<i>i</i> -C ₄ H ₉	48,40 (±1,09)	-6,01 (±1,01)	-5,44 (±1,31)	8,63 (±0,59)	0,983	107,0	0,78
3.30	C ₂ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	47,42 (±1,04)	-6,38 (±0,96)	-4,13 (±1,25)	8,51 (±0,57)	0,985	121,6	0,75
3.31	CH ₃	CH ₃	47,52 (±0,75)	-6,55 (±0,70)	-4,54 (±0,91)	9,69 (±0,41)	0,993	288,3	0,51
3.32	CH ₃	C ₂ H ₅	47,45 (±0,71)	-6,60 (±0,66)	-4,45 (±0,86)	9,68 (±0,39)	0,994	322,0	0,51
3.33	CH ₃	<i>n</i> -C ₃ H ₇	47,35 (±0,69)	-6,72 (±0,64)	-4,21 (±0,83)	9,57 (±0,38)	0,995	339,4	0,50
3.34	CH ₃	<i>i</i> -C ₃ H ₇	47,23 (±0,66)	-6,95 (±0,61)	-3,89 (±0,79)	9,43 (±0,36)	0,995	377,0	0,47
3.35	CH ₃	<i>n</i> -C ₄ H ₉	47,12 (±0,64)	-7,05 (±0,59)	-3,69 (±0,77)	9,36 (±0,35)	0,995	395,4	0,46
3.36	CH ₃	<i>i</i> -C ₄ H ₉	47,23 (±0,63)	-6,86 (±0,63)	-3,95 (±0,81)	9,46 (±0,37)	0,995	354,1	0,49

^aКоефицијент корелације; ^bСтандардна девијација; ^cФишеров тест

Батохромно померање апсорпционих максимума са повећањем поларности растварача ($s < 0$) показује да је диполни момент у побуђеном стању већи него у основном стању. Овакво понашање је карактеристично за процесе који подразумевају интрамолекуларно преношење наелектрисања. Осим тога, хидантоинско језгро је одговорно за успостављање водоничних веза са молекулима растварача. Апсорпциони максимуми се хипсохромно померају са повећањем НВ киселости растварача ($a > 0$), што је последица стварања водоничних веза између молекула протичних растварача и

слободног електронског пара атома кисеоника карбоксилних група, па је њихова екситација отежана. Насупрот томе, НВ својства растварача, која описује параметар β , мање су значајна, тако да одавање електрона услед водоничног везивања NH групе има за последицу померање апсорпционих максимума ка нешто нижим енергијама ($b < 0$).

Процентни удели солватохромних параметара (табела 3.10) показују да солватохромизам проучаваних деривата у већој мери потиче од специфичних него од неспецифичних интеракција са молекулима растварача. Осим тога, ови резултати потврђују да проучавана једињења постоје у облику лактам-таутомера у раствору.

Табела 3.10 Процентни удели солватохромних ефеката

Бр. јед.	P_{π} (%)	P_{β} (%)	P_{α} (%)	Бр. јед.	P_{π} (%)	P_{β} (%)	P_{α} (%)
3.12	25,49	29,49	45,02	3.25	30,79	25,88	43,33
3.13	28,20	27,35	44,45	3.26	32,27	23,86	43,87
3.14	30,91	24,89	44,20	3.27	34,28	20,70	45,02
3.15	25,93	29,35	44,72	3.28	30,45	26,34	43,21
3.16	29,46	26,05	44,49	3.29	29,93	27,09	42,98
3.17	33,76	22,61	43,64	3.30	33,54	21,71	44,74
3.18	31,98	23,91	44,11	3.31	31,54	21,88	46,59
3.19	35,07	21,34	43,59	3.32	31,82	21,50	46,67
3.20	35,01	21,60	43,39	3.33	32,75	20,55	46,71
3.21	34,85	21,39	43,76	3.34	34,29	19,19	46,52
3.22	30,74	25,63	43,63	3.35	35,07	18,36	46,57
3.23	30,34	26,46	43,20	3.36	33,84	19,49	46,67
3.24	33,58	21,85	44,58				

На основу процене способности проучаваних деривата да интерагују са окружењем проучаван је однос специфичних интеракција између молекула растварача и растворене супстанце и њихових одабраних структурних својстава, која описују ADMET параметари (табела 3.11). Региоселективна заштита хидантоинског језгра је важна за оптимално везивање за натријумске канале. Смитис је указао да хидрофобни заклон, који стварају фенил-групе молекула фенитоина, штити водоничне везе између имидног дела хидантоинског скелета и β -спирале протеинског сегмента рецептора од разарања воде [76]. Због тога су потребни додатни стерни параметри за адекватно описивање структурних својстава деривата овакве хомологне серије.

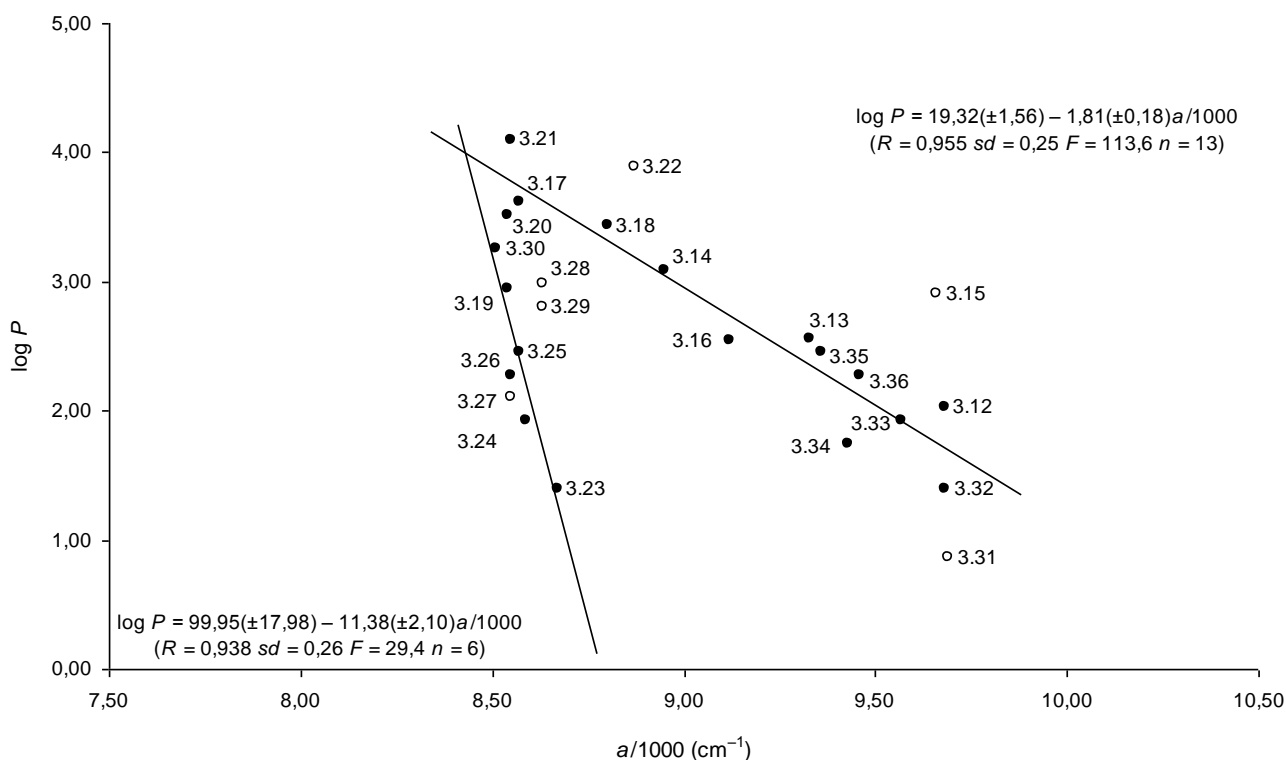
Липофилности проучаваних једињења процењене су израчунавањем вредности $\log P$ применом програмског пакета Advanced Chemistry Development (ACD) Software Solaris v. 4.67 (табела 3.11). Израчунате вредности $\log P$ су корелисане се регресионим

коефицијентом a из једначине (3.1) и добијене су две праволинијске зависности (слика 3.5), углавном као последица различитих структурних својстава супституента у положају 5 хидантоинског прстена.

Табела 3.11 Физичко-хемијска својства и фармакокинетички подаци проучаваних једињења

Бр. јед.	R ₁	R ₂	log P ^a	%Abs. ^b	log BB ^b	f _B ^b (%)	log k _A ^c	ΣE _s ^d	Σσ ^{*e}
3.12	C ₆ H ₅	CH ₃	2,03	95,2	0,13	87,126	4,050	-2,55	0,60
3.13	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	2,56	95,7	0,07	91,983	4,280	-2,62	0,50
3.14	C ₆ H ₅	<i>n</i> -C ₃ H ₇	3,09	95,9	0	95,173	4,515	-2,91	0,48
3.15	C ₆ H ₅	<i>i</i> -C ₃ H ₇	2,91	96,0	0,04	90,15	4,182	-3,02	0,41
3.16	C ₆ H ₅	CH ₂ =CHCH ₂	2,55	95,8	0,05	92,255	4,296	-2,94	0,70
3.17	C ₆ H ₅	<i>n</i> -C ₄ H ₉	3,62	96,1	-0,07	97,067	4,740	-2,94	0,47
3.18	C ₆ H ₅	<i>i</i> -C ₄ H ₉	3,44	96,1	-0,03	96,16	4,619	-3,48	0,47
3.19	C ₆ H ₅	<i>t</i> -C ₄ H ₉	2,94	96,2	0,05	96,275	4,632	-4,09	0,30
3.20	C ₆ H ₅	<i>c</i> -C ₅ H ₉	3,52	96,1	-0,04	92,757	4,327	-3,06	0,40
3.21	C ₆ H ₅	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	4,09	96,2	-0,13	94,537	4,458	-3,34	0,45
3.22	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	3,89	96,4	-0,14	95,395	4,536	-2,93	0,82
3.23	C ₂ H ₅	CH ₃	1,40	93,4	-0,20	46,132	3,153	-0,07	-0,10
3.24	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	1,93	94,1	-0,21	56,89	3,340	-0,14	-0,20
3.25	C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₃ H ₇	2,46	94,9	-0,17	70,307	3,594	-0,43	-0,22
3.26	C ₂ H ₅	<i>i</i> -C ₃ H ₇	2,28	94,8	-0,18	59,576	3,388	-0,54	-0,29
3.27	C ₂ H ₅	CH ₂ =CHCH ₂	2,10	94,6	-0,19	65,146	3,492	-0,46	0,00
3.28	C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₄ H ₉	2,99	95,2	-0,12	81,654	3,868	-0,46	-0,23
3.29	C ₂ H ₅	<i>i</i> -C ₄ H ₉	2,81	95,2	-0,14	75,939	3,719	-1,00	-0,23
3.30	C ₂ H ₅	C ₆ H ₅ CH ₂	3,25	95,6	-0,01	95,044	4,503	-0,45	0,12
3.31	CH ₃	CH ₃	0,87	92,2	-0,20	95,044	4,503	0,00	0,00
3.32	CH ₃	C ₂ H ₅	1,40	93,3	-0,21	33,701	2,926	-0,07	-0,10
3.33	CH ₃	<i>n</i> -C ₃ H ₇	1,93	94,3	-0,20	45,258	3,137	-0,36	-0,12
3.34	CH ₃	<i>i</i> -C ₃ H ₇	1,75	94,3	-0,19	57,868	3,358	-0,47	-0,19
3.35	CH ₃	<i>n</i> -C ₄ H ₉	2,46	94,9	-0,16	70,494	3,598	-0,39	-0,13
3.36	CH ₃	<i>i</i> -C ₄ H ₉	2,28	94,8	-0,16	65,26	3,494	-0,93	-0,13

^aизрачунато помоћу ACD Solaris v. 4.67; ^bподаци који се односе на интестиналну апсорпцију (%Abs.), пенетрацију кроз крвно-мождану баријеру (log BB) и удео лека који је везан за протеине плазме (f_B) су израчунати помоћу ChemSilico [147]; ^cафинитети везивања за протеине су израчунати помоћу једначине 35; ^dсума вредности Тафтових стерних параметара за R₁ и R₂ [62]; ^eсума вредности Тафтових електронских параметара за R₁ и R₂ [62].



Слика 3.5 Корелација $\log P$ и регресионог коефицијента a из Камлет–Тафтове једначине

Добра корелација $\log P$ и a добијена је укључивањем суме вредности Тафтовог параметра E_s за супституенте R_1 и R_2 (једначина 3.3).

$$\log P = 9,12(\pm 1,65) - 0,82(\pm 0,18)a/1000 - 0,48(\pm 0,06) \Sigma E_s \quad (3.3)$$

$(R = 0,903; \text{ } sd = 0,38; \text{ } F = 42,2; \text{ } n = 22)$

Деривати **3.19**, **3.20** и **3.35** су искључени из модела (3.3) из статистичких разлога и немају значајнији утицај на моделовање липофилности проучаване серије једињења. Добијен модел је у сагласности са Абрахамовом карактеризацијом подеоног система n -октанол/вода [112]. Вода је јача НВ киселина од n -октанола, па НВ базна једињења успостављају слабије интеракције са n -октанолом него са водом. Са повећањем величине молекула растворене супстанце повећава се и вредност $\log P$, пошто је потребна већа енергија да се савладају кохезионе силе између молекула воде и настану шупљине у које се умећу молекули растворене супстанце. У n -октанолу делују јаче дисперзионе силе са раствором супстанцом.

У литератури су постављени многобројни модели који описују односе између $\log P$ и интестиналне апсорпције [157, 158], пенетрације кроз крвно-мождану баријеру [159]

итд. У овом раду, коефицијент a из једначине 3.1 употребљен је и за моделовање интестиналне апсорпције (HIA) проучаваних једињења, чији су подаци израчунати применом програмског пакета ChemSilico. Вредности HIA ($\%Abs.$) су изражене као удели једињења који се апсорбују у танком цреву (табела 3.11). Може се очекивати да се 3,5-дисупституисани-5-фенилхидантоини добро апсорбују, пошто су процењене вредности HIA веће од 90 %. Задовољавајућа корелација $\%Abs.$ са a и ΣE_s (једначина 3.4), добијена за 23 једињења, показује да су НВ базност и величина растворене супстанце важне за апсорпцију. Одступање једињења **3.23** и **3.31** наводи на закључак да додатни фактори одређују интестиналну апсорпцију деривата хидантоина који поседује мале хидрофобне супституенте. Тиме се у основи потврђују и закључци Абрахама да водонично везивање и молекулска величина доминантно одређују HIA [125, 127]. Међутим, треба имати у виду да на апсорпцију испитиваних једињења не утиче само брзина пасивне дифузије, већ и брзина *in vivo* растварања у цревној течности.

$$\%Abs. = 98,96(\pm 1,59) - 0,51(\pm 0,18)a/1000 - 0,50(\pm 0,06)\Sigma E_s \quad (3.4)$$

$$(R = 0,904; sd = 0,37; F = 45,0; n = 23)$$

Опште је познато да кандидати за ЦНС-активне лекове треба да буду способни да ефикасно продру кроз крвно-мождану баријеру (КМБ). Са аспекта антиконвулзивне активности, оптимална липофилност за продирање кроз КМБ износи око $\log P = 2$ [160]. Релативни афинитети супстанци према крви или мозганом ткиву могу да се изразе преко коефицијента расподеле између крви и мозга, $\log BB = \log (C_{\text{мозак}}/C_{\text{крв}})$, где су $C_{\text{мозак}}$ и $C_{\text{крв}}$ равнотежне концентрације лека у мозгу и крви, респективно. На основу података израчунатих применом програмског пакета ChemSilico, може се са великом вероватноћом очекивати да сва проучавана једињења продиру у мозак, пошто да су њихове вредности $\log BB$ веће од -0.3 . Добијена зависност између односа равнотежних концентрација у мозгу и крви и a и ΣE_s показује да молекулска величина и водонично везивање значајно утичу на способност проучаваних деривата да продиру кроз КМБ. Деривати **3.21**, **3.22** и **3.30**, са великим хидрофобним супституентима у положају 3, одступају од постављеног модела 3.5. Може се претпоставити да ће се њихова активност смањити услед стерних сметњи током успостављања интеракција се рецепторима.

$$\log BB = -0,64(\pm 0,21) + 0,05(\pm 0,02)a/1000 - 0,07(\pm 0,01)\Sigma E_s \quad (3.5)$$

($R = 0,911$; $sd = 0,05$; $F = 46,2$; $n = 22$)

Терапијска применљивост хидантоинских антиконвулзива је ограничена, јер поседују инхерентну токсичност. Клиничка испитивања су показала да је токсичност фенитоина у вези са нивоом невезаног лека у плазми [161]. Вредност везивања лека за протеине (f_b , удео везаног лека) изражава се преко удела његове укупне концентрације у плазми, који је везан за протеине плазме (табела 3.11). Серум албумин (HSA, енгл. human serum albumin), најзаступљенији протеин у плазми (концентрација 0,53–0,75 mM), има више хидрофобних места везивања и везује различите групе лекова [162]. Процентуални подаци, који су израчунати применом програмског пакета ChemSilico, преведени су у одговарајуће афинитете везивања k_A помоћу једначине 3.6, која је изведена на основу закона о дејству маса. k_A представља афинитет везивања за HSA под претпоставком да се лек везује искључиво за HSA и, при томе, формира се бинарни комплекс, док је албумин присутан у вишку (концентрација 0,6 mM, [HSA]) у односу на концентрацију лека [163].

$$\log k_A = \log \frac{[f_b]}{1 - [f_b]} - \log[HSA] \quad (3.6)$$

Према подацима из табеле 3.11, везивање лекова за серум албумин може се уопштено објаснити преко хидрофобних интеракција деривата проучаване хомологне серије. Међутим, корелација вредности $\log k_A$ са a , која је побољшана укључивањем чланова $\Sigma\sigma^*$ и ΣE_s (једначина 3.7) указује да на везивање проучаваних деривата за албумин утичу специфична молекулска својства, као што су: усмерене водоничне везе, интермолекулски трансфер наелектрисања и испуњавање џепова рецептора.

$$\log k_A = 6,88(\pm 1,05) - 0,38(\pm 0,11)a/1000 - 0,21(\pm 0,07)\Sigma E_s + 0,59(\pm 0,29)\Sigma\sigma^* \quad (3.7)$$

($R = 0,920$; $sd = 0,24$; $F = 38,4$; $n = 25$)

На основу постављеног модела (3.7) може се закључити да су потребни велики електрон-акцепторски супституенти на хидантоинском језгру да би се постигао релативно висок степен везивања за протеине плазме. Због тога, очекује се да су деривати фенитоина најмање токсични међу проучаваним једињењима.

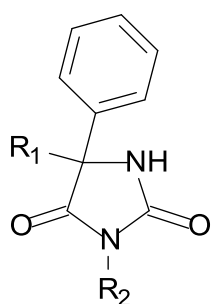
3.3. Однос структуре и антиконвулзивне активности 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина

Терапијски ефекти фенитоина потичу од селективне инхибиције нервних волтажних-зависних натријумских канала. Фенитоин се везује за натријумске канале у неактивном стању на волтажно и фреквентно зависан начин, тако да су неурони, који подлежу продуженој деполаризацији или понављаном опаљивању, комплетније инхибирани. Као што је већ истакнуто, Смитис је претпоставио да се формирају низови молекула, који се вероватно везују за β -спиралу протеинског дела рецептора водоничним везама преко карбонилне групе у положају 2 и NH групе у положају 3 [76]. На ово везивање утичу удео и положај хидрофобних структурних елемената, пошто је потребно да молекули пенетрирају кроз ћелијске мембране пре него што ступе у интеракцију са протеинима натријумских канала. Компаративна студија афинитета везивања деривата хидантоина и сродних једињења (као што су: хидрокси-амиди, оказолидиндиони, хидрокси- и аминокиселине) показала је да је хидантоински прстен у том смислу важан код деривата са кратким бочним алкил-групама, док је мање значајан код деривата са другим хидрофобним ланцима, који могу успешно да заузму додатна хидрофобна места на рецептору [3]. Уопште, проучавање односа структуре и активности антиконвулзивних лекова указало је да су потребни најмање једна хидрофобна група и дозор и/или акцептор водоничне везе, у одређеним оријентацијама, да би се испољила активност. У овом контексту, постављена је хипотеза по којој оријентација фенил-групе у положају 5 у односу на хидантоинско језгро значајно утиче на везивање молекула за натријумске канале [164].

У овом делу истраживања, проучавани су структура и биолошка својства четири 3,5-дисупституисана-5-фенилхидантоина, чије су липофилности сличне липофилности фенитоина (табела 3.12) [165]. На овакав избор једињења утицали су резултати истраживања Брујетеа (Brouillette) [166], у коме је показано да 5-*n*-пентил-5-фенилхидантоин поседује исти афинитет везивања за натријумске канале као фенитоин. За проучавана једињења је карактеристично да два хидрофобна региона раздваја поларан хидантоински регион, док у молекулу фенитоина постоје по један хидрофобни и један поларни регион. Основни циљ истраживања представља утврђивање њихове антиконвулзивне активности у пентилентетразолском (PTZ) тесту и потенцијала

изазивања седације. Наиме, фенитоин има значајну улогу у терапији генерализованих напада, али бројна нежељена дејства ограничавају његову употребу. PTZ се широко примењује за експериментално изазивање *status epilepticus*-а [167]. Потенцијално заштитно дејство неких од проучаваних деривата, уз слабо онеспособљавање/седативне ефекте на пацове, омогућава детаљније анализе третмана *status epilepticus*-а.

Табела 3.12 Хемијске структуре проучаваних 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина



Бр. јед.	R ₁	R ₂	log P ^a
3.10	C ₆ H ₅	H	2,52
3.16	C ₆ H ₅	CH ₂ =CHCH ₂	2,55
3.25	C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₃ H ₇	2,46
3.35	CH ₃	<i>n</i> -C ₄ H ₉	2,46
3.37	<i>i</i> -C ₃ H ₇	CH ₂ =CHCH ₂	2,35

^aпроцењено помоћу Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software ACD v. 11.02

Сви експерименти су изведени на мужјацима пацова Вистар (Wistar) соја тежине 220–250 g (Војна Фарма, Београд, Србија), који су били смештени у просторији са контролисаном температуром, изложени циклусима светла и мрака и имали слободан приступ храни и води. Животиње су биле насумично подвргнуте различитим режимима лекова. Процена антиконвулзивне активности је извршена у *s.c.* PTZ тесту (PTZ се примењује субкутано) и *i.v.* PTZ тесту (PTZ се примењује интравенски). Напади су класификовани према процедури Ламбертија (Lamberty) и Клитгарда (Klitgaard) [168]: I (грчење лица и ушију), II (конвулзивни таласи кроз тело), III (ритање, миоклонични трзаји), IV (извртање на страну) и V (генерализовани тонично-клонични напади). Тест спонтане локомоторне активности је коришћен за утврђивање могућих седативних ефеката проучаваних деривата. Сва једињења су растворена у стандардном растварачу (VEN, 85 % дестилована вода, 14 % пропилен-гликол, 1 % Tween 80) и примењена интерперитонијално 20 min пре тестирања. PTZ је растворен у истом растварачу за *s.c.* PTZ тест и у физиолошком раствору за *i.v.* PTZ тест.

Антиконвулзивни потенцијал проучаваних 5-фенилхидантоина је прелиминарно процењен у *s.c.* PTZ тесту. На основу добијених резултата, антиконвулзивне активности једињења **3.25** и **3.35** су квантификоване и у *i.v.* PTZ тесту. Ефекти фенитоина и проучаваних деривата на генерализоване клоничне нападе су приказани у табели 3.13. При статистичкој обради коришћена је једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) која је

указала да постоји статистички значајан укупни ефекат ($P < 0,05$), а post hoc (Tukey) тест је показао да фенитоин и једињење **3.25** у дози од 80 mg kg^{-1} значајно умањују клоничне нападе код пацова ($P < 0,05$). Из овог следи да једињење **3.25** поседује антиконвулзивну активност, која може да се пореди са активношћу фенитоина.

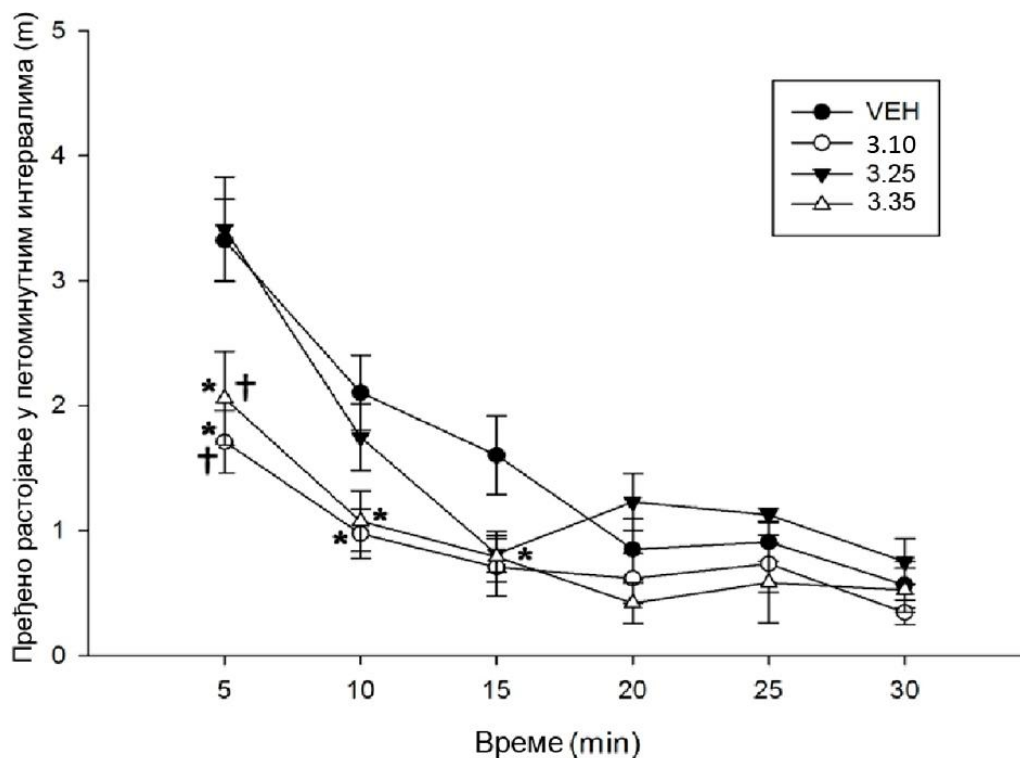
Табела 3.13 Антиконвулзивна активност и потенцијал изазивања седације једињења **3.10**, **3.16**, **3.25**, **3.35** и **3.37**

Бр. јед.	Доза (mg kg^{-1} , i.p.)	PTZ (70 mg kg^{-1} , s. c.)		PTZ (100 mg ml^{-1} , i.v. инфузија при брзини од $0,2 \text{ ml min}^{-1}$)	SLA
		Заштићено/укупно	Степен конвулзије	Праг PTZ (mg kg^{-1})	Укупно пређени пут (m)
3.10	40	3/8	III, III, III, IV, V	$49,91 \pm 2,86$	–
	80	4/6	II, IV	$59,68 \pm 8,95^*$	$5,08 \pm 0,97^{*\dagger}$
	120	1/8	II, III, III, III, III, V, V	$45,68 \pm 4,29$	–
3.16	80	3/8	III, III, III, III, V	–	–
	120	0/8	III, III, IV, V, V, V, V, V	–	–
3.25	40	–	–	$44,20 \pm 3,35$	–
	80	2/8	II, II, II, III, V, V	$59,43 \pm 3,04^*$	$9,08 \pm 0,99$
	120	2/8	II, III, III, III, V, V	–	–
3.35	40	–	–	$45,33 \pm 4,81$	–
	80	3/7	II, II, II, V	$43,01 \pm 4,14$	$5,44 \pm 0,83^{*\dagger}$
	120	4/8	II, II, V, V	–	–
3.37	80	0/8	II, II, III, III, III, III, IV, V	–	–
	120	0/8	II, III, III, IV, V, V, V, V	–	–
VEN	–	2/6	V, V, V, V	$36,90 \pm 1,50$	$9,35 \pm 1,07$

* $P < 0,05$ vs. VEN; † $P < 0,05$ vs. одговарајуће дозе једињења **3.25**

Локомоторна активност пацова је испитивана у тесту спонтане локомоторне активности (SLA, енгл. spontaneous locomotor activity). Укупно пређено растојање и растојања пређена у петоминутним интервалима приказани су у табели 3.13 и на слици 3.6, респективно. Једињења **3.35** и **3.10** су утицала на значајно смањење укупног пређеног растојања ($P < 0,05$) и растојања која су пређена у интервалима 0–5 и 5–10 min у односу на **VEN**. Осим тога, **3.35** и фенитоин испољавају седативне ефекте и у поређењу са једињењем **3.25**. Једињење **3.25** је условило значајно смањење ($P < 0,05$) локомоторне

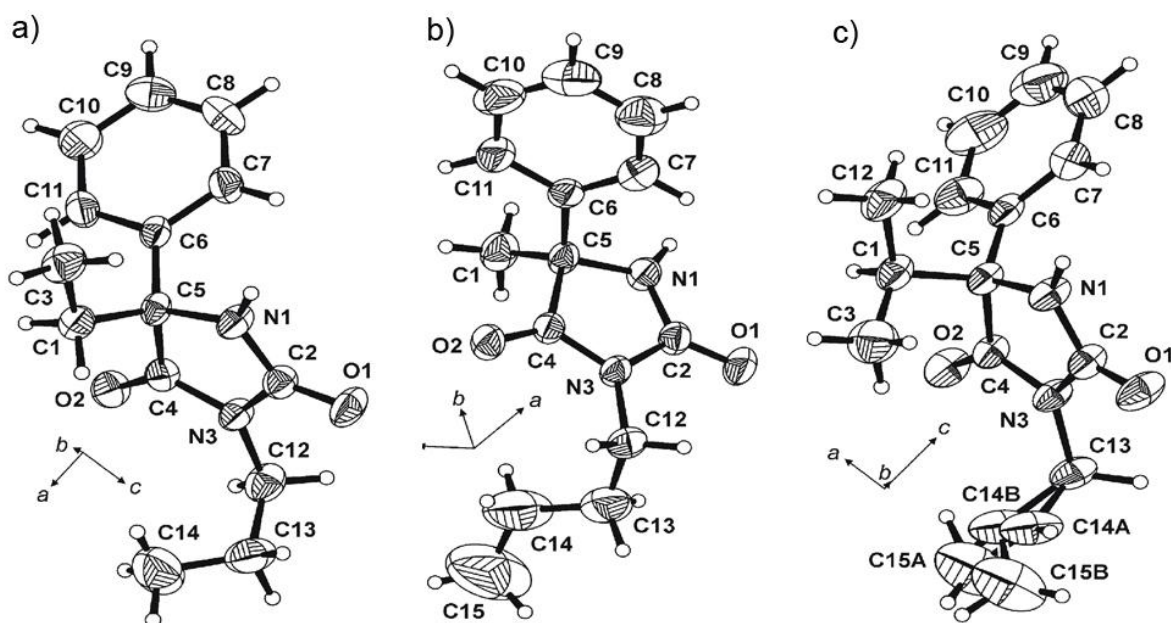
активности у периоду 10–15 min (слика 3.6). Ови резултати показују да **3.25** поседује слаб потенцијал изазивања седације и значајну активност против конвулзија изазваних у i.v. PTZ тесту, иако се и није показао као ефикасан у s.c. PTZ тесту.



Слика 3.6 Ефекат фенитоина и 3,5-дисупституисаних-5-фенилхидантоина на пређено растојање у комори у току шест консекутивних петоминутних интервала.* $P < 0,05$ упоређено са **VEH** † $P < 0,05$ упоређено са једињењем **3.25**.

У наставку истраживања, извршена је рендгенска структурна анализа три једињења (**3.25**, **3.35** и **3.37**) да би се испитала аналогија између међумолекулских интеракција у кристалном стању и интеракција са биолошким рецептором, које су одговорне за њихову антиконвулзивну активност. Иако проучавање конформационих својстава једињења у небиолошким условима не одражава нужно *in vivo* ситуације, кристалографски подаци могу да укажу на њихове вероватне конформације [169]. Пошто између молекула хидантоина постоје водоничне везе и липофилне интеракције, окружење у кристалном паковању може да апроксимира биолошко циљно место њиховог деловања [170].

Кристалографски подаци су приказани у табели 3.14. Молекулске структуре једињења **3.25**, **3.35** и **3.37** су представљене на слици 3.7. Дужине веза и углови хидантоинског прстена су слични код свих једињења. Вредност торзионог угла N1, C5, C6, C7 код фенитоина износи само 2° [52], док су одговарајући углови код једињења **3.25**, **3.35** и **3.37** $6.4(3)$, $-22.6(4)$ и $-12.8(3)^\circ$, респективно. Познато је да оријентација фенил-групе у положају 5 утиче на антиконвулзивну активност. Вредности торзионог угла фенил-групе код конформација минималне енергије најактивнијих деривата хидантоина налазе се између -11 и 11° [166]. Једино код једињења **3.25** вредност торзионог угла припада овом опсегу и ово једињење има оптимална фармаколошка својства.



Слика 3.7 Молекулске структуре једињења **3.25** (a), **3.35** (b) и **3.37** (c) са ознакама атома (елипсоиди су приказани са вероватноћом од 40 %). Атоми водоника су приказани као мале сфере произвољног пречника. Код **3.37**, постоје два пара неуређених атома C14A/C14B и C15A/C15B са окупацијама од 0,5.

Табела 3.14 Кристалографски подаци за једињења 3.25, 3.35 и 3.37

Једињење	3.25	3.35	3.37
Хемијска формула	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₂
M_r	246.30	246.30	258.31
Изглед кристала	плочаст, безбојан	блок, безбојан	плочаст, безбојан
Кристални систем	моноклинични	моноклинични	ромбични
Просторна група	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$Pbca$
a (Å)	7,7724(10)	14,748(2)	16,3379(6)
b (Å)	20,220(3)	8,4420(11)	6,2509(2)
c (Å)	8,6004(11)	11,0540(13)	28,3984(18)
β (°)	90,045(12)	94,583(14)	–
V (Å ³)	1351,6(3)	1371,9(3)	2900,2(2)
Z	4	4	8
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1,210	1,193	1,183
$F(000)$	528	528	1104
$\mu(\text{Mo } K\alpha)$ (mm ⁻¹)	0,082	0,081	0,079
Гранични Милерови индекси	$-9 \leq h \leq 6$	$-18 \leq h \leq 17$	$-19 \leq h \leq 17$
	$-23 \leq k \leq 24$	$-9 \leq k \leq 10$	$-7 \leq k \leq 4$
	$-9 \leq l \leq 10$	$-13 \leq l \leq 10$	$-34 \leq l \leq 32$
Рефлексије измерене/ независне	5943/2571 ($R_{\text{int}} = 0,0860$)	5723/2806 ($R_{\text{int}} = 0,0625$)	6686/2749 ($R_{\text{int}} = 0,0418$)
Примећене рефлексије/ограни чења/ параметри утачњавања	1698 / 0 / 166	1598 / 1 / 167	2056 / 4 / 181
Фактор слагања F^2	1,037	1,019	1,170
$R [I > 2\sigma(I)]$	$R_1 = 0,0636;$ $wR_2 = 0,0996$	$R_1 = 0,0727;$ $wR_2 = 0,1948$	$R_1 = 0,0726;$ $wR_2 = 0,1507$
R (сви подаци)	$R_1 = 0,1097;$ $wR_2 = 0,0854$	$R_1 = 0,1276;$ $wR_2 = 0,1623$	$R_1 = 0,0992;$ $wR_2 = 0,1393$
$\Delta\rho_{\text{max}}/\Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,118/-0,135	0,430/-0,269	0,205/-0,175

Водоничне N–H...O везе одређују кристално паковање једињења 3.25, 3.35 и 3.37 (табела 3.15). На овај начин, код 3.35 се формирају ланци дуж c -осе, а код 3.37 дуж b -осе (слика 3.8 b) и c) респективно). Ланци код 3.35 се умрежавају у тродимензионалну структуру преко слабих π - π интеракције типа "лицем у лице" (енг. face to face) између фенил-група суседних молекула (растојање центроид–центроид износи око 3.80 Å). На овај начин, паралелно са равни bc образују се хидрофилни и хидрофобни слојеви.

Водоничне везе присутне су у хидрофилним слојевима. Постоје две врсте наизменичних хидрофобних слојева у којима су π - π интеракције или Вандервалсове силе.

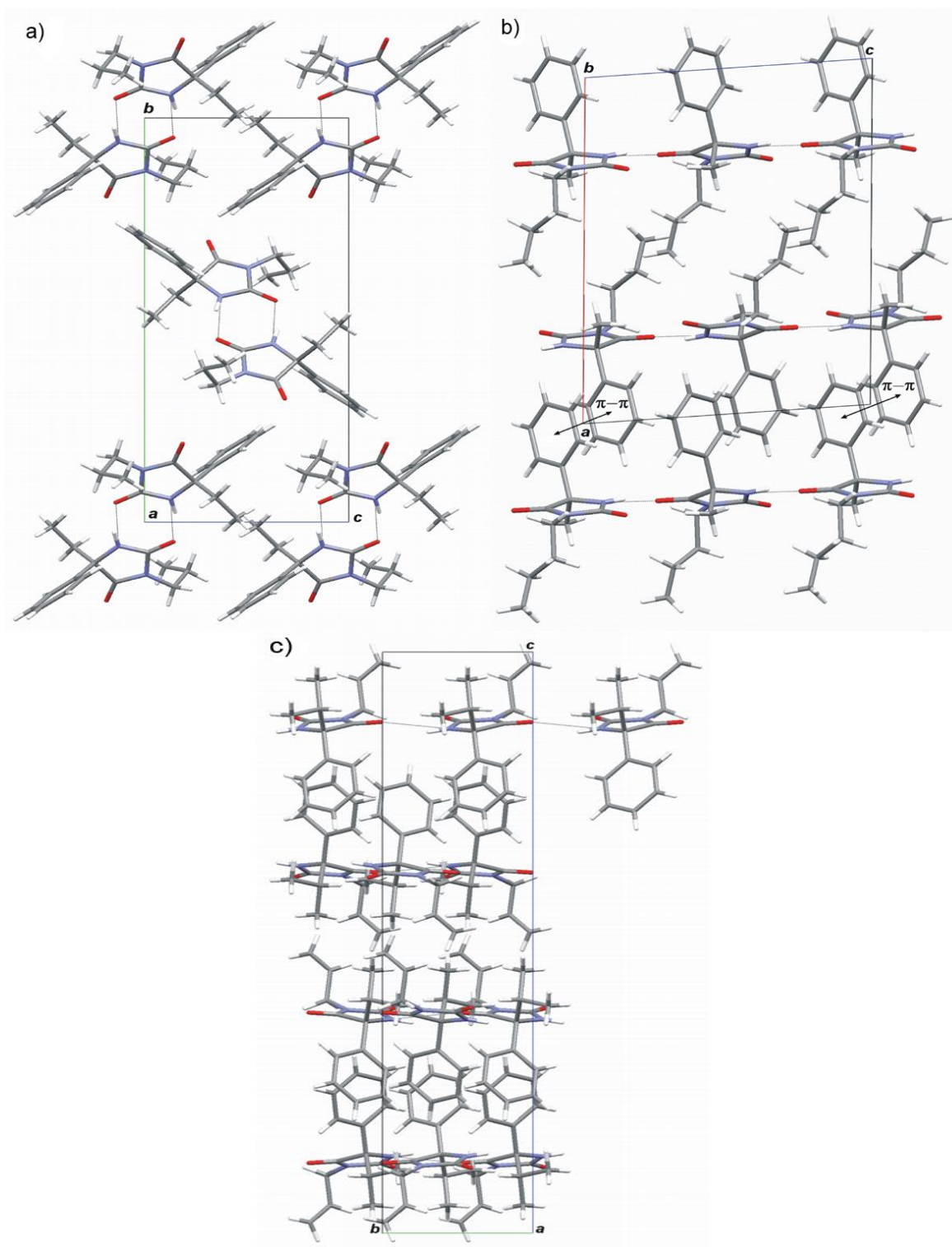
Кристално паковање једињења **3.25** је потпуно другачије (табела 3.14 и слика 3.8 a)): водоничне N-H...O везе између суседних молекула формирају центросиметричне R²₂(8) димере дуж *b*-осе. Специфична фармакокинетичка својства једињења **3.25** у поређењу са **3.35** и **3.37** вероватно су последица постојања центросиметричних димера.

Табела 3.15 Геометрија водоничних веза код **3.25**, **3.35** и **3.37**

Бр. јед.	D-H...A	<i>d</i> (D-H) (Å)	<i>d</i> (H...A) (Å)	<i>d</i> (D...A) (Å)	D-H...A (°)
3.25	N1-H1...O1 ¹	0,86	2,018	2,858(3)	165
3.35	N1-H1...O2 ²	0,86	2,034	2,842(3)	156
3.37	N1-H1...O2 ³	0,86	2,093	2,902(2)	157

Симетријски еквивалентни положаји: (1) $-x+2, -y, -z$; (2) $x, -y+1/2, z+1/2$; (3) $x, y-1, z$.

Пошто деривати хидантоина са сличним вредностима $\log P$ испољавају различита фармаколошка својства, може се претпоставити да се везују за специфично место на натријумским каналима. Резултати овог истраживања показују да једињење **3.25** поседује антиконвулзивну активност која може да се пореди са фенитоином и, при томе, испољава мање седативне ефекте. Будућа истраживања требало би да буду усмерена на проучавање могућности да дериват **3.25** изазива ефекте који ограничавају клиничку употребу фенитоина.



Слика 3.8 Кристално паковање једињења **3.25** дуж *a*-осе које показују центросиметричне димере једињења **3.37** дуж *a*-осе (*a*), једињења **3.35** дуж *b*-осе (*b*) и једињења **3.37** дуж *a*-осе (*c*). Водоничне везе су приказане испрекиданим линијама. Код једињења **3.37**, приказана је само половина неуређених алил-група и истакнут је један ред молекула повезаних водоничном везом у горњем делу.

3.4. Утицај структуре на антипролиферативну и антибактеријску активност 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина

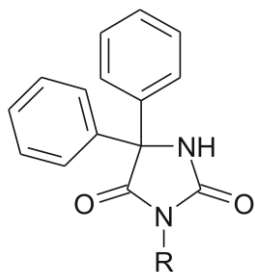
Канцер је једна од најразорнијих болести данашњице, коју карактерише неконтролисани раст (пролиферација) ћелија, које се инфилтрирају у нормално ткиво и разарају га и, при томе, се расејавају по организму. Иако је учињен напредак у дијагностици ових обољења, хируршким техникама, нези пацијената и адјувантним терапијама, већина смртних случајева је последица метастаза. Неколико истраживања се бави применом деривата хидантоина у лечењу канцера [171, 172]. Спиромустин, азотни иперит који садржи хидантоинско језгро, продире кроз крвно-мождану баријеру и усмерава транспорт лека ка тумору мозга [173]. Карми (Carmi) и сарадници су показали да се 5-бензилиденхидантоини понашају као изостери 4-анилинохиназолина, који инхибира тирозин киназу епидермалног фактора раста и користи се у третману канцера плућа [174, 175]. Они су додатно указали да је присуство ароматичне групе у положају 5 хидантоинског дела молекула неопходно за ефикасне интеракције са молекулским циљевима. Ананда Кумар (Ananda Kumar) и сарадници су проучавали антипролиферативне ефекте диазаспиробициклохидантоина према ћелијским линијама леукемије K562 и СЕМ и утврдили да се антипролиферативни ефекат једињења смањује у низу алкен > естар > етар, када се одговарајући супституенти са овим функционалним групама уведу у положај 3 [176, 177]. До сличног закључка се дошло у упоредној студији цитотоксичности аминокиселинских деривата хидроксиуреа и хидантоина. Најбољу антипролиферативну активност поседују деривати велике липофилности са циклоалкил-, фенил- и бензхидрил-групом [178].

Прикупљање детаљних структурних и фармаколошких података олакшава разумевање утицаја структуре на активност и омогућава моделовање нових деривата са повећаном антипролиферативном активношћу. У овом делу истраживања [179], испитивана је серија од дванаест деривата фенитоина који поседују алкил- (метил, етил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил и бензил), алкенил- (алил), етарску (етоксиметил, бензилоксиметил), естарску (ацетоксиметил) или алканоил- (бензоил) групу у положају 3 (табела 3.16). Одређена је њихова антипролиферативна активност према ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева НСТ-116. Оваквим модификовањем структуре фенитоина добијени су деривати који испољавају различите

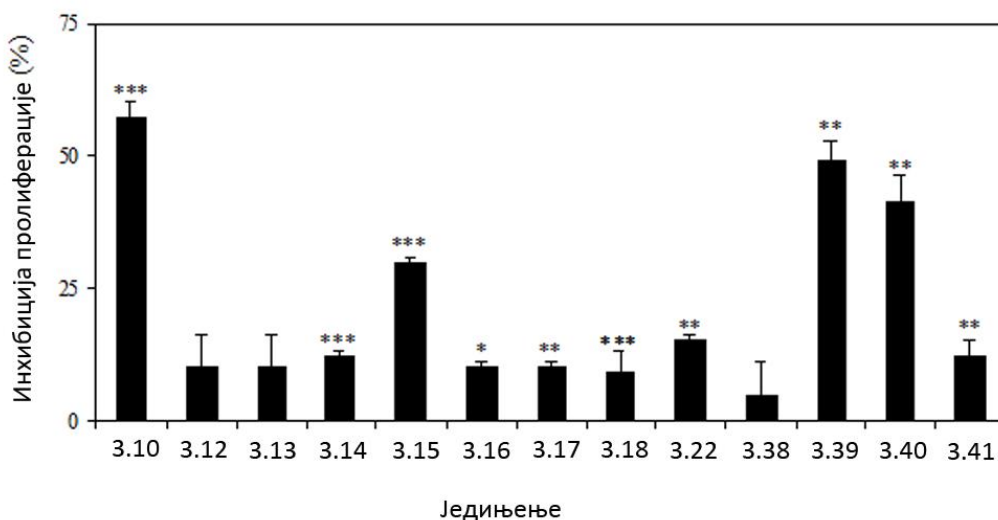
степене антиконвулзивне активности. Пупер и сарадници су утврдили да се MES-активност смањује када се хидантоински прстен *N*-метилује [77]. 3-Алкоксиметил деривати су активни против електрично и хемијски индукованих конвулзија [152, 180]. Са друге стране, 3-ацетоксиметил-5,5-дифенилхидантоин има ефекат, као и фенитоин, на сузбијање електрично индукованих конвулзија, али је неактиван против хемијски индукованих конвулзија [181].

Табела 3.16 Хемијске структуре и антиконвулзивни ефекти проучаваних једињења

Бр. јед.	R	MES ED ₅₀ (mg kg ⁻¹) ^a
3.10	H	≈7,5 [152]
3.12	CH ₃	39,6 [77]
3.13	C ₂ H ₅	-
3.14	<i>n</i> -C ₃ H ₇	-
3.15	<i>i</i> -C ₃ H ₇	-
3.16	<i>n</i> -C ₄ H ₉	-
3.17	CH ₂ =CHCH ₂	30,4 [182]
3.18	<i>i</i> -C ₄ H ₉	-
3.22	C ₆ H ₅ CH ₂	>200 [152]
3.38	C ₂ H ₅ OCH ₂	-
3.39	C ₆ H ₅ CH ₂ OCH ₂	>25 [180]
3.40	CH ₃ OCOCH ₂	<12,5 [152]
3.41	C ₆ H ₅ CO	-

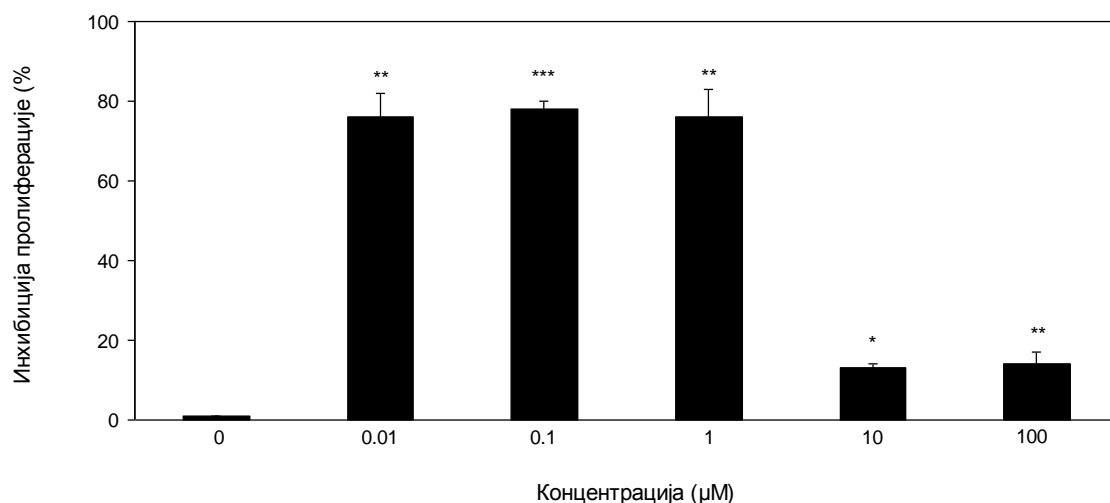


Сви проучавана једињења, изузев **3.12**, **3.13** и **3.38**, поседују статистички значајну антипролиферативну активност према ћелијској линији хуманог карцинома дебелог црева НСТ-116 у концентрацији од 100 μМ (слика 3.9). Једињење **3.22** је активно и у концентрацијама од 0,01, 0,1, 1 и 10 μМ (слика 3.10), а једињење **3.16** у концентрацији од 10 μМ. Аналогно, валпроати (деривати валпроинске киселине) показују сличну дозну зависност антипролиферативне активности према ћелијским линијама гастроинтестиналног ендокрина и карциноида [183, 184]. Валпроинска киселина (2-пропилпентанска киселина) је релативно једноставна масна киселина чија је антиконвулзивна активност блиска активности фенитоина.



Слика 3.9 Антипролиферативни учинци проучаваних 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина у концентрацији од 100 μM

Увођење супституената у положај 3 производи тренд промене антипролиферативне активности, који је сличан променама антиконвулзивне активности. *N*-Алкиловањем се смањује способност успостављања водоничних веза код деривата **3.12–3.18** при чему се смањује и њихова антипролиферативна активност у концентрацији од 100 μM . Постепено повећање величине алкил-групе доводи до блажег смањења активности једињења, уз изузетак изопропил-групе. Даље, једињења **3.39** и **3.40**, потентни антиконвулзиви, испољавају антипролиферативни ефекат, која је сличан матичном једињењу **3.10**. Неочекивана активност деривата **3.22** у ниским концентрацијама указује да релативна активност проучаваних деривата фенитоина не зависи само од физичко-хемијских својстава супституента у положају 3. Може се претпоставити да се деривати са бензил-групом (**3.22** и **3.39**) добро уклапају у молекулске циљеве, што није случај са дериватом који поседује релативно круту бензоил-групу (**3.41**).



Слика 3.10 Антипролиферативни учинак једињења **3.22**

Пошто деривати хидантоина који поседују ароматичне и хетероцикличне супституенте у положају 3 испољавају антибактеријску активност [185], додатно је одређена активност проучаваних деривата фенитоина према *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и клиничким изолатима *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus* (табела 3.17). Једино једињења **3.15** и **3.22** испољавају слабу антибактеријску активност према грам-позитивној бактерији *E. faecalis* и грам-негативним бактеријама *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli* (клинички изолати). Активни деривати испољавају најбоље ефекте према *E. coli*.

Пошто је цитохром P450 одговоран за метаболизам широког спектра лекова, Сузуки (Suzuki) и сарадници су, између осталог, тестирали инхибиторну способност једињења **3.15** и **3.22** према рекомбинантним ензимима CYP2C19 и CYP2C9 да би испитали њихове интеракције са активним местима ензима [186]. Метаболичко профилисање је указало да се 3-бензил дериват везује за активно место CYP2C19 преко своје фенил-групе у положају 5, која је оријентисана према активном кисеонику, и бензил-групе, која се смешта у хидрофобни џеп рецептора. Из тога следи да су оваква структурна својства, између осталог, одговорна за биолошке ефекте деривата **3.22**. Штавише, неколико примера из литературе указује да је бензил-група на атому азота амидне групе фармакофора, која је карактеристична за једињења која испољавају антипролиферативну активност [187–189]. Потребно је да се утврди молекулска основа биолошке активности једињења **3.22**, па су експерименти чији је циљ дефинисање његовог механизма деловања тренутно у току.

Табела 3.17 Антибактеријска активност 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина

Бр. јед.	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>E. Coli</i>			<i>P. mirabilis</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>S. aureus</i> ATCC 25923			<i>S. aureus</i>		
	<i>IZ</i> ^a	<i>MIC</i> ^b	<i>MBC</i> ^c	<i>IZ</i> ^a	<i>MIC</i> ^b	<i>MBC</i> ^c	<i>IZ</i> ^a	<i>MIC</i> ^b	<i>MBC</i> ^c	<i>IZ</i> ^a	<i>MIC</i> ^b	<i>MBC</i> ^c	<i>IZ</i> ^a	<i>MIC</i> ^b	<i>MBC</i> ^c	<i>IZ</i> ^a	<i>MIC</i> ^b	<i>MBC</i> ^c	<i>IZ</i> ^a	<i>MIC</i> ^b	<i>MBC</i> ^c
3.10	-	> 1000	>1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.12	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.13	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.14	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.15	21,25 ± 1,50	250	>500	23,00 ±0,00	125	125	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	21,00 ±0,00	250	500	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.16	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.17	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.18	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	18,75 ±1,50	500	500	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.22	20,05 ± 2,28	500	>500	20,50 ± 0,71	250	250	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.38	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.39	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.40	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000
3.41	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000	-	> 1000	> 1000

^aзона инхибиције (mm); ^bминимална инхибирајућа концентрација (μM); ^cминимална бактерицидна концентрација (μM)

4. Закључак

1. У циљу проучавања утицаја структуре на фармаколошку активност деривата хидантоина у овом раду су синтетисане две серије једињења:

а) 5-супституисани-5-фенилхидантоини обухватају 11 деривата, код којих су различите алкил-, циклоалкил- и арил-групе (метил, етил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *tert*-бутил, циклопентил, циклохексил, фенил и бензил) уведене у положај 5 хидантоинског прстена;

б) 3,5-дисупституисани-5-фенилхидантоини обухватају 25 деривата, код којих су различите алкил-, циклоалкил-, алкенил- и арил-групе (метил, етил, *n*-пропил, изопропил, алил, *n*-бутил, изобутил, *tert*-бутил, циклопентил, циклохексил, фенил и бензил) уведене у положаје 3 и 5 хидантоинског прстена.

На овакав избор једињења утицала је чињеница да се деривати 5-фенилхидантоина (нпр. фенитоин, мефенитоин, етоин) традиционално користе у лечењу епилепсије и срчане аритмије и, при томе, испољавају додатне биолошке ефекте. Сва проучавана једињења су синтетисана према поступцима из литературе или њиховим модификацијама и окарактерисана одређивањем температуре топљења и UV, FTIR, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопијом, а њихова чистоћа је утврђена помоћу HPLC-а. Апсорпциони максимуми проучаваних једињења одређени су у 15 растварача различите поларности у опсегу таласних дужина од 200 до 400 nm. Апсорпционе спектре карактерише једна трака са благим превојем на страни ниже енергије. Резултати квантохемијских израчунавања показују да најинтензивније апсорпције потичу од интрамолекулског трансфера електронске густине са хидантоинског прстена на фенил-групу.

2. Квантитативна процена утицаја растварача на померање апсорпционих максимума проучаваних једињења у изабраном сету растварача извршена је применом метода линеарне корелације енергије солватације (LSER), односно Камлет–Тафтовом једначином. Резултати корелационе анализе показују да се ефекти солватације могу успешно раздвојити на доприносе специфичних и неспецифичних интеракција између молекула растварача и растворене супстанце. Наиме, солватохромизам проучаваних једињења потиче у већој мери од водоничног везивања него од класичних ефеката солватације. Апсорпциони максимуми се батохромно померају са повећањем диполарности/поларизабилности растварача што је карактеристично за процесе у којима се интрамолекулски трансфер наелектрисања одиграва. Са друге стране,

водоничне везе се успостављају између имидног дела хидантоинског прстена и молекула растварача. Такође, може се закључити да проучавана једињења постоје у облику лактам-таутомера у раствору.

3. Анализа ефеката солватације на апсорпционе спектре је у овом раду први пут искоришћена за поређење физичко-хемијских и биолошких процеса у којима се успостављају поларне интеракције између серије једињења и специфичне кондензоване фазе. Липофилности проучаваних једињења одређене су израчунавањем $\log P$ вредности применом програмског пакета ACD Solaris v. 4.67, а молекулски дескриптори, који описују одговарајућа ADMET својства, применом програмског пакета ChemSilico. Стерни ефекти липофилних супституената на хидантоинском прстену и протон-акцепторска својства молекула утичу на њихово расподељивање у систему *n*-октанол/вода, као и на интестиналну апсорпцију, пенетрацију кроз крвно-мождану баријеру и везивање за протеине плазме. Иако се заснивају на спектрофотометријским мерењима, постављене корелационе једначине интерпретирају утицај структуре на липофилност и ADMET својства проучаваних једињења у складу са Абрахамовим моделом солватације, који је општеприхваћен у литератури. Ослањајући се на Абрахамов приступ у процени солватације, у овом раду приказана је и дискутована веза између фармаколошки релевантних својстава и различитих типова интеракција између молекула растварача и растворене супстанце. Солватохромна својства деривата хидантоина су први пут опсежно проучавана у овој дисертацији. Добијени резултати су значајни за потпуније дефинисање општег фармакофорног модела молекула антиконвулзива. Модели проистекли из овог рада ће допринети бољем сагледавању активности деривата хидантоина и бољем разумевању механизма њиховог деловања.

4. Тропараметарска Ханшова једначина је примењена за прелиминарну анализу односа структуре и активности осам 5-супституисаних-5-фенилхидантоина, чије су MES-активности одређене у литератури. Резултати корелационе анализе показују да се антиконвулзивна активност проучаваних једињења повећава увођењем електрон-акцепторских супституената у положај 5 хидантоинског прстена. Такође, може се закључити да велики супституенти образују хидрофобни закљон, који штити водоничне везе између хидантоинског прстена и β -спирале протеинског сегмента рецептора од екструзије воде.

5. Антikonвулзивне активности четири 3,5-дисупституисана хидантоина одређене су на пацовима у s. c. PTZ и i.v. PTZ тестовима, а потенцијал изазивања седације у тесту спонтане локомоторне активности (SLA). Пошто деривати сличних липофилности испољавају различите антионвулзивне ефекте, може се закључити да се везују за специфично место на натријумским каналима. Рендгенска структурна анализа три једињења је показала да постоји аналогија између међумолекулских интеракција у кристалном стању и интеракција са биолошким рецепторима, које су одговорне за антikonвулзивну активност. Једино код 3-*n*-пропил-5-етил-5-фенилхидантоина, величина торзионог угла између хидантоинског прстена и фенил-групе налази се у опсегу вредности које су карактеристичне за најактивније деривате хидантоина. Такође, ово једињење поседује антikonвулзивну активност која се може поредити са фенитоином и, при томе, испољава мање седативне ефекте. Даље истраживање требало би да буде усмерено на проучавање његових потенцијала да изазива ефекте који ограничавају клиничку употребу фенитоина.

6. Антипролиферативна активност према ћелијској линији хуманог карцинома колоне НСТ-116 одређена је за дванаест 3-супституисаних-5,5-дифенилхидантоина. Скоро сва једињења поседују значајну антипролиферативну активност у концентрацији од 100 μ M. Утврђено је да увођење супституената у положај 3 производи тренд промене антипролиферативне активности, који је сличан тренду код антikonвулзивне активности у односу на фенитоин. Дериват са бензил-групом поседује значајну активност и у нижим концентрацијама.

7. Додатно су одређени и антибактеријски учинци проучаваних једињења према *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и клиничким изолатима *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*. Једино 3-изопропил и 3-бензил деривати поседују слабу антибактеријску активност према грам-позитивној бактерији *E. faecalis* и грам-негативним бактеријама *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli*.

8. Резултати остварени у овој дисертацији доприносе проширењу фундаменталних знања из области синтезе, структуре и активности деривата хидантоина, потпунијем дефинисању општег фармакофорног модела молекула антikonвулзива и бољем разумевању механизма њиховог деловања. Добијени резултати показују да су проучавана једињења испунила фармакокинетичке

услове да буду кандидати за лекове и квалификовали се за фармакодинамичку фазу испитивања.

5. Литература

- [1] Baeyer, A. *Ann.* **1861**, *117*, 178.
- [2] Strecker, A. *Ann.* **1870**, *155*, 177.
- [3] Zha, C.; Brown, G. B.; Brouillette, W. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6519.
- [4] Scholl, S.; Koch, A.; Henning, D.; Kempeter, G.; Kleinpeter, E. *Struct. Chem.* **1999**, *10*, 355.
- [5] Knabe, J.; Baldauf, J.; Anhlem, A. *Pharmazie* 1997, **52**, 912
- [6] Anger, T.; Madge, D. J.; Mulla, M.; Riddal, D. *J. Med. Chem.* 2001, **44**, 115.
- [7] Kleinpeter, E. *Struct. Chem.* **1997**, *8*, 161.
- [8] Rodgers, T. R.; LaMontagne, M. P.; Markovac, A. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 591.
- [9] Wezneck, E. *Deut. Med. Wochschr.* **1916**, *42*, 1193
- [10] Merritt, H. H.; Putnam, T. J. *J. Am. Med. Assoc.* **1938**, *111*, 1068
- [11] Porret, D. *Makromol. Chem.* **1967**, *108*, 73
- [12] Albert, A. *Heterocyclic Chemistry*; The Athlone Press/University of London: London, 1959; str. 153.
- [13] Bausch, M. J.; David, B.; Dobrowolski, P.; Prasad, V. J. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5806.
- [14] Rosenberg, L. S.; Jackson, J. L. *Drug Der. Ind. Pharm.* **1989**, *15*, 373.
- [15] Stuckey, R. E. *J. Chem. Soc.* **1947**, *169*, 331.
- [16] Meijer, E. M.; Boesten, W. H. J.; Schaemaker, H. E.; Van Balken, J. A. M. u *Biocatalysis in Organic Synthesis*; Tramper, J.; Van der Plas, H. C.; Linko, P. Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1985; str. 135.
- [17] Ware, E. *Chem. Rev.* **1950**, *46*, 403.
- [18] Orazi, O. O.; Corral, R. A.; Schuttenberg, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1983**, 761.
- [19] Orazi, O. O.; Corral, R. A. *Experimentia* **1965**, *21*, 508.
- [20] López-Alvarado, P.; Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6875.
- [21] Edwards, J. T.; Lantos, I. *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 1925.
- [22] Salmon, M. R.; Kozlowski, A. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 2279.
- [23] Garliardi, D. D.; Jutras, W. J. US 2,955,057 Oktobar 4, 1960.
- [24] Moriya, T.; Hagio, K.; Yoneda H. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1891.
- [25] Nagase, S. *Nippon Kagaku Zasshi* **1960**, *81*, 938.
- [26] Daboun, H. A. F.; Abdou, S. E.; Hussein, M. M.; Elnagdi, M. H. *Synthesis* **1982**, *6*, 502.
- [27] Cortes, J.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2247.
- [28] de la Cuesta, E.; Ballesteros, P.; Trigo, G. G. *Heterocycles* **1981**, *16*, 1647.

- [29] Read, W. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1922**, *44*, 1746.
- [30] Chemische Fabrik von Heyden DE 310,427, Januar 30, 1919.
- [31] Menéndez, J. C.; Díaz, M. P.; Bellver, C.; Söllhuber, M. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 61.
- [32] Sarges, R.; Howard, H. R.; Kelbaugh, P. R. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4081.
- [33] Ugi, I. *Angew. Chem.* **1962**, *74*, 9.
- [34] Espada, M. *Farmaco (Sci. Ed.)* **1990**, *45*, 1237.
- [35] Knabe, J.; Wutton, W. *Arch. Pharm.* **1980**, *313*, 538.
- [36] Icli, S.; Colebrock, L. D. *J. Pure Appl. Sci.* **1976**, *9*, 39.
- [37] Ohashi, T.; Takahashi, S.; Nagamachi, T.; Yoneda, K.; Yamada, H. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 831.
- [38] Dumbris, S. M.; Díaz, D. J.; McElwee-White, L. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8862.
- [39] McCusker, J. E.; Logan, J.; McElwee-White, L. *Organometallics*, **1998**, *17*, 4037.
- [40] Edward, J. T.; Jitransgri, C. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 3339.
- [41] Trigo, G. C.; Avendaño, C.; Santos, E.; Edward, J. T.; Wong, S. C. *J. Chem. Soc.* **1979**, *57*, 1456.
- [42] Biltz, H. *Ber.* **1908**, *41*, 1379.
- [43] Poupaert, J. H.; De Keysler, J. L.; Vandervorst, D.; Dumont, P. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1984**, *93*, 493.
- [44] Muccioli, G. G.; Poupaert, J. H.; Wouters, J.; Norberg, B.; Poppitz, W.; Scriba, G. K. E.; Lambert, D. M. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1301.
- [45] Reagan, L. P.; McKittrik, C. R.; McEwan, B. S. *Neuroscience* **1999**, *91*, 211.
- [46] Carrington, H. C. *J. Chem. Soc.* **1947**, 681.
- [47] Volonterio, A.; Ramirez de Arellano, C.; Zanda, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2161.
- [48] Khorana, H. G. *J. Chem. Soc.* **1952**, 2081.
- [49] Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moor, P. K. *Farmakologija*, Peto izdanje, Data status: Novi Sad, 2003; str. 550–561.
- [50] Scott, K. R.; Abraham, D., Ed, *Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery*; Sixth Edition, Vol. 6, John Wiley & Sons: New York, 2003; str. 265–273.
- [51] Camerman, A.; Camerman, N. *Science* **1970**, *168*, 1457.
- [52] Camerman, A.; Camerman, N. *Acta Cryst. B* **1971**, *27*, 2205.
- [53] Camerman, A.; Camerman, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 268.
- [54] Coddington, P. W.; Lee, T. A.; Richardson, J. F. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 649.

- [55] Jones, G. L.; Amato, R. J.; Wimbish, G. H.; Peyton, G. A. *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 618.
- [56] Wong, M. G.; Defina, J. A.; Andrews, P. R. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 562.
- [57] Sternbach, L. H.; Sancilio, F. D.; Blount, J. F. *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 374.
- [58] Meldrum, B. S. *Epilepsia* **1977**, *38*, 7.
- [59] AHFS Drug Information, American Society of Health-System Pharmacists, 2003, str. 2109–2115.
- [60] Wong, P. T. –H.; Tan, S. –F; Lee, H. –S. *Japan. J. Pharmacol.* **1988**, *48*, 473.
- [61] Hammett, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 96.
- [62] Unger, S. H.; Hansch, C. *Progr. Phys. Org. Chem.* **1976**, *12*, 91.
- [63] Silipo, C.; Vittoria, A. *Farmaco, Ed. Sci.* **1979**, *34*, 858.
- [64] Lien, E. J.; Guo, Z. –R.; Li, L. –R.; Su, C. –T. *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 641.
- [65] Li, W. –Y.; Guo, Z. –R.; Lien, E. J. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 553.
- [66] Seiler, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1974**, *9*, 473.
- [67] Hansch, C.; Vittoria, A.; Silipo, C.; Jow, P. Y. C. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 546.
- [68] Taft, R. W.; Gurka, D.; Joris, L.; von R. Schleyer, P.; Rakshys, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4801.
- [69] Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 16.
- [70] H. Kubinyi, QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches, R. Mannhold, P. Krogsgaard-Larsen, H. Timmerman (eds) *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Vol. 1, VCH, Weinheim, 1993, str. 28.
- [71] Herbette, L. G.; Chester, D. W.; Rhodes, D. G. *Biophys. J.* **1986**, *49*, 91.
- [72] Rhodes, D. G.; Chester, D. W.; Herbette, L. G. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 869.
- [73] Seydel, J. K.; Cordes, H. –P.; Wiese, M.; Chi, H.; Croes, N.; Hanpft, R.; Lüllmann, H.; Mohr, K.; Patten, M.; Padberg, Y.; Lüllmann-Rauch, R.; Vellguth, S.; Meindl, W. R.; Schönenberger, H. *Quant. Struct.–Act. Relat.* **1989**, *8*, 266.
- [74] Seydel, J. K.; Albores Velasco, M.; Coats, E. A.; Cordes, H. P., Kunz, B.; Wiese, M. *Quant. Struct.–Act. Relat.* **1992**, *11*, 205.
- [75] Schweizer, R. J. *Receptor Res.* **1991**, *11*, 45.
- [76] Smythies, J. R. Receptor modeling for anticonvulsant and convulsant drugs. U *Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action*; Glaser, G. H.; Penry, J. K.; Woodbury, D. M., Ed.; Raven Press: New York, 1980; str. 207–222.
- [77] Poupaert, J. H.; Vandervorst, D.; Guiot, P.; Moustafa, M. M. M.; Dumont, P. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 76.

- [78] Wynberg, H.; Niewpoort, W. C.; Jonkman, H. T. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *46*, 4623.
- [79] Rump, S.; Ilczuk, I.; Rabsztyn, T.; Walczynna, K. *Pharmazie* **1980**, *36*, 780.
- [80] Cortes, S.; Liao, Z. -K.; Watson, D.; Kohn, H. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 601.
- [81] Dähne, S.; Moldenhauer, F. *Progr. Phys. Org. Chem.* **1966**, *70*, 618.
- [82] Fabian, J.; Hartmann, H. *J. Mol. Struct.* **1975**, *27*, 67.
- [83] Radeaglia, R.; Dähne, S. *J. Mol. Struct.* **1970**, *5*, 399.
- [84] Gallagher, S. H.; Armstrong, R. S.; Lay, P. A.; Reed, C. A. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 5817.
- [85] Abe, T.; Abboud, J. -L.; Belio, F.; Bosch, E.; Garcia, J. I., Mayoral, J. A.; Notario, R.; Ortega, J.; Rosés, M. *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 193–200.
- [86] Lougnot, D. J.; Brunero, P.; Fouassier, J. P.; Faure, J. *J. Chim. Phys. Phys. -Chim. Biol.* **1982**, *79*, 343.
- [87] Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T.; Bohlmann, F. *Liebigs Ann. Chem.* **1963**, *661*, 1.
- [88] Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.
- [89] Epley, T. D.; Drago R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5770.
- [90] Mayer, V.; Gutmann, V.; Gerget, W. *Monatsh. Chem.* **1975**, *106*, 1235.
- [91] Drago, R. S. *Applications of Electrostatic-Covalent Models in Chemistry*; Scientific Publishers; Gainesville, FL, 1994.
- [92] Koppel, I. A.; Palm, V. A. In *Advances in Linear Free Energy Relationships*; Chapman, N. B., Shorter, J., Eds.; Plenum Press: London, 1972: Chapter 5, str. 204–280.
- [93] Arnett, E. M.; Joris, L.; Mitchell, E.; Murty, T. S. S. R.; Gorrie, T. M.; Schleyer, P. V. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2365.
- [94] Maria, P. C.; Gal, J. F. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1296.
- [95] Kamlet, M. J.; Taft, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377.
- [96] Taft, R. W.; Kamlet, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2886.
- [97] Catalán, J.; Diaz, C.; López, V.; Perez, P.; de Paz, G. L. G.; Rodriguez, J. G. *Liebigs Ann.* **1996**, 1785.
- [98] Kirkwood, J. G. *J. Chem. Phys.* **1934**, *2*, 351.
- [98] Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486.
- [100] Kosower, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3253.

- [101] Brooker, L. G. S.; Craig, A. C.; Heseltine, D. W.; Jenkins, P. W.; Lincoln, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2443.
- [102] Dong, D. C.; Winnik, M. A. *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 2560.
- [103] Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Taft, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6027.
- [104] Drago, R. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1992**, 1827.
- [105] Catalán, J.; López, V.; Pérez, P.; Matin-Villamil, R.; Rodriguez, J. G. *Liebigs Ann.* **1995**, 241.
- [106] Kamlet, M. J.; Abboud, J. -L. M.; Abraham, M. H.; Taft R. W. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877.
- [107] Catalán, J.; Hopf, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4694.
- [108] Catalán, J. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5951.
- [109] Abraham, M. H.; Wittig, G. S.; Doherty, R. M.; Shuley, W. J.; *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II* **1990**, *2*, 1451.
- [110] Abraham, M. H., *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 2503.
- [111] Abraham, M. H.; Lieb, W. R.; Franks, N. P. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 719.
- [112] Dinčić, E.; Jovičić, A; Magdić, B.; Popović, P.; Đorđević, D.; Raičević, R. *Vojnosanit. Pregl.* **2002**, *59*, 633.
- [113] Mouritsen, O. G.; Jorgensen, K. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1507.
- [114] Hansch, C.; Björkroth, J. P.; Leo A. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 663.
- [115] Young, R. C.; Mitchell, R. C.; Brown, T. H.; Ganellin, C. R.; Griffiths, R.; Jones, M.; Rana, K. K.; Saunders, D.; Smith, I. R.; Sore, N. E.; Wilks, T. J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 656.
- [116] Seiler, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1974**, *9*, 473.
- [117] Abraham, M.; Chadha, H. S.; Mitchell, R. C. *Drug Des. Discov.* **1995**, *13*, 123.
- [118] Abraham, M.; Takács–Novák, K.; Mitchell, R. C. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 310.
- [119] Lombardo, F.; Blake, J. F.; Curatolo, W. J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4750.
- [120] Thamocharan, M.; Bawani, S. Z.; Zhou, X.; Adibi, S. A. *Am. J. Physiol.* **1999**, *276*, C821.
- [121] Swaan, P. W.; Koops, B. C.; Moret, E. E.; Tukker, J. J. *Receptor Channel* **1998**, *6*, 189.
- [122] Inui, K. I.; Yamamoto, M.; Saito, H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *261*, 195.
- [123] Palm, K.; Stenberg, P.; Luthman, K.; Artursson, P. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 568.
- [124] Abraham, M. J.; Le, J. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 868.

- [125] Zhao, Y.H.; Le, J.; Abraham, M. H.; Hersey, A.; Eddershaw, P. J.; Luscombe, C. N.; Boutina, D.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I.; Platts J. A. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 749.
- [126] Chiou, M. L.; Barve, A. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1792.
- [127] Zhao, Y. H.; Abraham, M. H.; Hersey, A.; Luscombe, C. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 939.
- [128] Murray, R. G.; Whitehead, D. M.; Le Strat, F.; Conway, S. J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 988.
- [129] Thompson, T. J.; Bedell, H. L.; Buffett, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, *47*, 874.
- [130] Chemische Fabrik von Heyden DE Patent 335 994 (1921).
- [131] Heymons, A.; Persch, W. GB Patent 823 517 (1959).
- [132] Tiffeneau, M.; Tchoubar, M. B.; Saiaslambert, M.; LeTellier-Dupre, M. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1947**, 445.
- [133] Novelli, A.; De Santis, A. M. *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 176.
- [134] Hoffmann, C. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1950**, 45.
- [135] Schlogl, K. *Monats. Chem.* **1958**, *89*, 532.
- [136] Testa, E.; Ettore, R. *Arch. Pharm.* **1957**, *290*, 532.
- [137] Chemische Fabrik, FR 769667 (1934)
- [138] Knabe, J. *Arch. Pharm.* **1980**, *313*, 538.
- [139] Sobahi, T. R.; Hassan, M. A.; Moustafa, H. A.; Bawaked, N. O. *JKAU*, **2008**, *20*, 85.
- [140] Skelly, P. D.; Ray, J. W.; Timberlake, J. W. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 267.
- [141] Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacobuzzo, C.; Guagliardi, A.; Burla, M. C.; Polidori, G.; Camalli, M. *J. Appl. Cryst.* **1994**, *27*, 435.
- [142] Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr. A* **2008**, *64*, 112.
- [143] Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837.
- [144] Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. J. *Comp. Aid. Mol. Des.* 2004, *18*,167; VegaZZ 2.3.1 <http://www.ddl.unimi.it>
- [145] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.;

- Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A.; Gaussian 03, Revision B.01, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.
- [146] Stewart, J. J. P.; MOPAC2009, Stewart Computational Chemistry, Version 10.153W, web: <http://OpenMOPAC.net>
- [147] <http://chemsilico.com>
- [148] Mandhane, S.N.; Aavula, K.; Rajamannar, T. *Seizure* **2007**, *16*, 636.
- [149] Savić, M. M.; Milinković, M. M.; Rallapalli, S.; Clayton, Sr T.; Joksimović, S.; Van Linn, M.; Cook, J. M. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2009**, *12*, 1179.
- [150] Perez, C.; Paul, M.; Bazerque, P. *Acta. Bio. Med. Exp.* **1990**, *15*, 113.
- [151] Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. *Methods* **2007**, *42*, 321.
- [152] Vida, J. A.; O’Dea, M.H.; Samour, C. M.; Reinhard, J. F. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 383.
- [153] Trišović, N.; Valentić, N.; Erović, M.; Đaković–Sekulić, T.; Ušćumlić, G.; Juranić, I. *Monatsch. Chem.* **2011**, *142*, 1227.
- [154] Đaković–Sekulić, T.; Despotović, V.; Ušćumlić, G. *J. Planar Chromat.* **2010**, *23*, 201.
- [155] Banjac, N.; Ušćumlić, G.; Valentić, N.; Mijin, D. *J. Solution Chem.* **2007**, *36*, 869.
- [156] Trišović, N.; Valentić, N.; Ušćumlić, G. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 62.
- [157] Komiya, I.; Park, J. Y.; Kamani, A.; Ho, N. F. H.; Higuchi, W. I. *Int. J. Pharm.* **1980**, *4*, 249.
- [158] Taylor, D. C.; Pownwall, R.; Burke, W. *J. Pharm. Pharmacol.* **1985**, *37*, 280.
- [159] Levin, V. A. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 682.
- [160] Hansch, C.; Björkroth, J. P.; Leo, A. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 663.
- [161] Peterson, G. M.; McLean, S.; Aldous, S.; von Witt, R. J.; Mollingen, K. S. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **1982**, *14*, 298.
- [162] Seedher, N.; Agarwal, P. *Ind. J. Pharm. Sci.* **2006**, *68*, 327.
- [163] Kratochwil, N. A.; Huber, W.; Müller, F.; Kansy, M.; Gerber, P. R. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 1355.
- [164] Brouillette, W. J.; Brown, G. B.; DeLorey, T. M.; Liang, G. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 871.

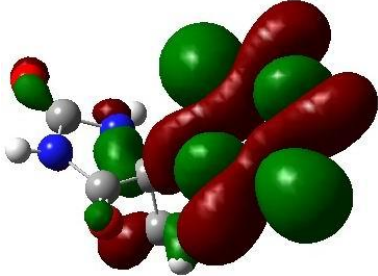
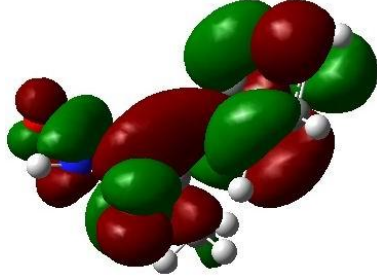
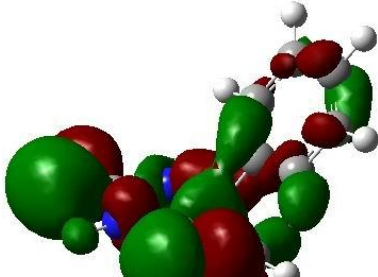
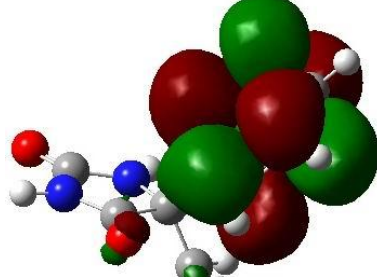
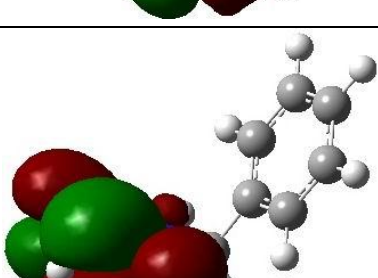
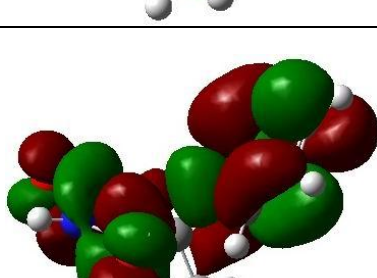
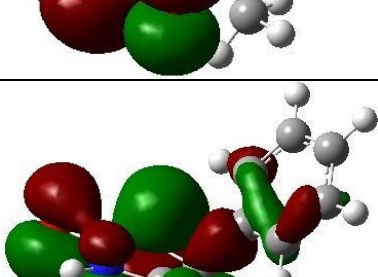
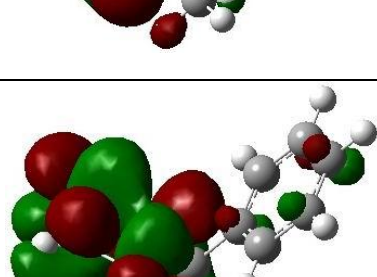
- [165] Trišović, N.; Timić, T.; Divljaković, J.; Rogan, J.; Poleti, D.; Savić, M. M.; Ušćumlić, *Monatsch. Chem.* predat za štampu.
- [166] Brown, M. L.; Brown, G. B.; Brouillette, W. J. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 602.
- [167] Sechi, G.; Rosati, G.; Deiana, G. A.; Petruzzi, V.; Deriu, F.; Correddu, P.; De Riu, P. L. *Brain Res.* **1997**, *764*, 230.
- [168] Lamberty, Y.; Klitgaard, H. *Epilepsy Behav.* **2000**, *1*, 256.
- [169] Dimmock, J. R.; Puthucode, R. N.; Smith, J. M.; Hetherington, M.; Quail, J. W.; Pugazhenthii, U.; Lechler, T.; Stables, J. P. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3984.
- [170] Jones, G. P.; Andrews, P. R. J. *Chem. Soc. Perkin Trans.* **1987**, 415.
- [171] Lesuisse, D.; Mauger, J.; Nemecek, C.; Maignan, S.; Boiziau, J.; Harlow, G.; Hittinger, A.; Ruf, S.; Strobel, H.; Nair, A.; Ritter, K.; Malleron, J. -L.; Dagallier, A.; El-Ahmad, Y.; Guilloteau, J. -P.; Guizani, H.; Bouchard, H.; Venot, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2224.
- [172] Fidler, I. J. *Semin. Cancer Biol.* **2002**, *12*, 89.
- [173] Shoemaker, D. D.; O'Dwyer, P. J.; Marsoni, S.; Plowman, J.; Davignon, J. P.; Davis, R. D. *Invest. New Drug.* **1983**, *1*, 303.
- [174] Carmi, C.; Cavazzoni, A.; Zuliani, V.; Lodola, A.; Bordi, F.; Plazzi, P. V.; Mor, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4021.
- [175] Cavazzoni, A.; Alfieri, R. R.; Carmi, C.; Zuliani, V.; Galetti, M.; Fumarola, C.; Frazzi, R.; Bonelli, M.; Bordi, F.; Lodola, A.; Mor, M.; Petronini, P. G. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 361.
- [176] Ananda Kumar, C. S.; Kavitha, C. V.; Vinaya, K.; Benaka Prasad, S. B.; Thimmegoweda, N. R.; Chandrappa, S.; Raghavan, S. C.; Rangappa, K. S. *Invest. New Drugs.* **2009**, *27*, 327.
- [177] Kavitha, C. V.; Mridula, N.; Ananda Kumar, C. S.; Bibha, C.; Muniyappa, K.; Rangappa, K. S.; Raghavan, S. C. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 348.
- [178] Opačić, N.; Barbarić, M.; Zorc, B.; Cetina, M.; Nagl, A.; Frković, D.; Kralj, M.; Pavelić, K.; Balzarini, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Ralić-Malić, S.; Mintas, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 475.
- [179] Trišović, N.; Božić, B.; Obradović, A.; Stefanović, O.; Marković, S.; Čomić, LJ.; Božić, B.; Ušćumlić, G. *J. Serb. Chem. Soc.* **2011**, *76*, 1597.
- [180] Samour, C. M.; Reinhard, J.; Vida, J. A. *J. Med. Chem.* **1970**, *14*, 187.
- [181] Vida, J. A.; Wilber, W. R. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 190.

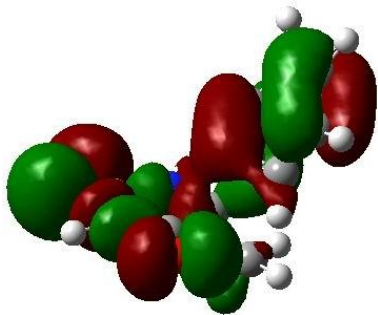
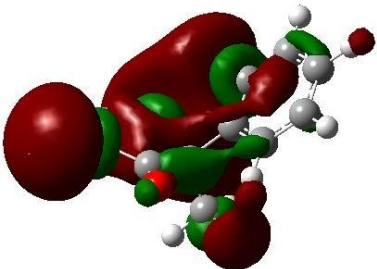
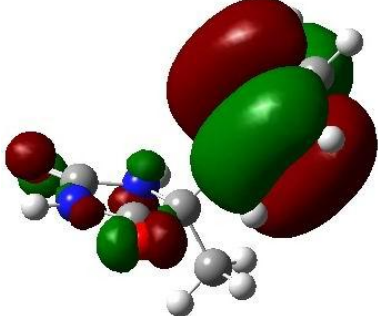
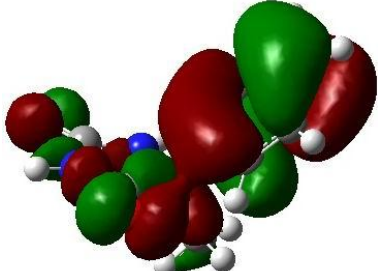
- [182] Sandberg, F. *Acta Physiol. Scand.* **1951**, *24*, 149.
- [183] Baradari, V.; Huether, A.; Höpfner, M.; Schuppan, D.; Scherübl, H. *Endocr. -relat. Cancer* **2006**, *13*, 1237.
- [184] Greenblatt, D. Y.; Vaccaro, A. M.; Jaskula-Sztul, R.; Ning, L.; Haymart, O. M.; Kunnimalaiyaan, M.; Chen, H. *Oncologist* **2007**, *12*, 942.
- [185] Szymańska, E.; Kieć-Kononowicz, K.; Białecka, A.; Kasprowicz, A. *Farmaco* **2002**, *57*, 39.
- [186] Suzuki, H.; Kneller, M. B.; Rock, D. A.; Jones, J. P.; Trager, W. F.; Rettie, A. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *429*, 1.
- [187] Marton, L. J.; Pegg, A. E. *Annu. Rev. Pharmacol.* **1995**, *35*, 55.
- [188] Gao, C.; Jiang, Y.; Tan, C.; Zu, X.; Liu, H.; Cao, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8670.
- [189] Elliott, G. T.; Nagle, W. A.; Kelly, K. F.; McCollough, D.; Bona, R. L.; Burns, E. R. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1039.

6. Прилог

6.1. Резултати израчунавања енергетских нивоа 5-метил-5-фенилхидантоина помоћу пакета Gaussian03

 # B3LYP/6-31G(d,p) FCheck TD=NStates=15 cube=orbitals Pop=Full

MO	Occupied	MO	Virtual
44		51	
45		52	
46		53	
47		54	

48		55	
49			
50			

Excitation energies and oscillator strengths:

Excited State 1: Singlet-A 5.1352 eV 241.44 nm f=0.0247

45 -> 51 0.16679

48 -> 51 -0.35039

48 -> 53 -0.18950

49 -> 51 0.16599

50 -> 51 0.44272

50 -> 53 0.21843

This state for optimization and/or second-order correction.

Copying the excited state density for this state as the 1-particle RhoCI density.

Excited State 2: Singlet-A 5.3304 eV 232.60 nm f=0.0006

48 -> 52 0.12020

49 -> 51 0.49431

49 -> 53 -0.16101

50 -> 52 0.45905

Excited State 3: Singlet-A 5.7353 eV 216.18 nm f=0.0493

47 -> 51 0.13883

48 -> 51 0.43166

48 -> 53 0.19903

49 -> 52 -0.12564
49 -> 53 -0.12109
50 -> 51 0.41489
50 -> 53 0.12695

Excited State 4: Singlet-A 5.8365 eV 212.43 nm f=0.0113 CT

47 -> 51 0.66212
49 -> 51 0.11529

Excited State 5: Singlet-A 6.0117 eV 206.24 nm f=0.0076

45 -> 51 0.23531
45 -> 53 0.12535
47 -> 51 -0.13768
48 -> 51 0.22534
48 -> 53 0.12715
49 -> 51 0.29114
49 -> 53 0.40597
50 -> 52 -0.23882

Excited State 6: Singlet-A 6.0932 eV 203.48 nm f=0.0085

45 -> 51 0.37719
45 -> 53 0.23801
48 -> 51 0.11056
48 -> 54 0.11577
49 -> 51 -0.16971
49 -> 52 0.24518
49 -> 53 -0.15189
50 -> 51 -0.17837
50 -> 53 0.29572

Excited State 7: Singlet-A 6.1177 eV 202.66 nm f=0.0095

45 -> 51 -0.31903
48 -> 51 0.17342
48 -> 53 -0.21861
48 -> 54 -0.12307
49 -> 52 0.10308
49 -> 53 0.17446
50 -> 53 0.45315

Excited State 8: Singlet-A 6.2379 eV 198.76 nm f=0.0121 CT

47 -> 52 -0.32991
48 -> 52 0.50613
49 -> 52 -0.20028
49 -> 53 -0.19834
50 -> 52 -0.15503

Excited State 9: Singlet-A 6.3319 eV 195.81 nm f=0.0014

47 -> 52 0.61004
48 -> 52 0.30858
50 -> 52 -0.10995

Excited State 10: Singlet-A 6.3723 eV 194.57 nm f=0.0071
46 -> 51 0.12937
47 -> 53 -0.20693
48 -> 51 -0.16658
48 -> 52 0.11934
48 -> 53 0.45744
49 -> 51 0.10435
49 -> 52 0.27133
49 -> 53 -0.11105
50 -> 52 -0.14484
50 -> 53 0.13979

Excited State 11: Singlet-A 6.5320 eV 189.81 nm f=0.0327 CT
46 -> 51 -0.22580
47 -> 53 0.57328
48 -> 51 -0.11554
48 -> 53 0.18645
49 -> 52 0.12207

Excited State 12: Singlet-A 6.5936 eV 188.04 nm f=0.0588 CT
46 -> 51 0.59679
46 -> 53 -0.12354
47 -> 53 0.27410
47 -> 54 -0.11487

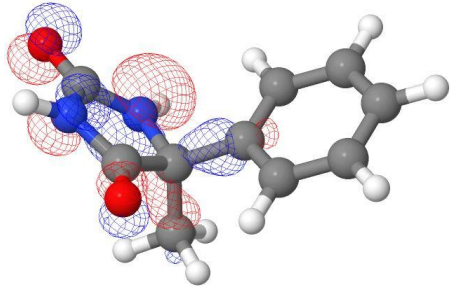
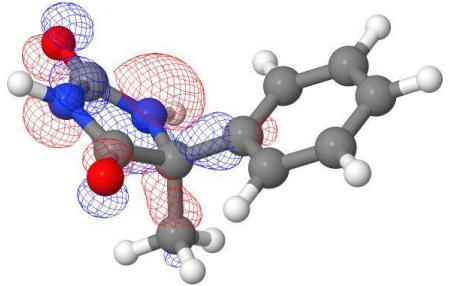
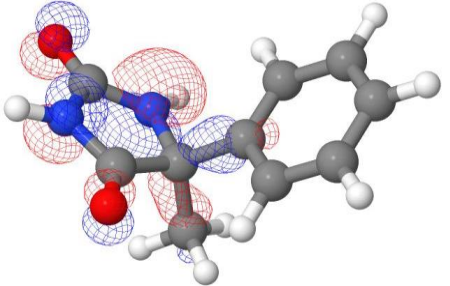
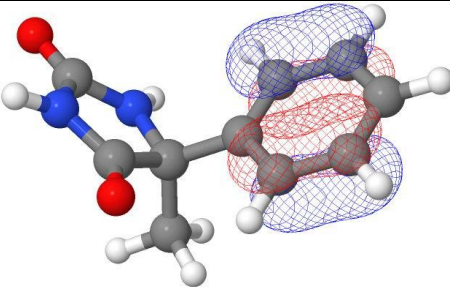
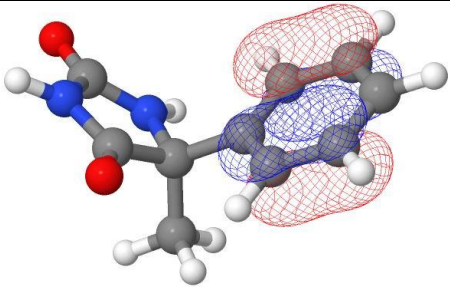
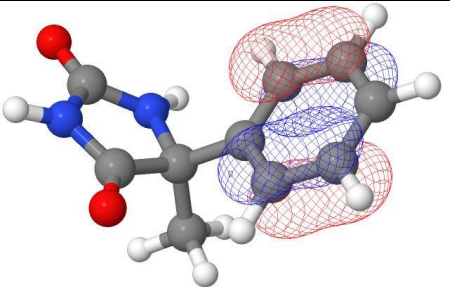
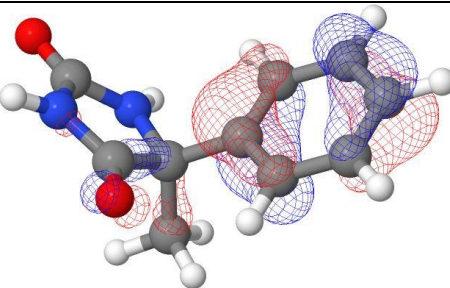
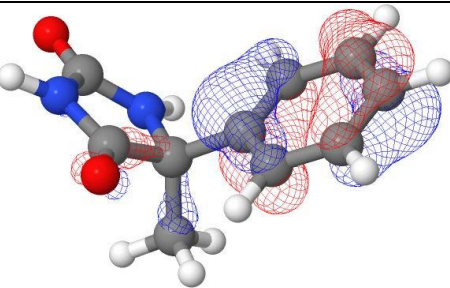
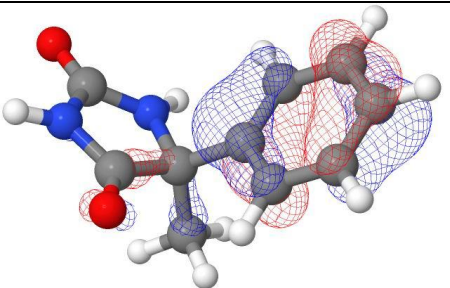
Excited State 13: Singlet-A 6.8928 eV 179.88 nm f=0.1685 small CT
45 -> 51 -0.30780
45 -> 52 -0.11961
45 -> 53 0.40339
46 -> 52 -0.16213
48 -> 51 -0.10152
48 -> 54 0.21262
49 -> 52 -0.22391
50 -> 53 0.10770

Excited State 14: Singlet-A 6.9198 eV 179.17 nm f=0.0012
45 -> 51 -0.10071
45 -> 53 0.14123
46 -> 52 0.67413

Excited State 15: Singlet-A 6.9824 eV 177.57 nm f=0.0503 CT
45 -> 52 0.59426
45 -> 53 0.10472
48 -> 52 0.22147
49 -> 53 0.16376
50 -> 52 0.12710

6.2. Резултати израчунавања енергетских nivoa 5-метил-5-фенилхидантоина помоћу пакета MOPAC 2009

	CHCl ₃	MeOH	DMF
34			
35			
36			

	CHCl ₃	MeOH	DMF
37			
38			
39			

Chloroform

STATE	ENERGY (EV)		Q.N.	SPIN	SYMMETRY	POLARIZATION		
	ABSOLUTE	RELATIVE				X	Y	Z
1+	-0.555240	0.000000	1+	SINGLET	A	0.0393	0.0379	0.0440
2	2.546586	3.101826	1	TRIPLET	A			
3	3.226259	3.781499	2	TRIPLET	A			
4	3.230789	3.786029	3	TRIPLET	A			
5	3.549723	4.104963	2	SINGLET	A	0.0193	0.0375	0.0066
6	3.572493	4.127733	4	TRIPLET	A			
7	3.736938	4.292178	3	SINGLET	A	0.0765	0.0657	0.0930
8	3.822700	4.377940	5	TRIPLET	A			
9	4.290481	4.845721	4	SINGLET	A	0.4763	0.2579	0.1154
10	5.244666	5.799906	5	SINGLET	A	0.3735	0.4691	0.8942
11	5.307061	5.862301	6	SINGLET	A	0.6184	0.8558	0.2420
13	5.048776	5.604016	7	SINGLET	A	0.1315	0.1518	0.222

<1> = +0.949629<127>-0.894062<10> -0.894062 <181> +0.646438<64> -0.597484<9> -0.597484<161> +0.594724<43> +0.546777<66> +0.546777<104>
202002 211011 211011 220002 211101 211101 220020 211011 211011
7.9333 9.3008 9.3088 9.3626 9.7273 9.7273 9.8054 8.1319 8.1319

<9> = -0.949629<122> +0.894062<189> -0.706958<10> -0.646438<65> -0.597484<1> -0.597484<169>
211101 200112 211011 211101 222000 200202
9.1581 20.3263 9.3088 8.8021 0.0000 22.4496

-0.377990<47> -0.371519<64> -0.371519<85> +0.347285<42> -0.315667<104> -0.315667<105> +0.302076<49> -0.280099<29> +0.274477< -
0.273198<27> +0.256151<2> +0.249199<209> -0.225965<22> -0.225965<127> -0.220364<84> +0.197432<50> -0.193509<3> -0.171703<210>
+0.167303<30>129> +0.160011<229> -0.142754<130> +0.143694<220> +0.117594<20> +0.100277<230>

<10> = -0.949629<123> -0.894062<1> -0.894062<190> -0.646438<66> -0.594724<47> -0.597484<170> -0.546777<64> -0.546777<106>
211011 222000 200022 211011 211011 200112 220002 202020
9.1581 0.0000 19.2129 8.1389 8.5642 19.6020 9.3626 11.3201

-0.465628<104> -0.377990<27> -0.371519<86> -0.347285<43> -0.347285<127> -0.315667<84> -0.225965<23> +0.224456<220>
+0.217231<2> -0.197432<49> -0.171703<209> +0.167303<29> -0.156804<50> +0.143694<240> -0.142754<129> +0.135451<130>
+0.116811<3> -0.110869<30> +0.110795<210> -0.100277<229>

<11> = -0.894062<20> -0.894062<191> +0.646438<75> -0.630823<211> +0.594724<54> +0.597484<171> +0.546777<77> +0.546777<115>
111111 111111 120102 022200 120120 111201 111111 111111
13.6411 14.4645 14.8322 14.1568 13.8450 14.8179 12.3006 13.4513

+0.465628<117> -0.451755<231> -0.377990<34> -0.371519<95> +0.347285<58> +0.347285<134> -0.315667<97> -0.225965<38> -
0.224456<201> +0.217231<19> +0.211449<18> -0.197432<52> +0.171703<212> -0.167303<32> -0.159541<17> -0.153905<131> +0.151183<71>
+0.143694<221> +0.143412<51> -0.142754<132> +0.123025<111> -0.119462<31> -0.111447<91>

<13> = -0.894062<193> +0.594724<56> -0.549527<53> -0.597484<173> +0.546777<79> +0.529867<133> +0.510143<16>
111012 120021 120120 111102 111012 112002 121011
14.8963 14.4539 13.8450 13.4825 14.6171 14.6171 10.7590

-0.486394<33> +0.465628<119> -0.402528<213> -0.377990<55> 0.377483<15> +0.371519<78> +0.347285<136> +0.315667<99>-
0.315667<118> +0.305568<233> +0.273198<35>+0.225965<135> +0.220364<98>

Methanol

STATE	ENERGY (EV)		Q.N.	SPIN	SYMMETRY	POLARIZATION		
	ABSOLUTE	RELATIVE				X	Y	Z
1+	-0.555272	0.000000	1+	SINGLET	A	0.0221	0.0252	0.0285
2	2.549024	3.104296	1	TRIPLET	A			
3	3.227711	3.782984	2	TRIPLET	A			
4	3.235123	3.790395	3	TRIPLET	A			
5	3.550911	4.106183	2	SINGLET	A	0.0156	0.0319	0.0084
6	3.569970	4.125242	4	TRIPLET	A			
7	3.736195	4.291467	3	SINGLET	A	0.0766	0.0653	0.0913
8	3.739051	4.294323	5	TRIPLET	A			
9	4.235065	4.790337	4	SINGLET	A	0.4897	0.2334	0.1013
10	5.215753	5.771025	5	SINGLET	A	0.3445	0.4548	0.8565
11	5.305734	5.861006	6	SINGLET	A	0.5980	0.8616	0.2692
13	5.057215	5.612487	7	SINGLET	A	0.1719	0.2204	0.3451

Dimethylformamide

STATE	ENERGY (EV)		Q.N.	SPIN	SYMMETRY	POLARIZATION		
	ABSOLUTE	RELATIVE				X	Y	Z
1+	-0.555328	0.000000	1+	SINGLET	A	0.0216	0.0247	0.0280
2	2.549036	3.104364	1	TRIPLET	A			
3	3.227690	3.783018	2	TRIPLET	A			
4	3.235204	3.790532	3	TRIPLET	A			
5	3.550890	4.106218	2	SINGLET	A	0.0156	0.0317	0.0084
6	3.569822	4.125150	4	TRIPLET	A			
7	3.736135	4.291463	3	SINGLET	A	0.0765	0.0653	0.0912
8	3.736400	4.291728	5	TRIPLET	A			
9	4.233386	4.788713	4	SINGLET	A	0.4900	0.2328	0.1010
10	5.214559	5.769886	5	SINGLET	A	0.3439	0.4538	0.8548
11	5.305700	5.861028	6	SINGLET	A	0.5983	0.8616	0.2688
13	5.058315	5.613643	7	SINGLET	A	0.1737	0.2224	0.3494

Биографски подаци

Немања Тришовић је рођен 1. марта 1983. године у Чачку, где је завршио основну школу и Гимназију. Школске 2002/03. уписао се на Технолошко-металуршки факултет у Београду. Дипломирао је 29. августа 2007. године, као студент генерације, на смеру Органска хемијска технологија и инжењерство полимера (просечна оцена положених испита 9,86) одбранивши дипломски рад на тему „Утицај структуре на антиконвулзивну активност деривата 5,5-дифенилхидантоина“ са оценом 10. Године 2006. у оквиру програма студентске размене боравио је два месеца на Хемијском факултету Универзитета у Ростоку (Немачка). Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду на Катедри за органску хемију код ментора проф. др Гордане Ушћумлић уписао је школске 2007/08. године. Од 1. октобра 2009. године запослен је на пројекту при Министарству науке под називом „Проучавање синтезе, структуре и активности органских једињења природног и синтетског порекла“. У оквиру свог научно-истраживачког рада бави се проучавањем односа структуре и билошке активности хетероцикличних једињења. До сада је публиковао 5 радова у истакнутим међународним часописима, 5 радова у међународним часописима, 3 рада у националним часописима и већи број саопштења на међународним и националним конференцијама.

Вишеструки је добитник признања „Др Панта Тутунџић“ које додељује Технолошко-металуршки факултет за изузетне успехе постигнуте у току редовних студија (2003, 2004, 2005 и 2007. године), као и награде коју додељује EFG банка у оквиру пројекта „Инвестирамо у европске вредности – 100 најбољих студената завршних година државних факултета Србије“ (2006. године). Добитник је и признања Српског хемијског друштва за успех постигнут у току студирања (2008. године).

Говори енглески, француски и немачки језик.

Члан је Српског хемијског друштва.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

ПРОУЧАВАЊЕ УТИЦАЈА СТРУКТУРЕ НА АНТИКОНВУЛЗИВНУ АКТИВНОСТ
3,5-ДИСУПСТИТУИСАНИХ-5-ФЕНИЛХИДАНТОИНА МЕТОДОМ ЛИНЕАРНЕ КОРЕЛАЦИЈЕ
ЕНЕРГИЈЕ СОЛВАТАЦИЈЕ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 12.2.2014.

Немања Турчиновић

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

ПРОУЧАВАЊЕ УТИЦАЈА СТРУКТУРЕ НА АНТИКОНВУЛЗИВНУ АКТИВНОСТ
3,5-ДИСУПСТИТУИСАНИХ-5-ФЕНИЛХИДАНТОИНА МЕТОДОМ ЛИНЕАРНЕ КОРЕЛАЦИЈЕ
ЕНЕРГИЈЕ СОЛВАТАЦИЈЕ

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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 следећој страници.)

Потпис

Немања Тршиновић

У Београду, 12.2.2014.

1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.