



Универзитет у Новом Саду
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД
Катедра за примењене и инжењерске хемије

Милица Ж. Караџић, маг. инж. технол.

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

**ХРОМАТОГРАФСКА, МИКРОБИОЛОШКА И *IN SILICO*
АНАЛИЗА СТЕРОИДНИХ ЈЕДИЊЕЊА ОД
ПОТЕНЦИЈАЛНОГ БИОМЕДИЦИНСКОГ ЗНАЧАЈА**

Ментор: Др Лидија Р. Јеврић, ванредни професор

Нови Сад, 2017.



University of Novi Sad
FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD
Department of Applied and Engineering Chemistry

MSc Milica Ž. Karadžić

DOCTORAL DISSERTATION

**CHROMATOGRAPHIC, MICROBIOLOGICAL AND *IN SILICO* ANALYSIS OF STEROID COMPOUNDS WITH
POTENTIAL BIOMEDICAL IMPORTANCE**

Mentor: Dr. Lidija R. Jevrić, Associate Professor

Novi Sad, 2017.

САДРЖАЈ

РЕЗИМЕ	1
СПИСАК СКРАЋЕНИЦА	3
1. УВОД	7
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО	9
2.1. Карактеристике стероида	9
2.2. Хроматографска анализа стероида	10
2.3. Микробиолошка активност стероидних једињења	12
2.4. Антиканцерогена активност стероидних једињења	14
2.5. Испитивани стероидни деривати	15
2.6. Липофилност	16
2.6.1. Методе одређивања липофилности	19
2.6.2. Хроматографске методе проучавања липофилности биолошки активних једињења	20
2.7. Молекулски дескриптори	21
2.8. Хемометријска анализа	24
2.8.1. Основни принципи хемометријске анализе	24
2.8.2. QSRR и QSAR анализа	26
2.8.3. Класификационе хемометријске технике	27
2.8.4. Регресионе хемометријске технике	29
2.8.5. Непараметарска селекција варијабли	32
2.8.6. Формирање и валидација модела	33
2.9. Рачунарски асистирано дизајнирање лекова	35
2.9.1. Структура протеина и њено експериментално одређивање	37
2.9.2. Анализа молекулског докинга	38
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	42
3.1. Серија испитиваних стероидних деривата	42
3.2. Хроматографска анализа	46
3.3. Рачунарско моделовање молекула и обрада података	48
3.4. <i>In vitro</i> одређивање антимикуробне активности	49
3.5. Биолошка активност стероидних деривата	51

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	53
4.1. Хроматографско понашање стероидних деривата	53
4.1.1. Хроматографско понашање на C18 колони	54
4.1.2. Хроматографско понашање на C8 колони	60
4.1.3. Хроматографска ретенција као алтернативни параметар липофилности	63
4.2. Рачунарско моделовање структуре испитиваних једињења	65
4.3. <i>In silico</i> ADMET профили испитиваних стероида	69
4.4. Класификација испитиваних једињења	71
4.4.1. Анализа главних компоненти	71
4.4.2. Хијерархијска кластер анализа	78
4.5. QSRR моделовање применом линеарне регресије	81
4.6. QSRR моделовање применом мултипле линеарне регресије	87
4.7. Генерализована метода корелације парова	93
4.8. QSRR моделовање применом нелинеарне регресије	96
4.9. <i>In vitro</i> одређивање минималне инхибиторне концентрације	102
4.10. Докинг анализа испитиваних стероидних деривата	104
4. ЗАКЉУЧАК	109
5. ЛИТЕРАТУРА	113
6. ПРИЛОГ	131
БИОГРАФИЈА	149
КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА	150
KEY WORD DOCUMENTATION	153

РЕЗИМЕ

Испитивано је хроматографско понашање (хроматографска липофилност) 29 стероидних једињења (триазола и тетразола, толуенсулфонилхидразида, диона, нитрила и динитрила) од потенцијалног биомедицинског значаја помоћу течне хроматографије високих перформанси на обрнутим фазама, применом две стационарне и две мобилне фазе. Липофилност, изражена преко ретенционог параметра $\log k$, моделована је QSRR приступом. Формирани линеарни и нелинеарни модели омогућили су испитивање односа између ретенционих параметара и *in silico* молекулских дескриптора, који су израчунати на основу структуре испитиваних једињења. Добра предиктивна моћ формираних модела, добијених за калибрациони сет, потврђена је и применом екстерног тест сета и валидационог сета. Предиктивна моћ формираних модела потврђује могућност њиховог коришћења за предвиђање липофилности нових, структурно сличних, једињења. Примењене су и класификационе хеометријске методе (анализа главних компоненти и хијерархијска кластер анализа) како би се уочиле сличности и разлика између једињења. Поред тога, представљена је *in vitro* анализа антимикуробног потенцијала испитиваних стероидних једињења према *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Два једињења, са епоксидном групом у положају 4,5, испољила су бактериостатски ефекат према *S. aureus*. Такође, приказана је докинг анализа одабраних испитиваних једињења са антипролиферативном активношћу према ћелијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. РС-3). На основу визуелизације оптималних положаја и анализе постојећих интеракција, идентификовано је једињење са највећим потенцијалом као инхибитор хуманог цитохрома P450 CYP17A1.

Кључне речи: хеометрија, класификација, липофилност, антимикуробна активност, докинг анализа, регресија, стероидни деривати, течна хроматографија, QSRR анализа

ABSTRACT

Chromatographic behavior (chromatographic lipophilicity) of 29 steroid compounds (triazole and tetrazole, toluenesulfonylhydrazide, dione, dinitrile and nitrile) with potential biomedical importance was investigated by reversed-phases high-performance liquid chromatography using two stationary and two mobile phases. The lipophilicity expressed through the retention parameter $\log k$ was modeled using QSRR approach. Formed linear and non-linear models enabled the study of the relationship between the retention parameters and *in silico* molecular descriptors calculated from the structure of the investigated compounds. Good predictive power of the established models obtained for the calibration set was confirmed by the application of an external test set and validation set. The predictive power of the established model confirms the possibility of their use for lipophilicity prediction of new, structurally similar compounds. The classification chemometric methods (principal components analysis and hierarchical cluster analysis) were applied in order to recognize the similarities and differences between the compounds. This dissertation presents the *in vitro* analysis of the antimicrobial potentials of the investigated steroid compounds against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Two compounds, with epoxy group in the position 4,5, exhibited bacteriostatic effect against *S. aureus*. The docking analysis of selected test compounds with antiproliferative activity toward cells of androgen receptor-negative prostate cancer (AR-neg. PC-3) is showed. Based on the optimal position visualization and analysis of existing interactions a compound with the most promising potential as human cytochrome P450 CYP17A1 inhibitor is identified.

Keywords: chemometrics, classification, lipophilicity, antimicrobial activity, molecular docking, regression, steroid derivatives, liquid chromatography, QSRR analysis

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

ADMET	апсорпција, дистрибуција, метаболизам, екскреција и токсичност (<i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity</i>)
ANN	вештачка неуронска мрежа (<i>Artificial Neural Network</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BFGS	Бројден-Флечер-Голфарб-Шано (<i>Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno</i>)
C18	октадецил
C8	октил
CADD	рачунарски асистирано дизајнирање лекова (<i>Computer-Aided Drug Design</i>)
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CN	цијано
CV	унакрсна валидација (<i>Cross Validation</i>)
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
GPCM	генерализована метода корелације парова (<i>Generalized Pair Correlation Method</i>)
GSA	глобална анализа осетљивости (<i>Global Sensitivity Analysis</i>)
HCA	хијерархијска кластер анализа (<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
HPLC	течна хроматографија високих перформанси (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HPTLC	хроматографија на танком слоју високих перформанси (<i>High Performance Thin-Layer Chromatography</i>)
LR	линеарна регресија (<i>Linear Regression</i>)
MBC	минимална бактерицидна концентрација (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)

MIC	минимална инхибиторна концентрација (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MLP	вишеслојна неуронска мрежа (<i>Multy Layer Perceptron</i>)
MLR	мултипла линеарна регресија (<i>Multiple Linear Regression</i>)
PCA	анализа главних компоненти (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCM	метода корелације парова (<i>Pair Correlation Method</i>)
QSAR	квантитативна веза између структуре и активности молекула (<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>)
QSPR	квантитативна веза између структуре и физичко-хемијских особина молекула (<i>Quantitative Structure-Property Relationships</i>)
QSRR	квантитативна веза између структуре и ретенције молекула (<i>Quantitative Structure-Retention Relationships</i>)
RD	рангирање на основу разлика (<i>Ranking by Differences</i>)
RMSD	корен средњег квадратног одступања (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
RP-8	реверсна фаза октил силика
RP-18	реверсна фаза октадецил силика
RPD	рангирање на основу разлика у вероватноћи (<i>Ranking by Probability-Weighted Differences</i>)
RP HPLC	течна хроматографија високих перформанси на обрнутим фазама (<i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatograph</i>)
SLP	једнослојна неуронска мрежа (<i>Single Layer Perceptron</i>)
SR	просто рангирање на основу победа (<i>Simple Ranking by Wins</i>)
TLC	хроматографија на танком слоју (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)
VIF	фактор инфлације варијансе (<i>Variance Inflation Factor</i>)

МОЛЕКУЛСКИ ДЕСКРИПТОРИ КОРИШЋЕНИ ЗА КЛАСИФИКАЦИЈУ И QSRR МОДЕЛОВАЊЕ

(¹ALOGPS 2.1; ²PaDEL Descriptor; ³PreADMET online program; ⁴ChemBioDraw Ultra 12.0; ⁵Molinspiration online program; ⁶MarvinSketch 15.3.23; ⁷ChemBio3D Ultra 12.0)

AClogP	дескриптор липофилности ¹
AClogS	дескриптор липофилности ¹
AlogP	дескриптор липофилности ²
ALOGP	дескриптор липофилности ¹
ALOGPs	дескриптор липофилности ¹
ALOGpS	дескриптор липофилности ¹
Alogp2	дескриптор липофилности ²
Average logP	дескриптор липофилности ¹
Average logS	дескриптор липофилности ¹
BBB	крвно-мождана баријера ³
Caco2	пропустљивост ћелија аденокарцинома колоне према испитиваним једињењима ³
CLogP	дескриптор липофилности ⁴
CrippenLogP	дескриптор липофилности ²
ECSEN	ексцентрични индекс повезивања ²
EI	инхибиција ензима ⁵
FMF	фракција молекулског оквира ²
logP	дескриптор липофилности ⁶
LPMaxA	дужина нормална на максималну површину ⁶
MaxPR	максималан пројекциони полупречник ⁶

MDCK	пропустљивост Мадин-Дарби (<i>Madin-Darbi</i>) епителијалних ћелија псећег бубрега према испитиваним једињењима ³
miLogP	дескриптор липофилности ¹
MinPA	минимална пројекциона површина ⁶
MlogP	дескриптор липофилности ²
MLOGP	дескриптор липофилности ¹
MMFF94E	<i>Molecular Mechanics Force Field</i> енергија ⁶
NRL	способност формирања лиганда са нуклеарним рецептором ⁵
PC	дескриптор липофилности ⁷
SP	пропустљивост коже према испитиваним једињењима ³
TE	укупна енергија ⁷
XlogP	дескриптор липофилности ²
XLOGP2	дескриптор липофилности ¹
XLOGP3	дескриптор липофилности ¹

1. УВОД

Стероидна једињења поље су истраживања многих научника због своје потенцијалне биолошке активност и биомедицински значај. Стога је велика пажња посвећена дизајнирању и синтези нових стероидних деривата из природних стероида. Стероиди имају важну улогу у људском организму јер регулишу различите биолошке процесе као што су развој женских и мушких полних карактеристика, метаболизам угљених хидрата, синтезу протеина, однос HDL и LDL холестерола, утичу на задржавање воде и соли, ниво триглицерида и инсулина. Како је испитана антиканцерогена, антибактеријска, антивирална и антифунгална активност великог броја стероидних деривата, они се као лекови користе у терапији различитих врста карцинома, аутоимуних и кардиоваскуларних болести.

In vitro експериментима утврђено је да новосинтетисани стероидни триазоли и тетразоли, толуенсулфонилхидразида, диони, нитрили и динитрили поседују значајну антипролиферативну активност према одређеним ћелијским линијама канцера (Gaković, 2008; Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015). Ова докторска дисертација даје допринос у погледу хроматографске, *in vitro* микробиолошке и *in silico* карактеризације испитиваних стероидних једињења од потенцијалног биомедицинског значаја.

Хеометрија, као хемијска дисциплина, која користи математичке и статистичке методе, приступа експериментално добијеним подацима у циљу утврђивања корелација између одабраних варијабли или у циљу класификације испитиваних једињења. Проучавањем односа између структуре и хроматографског понашања биолошки активних једињења бави се методологија проучавања квантитативне везе између структуре и ретенције (*Quantitative Structure-Retention Relationships*, QSRR). QSRR методологија се бави предвиђањем ретенционог понашања новосинтетисаних једињења на основу његових структурних карактеристика, идентификацијом молекулских дескриптора који садрже највише корисних информација, проценом липофилности, карактеризацијом фаза и разјашњавањем механизма раздвајања у хроматографским системима.

Како липофилност биолошки активних једињења диктира њихово кретање кроз биолошке мембране, као и процесе адсорпције, дистрибуције, метаболизма, екскреције и токсичности, хроматографско одређивање липофилности доприноси физичко-хемијској карактеризацији испитиваних стероидних једињења. Значај овог истраживања огледа се у формирању математичких модела који поседују способност предвиђања липофилности нових стероидних деривата које тек треба синтетисати. Потребно је, такође, истаћи велику предност експериментално одређене хроматографске липофилности над *in silico* дескрипторима липофилности. Биолошкој карактеризацији једињења доприноси *in vitro* испитивање антимикуробне активности чија је сврха проналажења новог антимикуробног агенса. Анализа молекулског докинга одабраних стероидних једињења са антипролиферативном активношћу према ћелијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. PC-3) доприноси идентификацији једињења од потенцијалног биомедицинског значаја.

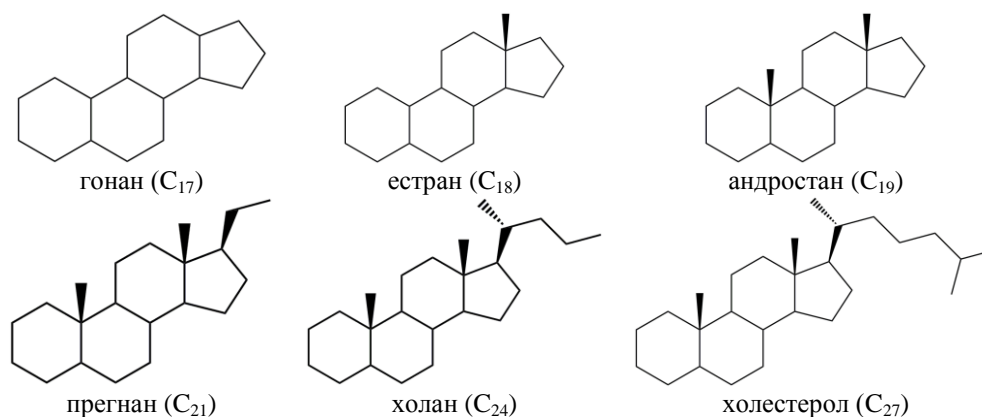
Због свог потенцијалног биомедицинског значаја серија стероидних једињења предмет је испитивања ове докторске дисертација, чији су циљеви:

- одређивање хроматографске липофилности ($\log k$) новосинтетисаних стероидних триазола и тетразола, толуенсулфонилхидразида, диона, нитрила и динитрила применом течне хроматографије високих перформанси на обрнутим фазама;
- утврђивање сличности између испитиваних деривата стероида применом класификационих хеометријских техника;
- дефинисање квантитативне везе између ретенционог понашања (хроматографске липофилности) и хемијске структуре испитиваних једињења применом линеарног и нелинеарног QSRR приступа;
- оцена и одабир математичких модела погодних за предвиђање хроматографске липофилности испитиваних стероидних једињења;
- одређивање *in vitro* антимикуробног потенцијала одабраних једињења према *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*;
- визуелизација оптималних положаја и анализа постојећих интеракција између одабраних испитиваних једињења са антипролиферативном активношћу према ћелијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. PC-3) као инхибитора хуманог цитохрома P450 CYP17A1, применом докинг анализе.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. Карактеристике стероида

Стероиди су полициклична једињења која се састоје од 17 атома угљеника организованих у четири прстена. У односу на број угљеникових атома, стероиди су подељени у шест група: гонан (C_{17}), естран (C_{18}), андростан (C_{19}), прегнан (C_{21}), холан (C_{24}) и холестерол (C_{27}) (слика 2.1).



Слика 2.1. Подела стероида у односу на број угљеникових атома

Стероиди имају важну улогу као сигнални молекули у различитим метаболичким путевима у организму. Они утичу на репродуктивну функцију, енергетски метаболизам, баланс воде и соли, као и у регулацији понашања и когнитивних функција (Lancel и сар., 1997; Biason-Lauber, 1998; Mellon и Griffin, 2002; Weill-Engerer и сар., 2002; Reddy, 2004; Napoli и сар., 2005; Hirst и сар., 2014; Khera и сар., 2014; Vejrazkova и сар., 2014). У односу на биолошку активност стероиди могу бити подељени у четири категорије: стероли (прекурсори за синтезу других биолошки важних стероида), жучне киселине (крајњи производи метаболизма холестерола) и стероидни хормони (регулација метаболизма и полног развоја).

Стероиди могу да имају различиту растворљивост – од хидрофилних до изразито липофилних (Heftmann, 1976). Највећи утицај на липофилност, а самим тим и на

пролазак кроз биолошку мембрану и на понашање у хроматографском систему, имају природу функционалних група и њихов положај у молекулу.

2.2. Хроматографска анализа стероида

Различити деривати стероида могу се изоловати из биолошких узорака помоћу хроматографских техника. Због своје осетљивости и високе специфичности, хроматографске методе се користе у квалитативној и квантитативној анализи стероида, као и за одређивање њихове липофилности. У табели 2.1. приказан је преглед литературе хроматографије различитих стероидних једињења.

За хроматографску анализу стероида често се користи хроматографија на танком слоју (*Thin-Layer Chromatography*, TLC), као и хроматографија на танком слоју високих перформанси (*High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC). У новије време, испитано је ретенционо понашање деривата имидазолина у HPTLC систему на цијано (CN), реверсна фаза октил силика (RP-8) и реверсна фаза октадецил силика (RP-18) стационарним фазама и применом мобилне фазе метанол-вода при различитим запреминским уделитема метанола (Filipić и сар., 2016а). Испитана је, такође, и ретенција деривата секо-андростана помоћу HPTLC са C-18 стационарном фазом и системима растварача вода-диоксан и вода-ацетонитрил (Milošević и сар., 2014). Исти деривати испитани су помоћу TLC на нормалним фазама са комерцијалним LuxPlate® силика гелом и уз коришћење мобилних фаза толуен-диоксан и толуен-ацетонитрил. TLC и HPTLC нашле су примену у испитивању ретенционог понашања кортизона, хидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона и норгестрела (Gagliardi и сар., 2002; Marcinić и сар., 2005; Nowakowska и сар., 2013).

Течна хроматографија високих перформанси (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) се највише примењује за анализу стероида и одређивање њихове ретенције (хроматографске липофилности). Ретенционо понашање 17 α -пиколил и 17(E)-пиколинилиден андростанских деривата испитано је помоћу течне хроматографије високих перформанси на обрнутим фазама (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, RP HPLC) на C-18 стационарној фази уз коришћење мобилне фазе коју чини смеша метанол-вода (Kovačević и сар., 2016а). Деривати имидазолина поред HPTLC анализе проучавани су и применом HPLC

анализе (Filipic и сар., 2016б). Стероидни сапонини су анализирани применом RP HPLC на C-18 стационарној фази са мобилном фазом коју чини смеша три растварача хлороформ-метанол-вода (Sastre и сар., 2016). За анализу стероидних једињења највише се користи C-18 модификовани силика гел (Kowalska и Krupczyńska., 2006). Присуство функционалних група код молекула стероида значајно утиче на њихово хроматографско понашање и стога је потребно одабрати оптималне хроматографске услове за рад.

Табела 2.1. Хроматографија стероидних једињења у савременој научној литератури

Једињење(а)	Врста анализе	Референца
кортикостероиди и анаболички стероиди	LC-MS/MS	Chiesa и сар., 2016
хетероциклични стероиди	HPLC	Elmegeed и сар., 2016
деривати имидазолина	HPTLC	Filipic и сар., 2016а
деривати имидазолина	HPLC	Filipic и сар., 2016б
кето стероиди	LC-HRMS	Frey и сар., 2016
17 α -пиколил и 17(E)-пиколинилиден андростански деривати	HPLC	Kovačević и сар., 2016а
анаболички стероиди	UHPLC-MS/MS	Liu и сар., 2016
андрогени анаболички стероиди	GC-MS/MS	Raro и сар., 2016
природни стероиди биљака	LC-MS	Xu и сар., 2016
ендогени андрогени стероиди	UPC ² -MS/MS	Quanson и сар., 2016
стероидни сапонини	HPLC	Sastre и сар., 2016
анаболички стероиди	LC-MS/MS	Balcells и сар., 2015
стероиди из мозга мајмуна	UPLC-MS/MS	Bertin и сар., 2015
ендогени стероиди	GC-MS/MS	Caron и сар., 2015
стероидни хормони	HPLC	Gañán и сар., 2014
стероиди из јаја различитих животиња	LC-MS/MS	Mi и сар., 2014
деривати секо-андростана	HPTLC, TLC	Milošević и сар., 2014
стероидни хормони	LC-MS/MS	Keevil и Path, 2013
кортизон, хидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, норгестрел	HPTLC, TLC	Nowakowska и сар., 2013

GC-MS/MS - гасна хроматографија тандем масена спектрометрија; HPLC - течна хроматографија високих перформанси; HPTLC – хроматографија на танком слоју високих перформанси; LC-HRMS - течна хроматографија са масеном спектрометријом високе резолуције; LC-MS - течна хроматографија са масеном спектрометријом; LC-MS/MS - течна хроматографија тандем масена спектрометрија; UHPLC-MS/MS - течна хроматографија ултра високих перформанси тандем масена спектрометрија; TLC - хроматографија на танком слоју; UPC²-MS/MS - високопропусна конвергентна хроматографија ултра перформанси тандем масена спектрометрија; UPLC-MS/MS - течна хроматографија ултра перформанси тандем масена спектрометрија

За анализу деривата стероида користе се и течна хроматографија тандем масена спектрометрија, гасна хроматографија тандем масена спектрометрија, течна хроматографија са масеном спектрометријом високе резолуције, високопропусна конвергентна хроматографија ултра перформанси тандем масена спектрометрија и др. (Chiesa и сар., 2016; Frey и сар., 2016; Quanson и сар., 2016; Rago и сар., 2016).

2.3. Микробиолошка активност стероидних једињења

In vitro микробиолошка активност различитих стероидних деривата испитана је на више врста микроорганизама у оквиру одређеног броја научно-истраживачких радова. Више серија катјонских стероидних антибиотика тестирано је на *Staphylococcus aureus* и добијене су минималне инхибиторне концентрације (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) од 0,40 до 3,13 µg/mL (Savage и сар., 2002). Стероиди изоловани из две биљке рода *Chromolaena* тестирани су на *S. aureus* коришћењем диск дифузионе методе (Taleb-Contini и сар., 2003). Добијене MIC су биле у распону од 64 до 250 µg/mL. Више катјонских стероидних једињења испитивано је помоћу микродилуционе методе (Erand и сар., 2007). Утврђене MIC су биле у распону од 0,4 до 9,0 µg/mL за четири тестирана једињења према *S. aureus*. Испитиване су, такође, MIC стероидних алкалоида према *S. aureus* (Chagnon и сар., 2014). Одређене вредности за MIC су веће од 64 µg/mL, док су за три испитивана једињења оне биле у границама од 8 до 16 µg/mL. У табели 2.2. дат је преглед литературе микробиолошке активности одабраних стероидних једињења.

Како се суочавамо са појавом резистенције бактерија на антибиотике (стрептомицин, тетрациклин, хлорамфеникол и др.), проценат излечења у целом свету се последњих деценија се значајно смањује. Доказана је резистентност *E. coli* на трећу генерацију цефалоспорина, као и појава ванкомицин- и метицилин-резистентних *S. aureus* (Tenover, 2006; Guo и сар., 2017). Појава мултирезистентне (метицилин, пиперацилин, гентамицин и др.) *P. aeruginosa* такође је забележена (Tenover, 2006; Guo и сар., 2017).

Табела 2.2. Стероидна једињења и њихова *in vitro* микробиолошка активност

Једињење(а)	Антибактеријска активност	Антифунгална активност	Метода	Референца
андрогени деривати	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	-	микродилуциона	Figueroa-Valverde и сар., 2015
стероидни алколиди	- <i>Staphylococcus aureus</i>	-	микродилуциона	Chagnon и сар., 2014
нови стероидни халкони	- <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Escherichia coli</i>	- <i>Aspergillus niger</i> - <i>Candida albicans</i>	микродилуциона	Kakati и сар., 2013
оксистероли	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Benjaminiella poitrasii</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> - <i>Fusarium oxysporum</i>	микродилуциона	Shingate и сар., 2013
катјонска стероидна једињења	- <i>Bacillus anthracis</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Proteus mirabilis</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i>	-	микродилуциона	Erand и сар., 2007
стероиди изоловани из две врсте <i>Chromolaena</i>	- <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Streptococcus sobrinus</i>	- <i>Candida albicans</i> - <i>Candida tropicalis</i>	диск дифузиона	Taleb-Contini и сар., 2003
катјонски стероидни антибиотици	- <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella pneumonia</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i>	-	микродилуциона	Savage и сар., 2002

Светска здравствена организација (*World Health Organisation*, WHO) објавила је у фебруару 2017. године приоритетну листу патогена за које је потребно наћи нове антибиотике (WHO). Међу њима су бактерије из фамилије *Enterobacteriaceae*, у које спада и *E. coli*, са критичним приоритетом. Оне се налазе у првој приоритетној групи због своје карбапенем-резистентности и продукције ензима (ESBL) који деградирају β-лактамске антибиотике (трећа генерација цефалоспорина). На листи WHO, са високим приоритетом, налази се и *S. aureus*, са метицилин- и ванкомицин-резистентношћу.

Из досада наведених разлога неопходно је перманентно трагати за новим антибактеријским агенсима. У овој дисертацији изведена је микробиолошка анализа стероидних деривата у циљу испитивања њихове антимицробне активности и давања одговора на могући механизам дејства.

2.4. Антиканцерогена активност стероидних једињења

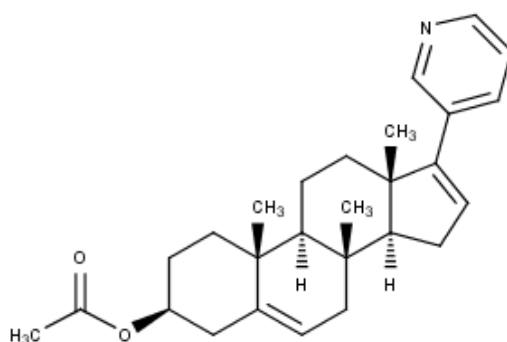
Будући да је канцер највећи узрок смртности у свету, предвиђа се да ће број оболелих у наредне две деценије премашити 22 милиона (Jemal и сар., 2011). Савремена терапија канцера обухвата преко 100 антиканцерогених лекова са различитим механизмима деловања (Novaković, 2015). Рак простате је најчешћи облик ове болести и јавља се код мушкараца у економски развијеним земљама (Jemal и сар., 2011).

Стероидни деривати играју улогу лигананда или супстрата за хормонске рецепторе и ензиме у различитим биолошким процесима, расту ћелија и пролиферацији (Gupta и сар., 2013). Различити синтетисани стероидни деривати показују *in vitro* антипролиферативну активност према хуманим канцер ћелијама грлића материце, дебелог црева, јетре, желуца, плућа и дојке (Djurendić и сар., 2008; Djurendić и сар., 2009; Abdelhalim и сар., 2011; Elmegeed и сар., 2011; Djurendić и сар., 2012; Savić и сар., 2013; Yu и сар., 2013; Vines и сар., 2014; Patani и Martin, 2014; Siegfried и Stabile, 2014; Cui и сар., 2015).

Многобројни стероидни деривати, заједно са абиратероном, показали су антипролиферативну активност према ћелијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. PC-3) (Moreira и сар., 2007; Djurendić и сар., 2008; Djurendić и сар., 2009; Djurendić и сар., 2012; Savić и сар., 2013; Yu и сар., 2013; Richmond и сар., 2014; Li и сар., 2015).

Абиратерон, 17 α -хидролаза инхибитор, одобрен је од стране Агенције за храну и лекове (*Food and Drug Agency, FDA*) Сједињених Америчких Држава за третирање канцера простате (Attard и сар., 2005; de Vono и сар., 2011; DeVore и Scott, 2012; Ryan и сар., 2013) (Слика 2.2).

Како хетероциклични систем (пиридин, пиримидин, триазол, тетразол, хидразид, нитрил) повезан са стероидним језгром преко А или D прстена, може да има важну улогу у биолошкој активности, додатна пажња је посвећена таквим стероидним дериватима, у које спадају и деривати испитивани у оквиру ове дисертације. Антипролиферативна активност испитиваних стероидних деривата тестирана је на неколико врста ћелијских линија канцера, и показало се да су нека једињења испољила значајну антипролиферативну активност (Gaković, 2008; Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015; Kovačević и сар., 2017).



Слика 2.2. Структурна формула абиратерона

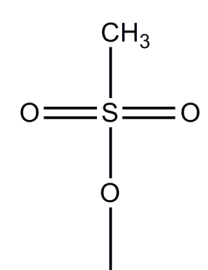
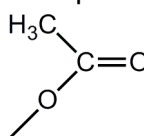
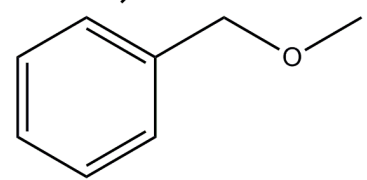
2.5. Испитивани стероидни деривати

Пошто је утврђено да стероидни триазоли и тетразоли, толуенсулфонилхидразиди, диони, нитрили и динитрили имају побољшан биолошки потенцијал, синтетисана је нова серија стероидних деривата са модификацијама у А и/или В прстену стероидног језгра (Gaković, 2008; Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015). Серија од двадесет девет стероидних једињења подељена је у четири групе у односу на њихову структуру: триазоли и тетразоли (једињења **I.1 - I.7**), толуенсулфонилхидразиди (**II.8 - II.11**), нитрили и

динитрили (III.12 - III.27) и диони (IV.28 и IV.29). Функционалне групе које су увођене као супституенти приказане су у табели 2.3.

Антипролиферативна активност деривата испитана је *in vitro* према хуманим ћелијским линијама канцера простате (AR-нег. PC-3), дојке (ER+ MCF-7 и ER-нег. MDA-MB-231), грлића материце (HeLa), дебелог црева (HT-29), хроничне мијелоидне леукемије (K-562), као и према здравим ћелијама феталних фибробласта плућа (MRC-5) (Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015). Публиковани резултати указују на значајан антиканцерогени потенцијал испитиваних деривата. Докинг анализом предвиђан је афинитет везивања појединих деривата за 17 α -хидроксилазу (CYP17A1), ароматазу (CYP19A1), β -естрадиол везан ER α рецептор (ER α -LBD) и естроген (ER α) и андроген рецептор (AR), (Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić и сар., 2015).

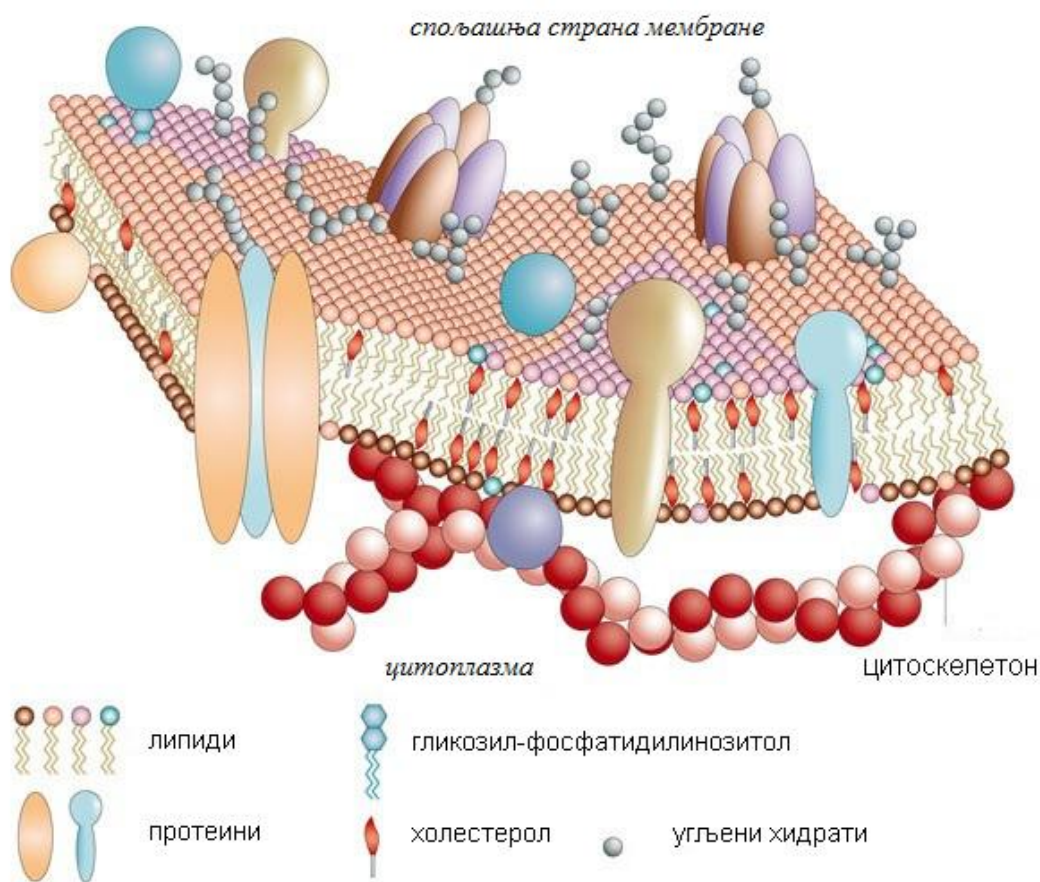
Табела 2.3. Супституенти присутни код стероидних деривата испитиваних у овој дисертацији

Супституент	Ознака	Формула
метилсулфониокси	MsO	
ацетокси	AcO	
бензилокси	BnO	

2.6. Липофилност

Једна од најважнијих особина молекула која утиче на његову биолошку активност и могућност интеракције са неводеном (ћелијска мембрана) и воденом (унутрашњост ћелије) средином је липофилност. Течно-мозаични модел хумане ћелијске мембране

приказан је на слици 2.3. Она има велик утицај на апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам и елиминацију биолошки активних једињења (Odović и Trbojević-Stanković, 2009). Структура биолошких мембрана условљена је утицајем хидрофобних интеракција. Оне олакшавају пролаз липофилних супстанци и спречавају слободну дифузију поларних молекула (осим воде) кроз биолошку мембрану. Липофилност се издваја као доминантан фактор приликом лиганд-рецептор интеракција (Waring и сар., 2009). Она такође утиче на формирање комплекса између биолошки активне компоненте и протеина крви, као и рецептора на месту деловања лека у организму (Di и Kerns, 2003; Kerns и Di, 2003). Због свега наведено, придаје се велики значај проучавању липофилности, односно хидрофобности, биолошки активних једињења.



Слика 2.3. Течно-мозаични модел хумане ћелијске мембране (SlideShare)

Подеони коефицијент дефинисан је 1872. године као равнотежна расподела супстанце између два немешљива растварача, при константној температури (Berthelot и Jungfleisch, 1872). Сам појам хидрофобности уведен је 1964. године (Fujita и сар., 1964). Тада је систем октанол-вода по први пут коришћен за мерење хидрофобности.

Такође, и октанол и вода имају хидроксидну групу која је слободна за поларне интеракције са молекулима испитиване супстанце.

Липофилност се најчешће изражава преко логаритма подеоног коефицијента између воде и органског растварача немешљивог са водом ($\log P$). Липофилност јонизујућих молекула, који ступају у интеракције са једном од фаза, изражава се преко логаритма дистрибуционог коефицијента ($\log D$). За његово израчунавање, неопходно је навести при којој вредности рН је рачунат.

Табела 2.4. Процена липофилности различитих једињења у савременој научној литератури

Једињење(а)	Хроматографска метода и услови одређивања	Референца
бензодиазепини, полиароматични угљоводоници, феноли	TLC, C18- и CP- силика гел, MeOH-H ₂ O, ACN-H ₂ O	Andrić и сар., 2016
цефалоспорини	TLC, RP-8, RP-18,-NH ₂ ,-DIOL, -CN силика гел, MeOH-H ₂ O, ACN-H ₂ O	Dąbrowska и сар., 2017
деривати имидазолина	HPTLC, CN, RP-8, RP-18 силика гел, MeOH-NH ₃ -H ₂ O	Filipic и сар., 2016a
17 α -пиколил и 17(E)-пиколинилиден андростански деривати	HPLC, ZORBAX Eclipse XDB-C18, MeOH-H ₂ O	Kovačević и сар., 2016a
4-амино-7-хлорохинолин једињења	TLC, DMSO-ACE-H ₂ O	Šegan и сар., 2016
неуротоксини и 1,2,4-триазолна једињења	TLC, C8-, C18-, C18W-, CP-, AP- и DIOL-модификоване силика плоче, SDS-ACN-THF	Andrić и Héberger, 2015b
једињења са фенантренским скелетом	TLC, RP-18, CN силика гел, ACE-H ₂ O, ACE-PET	Ciura и сар., 2015
деривати бензмидазола	TLC, C-18 силика гел, MeOH-PB	Karadžić и сар., 2015г
1,2,4-триазинони	HPLC, Supelcosil LC-18, ACN-DI-MeOH-H ₂ O	Sztanke и сар., 2015

ACE - ацетон; ACN - ацетонитрил; AP - аминокпропил; C8 - октил; C18 - октадецил; C18W - октадецил квашљив; CN - цијано; CP - цијанопропил; DI - диоксан; DIOL - диол; DMSO - диметил сулфоксид; H₂O - вода; HPLC - течна хроматографија високих перформанси; HPTLC - хроматографија на танком слоју виоских перформанси; MeOH - метанол; NH₃ - амино; NH₃ - амонијак; PB - фосфатни пуфер; PET - петролетар; RP-8 - реверсна фаза октил; RP-18 - реверсна фаза октадецил; SDS - натријум додецил сулфат; THF - тетраhydroфуран; TLC - хроматографија на танком слоју

Потребно је истаћи разлику између термина хидрофобног везивања и липофилности. Хидрофобно везивање подразумева тенденцију неполарних група ка груписању у воденим растворима, при чему долази до смањења степена контакта са суседним молекулима воде (Pliška и сар., 1996). Под липофилношћу се подразумева афинитет молекула, или неког његовог дела, ка липофилном окружењу (Van de Waterbeemd и

сар., 1997). Липофилност изражена у логаритамском облику као октанол-вода партициони коефицијент ($\log P_{o/w}$) једна је од примарних физичко-хемијских карактеристика за испитивање потенцијалних лекова (Poole и Poole, 2003; Giaginis и Tsantili-Kakoilidou, 2008a).

Процена хроматографске липофилности различитих једињења у савременој литератури приказана је у табели 2.4.

2.6.1. Методе одређивања липофилности

За одређивање липофилности једињења могуће је користити методу мућкања (*shake-flask*) и хроматографске методе. Хроматографско одређивање липофилности једињења представља изразито важно алтернативно експериментално решење. Највише се примењују хроматографске технике на обрнутим фазама: течна хроматографија високих перформанси и хроматографија на танком слоју (Kaliszan и сар., 2001; Perišić-Janjić и сар., 2004; Sârбу и сар., 2012; Kovačević и сар., 2015; Kovačević и сар., 2016a). Примену у овом домену нашла је и хроматографија на танком слоју на нормалним фазама (Perišić-Janjić и сар., 2005). Како међумолекулске интеракције у биолошком систему могу да се упореде са интеракцијама које се јављају у хроматографској средини, хроматографија је погодна за проучавање понашања и особина биолошки активних једињења.

Одређивање липофилности методом мућкања познато је као традиционална метода за одређивање липофилности, односно вредности $\log P$, у систему течно-течно. Расподела испитиване супстанце се врши између две фазе (1-октанола и воде). Након расподеле, концентрација испитиване супстанце у свакој од фаза се одређује неком од одабраних метода (спектрофотометријом, течном хроматографијом високих перформанси, гасном хроматографијом). Недостаци ове методе су дужина трајања експеримената, неопходност велике количине испитиване супстанце и њена слаба репродуктивност (Berthod и Carda-Broch, 2004). Највећи недостатак оваквог начина одређивања липофилности је немогућност одређивања партиционог коефицијента изразито хидрофилних или изразито липофилних супстанци. Због свега наведеног и из разлога што традиционалан начин одређивања липофилности за многа једињења није могућ, ова метода је изгубила на свом значају (Brandstrom, 1963).

Рачунарско израчунавање липофилности је опште прихваћен и често коришћен начин израчунавања липофилности помоћу софтверских пакета. Софтверски пакети се ослањају на субструктуре молекула (*substructure-based methods*) или на својства молекула (*property-based methods*) (Mannhold и Ostermann, 2008; Tetko и Poda, 2008). Приступ заснован на подструктурама разлаже испитивани молекул на фрагменте или појединачне атоме и сабирањем појединачних доприноса формира крајњу вредност $\log P$. Код методе која се заснива на својствима молекула, дескриптори који описују цео молекул користе се за израчунавање вредности $\log P$. На бази теоријских основа развијено је више програма за израчунавање молекулских дескриптора коришћених у оквиру ове дисертације.

2.6.2. Хроматографске методе проучавања липофилности биолошки активних једињења

Међумолекулске интеракције у биолошком систему се могу се упоредити са интеракцијама које се јављају у хроматографској средини (Odović и Trbojević-Stanković, 2009). Због тога је могуће хроматографским методама, брзо и једноставно, одредити хроматографску липофилност биолошки активних супстанци.

TLC анализа је погодна за проучавање хидрофобности различитих биолошки активних супстанци употребом одговарајућих сорбената и бинарних система растварача, у којима се варира удео органске компоненте. Ретенционо понашање једињења може да пружи информације о његовим физичко-хемијским карактеристикама, међу којима је липофилност једна од значајнијих (Perišić-Janjić и сар., 2004; Héberger, 2007). У табели 2.5. приказани су хроматографски параметри липофилности за TLC и HPLC.

Код HPLC одређивања, на ретенцију испитиваног молекула, поред врсте стационарне и мобилне фазе, утичу и природа молекула, као и различите интеракције између молекула и растварача. Код RP HPLC на ретенцију утичу интеракције неполарног дела молекула са поларним растварачем (вода), који се налази у мобилној фази. За одређивање липофилности једињења у PR HPLC најчешће се користи модификовани силика гел са *n*-октадецил (C18) и *n*-октил (C8) угљоводоничним низом. Хроматографске методе одређивања липофилности показале су се као много

поузданије и репродуктивније од традиционалне методе мућкања (Sârбу и Kuhajda, 2001; Sârбу и Onișor, 2008).

Табела 2.5. Хроматографски параметри у TLC и HPLC

Параметар	Једначина	Референца
ретенциона константа R_M , израчуната из експериментално одређених R_F вредности	$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$	Bate-Smith и Westall, 1950
зависност R_M вредности од удела органске компоненте у мобилној фази	$R_M = R_M^0 + mC$	Bate-Smith и Westall, 1950
параметар хидрофобности (C_0) који представља удео органске компоненте у мобилној фази за који је $R_M = 0$	$C_0 = -\frac{R_M^0}{m}$	Biegankowska и сар., 1995
логаритам ретенционог фактора ($\log k$)	$\log k = \log\left(\frac{t_r - t_0}{t_0}\right)$	Valkó, 2004
повезивање логаритма ретенционог фактора са концентрацијом органске компоненте у мобилној фази	$\log k = \log k_w + SC$	Tache и сар., 2012
концентрација органске компоненте у мобилној фази за коју је расподела компоненти између мобилне и стационарне фазе једнака, а $\log k = 0$	$\rho_0 = \frac{\log k_w}{S}$	Valkó и Slegel, 1993

R_F - однос пута који пређе супстанца и пута који пређе мобилна фаза у процесу развијања хроматограма; m - хидрофобна површина испитиване супстанце; t_r - ретенционо време испитиване супстанце; t_0 - мртво ретенционо време (време проласка супстанце кроз колону без задржавања на стационарној фази које се дефинише првим пиком на хроматограму (Cirera-Domènech и сар., 2013)); $\log k_w$ - ретенција испитиване супстанце у мобилној фази без присуства модификатора, односно у чистој води; C - удео органске компоненте у мобилној фази; S - нагиб праве

2.7. Молекулски дескриптори

Након моделовања структуре молекула потребно је израчунати молекулске дескрипторе који из ње произилазе. Помоћу њих се нумерички квантификује нека особина молекула (Livingstone, 2000). Молекулски дескриптори представљају резултат логичке и математичке процедуре чији је циљ конверзија хемијске информације у нумеричке вредности (Todeschini и Consonni, 2000). Своју примену нашли су у моделовању особина супстанци у области аналитичке хемије, фармацеутске хемије, медицине, токсикологије и др. Користе се за анализу квантитативне везе између структурних карактеристика молекула и њихових физичко-хемијских особина и биолошког понашања. Молекулски дескриптори се могу класификовати у односу на (Karelson, 2000; Todeschini и Consonni, 2000; King, 2002):

- начин генерисања 1. емпиријски (експериментални);

- део молекула
 - 2. теоријски (рачунски);
 - 1. локални;
 - 2. глобални;
- димензионалност
 - 1. бездимензионални (0D);
 - 2. једнодимензионални (1D);
 - 3. дводимензионални (2D);
 - 4. тродимензионални (3D);
 - 5. четвородимензионални (4D) ;
- природу
 - 1. физичко-хемијски;
 - 2. тополошки;
 - 3. квантно-механички;
 - 4. биолошки (ADMET).

Молекулски дескриптори могу бити експериментално одређени или теоријски (рачунски) израчунати помоћу математичких формула или рачунарских алгоритама. Основна разлика између ове две врсте одређивања је статистичка грешка која потиче од мерења приликом експерименталног одређивања дескриптора. Међутим, грешке које произилазе из рачунања теоријских дескриптора резултат су одређених претпоставки и апроксимација приликом извођења прорачуна. Теоријски дескриптори имају предности у односу на експерименталне дескрипторе, јер су често у директној вези са физичко-хемијским својствима молекула и већина њих је лако доступна. Највећа предност теоријских дескриптора огледа се у томе што не изискују велике материјалне трошкове, штеде време и лако су доступни. (Consonni и Todeschini, 2009).

Физичко-хемијски дескриптори обухватају липофилност, температуру кључања, температуру топљења, критичан притисак и др, а користе се за предвиђање физичко-хемијских особина, ретенционог понашања, липофилности и биолошких карактеристика молекула (Katritzky и сар., 2010; Podunavac-Kuzmanović и сар., 2011; Podunavac-Kuzmanović и сар., 2012; Jevrić и сар., 2013; Kovačević и сар., 2013a; Karadžić и сар., 2015a). Одговарајућим рачунарским софтверима могуће је израчунати физичко-хемијске дескрипторе како познатих једињења, тако и оних која још увек нису синтетисана (Todeschini и Consonni, 2000; King, 2002).

Квантно-механички (квантно-хемијски) дескриптори описују електронске и геометријске особине молекула, као и њихове међусобне интеракције (Karelson и сар.,

1996). У ову групу убрајају се дескриптори електронске густине, индекси поларности, диполни момент и др. Енергетски параметри, као квантно-механички дескриптори, могу да послуже при расветљавању ретенционих механизма (Liu и сар., 2005).

У тополошке дескрипторе спадају Винеров (*Wiener*) индекс, молекулски тополошки индекс, Балабанов (*Balaban*) индекс и др. Они произилазе из 2D структуре молекула и формулишу се на основу теорије графова (Balaban, 1976). Они носе информације о начину повезивања атома (чворова) у молекулском графу (степен рачвања) (Schultz и сар., 1990; Balaban, 1995). Укључени су у дефинисање везе између структуре и ретенције добијене у HPLC и GC системима (Giaginis и Tsantili-Kakoilidou, 2008б; Ghavami и Faham, 2010).

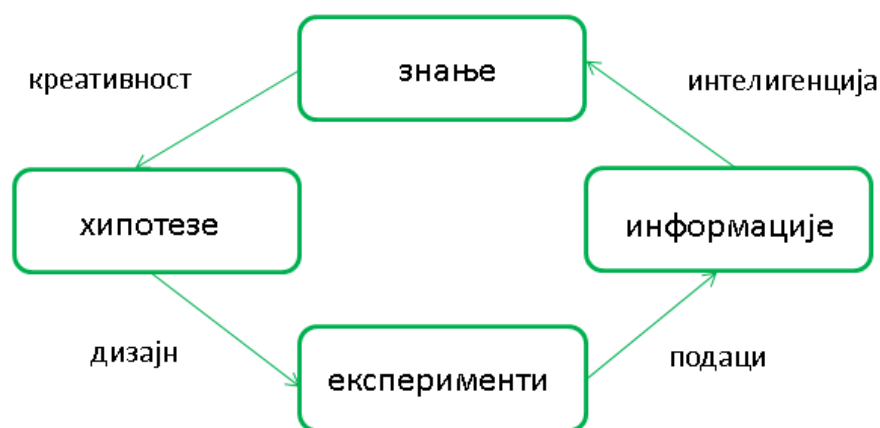
Биолошки или ADMET (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) дескриптори описују једињење из угла његове способности апсорпције, дистрибуције, метаболизма, екскреције и токсичности. Ова група дескриптора има изузетно значајну улогу у преселекцији нових фармаколошки активних једињења од потенцијалног биомедицинског значаја, која ће бити даље испитана *in vitro* и *in vivo*. Помоћу ADMET дескриптора могуће је предвидети понашање молекула у организму и на тај начин уштедети новац и време потраге за новим фармаколошки активним једињењима. У ову групу дескриптора убрајају се различити дескриптори апсорпције, везивања протеина, инхибиције, индукције или активације ензима, као и дескриптори токсичности, канцерогености и мутагености једињења (Mitragotri и сар., 2011; Cheng и сар., 2012; Moroy и сар., 2012; PreADMET).

Појава великог броја молекулских дескриптора и њихова лака доступност пружила је могућност за истраживање нових веза, док је коришћењем теоријски израчунатих дескриптора обезбедило успостављање везе између експерименталних података и теоријских информација које проистичу из саме структуре молекула. *In silico* молекулски дескриптори значајно су допринели избегавању скувих лабораторијских експеримената. Развојем савремених софтвера за моделовање молекулских структура и израчунавање дескриптора довео је до тога да их је доступно преко 5000 и тај број стално расте.

2.8. Хеометријска анализа

2.8.1. Основни принципи хеометријске анализе

Израз хеометрија први пут је употребљен 1974. године за дефинисање научне дисциплине која издваја хемијски релевантне информације и информације које су резултат хемијских експеримената (Wold, 1995). У ширем смислу, хеометрија представља научну дисциплину која се бави применом математичких и статистичких метода за обраду података у домену хемије. Прецизнија дефиниција хеометрију описује као хемијску дисциплину која користи математику, статистику и логику за дизајнирање и селекцију оптималних експерименталних услова, добијање максимално релевантних хемијских информација анализирајући хемијске податке и добијање знања о самом хемијском систему (Слика 2.4.) (Massart и сар., 1997).



Слика 2.4. Хеометријски циклус

Упоредо са развојем хеометрије, развијали су се и рачунарски програми за молекулско моделовање и израчунавање молекулских дескриптора, који су олакшали предвиђање особина молекула. У зависности од тога коју особину молекула је потребно предвидети, хеометријска анализа разликује три приступа:

- QSRR (*Quantitative Structure-Retention Relationships*) - описује квантитативну везу између структуре и ретенције једињења;
- QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) - говори о квантитативној вези између структуре и активности једињења;

- QSPR (*Quantitative Structure-Property Relationships*) - дефинише квантитативну везу између структуре и физичко-хемијских особина једињења.

Хеометријска анализа обухвата како класификационе тако и регресионе технике (Слика 2.5). Класификационе технике се користе за уочавање сличности или разлика између испитиваних једињења и њихово груписање, док се регресионе технике користе за успостављање различитих математичких модела.

Како се хеометрија показала погодном за обраду великог броја података и издвајање најбитнијих информација, успешно се примењује на различитим пољима као што су биотехнологија, микробиологија, прехранбено инжењерство, форензичка хемија, фармацеутско инжењерство (Dodić и сар., 2014; Gadzuric и сар., 2014; Podunavac-Kuzmanović и сар., 2011, Podunavac-Kuzmanović и сар., 2015; Jevrić и сар., 2017). Последњих година њена употреба и примена је толико порасла да се данас модерне аналитичке методе често комбинују са хеометријским методама.



Слика 2.5. Приказ класификационих и регресионих хеометријских техника

2.8.2. QSRR и QSAR анализа

QSRR анализа је доживела своју експанзију након публиковања научних студија које су утемељиле ову методологију (Héberger, 2007; Kaliszan, 2007). У QSRR математичким моделима зависнопроменљиве варијабле, проистекле из молекулске структуре (молекулски дескриптори) корелирају се са хроматографским ретенционим параметрима, као независниом променљивом. Главни циљеви QSRR анализе су:

- предвиђање ретенције нових једињења;
- идентификација најважнијих молекулских дескриптора у погледу информација које носе;
- разјашњавање механизма раздвајања у датом хроматографском систему;
- процена комплексних физичко-хемијских карактеристика испитиваних једињења;
- процена релативних биолошких активности.

Пошто QSRR анализа описује квантитативну везу између структуре и ретенције молекула, своју примену је преваходно нашла у предвиђању ретенционог понашања и липофилности различитих једињења (Mizera и сар., 2015; Filipić и сар., 2016a; Kovačević и сар., 2016a; Jevrić и сар., 2017). Примена ове врсте анализе пружа још и могућност да се окарактеришу стационарне и мобилне фазе у хроматографији (Kovačević и сар., 2015). Развој истраживачке QSRR области је од посебног значаја за медицинску хемију, као први и елиминациони корак у испитивању липофилности потенцијално биолошки активних једињења. На овај начин би се скратио дуготрајан процес истраживања и смањило улагање у ресурсе.

QSAR анализа описује зависност између хемијске структуре и биолошке активности молекула (Brereton и сар., 2003). Користи се и за предвиђање активности различитих једињења према разноврсним микроорганизмама као што су *Mycobacterium tuberculosis* (Minovski и сар., 2011), *Candida albicans* (Podunavac-Kuzmanović и сар., 2012), *Bacillus* spp. (Podunavac-Kuzmanović и сар., 2011), *Streptomyces hygroscopicus* (Dodić и сар., 2014), *Pseudomonas aeruginosa* (Podunavac-Kuzmanović и сар., 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Podunavac-Kuzmanović и сар., 2013). Помоћу QSAR моделовања предвиђена је антиканцерогена активност 17 α -пиколил и 17(E)-пиколинилиден андростанских деривата (Kovačević и сар., 2014) и D-хому лактона и D-секо андростанских деривата

са модификацијама у А- и/или В- прстену (Ковачевић и сар., 2016б), деривата пиразол-4-карбоксамида (Sharma и сар., 2016) и бензимидазола (Akhtar и сар., 2017). Поред наведеног, QSAR анализа је нашла примену у предвиђању активности молекула који још нису синтетисани (Katritzky и сар., 1997).

2.8.3. Класификационе хеометријске технике

Анализа главних компоненти (*Principal Component Analysis*, PCA) је најчешће примењивана класификациона метода у различитим публикацијама из домена хроматографске анализе (McIlroy и сар., 2015), QSAR (Rybka и сар., 2014; Chen и сар., 2015), QSPR (Mehraein и Riahi, 2017) и QSRR (Jevrić и сар., 2017) проблематике, анализе хране (Gosetti и сар., 2015; Li и сар., 2016; Werteker и сар., 2016) и хране за животиње (Azilawati и сар., 2015). Она се примењује када је потребно смањити скуп података међу којима се јављају корелације. Уколико не постоји корелација између варијабли, примена PCA анализе нема сврху (Miller и Miller, 2010). Помоћу ове методе врши се груписање сличних објеката (једињења).

PCA анализа има за циљ да дефинише нове главне компоненте ($PC1, PC2, \dots PCn$) које представљају комбинацију оригиналних варијабли ($X_1, X_2, \dots X_n$):

$$PC1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n \quad 2.1.$$

$$PC2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2n}X_n \quad 2.2.$$

Прва главна компонента (PC1) представља правац који на оптималан начин дефинише растојање између објеката и описује максималну варијансу пројекције података на дати правац. Другу главну компоненту (PC2) дефинише правац нормалан на PC1, описујући максимум преосталог варијабилитета. Укупан број главних компонента једнак је са бројем анализираних варијабли. За даљу анализу се узимају главне компоненте које описују најмање 80% укупне варијансе (Varmuza и Filzmoser, 2009).

Резултат PCA анализе приказују се помоћу графика скорова (*scores plot*) и графика коефицијената латентних варијабли (*loadings plot*), на којима могу да се уоче сличности између испитиваних објеката. График скорова приказује преглед података у

односу на груписање објеката, док график коефицијената латентних варијабли указује на везу између варијабли и даје информацију о доприносу варијабли на позиционирање објеката на графику скорова (Trifković и сар., 2010).

Хијерархијска кластер анализа (*Hierarchical cluster analysis*, HCA) је хеометријска метода која се користи за груписање сличних објеката у кластере. Кластер анализа проналази објекте који су позиционирани један близу другог у простору варијабли. Помоћу ове методе, удаљеност између два објекта се мери и што је мања, то су објекти сличнији. Помоћу Еуклидове (*Euclidean*) дистанце (d) представља се растојање између два објекта у n -димензионом простору варијабли и рачуна се помоћу једначине (Miller и Miller., 2010):

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} \quad 2.3.$$

Груписање објеката може да се врши на два начина. Агломеративни метод најпре посматра сваки објекат појединачно, након чега се блиски објекти постепено спајају у једну групу. Дивизиони хијерархијски метод функционише обрнуто – од једна групе се формирају две, а од њих следеће две. Агломеративни метод се чешће примењује. Постоје различите методе рачунања дистанци између кластера: појединачно повезивање (*single linkage*), потпуно повезивање (*complete linkage*), просечно повезивање (*average linkage*), метода центроида (*centroid*) и Вардова (*Ward*) метода (Ward, 1963; Abonyi и Feil, 2007).

Резултат ове анализе се представља графички помоћу дијаграма који се назива дендрограм, где су објекти организовани у редове на основу своје сличности (McKenna, 2003). Вертикална оса представља меру сличности на основу које се објекти придружују групи (Daszykowski и сар., 2001). HCA анализа налази широку примену у хроматографској и QSRR анализи, фармакологији и нафтној индустрији за кластеровање различитих једињења и узорака (Zhao 2009; Wang и сар., 2011; Karadžić и сар., 2015б; Novák и сар., 2017).

2.8.4. Регресионе хеометријске технике

Код линеарне регресије (*Linear Regression*, LR) зависна променљива (Y) корелира се са једном независнопроменљивом (X), као што је приказано у једначини:

$$Y = a + b \cdot X + c \quad 2.4.$$

где је a одсечак на y оси, b нагиб праве и c грешка која је независна и чија је средња вредност једнака нули (Miller и Miller, 2010). Вредности одсечка на y оси и нагиба праве имају за циљ минимизацију суме разлике између вредности које су предвиђене једначином и стварних вредности добијених експерименталним испитивањима. У већини случајева зависну променљиву Y одређује већи број независних варијабли (X_1, X_2, \dots), што подразумева употребу мултиваријантне регресије.

Мултипла линеарна регресија (*Multiple Linear Regression*, MLR) представља најчешће коришћену регресиону методу, која је нашла широку примену у QSRR (Karadžić и сар., 2015в; Karadžić и сар., 2015г; Karadžić и сар., 2015д; Đaković-Sekulić и сар., 2011; Fragkaki и сар., 2009), QSAR (Podunavac-Kuzmanović и сар., 2012; Minovski и сар., 2011; Pourbasheer и сар., 2010; Dudek и сар., 2006) и QSPR моделовању (Luilo и Cabaniss, 2010;). MLR модел укључује више од једне независнопроменљиве:

$$Y = a + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + \dots + b_k \cdot X_k + c \quad 2.5.$$

где је a константа модела, X_1, \dots, X_k су независнопроменљиве са одговарајућим коефицијентима b_1, \dots, b_k (за независно променљиве од 1 до k). Порастом броја независнопроменљивих корелације ће се побољшавати (Simpson, 2000).

Уколико узмемо у обзир чињеницу да су независнопроменљиве заправо молекулски дескриптори, вредности коефицијената показују утицај појединачних молекулских дескриптора на својство једињења које се предвиђа. Предзнак коефицијента говори о позитивном или негативном доприносу појединачног дескриптора. Међутим, ова тумачења резултата нису тачна уколико постоји мултиколинеарност, односно виоска корелација између молекулских дескриптора. Стога, како би се правилно тумачио модел и установило који од дескриптора има најјачи ефекат и утицај на зависнопроменљиву, неопходно је избећи појаву мултиколинеарности. Она се може

учити помоћу фактора инфлације варијансе (*Variance Inflation Factor*, *VIF*), дефинисаног једначином:

$$VIF(x_i) = \frac{1}{(1-R_i^2)} \quad 2.6.$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, k$$

где је R_i^2 коефицијент детерминације између x_i и осталих молекулских дескриптора. $VIF > 1$ указује на присуство мултиколинеарности у одређеном степену, док се у литератури мултиколинеарност толерише до $VIF < 10$ (O'Brien, 2007; Young и сар., 2008; Montgomery и Runger, 2014).

Код формирања MLR модела мора се водити рачуна о односу броја молекулских дескриптора и броја података (број испитиваних једињења) који учествују у формирању модела. Овај однос дефинише Топлис-Костело (*Topliss-Costello*) правило (Topliss и Costello, 1972):

$$N/n \geq 5 \quad 2.7.$$

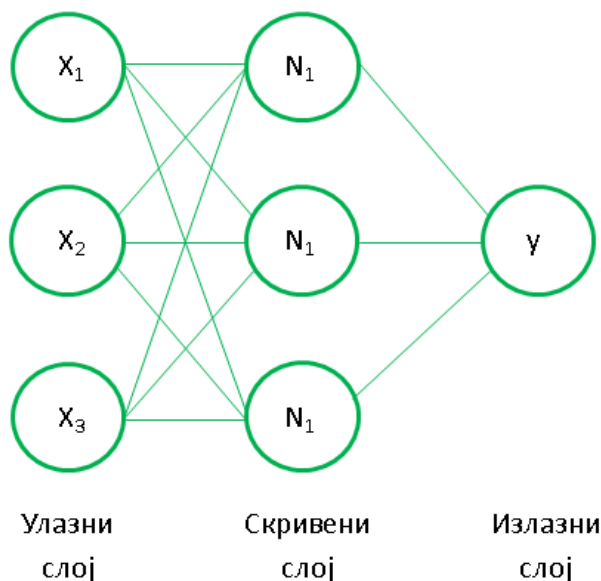
где је N број података, а n број молекулских дескриптора. Уколико се у MLR модел уведе велик број молекулских дескриптора, то може довести до дестабилизације модела и умањити способност предвиђања.

Вештачке неуронске мреже (*Artificial Neural Networks*, ANN) су дефинисане као структуре састављене од густо повезаних адаптивних процесних елемената. Оне имају способност опонашања основних карактеристика људског мозга јер се свака неуронска мрежа састоји од вештачких неурона чији је задатак да имитирају биолошке неуроне. Њихова ефикасност се огледа у могућности да препознају сложене односе између улазних варијабли без претходних информација везаних за саму природу проблема. Вештачке неуронске мреже користе се за моделовање нелинеарних корелација (Leardi, 2003; Garkani-Nejad и Jalili-Jahani, 2010). Основна структура ANN модела одређена је бројем слојева и бројем чворова по слоју (Слика 2.6).

ANN се састоји од неколико слојева неурона (Simon и Nazmul Karim., 2001):

- улазни слој (*input layer*) – којим се уводе подаци за модел и рачунају се пондерисане (оптерећене) суме;
- скривени слој (*hidden layer*) – служи за обраду података;

- излазни слој (*output layer*) – представља резултате примене ANN.



Слика 2.6. Модел вештачке неуронске мреже

Неуронске мреже се на основу архитектуре могу поделити на једнослојне (*Single Layer Perceptron, SLP*) и вишеслојне (*Multiple Layer Perceptron, MLP*). Код ANN разликујемо архитектуре са пропацијом сигнала унапред (*feedforward*) и са повратном спрегом (*feedback*).

У неким случајевима потребно је извршити нормализацију улазних података (Jayalakshmi и Santhakumaran, 2011). Нормализација се врши у случају када улазни подаци обухватају веома широк опсег. Такозвана *min-max* нормализација врши се помоћу једначине:

$$y_{norm} = (1 - \Delta^U - \Delta^L) \cdot \left(\frac{y - y_{min}}{y_{max} - y_{min}} \right) + \Delta^L \quad 2.8.$$

где су y_{norm} , y_{max} и y_{min} нормализована, максимална и минимална вредност зависне варијабле y , а Δ^U и Δ^L вредности маргина које ограничавају екстраполациону способност мреже (Jayalakshmi and Santhakumaran, 2011).

Улазни подаци се обрађују тренирањем вишеслојних неуронских мрежа (MLP) помоћу Бројден-Флечер-Голфарб-Шано (*Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno, BFGS*) алгоритма, који за B матрицу користи формулу:

$$B'_{BFGS} = B + \frac{\Delta g \Delta g^T}{\Delta g^T \Delta x} - \frac{B \Delta x \Delta x^T B}{\Delta x^T B \Delta x} \quad 2.9.$$

$$\Delta x = x_{k+1} - x_k$$

$$\Delta g = g_{k+1} - g_k$$

где су B и B'_{BFGS} стара и нова апроксимација другог извода, а Δx и Δg су вектори у R^n које задовољава $\Delta x^T \Delta g > 0$ (Kovačević и сар., 2014).

Глобална анализа осетљивости (*Global Sensitivity Analysis*, GSA) се користи за карактеризацију међусобног односа улазних варијабли. Она анализира утицај сваке улазне варијабле и рачуна фракцијални допринос појединачних варијабли на предикт модел (Homma и Saltelli, 1996). Уколико је вредност GSA коефицијента варијабле мања од 1, такву варијаблу треба изузети из модела (Kovačević и сар., 2014).

У случају ANN регресије, не постоји дефинисана параметарска једначина, већ се архитектура мреже описује статистичким параметрима. Последњих година неуронске мреже нашле су различите практичне примене у области предвиђања ретенционог понашања (Kovačević и сар., 2016а; Fragkaki и сар., 2012), антиканцерогене (Kovačević и сар., 2014), антифунгалне (Podunavac-Kuzmanović и сар., 2013) и анти-ХИВ активности (González-Díaz и сар., 2014) различитих биолошки активних једињења.

2.8.5. Непараметарска селекција варијабли

Појава непараметарских метода за рангирање и селекцију варијабли у хеометријским научним радовима, довела је до развоја методе корелације парова (*Pair Correlation Method*, РСМ). Ова метода подразумева способност разликовања (дискриминације) између две варијабле (Héberger и Rajkó, 2002а). Она може да се користи у случају када је потребно идентификовати фундаменталан фактор у мноштву корелираних варијабли, чак и када остали статистички критеријуми не детектују значајне разлике (Rajkó и Héberger, 2001). Метода корелације парова може лако бити генерализована (*Generalized Pair Correlation Method*, GPCM) да би се извршила селекција варијабли када их има више од две. Као критеријум за селекцију користи се условни Фишеров (*Fisher's*) егзактан тест, приказан као матрица 2×2 . Тест даје потврду за прихватање хипотезе о значајној различитости два фактора, који су скоро једнако корелирани са

зависном варијаблом. Потребно је нагласити да је генерализована метода корелације парова осетљива на појаву аутлајера (*outliers*) (Gere и сар., 2015).

Код генерализоване методе корелације парова врши се поређење фактора у паровима у свим комбинацијама. Тестом се изражавају разлике између фактора, које се дефинишу улогама „надређеног” и „подређеног” фактора или као „победник – губитник”. Постоје три начина рангирања варијабли (Héberger и Rajkó, 2002b):

- просто рангирање на основу победа – *Simple Ranking by Wins*, SR;
- рангирање на основу разлика (победе минус губици) – *Ranking by Differences*, RD;
- рангирање на основу разлика у вероватноћи – *Ranking by Probability-Weighted Differences*, RPD.

Овакав начин селекције варијабли може бити коришћен за преселекцију варијабли (одабир варијабли пре примене регресионих метода) као и за њихову постселекцију (рангирање предикт варијабли након примене регресионих метода) (Héberger и Rajkó, 2002a). Важно је напоменути да непараметарска селекција варијабли може да рангира варијабле другачије него што се то чини на класичан начин (Héberger и Rajkó, 2002a). Генерализована метода корелације парова нашла је своју примену у савременим научним публикацијама у области хеометријске анализе хроматографске и *in silico* липофилности (Andrić и Héberger, 2015a; Andrić и Héberger, 2015b; Andrić и сар., 2016).

2.8.6. Формирање и валидација модела

Формирању и валидацији модела претходи прикупљање и припрема експерименталних података. Након тога следи рачунарско моделовање молекула и рачунање *in silico* молекулских дескриптора. Помоћу устаљених статистичких метода врши се селекција погодних молекулских дескриптора, пошто рачунарски програми омогућавају рачунање великог броја дескриптора. Након формирања математичких модела следи одабир статистички валидних модела.

Као посебна проблематика јавља се како од целокупног броја израчунатих дескриптора одабрати оне који ће потенцијално бити укључени у модел (Van de Waterbeemd и Rose.,

2008). Одабир адекватних молекулских дескриптора (независно променљивих варијабли) врши се помоћу (Shahlaei, 2013):

- регресије свих променљивих (*all possible regression*) – користи се за проверу корелација између зависнопроменљиве и једне или више варијабли;
- селекције унапред (*forward selection*) – у првом кораку формира се модел који садржи варијаблу са највећим коефицијентом корелације са зависном променљивом и у наредним корацима се придружују варијабле које повећавају коефицијент корелације, све док се не придружи варијабла која не доприноси повећању коефицијента корелације;
- селекције уназад (*backward elimination*) – први корак подразумева формирање модела који садржи све доступне варијабле а затим се уклањају варијабле које најмање доприносе коефицијенту корелације;
- степенасте селекције (*stepwise selection*) – подразумева комбиновање метода селекције унапред и елиминације уназад.

Валидација модела је врло важан корак, при чему је квалитет модела дефинисан статистичким параметрима (Chirico и Gramatica, 2011; Chirico и Gramatica, 2012; Gramatica и Sangion, 2016). Стандардни статистички параметри представљају први корак у селекцији формираних модела. Стандардни статистички параметри и њихове вредности су (Caballero и сар., 2005; Јеврић и сар., 2013):

- Пирсонов коефицијент корелације (R) > 0,80;
- коефицијент детерминације (R^2) > 0,64;
- подешени коефицијент детерминације (R^2_{adj}) > 0,70;
- F -вредност (Фишеров тест);
- корен средње квадратне грешке ($RMSE$, *Root Mean Square Error*);
- p -вредност (вероватноћа).

Након потврде стандардних статистичких параметара и одабира модела, потребно је извршити њихову валидацију. Код интерне валидације најчешће се примењује метода унакрсне валидације у којој, у зависности од броја објеката издвојених из калибрационог сета, разликујемо – „изостави једног из модела” (LOO , *Leave-One-Out*) и „изостави више из модела” (LMO , *Leave-More-Out*). Као параметри унакрсне валидације вреднују се (Caballero и сар., 2005; Ковачевић и сар., 2013б):

- коефицијент детерминације унакрсне валидације (R^2_{CV}) > 0,60;
- укупна сума квадрата (TSS , *Total Sum of Squares*);
- сума квадрата одступања од предвиђених вредности ($PRESS$, *Predicted Residual Error Sum of Squares*);
- $PRESS/TSS$ однос < 0,40;
- стандардна девијација предвиђања (SD_{PRESS}).

Како би се осигурала релевантност формираних модела, потребно је извршити њихову екстерну валидацију формираних модела (Golbraikh и Tropsha, 2002a; Golbraikh и Tropsha, 2002b). Екстерни тест сет формира се издвајањем 15 – 30% података из полазног сета података. Параметри екстерне валидације и њихове вредности су:

- Пирсонов коефицијент корелације екстерног тест сета (R_{test}) > 0,80;
- коефицијент детерминације екстерног тест сета (R^2_{test}) > 0,64;
- корен средње квадратне грешке екстерног тест сета ($RMSE_{test}$, *Root Mean Square Error*).

Формуле за рачунање наведених статистичких параметара дате су у прилогу (Једначина П–7.1. – једначина П–7.8.)

Поред нумеричке валидације модела, важан аспект валидације QSRR модела је и графички приказ експерименталних и предвиђених вредности, као и анализа резидуа (остатака). Линеарна зависност између експерименталних и предвиђених вредности треба да има нагиб који тежи јединици и одсечак који се приближава нули, како би модел био квалитетнији. Код анализе резидуа, на графику зависности експерименталне вредности-остаци, резидуе треба да буду насумично распоређене око нулте вредности на у оси како би се могло говорити о непредвидивости остатака.

2.9. Рачунарски асистирано дизајнирање лекова

Рачунарска хемија (*Computational chemistry*) примењује принципе рачунарских наука у решавању хемијских проблема. Она користи резултате теоријске хемије инкорпорираних у рачунарске програме за формирање структура и рачунање карактеристика молекула. Добијени резултати су у складу са експериментално добијеним резултатима, док у неким случајевима могу да предвиде до сада несагледане

феномене. Докинг малог молекула у биолошки активан макромолекул ради мерења интеракција између њих и визуелизација оптималног положаја лиганд-протеин комплекса општеприхваћен је метод у рачунарски асистираним дизајнирању лекова (*Computer-Aided Drug Design, CADD*). Оно може да се врши на основу структуре лиганда или на основу структуре циљаног места (Табела 2.6).

Табела 2.6. Методе рачунарски асистираним дизајнирања лекова

	непозната структура лиганда	позната структура лиганда
непозната структура циљаног места	рачунарски асистираним дизајнирање лекова није могуће	<ol style="list-style-type: none"> хомолого моделовање циљаног места на основу структуре сличног протеина дизајнирање на основу лиганда
позната структура циљаног места	<ol style="list-style-type: none"> <i>de novo</i> дизајн виртуелни скрининг 	докинг протеин-лиганд

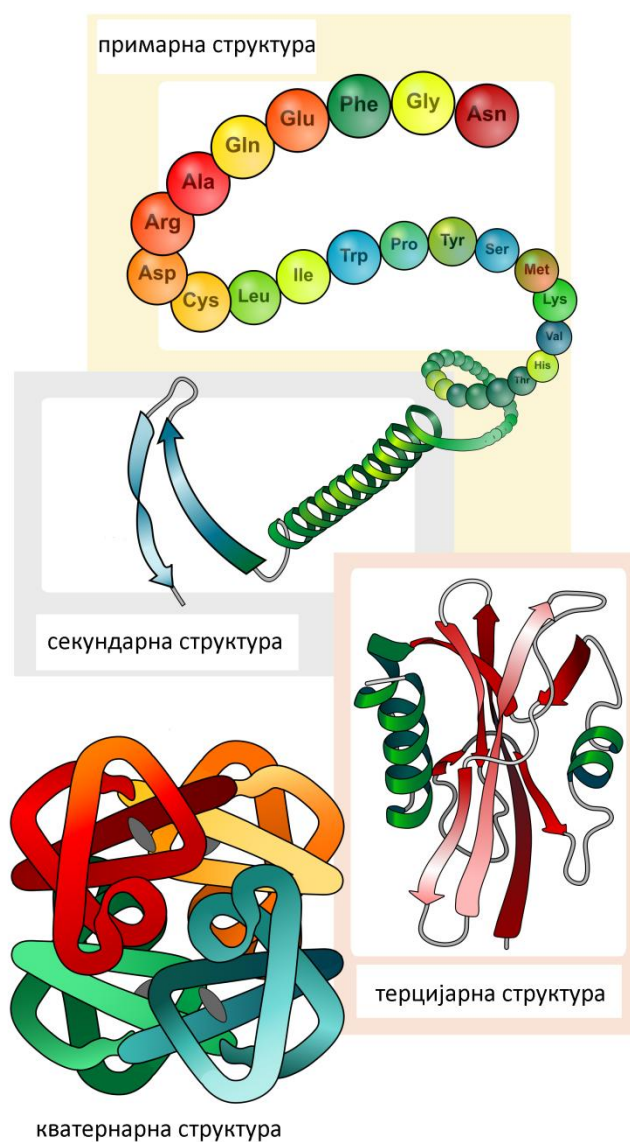
Молекулско моделовање је доживело своју експанзију упоредо са развојем рачунарских техника, а самим тим и нових софтвера. У *online* базама података је доступан велик број тродимензионалних структура протеина, нуклеинских киселина, комплекса протеин-нуклеинска киселина и других једињења. Почетком 2017. године овај број је износио 127 352 тродимензионалних структура у *RCSB PDB online* бази података (Vertman и сар., 2000) (Табела 2.7).

Табела 2.7. Број доступних тродимензионалних структура у *RCSB PDB online* бази на дан 10.03.2017.

Експериментални метод	Протеини	Нуклеинске киселине	Комплекси протеин-нк	Остало	Укупно
кристалографија рендгенским зрацима (<i>X-ray</i>)	106 595	1 820	5 471	4	113 890
нуклеарна магнетна резонанца (<i>NMR</i>)	10 296	1 190	241	8	11 735
електронска микроскопија	1 021	30	367	0	1 418
хибрид	99	3	2	1	105
остало	181	4	6	13	204
укупно	118 192	3 047	6 087	26	127 352

2.9.1. Структура протеина и њено експериментално одређивање

Протеини су маркомолекули код којих разликујемо четири нивоа структуре: примарну, секундарну, терцијарну и кватернарну (Слика 2.7). Протеини имају веома важну биолошку улогу у организму и она може бити: ензимска (каталише стотине биохемијских реакција у живој ћелији), структурна (какву имају колаген и кератин), хормонска (регулише метаболизма), транспортна (транспортује хемоглобина и других гасова) и механичка (подстичу контракцију мишића), а могу имати и улогу антитела (која поспешују имуни систем организма).



Слика 2.7. Типови структуре протеина (SlideShare)

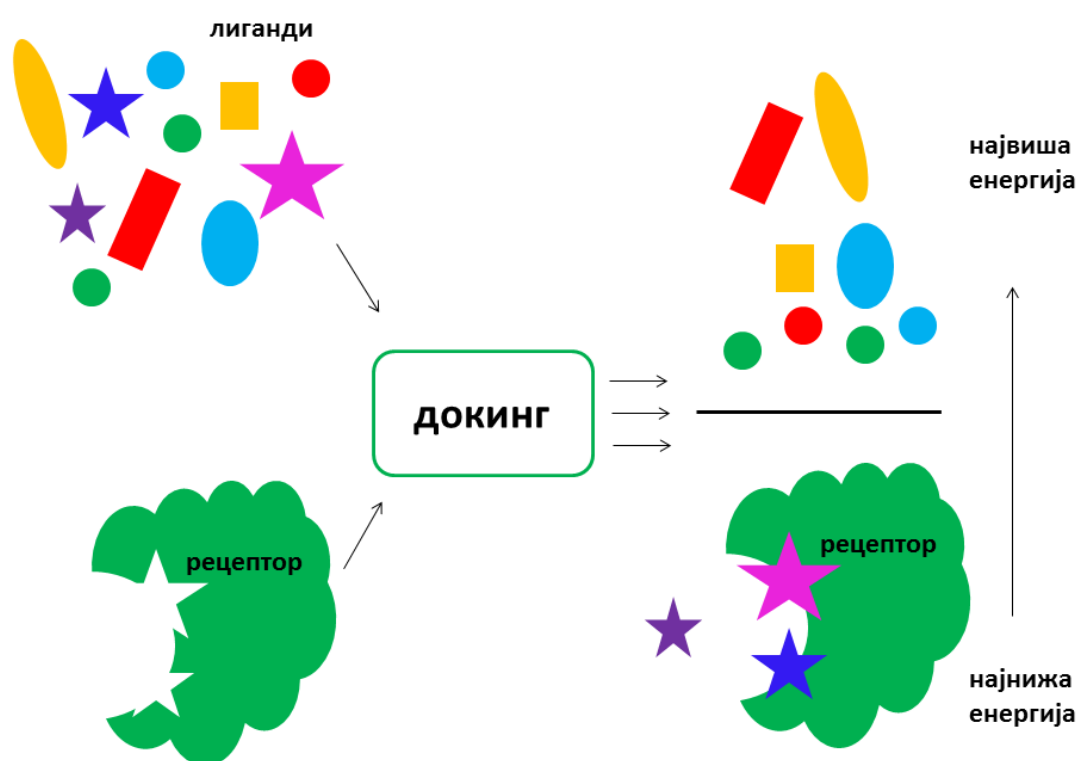
У циљу одређивања протеина одговорних за поједине болести и трагању за новим лековима, неопходно је експериментално одредити структуру жељених протеина. Овакви експерименти су и скупи и временски веома захтевни, а неопходно је и изоловати чист протеин у довољној концентрацији. Као једна од великих препрека јавља се изузетно висока цена таквих експеримената (30 000 - 100 000 долара по структури). Због наведених чињеница, акценат је стављен на одређивање појединачних структура које би омогућиле моделовање што већег броја тродимензионалних структура протеина (Kuroda и сар., 2000; Brenner., 2001). *RCSB PDB online* база података прикупља све експериментално одређене структуре.

За експериментално одређивање структуре протеина примењују се следеће технике: кристалографија рендгенским зрацима (*X-ray*), нуклеарна магнетна резонанца (*NMR*), крио-електронска микроскопија (*cryo-EM*) и неутронска дифракција. Најчешће се примењује кристалографија рендгенским зрацима, превасходно због своје високе резолуције. Тако се и у *RCSB PDB online* бази података налази око 90% испитиваних структура управо применом ове методе.

2.9.2. Анализа молекулског докинга

Докинг анализа представља енергетски базирану операцију чији је циљ проналазак потенцијалних места везивања два молекула која међусобно интерагују, као и њихове конформације и енергије везивања (Mosser и сар., 2000; Bissantz и сар., 2010; Tuccinardi и сар., 2014). Докинг процедура служи као водич за идентификацију приоритетне оријентације лиганда који интерагује са макромолекулом. Лиганд може да се прилагоди малим променама конформације да би се избегле стерне сметње и омогућиле повољне интеракција са рецептором. Докинг анализа је веома корисна за процену квалитета биолошки активних једињења односно потенцијалних лекова. Уколико је лиганд већ познат биолошки активан молекул, докинг анализа омогућава идентификацију његове биолошки активне конформације. Уколико је лиганд потенцијални кандидат као биолошко активно једињење, докинг анализа пружа увид у његово пријањање на рецептор. Шематски приказ анализе молекулског докинга дат је на слици 2.8.

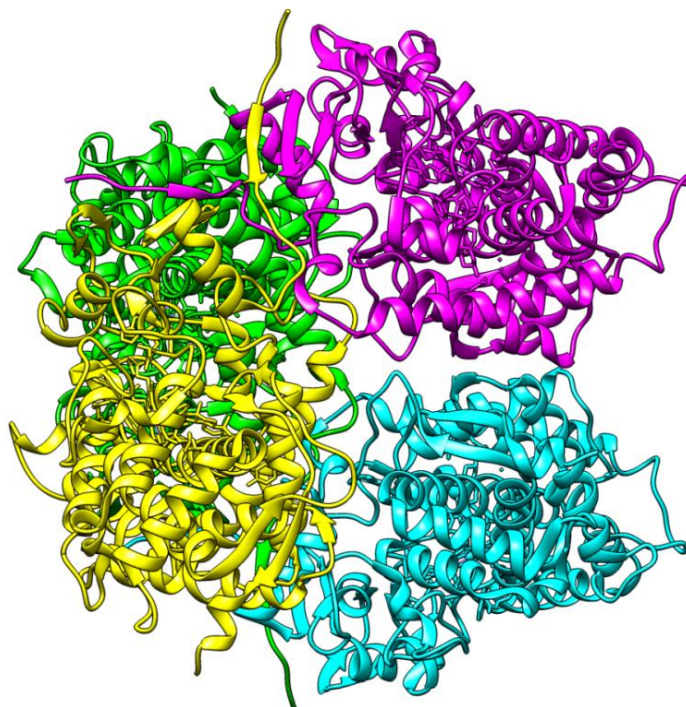
Примена докинг анализе се односи на виртуелни скрининг као начин идентификације потенцијалних биолошки најактивнијих молекула из великог сета података, као и предвиђање интеракције протеин-лиганд, у погледу места и јачине интеракције. На основу информација о месту и начину везивања лиганда за протеин, могу да се таргетирају делови молекула значајни за везивање, предложи промена структуре која ће за циљ имати повећање афинитета везивања и избегне промена која доводи до онемогућавања пријањања лиганда на протеин.



Слика 2.8. Шема анализе молекулског докинга

Докинг анализу чине четири кључна корака:

- одабир жељене 3D структуре (Слика 2.9.) из *RCSB PDB online* базе података и њена даља припрема (уклањање резидуа, додавање водоничних веза);
- идентификација активног места протеина;
- припрема 3D структуре и минимизација енергије потенцијалног лиганда;
- одређивање начина везивања лиганда за активно место протеина и његову карактеризацију.



Слика 2.9. Пример 3D структуре протеина из *RCSB PDB online* базе (17 α -хидроксилаза, PDB код: 3RUK)

Примена докинг анализе изузетно је актуелна у научним публикацијама из домена медицине, фармакологије, микробиологије, прехранбеног инжењерства и др. Антиканцерогена активност 2-амино-3-хлоро-5-трифлуорометил пиридин деривата испитивана је помоћу анализе молекулског докинга, за различите протеине тумора мозга (PDB: 4O33), јетре (PDB: 1M17) и желуца (PDB: 2CCS) (Asath и сар., 2017). Ново бензоксазолно једињење је синтетисано и урађена је његова докинг анализа за циљане протеине, никотинамид аденин динуклеотидфосфат (PDB: 5B1Y) и B-DNK протеин (PDB: 1BNA) (Tuğrul Zeurek и сар., 2017). Деривати триазола, инхибитори ксантин оксидоредуктазе испитани су применом анализе молекулског докинга и симулацијом молекулске динамике ради проналажења оптималне конформације везивања инхибитора за ксантин дехидрогеназу (PDB: 1V97) (Tang и сар., 2016). Испитан је потенцијал D-хому лактона и D-секо андростанских деривата са модификацијама у А- и/или В- прстену као инхибитора хуманог цитохрома P45017A1 применом анализе молекулског докинга (Kovačević и сар., 2016a). Дат је увид у механизам антикацерогене активности пентацикличних алкалоида добијених из *Uncaria tomentosa* применом докинг анализе за седам различитих протеина из *RCSB PDB online* базе (Kozielewicz и сар., 2014). Молекулска докинг анализа изведена је за шест деривата

анилина и пиридиниламина, као инхибитора киназе, у циљу карактеризације специфичних интеракција између потенцијалних инхибитора киназе и активног места седам протеина (Caballero и сар., 2011).

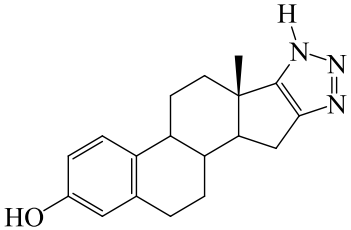
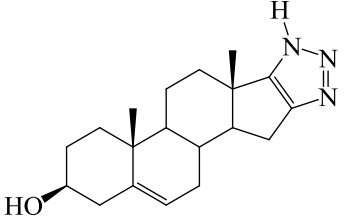
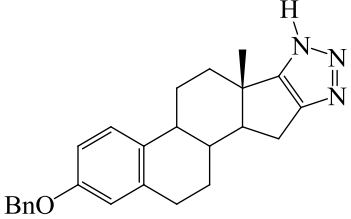
Докинг анализа се користи за предвиђање различитих модела везивања инхибитора протеина. Примена докинг анализе сужава избор потенцијално биолошки активних једињења која ће се детаљније експериментално испитивати и на тај начин уштедети време и ресурсе.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

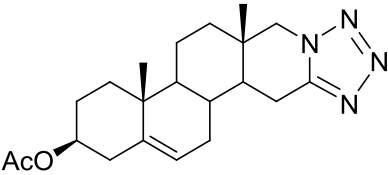
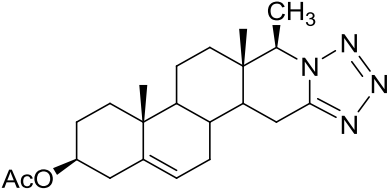
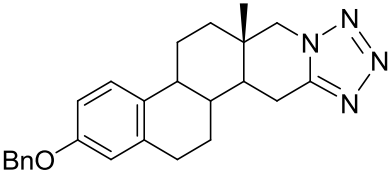
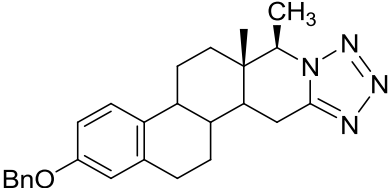
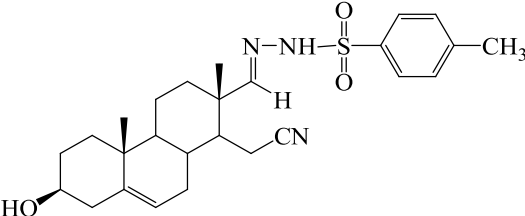
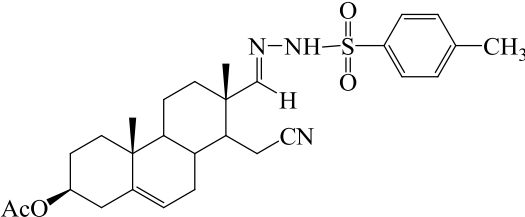
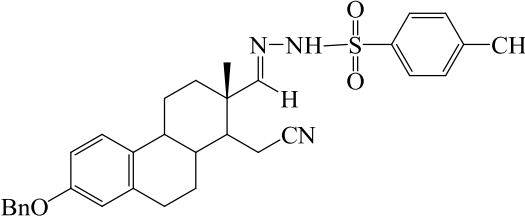
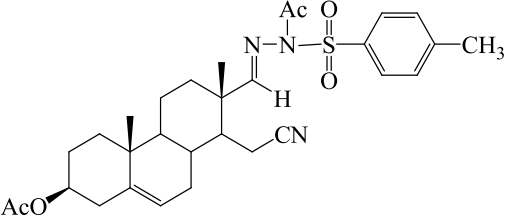
3.1. Серија испитиваних стероидних деривата

Испитивани стероидни деривати су синтетисани на Катедри за органску хемију, Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду. Синтеза и њена потврда детаљно су описани у литератури (Gaković, 2008; Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015). Серија од двадесет девет стероидних једињења подељена је, у односу на њихову структуру, у четири групе: триазоли и тетразоли (једињења **I.1** - **I.7**), толуенсулфонилхидразиди (**II.8** - **II.11**), нитрили и динитрили (**III.12** - **III.27**) и диони (**IV.28** и **IV.29**). Структурне формуле и IUPAC називи испитиваних стероидних деривата дати су у табели 3.1.

Табела 3.1. Хемијске структуре и IUPAC називи испитиваних једињења

Једињење	Хемијска структура	IUPAC назив
I.1		3-хидроксиестра-1,3,5(10)-триено[16,17-d]-1,2,3-триазол
I.2		3β-хидроксиандрост-5-ено[16,17-d]-1,2,3-триазол
I.3		3-бензилоксиестра-1,3,5(10)-триено[16,17-d]-1,2,3-триазол

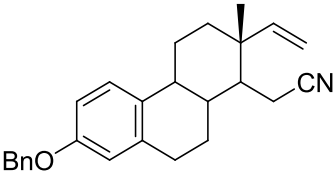
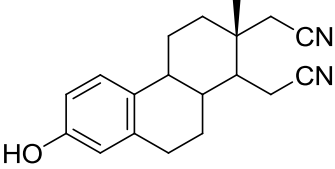
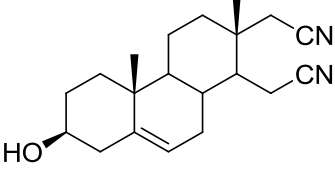
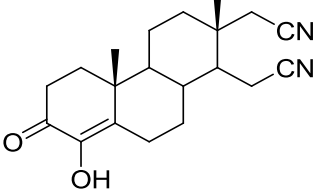
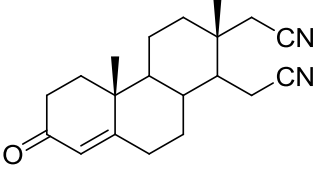
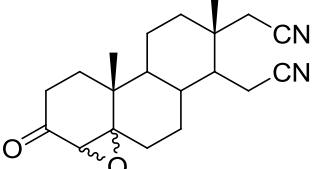
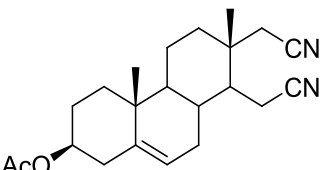
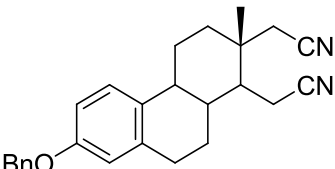
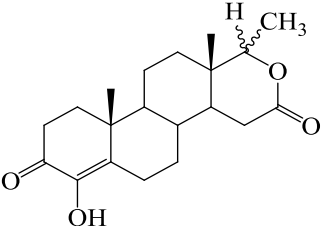
Табела 3.1. Хемијске структуре и ИУПАС називи испитиваних једињења (наставка)

Једињење	Хемијска структура	ИУПАС назив
I.4		3β-ацетокси-17-аза-17а-хомоандрост-5-ено[16,17-е]тетразол
I.5		3β-ацетокси-17-аза-17а-хомо-17β-метиландрост-5-ено[16,17-е]тетразол
I.6		3-бензилокси-17-аза-17а-хомоестра-1,3,5(10)-триено[16,17-е]тетразол
I.7		3-бензилокси-17-аза-17а-хомо-17β-метилестра-1,3,5(10)-триено[16,17-е]тетразол
II.8		3β-хидрокси-17-оксо-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил <i>p</i> -толуенсулфонилхидразид
II.9		3β-ацетокси-17-оксо-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил <i>p</i> -толуенсулфонилхидразид
II.10		3-бензилокси-17-оксо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил <i>p</i> -толуенсулфонилхидразид
II.11		3β-ацетокси- <i>N'</i> -ацетил-17-оксо-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил <i>p</i> -толуенсулфонилхидразид

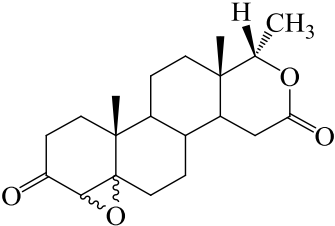
Табела 3.1. Хемијске структуре и IUPAC називи испитиваних једињења (наставак)

Једињење	Хемијска структура	IUPAC назив
III.12		3,17-диоксо-4-хидрокси-17-метил-16,17-секоандрост-4-ен-16-нитрил
III.13		3,17-диоксо-4β,5β-епокси-17-метил-16,17-секоандростан-16-нитрил
III.14		3β-ацетокси-17-(метилсулфонилокси)-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил
III.15		(17S)-3β-ацетокси-17-(метилсулфонилокси)-17-метил-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил
III.16		(17R)-3β-ацетокси-17-(метилсулфонилокси)-17-метил-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил
III.17		3-бензилокси-17-(метилсулфонилокси)-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил
III.18		3-бензилокси-17-метил-17-(метилсулфонилокси)-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил
III.19		3β-ацетокси-17-метил-16,17-секоандрост-5-ен-16-нитрил

Табела 3.1. Хемијске структуре и IUPAC називи испитиваних једињења (наставка)

Једињење	Хемијска структура	IUPAC назив
III.20		3-бензилокси-17-метилен-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16-нитрил
III.21		3-хидрокси-17а-хомо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16,17а-динитрил
III.22		3β-хидрокси-17а-хомо-16,17-секоандрост-5-ен-16,17а-динитрил
III.23		4-хидрокси-3-оксо-17а-хомо-16,17-секоандрост-4-ен-16,17а-динитрил
III.24		3-оксо-17а-хомо-16,17-секоандрост-4-ен-16,17а-динитрил
III.25		смеша 4α,5α- и 4β,5β-епокси-3-оксо-17а-хомо-16,17-секоандростан-16,17а-динитрил
III.26		3β-ацетокси-17а-хомо-16,17-секоандрост-5-ен-16,17а-динитрил
III.27		3-бензилокси-17а-хомо-16,17-секоестра-1,3,5(10)-триен-16,17а-динитрил
IV.28		смеша 17α- и 17β-метил 4-хидрокси-17-оксо-хомоандрост-4-ен-3,16-дион

Табела 3.1. Хемијске структуре и IUPAC називи испитиваних једињења (наставка)

Једињење	Хемијска структура	IUPAC назив
IV.29		смеша 4 α ,5 α - и 4 β ,5 β -епокси-17 α -метил-17-окса-17 α -хомоандростан-3,16-дион

3.2. Хроматографска анализа

Анализа хроматографског понашања испитиваних једињења изведена је помоћу уређаја за течну хроматографију високих перформанси *Agilent Technologies 1200 Series HPLC* (Санта Клара, Калифорнија, САД) са *Diode Array (DAD)* и *Evaporative Light Scattering* детектором (*ELSD*) (Слика 3.1). Анализа је изведена у Лабораторији за технологију, квалитет и безбедост хране - *FINS Lab*, Научног института за прехранбене технологије у Новом Саду (ФИНС). Систем чине бинарна пумпа, дегазер и аутоматски инјектор, повезани са рачунаром за обраду података помоћу *Agilent ChemStation* програма. Као стационарне фазе коришћене су две хроматографске колоне: *ZORBAX SB-C18* (Санта Клара, Калифорнија, САД) и *ZORBAX Eclipse Plus C8, Rapid Resolution HT* (Санта Клара, Калифорнија, САД), чије карактеристике су дате у табели 3.2.

Испитивани стероидни деривати су растворени у ацетону, у концентрацији од 1 mg/mL и профильтрирани помоћу филтера *Captiva Econofilter (nylon membrane, 25 mm diameter, 0,45 μ m pore size)* (Санта Клара, Калифорнија, САД). Хроматографска анализа је изведена изократски. Као мобилне фазе коришћене су бинарне смеше ацетонитрил-вода и метанол-вода, са различитим запреминским уделима компонената. За *ZORBAX SB-C18* колону, коришћен је запремински удео ацетонитрила 70 - 80 v/v и метанола 70 - 85 v/v, при протоку од 0,6 mL/min. За *Zorbax Eclipse Plus C8* колону, коришћен је запремински удео ацетонитрила 60 - 90 v/v, при протоку од 1,0 mL/min. Узорци су инјектовани у запремини од 10 μ L на *ZORBAX SB-C18* и 0,1 μ L на *ZORBAX Eclipse Plus C8* колони. Током анализа, одржавана је константна температура колоне од 30°C. DAD детекција је изведена на 210, 280 и 320 nm, док је за рачунање капацитетног фактора коришћено ретенционо време детектовано на 210 nm. Сигнал ELSD детектора

коришћен је ради потврде детекције испитиваних једињења. Радна температура ELSD детектора је износила 40°C, притисак 3,5 bar и осетљивост 5.



Слика 3.1. Agilent Technologies 1200 Series HPLC уређај

Табела 3.2. Карактеристике коришћених хроматографских колона

Карактеристике	ZORBAX SB-C18	ZORBAX Eclipse Plus C8, Rapid Resolution HT
Тип структуре	Честице	Честице
Величина честица (μm)	5	1,8
Величина пора (\AA)	80	95
Површина (m^2/g)	180	160
Засићеност угљеником (<i>carbon load</i>) (%)	10	8
Замена група у стационарној фази (<i>endcapped</i>)	Не	Да (дупло)
Дужина колоне (mm)	250	100
Пречник колоне (mm)	3,0	2,1
Температурни лимит ($^{\circ}\text{C}$)	90	60
Опсег pH	1,0 – 8,0	2,0 – 8,0

Хемикалије коришћене за хроматографску анализу:

- ацетон ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, HPLC чистоће, *J. T. Baker*, Девентер, Холандија);
- ацетонитрил (CH_3CN , HPLC чистоће, *J. T. Baker*, Девентер, Холандија);
- метанол (MeOH , HPLC чистоће, *J. T. Baker*, Девентер, Холандија);
- ултрачиста вода, *Milipore, Elix UV* и *Simplicity Water Purification System*, Молсеим, Француска).

У сваком од хроматографских система мерење ретенције изведено је у три понављања. Са добијених хроматограма очитана су ретенциона времена једињења (t) и мртва ретенциона времена (t_0) дефинисана првим регистрованим сигналом на хроматограму. Израчунат је капацитетни фактор (k) једињења, а логаритмовани капацитетни фактори ($\log k$) коришћени су за формирање QSRR модела као зависнопроменљиве.

3.3. Рачунарско моделовање молекула и обрада података

Након моделовања хемијске структуре молекула, рачунати су молекулски дескриптори на основу једнодимензионалних (1D), дводимензионалних (2D) и тродимензионалних (3D) молекулских структура. Тродимензионалну молекулску структуру било је неопходно оптимизовати, применом MM2 методе за оптимизацију енергије. Минимизација је изведена уз задату вредност RMS грешке (*Root Mean Square*) од 0,0001 kcal/Å · mol. За моделовање хемијске структуре молекула и рачунање молекулских дескриптора коришћени су следећи програми:

- ChemBioDraw Ultra 12.0 (ChemBioOffice, 2012);
- ChemBio3D Ultra 12.0 (ChemBioOffice, 2012);
- MarvinSketch 15.3.23 (ChemAxon);
- PreADMET online program (PreADMET);
- Molinspiration online program (Molinspiration Cheminformatics);
- ALOGPS 2.1 online program (VCCLAB, 2005);
- OpenEye Babel software (Babel).

Хеометријска обрада података спроведена је помоћу следећих програма:

- Statistica 10 (StatSoft Inc);
- NCSS 2007 (Hintze);
- GPCM (VBA program);
- Microsoft Excel 2010 (Microsoft).

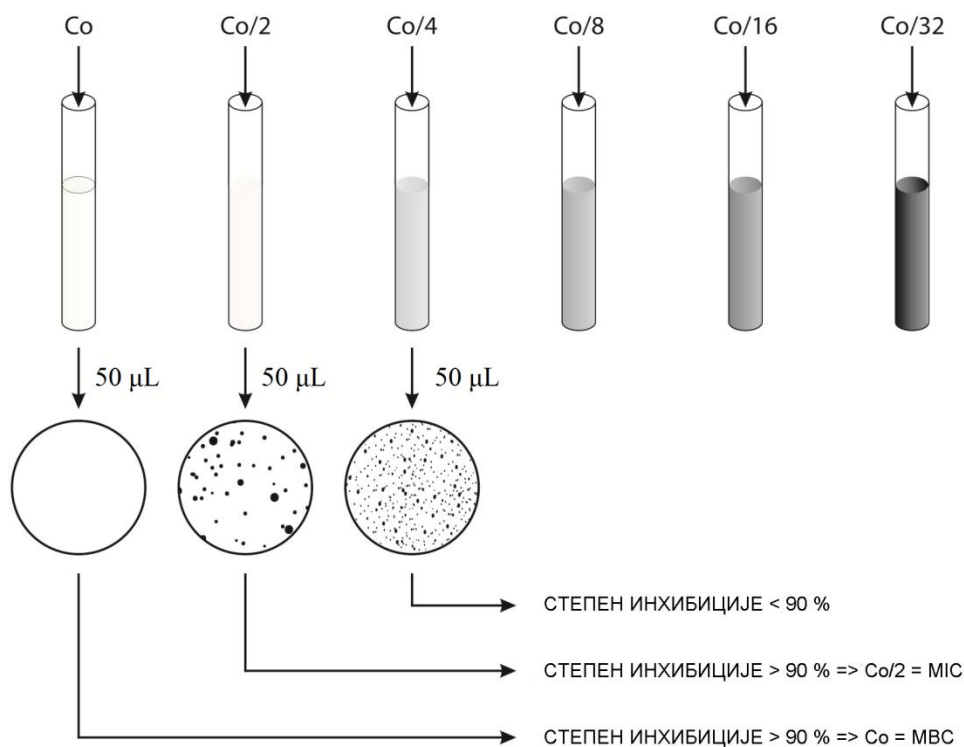
Метода молекулског докинга спроведена је помоћу следећих програма:

- RCSB PDB (PDB Data Base);
- Chimera software (UCSF Chimera);

- DOCK 6.5 software (UCSF DOCK).

3.4. *In vitro* одређивање антимикуробне активности

Анализа антимикуробног понашања серије испитиваних једињења изведена је на Одељењу за микробиологију, Технолошког факултета Нови Сад, Универзитета у Новом Саду. Одређена је минимална инхибиторна концентрација (МИС) применом модификоване микродилуционе методе, према шеми датој на слици 3.2.



Слика 3.2. Шема модификоване микродилуционе методе у епруветама димензија 7,5 x 80 mm (C_0 – почетна концентрација антимикуробне супстанце)

Испитивана једињења су растварана у дихлорметану (*Lach-Ner*, Нератовице, Чешка) у Епендорф епруветама (епендорфицама). *Laminar-flow* комора (*Biobase Biosafety BSC-1100IIA2-X*, *Jinan Biobase Biotech Co., Ltd.*, Ђинан, Кина) коришћена је за све манипулације са микроорганизмима и за отпаравање дихлорметана. Као бактеријски сојеви коришћени су грам-негативна *Escherichia coli* АТСС 25922 и грам-позитивна

Staphylococcus aureus ATCC 25923, док је као тест култура квасца коришћена *Candida albicans* ATCC 10231. Сви микроорганизми су чувани у складу са ISO11133:2014 стандардом (SRPS ISO11133:2014). Милер-Хинтон (*Müller-Hinton*) бујон (МНВ, *HiMedia*, Мумбај, Индија) за бактеријске сојеве и Сабуров (*Sabouraud*) декстрозни бујон (SDB, *HiMedia*, Мумбај, Индија) инокулисани су са суспензијом ћелија направљеном од култура које се чувају дубоко замрзнуте на -80°C (*Snijders Labs*, Тилибург, Холандија) и инкубирани на 37°C . За 24-часовне суспензије ћелија одређиван је број живих ћелија уобичајеном методом посева на подлогама истог састава као и бујони, тј. МН/SD агару.

Модификована микродилуциона метода у односу на CLSI приручнике (CLSI, 2002; CLSI, 2012) коришћена је за одређивање МИС испитиваних стероидних деривата. Испитивана једињења су растворена у подхлађеном дихлорметану (тачка кључања $39,6^{\circ}\text{C}$) у епандорфицама у иницијалној концентрацији од 10 mg/mL . Из иницијалног раствора направљена је серија раствора (1:1) до концентрације $0,078\text{ }\mu\text{g/mL}$. За један тест микроорганизам коришћено је по $50\text{ }\mu\text{L}$ раствора супстанце пренето у серију епрувета ($7,5 \times 80\text{ mm}$). Након преношења овог аликвота директно на дно стерилне стаклене епрувете, оне су изложене протоку стерилног ваздуха у *laminar-flow* комори до испарења целокупне запремине растварача.

За све тестиране микроорганизме серија разређења припремљена је у МНВ/SDB од културе у касној експоненцијалној фази раста. У сваку епрувету са испитиваним једињењима, као и три празне епрувете (слепа проба), пренето је по $100\text{ }\mu\text{L}$ суспензије ћелија (приближна концентрација $3 \times 10^3\text{ CFU/mL}$) припремљене у МНВ/SDB. Након хомогенизовања садржаја епрувете су инкубирани 24 – 48 сати на 37°C .

Након инкубације и хомогенизације серија разређења до 1:1000 припремљена је у пуферисаној пептонској води (*Buffered peptone water*, BPW; *HiMedia*, Мумбај, Индија). Аликвоти ($2 \times 50\text{ }\mu\text{L}$) из сваке појединачне суспензије засејани су на плоче са Милер-Хинтон агаром (МНА) и Сабуров декстрозним агаром (SDA) и плоче су инкубирани 24 – 48 сати на 37°C . Након инкубације колоније су пребројане и број ћелија је одређен и изражен као CFU/mL.

Она концентрација антимикуробног средства која је довела до инхибиције раста или одумирања више од 90% ћелија, сматра се минималном инхибиторном концентрацијом, док се она која је довела до смрти више од 99,99% ћелија, сматра се минималном бактерицидном концентрацијом (*Minimum Bactericidal Concentration*, MBC).

Пре изведених анализа утврђен је ефекат резидуа растварача након његовог отпаравања. Све анализе су рађене у три понављања.

3.5. Биолошка активност стероидних деривата

Анализа антиканцерогене активности испитиваних стероидних деривата у односу на различите ћелијске линије канцера, објављена је у литератури (Gaković, 2008; Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015). Погодним тестовима установљено је да одређени број једињења испољава значајну *in vitro* антиканцерогену активност према хуманим ћелијским линијама канцера простате (AR-нег. PC-3), дојке (ER+ MCF-7 и ER-нег. MDA-MB-231), грлића материце (HeLa), дебелог црева (HT-29), хроничне мијелоидне леукемије (K-562), као и према здравим ћелијама феталних фибробласта плућа (MRC-5) (Gaković, 2008; Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015).

За докинг анализу коришћене су вредности антиканцерогене активности према ћелијским линијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. PC-3) (Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013). Процедура анализе антиканцерогене активности испитиваних стероидних деривата према AR-нег. PC-3 ћелијској линији описана је у литератури (Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić и сар., 2015). Антиканцерогена активност изражена је преко IC_{50} вредности, која је дефинисана као половина максималне инхибиторне концентрације неке биолошки активне супстанце. У односу на антиканцерогену активност, биолошки активна једињења се класификују као: изразито јака ($IC_{50} < 10 \mu M$), задовољавајућа ($10 \mu M < IC_{50} < 20 \mu M$), умерена или слаба ($20 \mu M < IC_{50} < 100 \mu M$) и занемарљива ($IC_{50} > 100 \mu M$) (Ajduković, 2013). Метода молекулског докинга изведена је за четири једињења из групе триазола и тетразола (**I.2**, **I.4**, **I.5**, **I.6**), чије се IC_{50} вредности налазе у области задовољавајуће и умерене антиканцерогене активности. Метода молекулског докинга за једињења **III.22**, **III.23** и **III.24** описана је у литератури (Nikolić и сар., 2015). У табели 3.3. приказане су IC_{50} вредности *in vitro* испитивања антиканцерогене активности десет стероидних деривата према ћелијској линији AR-нег. PC-3.

Табела 3.3. IC₅₀ вредности *in vitro* испитивања антипролиферативне активности испитиваних стероидних деривата према ћелијској линији AR-нег. РС-3

Једињење	IC ₅₀ (μМ)	Референца
I.1	108,64	Sakač и сар., 2009
I.2	12,27	Sakač и сар., 2009
I.4	78,96	Penov-Gaši и сар., 2013
I.5	15,32	Penov-Gaši и сар., 2013
I.6	65,45	Penov-Gaši и сар., 2013
I.7	> 100	Penov-Gaši и сар., 2013
III.12	> 100	Sakač и сар., 2008
III.22	19,12	Nikolić и сар., 2015
III.23	8,69	Nikolić и сар., 2015
III.24	8,27	Nikolić и сар., 2015

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Хроматографско понашање стероидних деривата

Понашање испитиваних стероидних једињења у течној хроматографији условљено је присуством различитих функционалних група у њиховој сложеној структури. Такође, органски растварачи (модификатори), који улазе у састав мобилне фазе, узрокују различите међумолекулске интеракције између анализата, стационарне и мобилне фазе. Органски растварачи се у односу на донор-акцепторске интеракције водоничних веза могу сврстати у протичне (донори протона у водоничној вези) и апротичне (акцептори протона у водоничној вези). Ретенционо понашање испитиваних стероидних једињења посматрано је у RP системима са C8 и C18 колонама и са два поларна модификатора мобилне фазе, протичним (метанол) и апротичним (ацетонитрил), у варираним запреминским уделима.

Метанол поседује способност да интерагује са молекулима воде, што у хроматографским системима који имају метанол као модификатор мобилне фазе, значајно утиче на ретенцију испитиваних једињења (Natalini и сар., 2006). У воденом раствору метанола, налазе се метанол, вода и метанол везан за воду, чија асоцијација умањује утицај органског модификатора и тако доводи до смањења ретенције.

У испитиваним хроматографским системима коришћен је удео органских модификатора, ацетонитрила и метанола, у опсегу 70 – 80 v/v за систем C18-ацетонитрил-вода, 70 – 85 v/v за систем C18-метанол-вода и 60 – 90 v/v за систем C8-ацетонитрил-вода. У наведеним опсезима органских модификатора испитивана стероидна једињења била су у потпуности растворљива у мобилној фази, што представља неопходан предуслов да би се могло спровести хроматографско испитивање.

Хроматограми представника из сваке групе испитиваних стероидних деривата (**I.3**, **II.11**, **III.13** и **IV.29**) приказани су у прилогу (Слика П–7.1 – Слика П–7.12).

4.1.1. Хроматографско понашање на C18 колони

Као реверсна стационарна фаза која се најчешће користи, октадецил (C18) представља силика гел модификован са дугачким угљоводоничним ланцима са осамнаест атома угљеника. Стога је стационарна фаза је мање поларна од мобилне фазе. Као што је познато, јаке интеракције се јављају између поларне мобилне фазе и поларних молекула. Поларни молекули се мање адсорбују на колону и због тога имају мању ретенцију од неполарних молекула који интерагују са угљоводоничним групама, помоћу Ван дер Валсових (*Van der Waals*) дисперзионих сила. Неполарни молекули се због веће адсорпције дуже задржавају на колони, што има за последицу већу ретенцију. Како је метанол генерално поларнији од ацетонитрила, поларнији молекули се мање адсорбују на колону и имају мању ретенцију у систему метанол-вода. Пошто испитивана стероидна једињења нису јако поларна, може се претпоставити да ће интеракције између њих и мобилне фазе ацетонитрил-вода бити јаче него интеракције између испитиваних једињења и мобилне фазе са метанолом. Стога је ретенција испитиваних једињења у систему са ацетонитрилом нижа од ретенције у систему са метанолом.

За вариране запреминске уделе ацетонитрила и метанола у мобилној фази приказане су вредности $\log k$ параметра, као и његове стандарне девијације (Табела 4.1. и Табела 4.2). Може се закључити да су вредности $\log k$ параметра у оба система више када је запремински удео модификатора у мобилној фази нижи. Стога су највише вредности $\log k$ параметра у систему ацетонитрил-вода добијене када је коришћено 70 v/v ацетонитрила, исто као и у систему метанол-вода, када је коришћено 70 v/v метанола у мобилној фази.

Табела 4.1. Експериментални резултати $\log k$ параметра у систему ацетонитрил (ACN)-вода на ZORBAX SB-C18 колони

Једињење	$\log k$ (\pm SD)				
	ACN 70 v/v	ACN 72,5 v/v	ACN 75 v/v	ACN 77,5 v/v	ACN 80 v/v
I.1	-0,836 (\pm 0,004)	-0,958 (\pm 0,000)	*	*	*
I.2	-0,592 (\pm 0,001)	-0,646 (\pm 0,001)	-0,685 (\pm 0,001)	-0,731 (\pm 0,005)	-0,761 (\pm 0,000)
I.3	0,520 (\pm 0,004)	0,440 (\pm 0,006)	0,362 (\pm 0,004)	0,280 (\pm 0,001)	0,211 (\pm 0,000)
I.4	0,202 (\pm 0,001)	0,130 (\pm 0,002)	0,063 (\pm 0,001)	-0,007 (\pm 0,001)	-0,069 (\pm 0,002)
I.5	0,372 (\pm 0,004)	0,297 (\pm 0,003)	0,228 (\pm 0,003)	0,157 (\pm 0,001)	0,095 (\pm 0,001)
I.6	0,472 (\pm 0,004)	0,385 (\pm 0,001)	0,299 (\pm 0,003)	0,210 (\pm 0,001)	0,133 (\pm 0,002)
I.7	0,635 (\pm 0,002)	0,541 (\pm 0,002)	0,454 (\pm 0,001)	0,364 (\pm 0,001)	0,284 (\pm 0,002)
II.8	-0,380 (\pm 0,005)	-0,482 (\pm 0,001)	-0,583 (\pm 0,001)	-0,693 (\pm 0,002)	-0,793 (\pm 0,001)
II.9	0,578 (\pm 0,001)	0,267 (\pm 0,000)	0,159 (\pm 0,001)	0,056 (\pm 0,002)	-0,046 (\pm 0,007)
II.10	0,618 (\pm 0,006)	0,506 (\pm 0,001)	0,392 (\pm 0,000)	0,274 (\pm 0,002)	0,171 (\pm 0,007)
II.11	0,688 (\pm 0,000)	0,582 (\pm 0,003)	0,480 (\pm 0,002)	0,375 (\pm 0,001)	0,283 (\pm 0,005)
III.12	*	*	*	*	*
III.13	-0,324 (\pm 0,002)	-0,400 (\pm 0,001)	-0,474 (\pm 0,000)	-0,553 (\pm 0,005)	-0,631 (\pm 0,000)
III.14	0,122 (\pm 0,000)	0,032 (\pm 0,003)	-0,055 (\pm 0,004)	-0,146 (\pm 0,001)	-0,229 (\pm 0,002)
III.15	0,185 (\pm 0,001)	0,100 (\pm 0,006)	0,012 (\pm 0,001)	-0,081 (\pm 0,000)	-0,164 (\pm 0,001)
III.16	0,262 (\pm 0,003)	0,178 (\pm 0,001)	0,092 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,000)	-0,079 (\pm 0,001)
III.17	0,416 (\pm 0,001)	0,310 (\pm 0,002)	0,206 (\pm 0,001)	0,100 (\pm 0,001)	0,005 (\pm 0,000)
III.18	0,539 (\pm 0,001)	0,434 (\pm 0,005)	0,330 (\pm 0,006)	0,225 (\pm 0,004)	0,127 (\pm 0,001)
III.19	0,745 (\pm 0,001)	0,655 (\pm 0,008)	0,570 (\pm 0,006)	0,483 (\pm 0,001)	0,404 (\pm 0,002)
III.20	1,009 (\pm 0,001)	0,900 (\pm 0,001)	0,796 (\pm 0,003)	0,689 (\pm 0,007)	0,593 (\pm 0,000)
III.21	-0,723 (\pm 0,001)	-0,856 (\pm 0,002)	-1,022 (\pm 0,002)	*	*
III.22	-0,650 (\pm 0,004)	-0,745 (\pm 0,000)	-0,914 (\pm 0,002)	-1,040 (\pm 0,001)	-1,203 (\pm 0,007)
III.23	-0,487 (\pm 0,006)	-0,572 (\pm 0,001)	-0,660 (\pm 0,003)	-0,765 (\pm 0,002)	-0,869 (\pm 0,003)
III.24	-0,485 (\pm 0,000)	-0,563 (\pm 0,002)	-0,644 (\pm 0,004)	-0,734 (\pm 0,001)	-0,813 (\pm 0,005)
III.25	-0,451 (\pm 0,002)	-0,534 (\pm 0,002)	-0,622 (\pm 0,008)	-0,722 (\pm 0,005)	-0,818 (\pm 0,007)
III.26	0,158 (\pm 0,000)	0,073 (\pm 0,001)	-0,010 (\pm 0,001)	-0,093 (\pm 0,000)	-0,172 (\pm 0,006)
III.27	0,450 (\pm 0,004)	0,353 (\pm 0,001)	0,256 (\pm 0,003)	0,152 (\pm 0,002)	0,059 (\pm 0,000)
IV.28	*	*	*	*	*
IV.29	-0,234 (\pm 0,002)	-0,298 (\pm 0,000)	-0,363 (\pm 0,005)	-0,429 (\pm 0,002)	-0,491 (\pm 0,003)

* пик једињења удвојен са пиком растварача

Могуће је запазити да са порастом запреминског удла модификатора у мобилној фази, ретенционо време испитиваних стероидних једињења опада. Ретенциони подаци прве групе (триазоли и тетразоли) показују да су триазоли (једињења **I.1** - **I.3**) поларнији од тетразола (**I.4** - **I.7**). У трећој групи (нитрили и динитрили), која је и најбројнија, нитрили (**III.12** - **III.20**) показују већу поларност од динитрила (**III.21** - **III.27**).

Табела 4.2. Експериментални резултати $\log k$ параметра у систему метанол (MeOH)-вода на ZORBAX SB-C18 колони

Једињење	$\log k$ (\pm SD)				
	MeOH 70 v/v	MeOH 75 v/v	MeOH 77,5 v/v	MeOH 80 v/v	MeOH 85 v/v
I.1	0,069 (\pm 0,002)	-0,153 (\pm 0,002)	-0,270 (\pm 0,004)	-0,381 (\pm 0,002)	-0,612 (\pm 0,000)
I.2	0,254 (\pm 0,000)	0,033 (\pm 0,002)	-0,083 (\pm 0,001)	-0,190 (\pm 0,002)	-0,409 (\pm 0,000)
I.3	1,442 (\pm 0,002)	1,102 (\pm 0,000)	0,942 (\pm 0,003)	0,790 (\pm 0,002)	0,478 (\pm 0,001)
I.4	0,676 (\pm 0,000)	0,400 (\pm 0,003)	0,280 (\pm 0,004)	0,156 (\pm 0,006)	-0,097 (\pm 0,000)
I.5	0,913 (\pm 0,001)	0,611 (\pm 0,003)	0,482 (\pm 0,001)	0,351 (\pm 0,001)	0,082 (\pm 0,002)
I.6	1,107 (\pm 0,005)	0,797 (\pm 0,000)	0,647 (\pm 0,002)	0,502 (\pm 0,001)	0,210 (\pm 0,001)
I.7	1,343 (\pm 0,004)	1,001 (\pm 0,004)	0,845 (\pm 0,003)	0,688 (\pm 0,003)	0,376 (\pm 0,001)
II.8	0,141 (\pm 0,003)	-0,152 (\pm 0,002)	-0,300 (\pm 0,003)	-0,450 (\pm 0,001)	-0,772 (\pm 0,000)
II.9	0,847 (\pm 0,002)	0,499 (\pm 0,001)	0,316 (\pm 0,000)	0,155 (\pm 0,001)	-0,160 (\pm 0,003)
II.10	1,310 (\pm 0,002)	0,908 (\pm 0,001)	0,731 (\pm 0,001)	0,549 (\pm 0,003)	0,193 (\pm 0,001)
II.11	1,232 (\pm 0,002)	0,849 (\pm 0,004)	0,685 (\pm 0,001)	0,510 (\pm 0,006)	0,170 (\pm 0,002)
III.12	-0,189 (\pm 0,004)	-0,380 (\pm 0,000)	-0,487 (\pm 0,001)	-0,594 (\pm 0,001)	-0,849 (\pm 0,003)
III.13	-0,140 (\pm 0,001)	-0,340 (\pm 0,001)	-0,442 (\pm 0,000)	-0,539 (\pm 0,005)	-0,748 (\pm 0,005)
III.14	0,475 (\pm 0,003)	0,200 (\pm 0,003)	0,063 (\pm 0,002)	-0,069 (\pm 0,001)	-0,340 (\pm 0,002)
III.15	0,560 (\pm 0,002)	0,271 (\pm 0,000)	0,136 (\pm 0,002)	-0,001 (\pm 0,001)	-0,275 (\pm 0,000)
III.16	0,679 (\pm 0,001)	0,387 (\pm 0,000)	0,249 (\pm 0,002)	0,114 (\pm 0,001)	-0,158 (\pm 0,000)
III.17	0,946 (\pm 0,004)	0,614 (\pm 0,002)	0,471 (\pm 0,001)	0,317 (\pm 0,000)	0,012 (\pm 0,002)
III.18	1,128 (\pm 0,001)	0,785 (\pm 0,003)	0,635 (\pm 0,004)	0,475 (\pm 0,007)	0,162 (\pm 0,002)
III.19	1,272 (\pm 0,001)	0,949 (\pm 0,003)	0,802 (\pm 0,000)	0,655 (\pm 0,001)	0,359 (\pm 0,002)
III.20	1,743 (\pm 0,008)	1,371 (\pm 0,001)	1,191 (\pm 0,001)	1,027 (\pm 0,000)	0,666 (\pm 0,001)
III.21	-0,446 (\pm 0,006)	*	*	*	*
III.22	-0,277 (\pm 0,002)	-0,564 (\pm 0,006)	-0,643 (\pm 0,001)	-0,778 (\pm 0,002)	-1,069 (\pm 0,006)
III.23	-0,349 (\pm 0,001)	-0,569 (\pm 0,002)	-0,694 (\pm 0,000)	-0,814 (\pm 0,001)	-1,038 (\pm 0,004)
III.24	-0,304 (\pm 0,005)	-0,526 (\pm 0,006)	-0,645 (\pm 0,003)	-0,760 (\pm 0,005)	-1,057 (\pm 0,001)
III.25	-0,334 (\pm 0,001)	-0,554 (\pm 0,004)	-0,666 (\pm 0,003)	-0,782 (\pm 0,002)	-1,054 (\pm 0,005)
III.26	0,470 (\pm 0,004)	0,194 (\pm 0,001)	0,077 (\pm 0,001)	-0,053 (\pm 0,003)	-0,311 (\pm 0,001)
III.27	0,954 (\pm 0,000)	0,637 (\pm 0,002)	0,487 (\pm 0,000)	0,340 (\pm 0,004)	0,046 (\pm 0,004)
IV.28	-1,033 (\pm 0,000)	*	*	*	*
IV.29	0,092 (\pm 0,001)	-0,105 (\pm 0,005)	-0,206 (\pm 0,007)	-0,301 (\pm 0,001)	-0,499 (\pm 0,007)

* пик једињења удвојен са пиком растварача

У односу на поларност, сва испитивана једињења се понашају у складу са њиховим функционалним групама (хидрокси > оксо > ацетокси > бензилокси), узимајући у обзир да је хидроксидна група најполарнија, а бензилокси најмање поларна функционална група. Све наведено је у складу са теоријом хроматографије (Ковачевић и сар., 2016а).

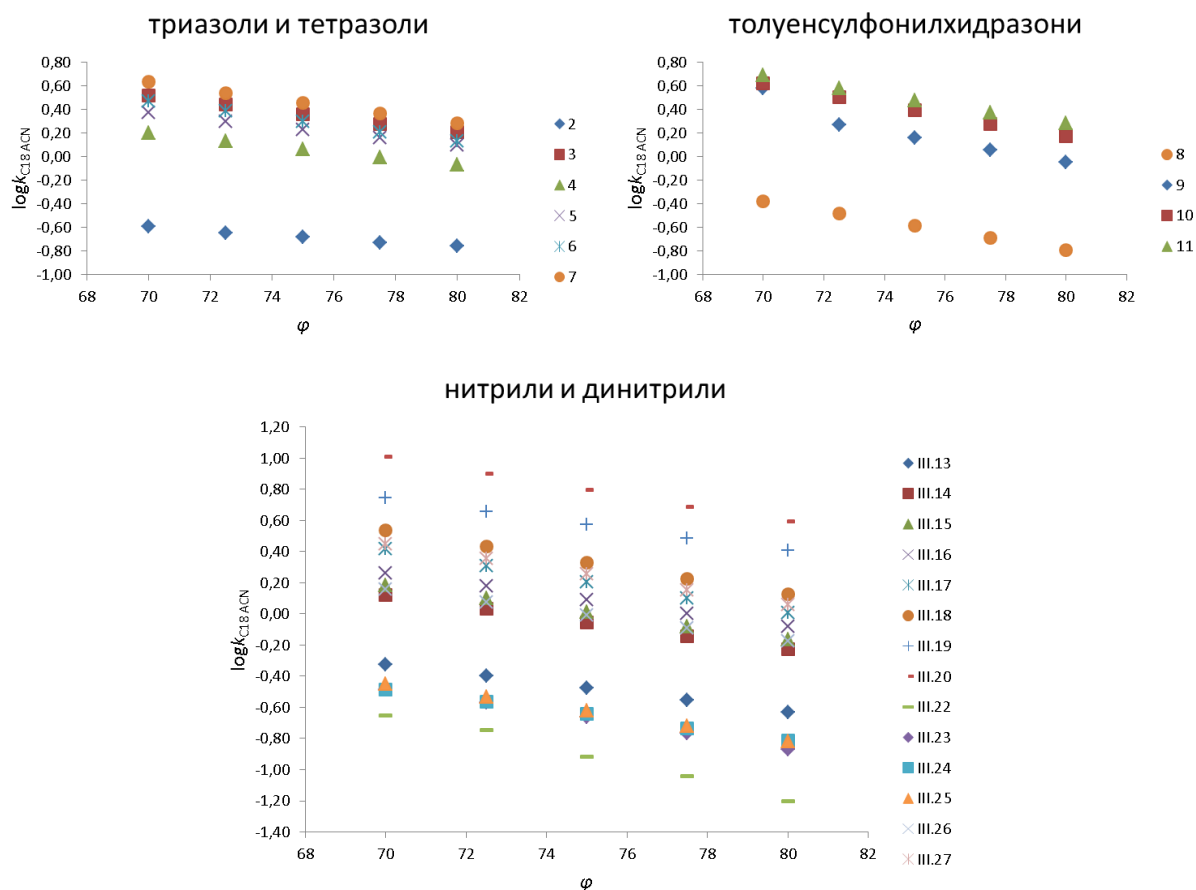
Табела 4.3. Вредности $\Delta \log k$ за увођење или замену функционалних група у систему C18-ацетонитрил-вода

Једињења која се пореде	Разлике	$\Delta \log k$				
		ACN 70 v/v	ACN 72,5 v/v	ACN 75 v/v	ACN 77,5 v/v	ACN 80 v/v
I.1 и I.3	3-OH → 3-BnO	1,356	1,398	-	-	-
I.4 и I.5	17-CH ₃	0,169	0,168	0,165	0,164	0,164
I.6 и I.7	17-CH ₃	0,163	0,156	0,155	0,154	0,150
II.8 и II.9	3-OH → 3-AcO	0,958	0,749	0,742	0,748	0,747
III.14 и III.15	17-CH ₃	0,063	0,068	0,067	0,065	0,065
III.14 и III.16	17-CH ₃	0,139	0,146	0,147	0,147	0,150
III.17 и III.18	17-CH ₃	0,123	0,123	0,124	0,124	0,122
III.21 и III.27	3-OH → 3-BnO	1,172	1,209	1,278	-	-
III.22 и III.26	3-OH → 3-AcO	0,808	0,817	0,905	0,947	1,030

Табела 4.4. Вредности $\Delta \log k$ за увођење или замену функционалних група у систему C18-метанол-вода

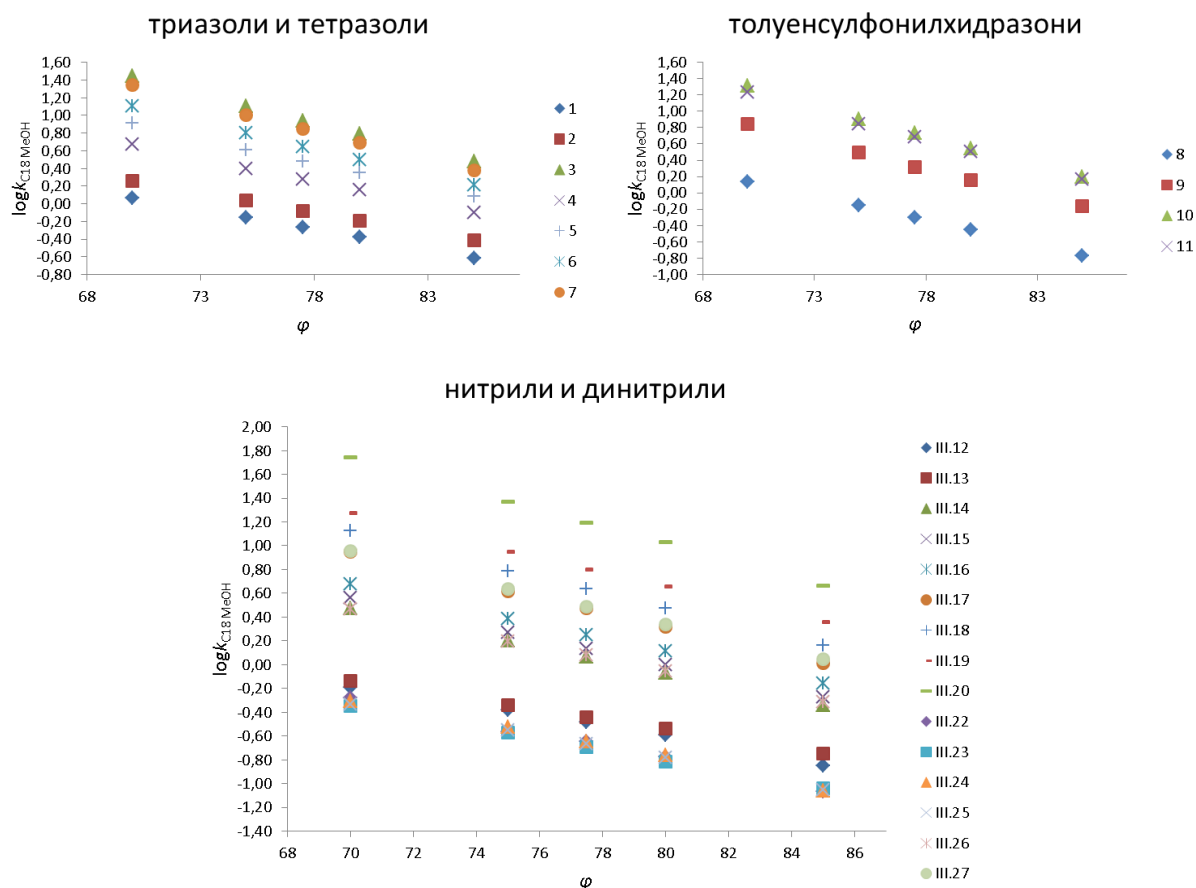
Једињења која се пореде	Разлике	$\Delta \log k$				
		MeOH 70 v/v	MeOH 75 v/v	MeOH 77,5 v/v	MeOH 80 v/v	MeOH 85 v/v
I.1 и I.3	3-OH → 3-BnO	1,373	1,255	1,212	1,171	1,090
I.4 и I.5	17-CH ₃	0,237	0,211	0,201	0,195	0,179
I.6 и I.7	17-CH ₃	0,236	0,204	0,198	0,187	0,166
II.8 и II.9	3-OH → 3-AcO	0,706	0,652	0,616	0,605	0,612
III.14 и III.15	17-CH ₃	0,085	0,071	0,072	0,068	0,065
III.14 и III.16	17-CH ₃	0,205	0,187	0,186	0,183	0,182
III.17 и III.18	17-CH ₃	0,182	0,171	0,164	0,158	0,149
III.21 и III.27	3-OH → 3-BnO	1,400	-	-	-	-
III.22 и III.26	3-OH → 3-AcO	0,747	0,758	0,721	0,725	0,758

Утицај увођења или замене функционалних група на ретенцију приказано је поређењем парова једињења, за оба хроматографска система, приказаних у табели 4.3. и табели 4.4. Замена хидроксидне групе у позицији 3 бензилокси (парови **I.1** и **I.3**, **III.21** и **III.27**) и ацетокси групом (парови **II.8** и **II.9**, **III.22** и **III.26**) значајно утиче на повећање ретенције. Увођењем метил групе у положај 17, такође долази до повећања ретенције, као што је случај код парова једињења **I.4** и **I.5**, **I.6** и **I.7**, **III.14** и **III.15**, **III.14** и **III.16**, **III.17** и **III.18**.



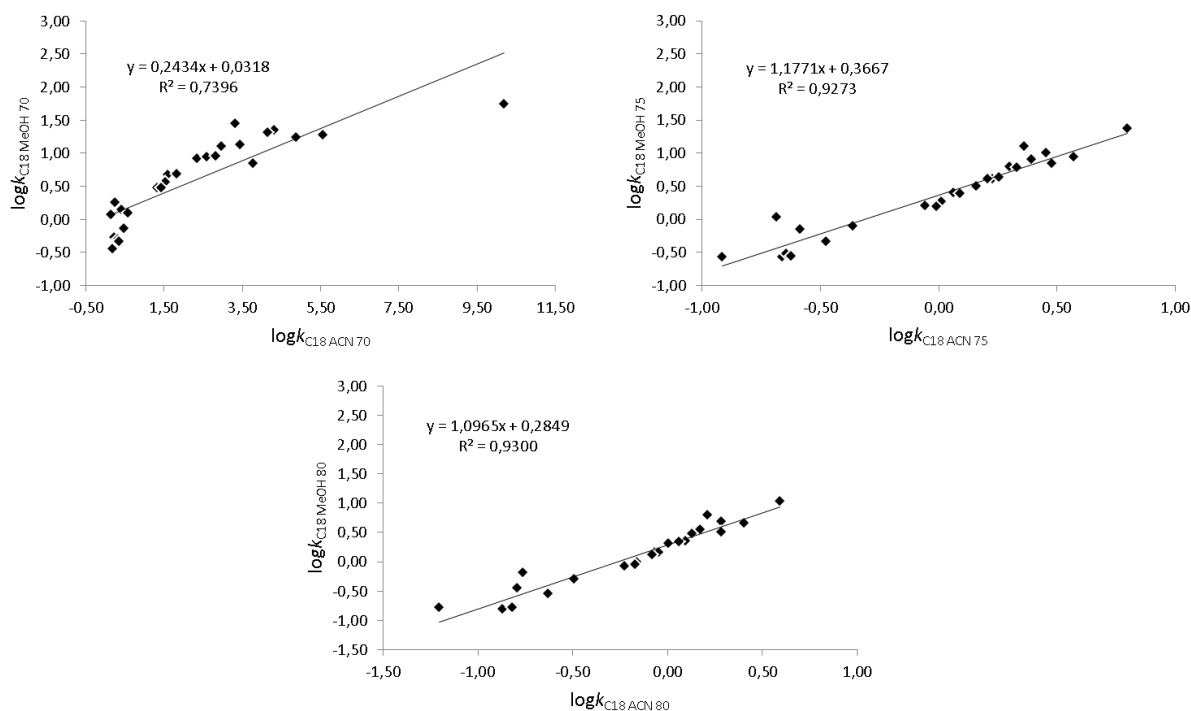
Слика 4.1. Зависност $\log k$ параметра од запреминског удела (φ) ацетонитрила за испитиване серије стероидних деривата у систему C18-ацетонитрил-вода

На слици 4.1. и слици 4.2. приказане су зависности $\log k$ параметра од запреминског удела (φ) ацетонитрила/метанола за сваку појединачну групу унутар серије испитиваних једињења. На основу графичких приказа може се закључити да се $\log k$ параметар правилно мења са променом запреминског удела модификатора. Параметри линеарне зависности између $\log k$ параметра и запреминског удела за оба хроматографска система приказани су у прилогу (Табела П–7.1).



Слика 4.2. Зависност $\log k$ параметра од запреминског удела (φ) метанола за испитиване серије стероидних деривата у систему С18-метанол-вода

Између вредности $\log k$ параметара за различите модификаторе у истим запреминским односима такође се јавља добра линеарна корелација (Слика 4.3). Она указује на могућност замене једног модификатора другим и пружа могућност одабира модификатора који ће, у датом хроматографском систему, резултирати оптималним вредностима $\log k$ параметара.



Слика 4.3. Зависност између вредности $\log k$ параметра израчунате за различите мобилне фазе и различите уделе модификатора (φ) у мобилној фази

4.1.2. Хроматографско понашање на С8 колони

Као друга најчешће коришћена стационарна фаза у RP хроматографији јавља се октил (С8), силика гел модификован са дугачким угљоводоничним ланцима са осам атома угљеника. Вредности $\log k$ параметра и његове стандарне девијације за све испитане комбинације мобилне фазе приказани су у табели 4.5. Може се закључити да са порастом удела органског модификатора у мобилној фази, ретенционо време испитиваних једињења опада. Сходно томе, највише вредности $\log k$ параметра добијене су када је запремински удео ацетонитрила био 60 v/v. Сва испитивана једињења се понашају у складу са поларношћу садржаних функционалних група и важи следеће: бензилокси < ацетокси < оксо < хидрокси. Добијени резултати у складу су са теоријом хроматографије (Ковачевић и сар., 2016а).

Табела 4.5. Експериментални резултати $\log k$ параметра у систему ацетонитрил-вода на *Zorbax Eclipse Plus C8* колони

Једињење	$\log k$ (\pm SD)				
	ACN 60 v/v	ACN 70 v/v	ACN 75 v/v	ACN 80 v/v	ACN 90 v/v
I.1	*	*	*	*	*
I.2	-0,787 (\pm 0,000)	-0,925 (\pm 0,001)	-1,289 (\pm 0,001)	-1,427 (\pm 0,000)	-1,532 (\pm 0,001)
I.3	0,429 (\pm 0,000)	0,033 (\pm 0,004)	-0,164 (\pm 0,000)	-0,359 (\pm 0,005)	-0,798 (\pm 0,000)
I.4	0,133 (\pm 0,001)	-0,202 (\pm 0,002)	-0,367 (\pm 0,001)	-0,522 (\pm 0,001)	-0,871 (\pm 0,003)
I.5	0,269 (\pm 0,000)	-0,071 (\pm 0,002)	-0,235 (\pm 0,007)	-0,394 (\pm 0,001)	-0,735 (\pm 0,003)
I.6	0,429 (\pm 0,000)	0,040 (\pm 0,001)	-0,144 (\pm 0,002)	-0,331 (\pm 0,001)	-0,698 (\pm 0,002)
I.7	0,555 (\pm 0,001)	0,143 (\pm 0,007)	-0,056 (\pm 0,001)	-0,246 (\pm 0,000)	-0,677 (\pm 0,001)
II.8	-0,265 (\pm 0,002)	-0,726 (\pm 0,000)	-0,952 (\pm 0,002)	-1,206 (\pm 0,007)	-1,637 (\pm 0,001)
II.9	*	*	*	*	*
II.10	0,738 (\pm 0,001)	0,241 (\pm 0,002)	-0,005 (\pm 0,000)	-0,253 (\pm 0,005)	-0,849 (\pm 0,004)
II.11	0,744 (\pm 0,001)	0,290 (\pm 0,002)	0,072 (\pm 0,002)	-0,141 (\pm 0,002)	-0,623 (\pm 0,001)
III.12	*	*	*	*	*
III.13	-0,266 (\pm 0,001)	-0,604 (\pm 0,003)	-0,787 (\pm 0,004)	-0,912 (\pm 0,004)	-1,474 (\pm 0,000)
III.14	0,188 (\pm 0,001)	-0,198 (\pm 0,002)	-0,401 (\pm 0,000)	-0,600 (\pm 0,001)	-1,054 (\pm 0,002)
III.15	0,236 (\pm 0,001)	-0,160 (\pm 0,001)	-0,359 (\pm 0,000)	-0,560 (\pm 0,006)	-0,996 (\pm 0,002)
III.16	0,304 (\pm 0,001)	-0,082 (\pm 0,006)	-0,271 (\pm 0,000)	-0,465 (\pm 0,003)	-0,865 (\pm 0,001)
III.17	0,494 (\pm 0,002)	0,047 (\pm 0,002)	-0,179 (\pm 0,000)	-0,408 (\pm 0,003)	-0,930 (\pm 0,004)
III.18	0,596 (\pm 0,003)	0,146 (\pm 0,003)	-0,076 (\pm 0,002)	-0,300 (\pm 0,001)	-0,854 (\pm 0,001)
III.19	0,740 (\pm 0,004)	0,357 (\pm 0,002)	0,176 (\pm 0,001)	-0,001 (\pm 0,001)	-0,384 (\pm 0,003)
III.20	1,028 (\pm 0,001)	0,568 (\pm 0,001)	0,348 (\pm 0,004)	0,140 (\pm 0,001)	-0,318 (\pm 0,007)
III.21	-0,557 (\pm 0,001)	-0,977 (\pm 0,000)	-1,307 (\pm 0,004)	-1,905 (\pm 0,003)	-1,980 (\pm 0,003)
III.22	-0,572 (\pm 0,002)	-0,929 (\pm 0,004)	-1,225 (\pm 0,002)	-1,507 (\pm 0,000)	-2,201 (\pm 0,006)
III.23	-0,419 (\pm 0,000)	-0,815 (\pm 0,001)	-0,962 (\pm 0,007)	-1,405 (\pm 0,003)	-2,377 (\pm 0,004)
III.24	-0,461 (\pm 0,006)	-0,864 (\pm 0,001)	-0,979 (\pm 0,002)	-1,271 (\pm 0,001)	-1,980 (\pm 0,004)
III.25	-0,139 (\pm 0,002)	-0,737 (\pm 0,001)	-0,881 (\pm 0,002)	-1,114 (\pm 0,005)	-1,980 (\pm 0,000)
III.26	0,194 (\pm 0,001)	-0,171 (\pm 0,004)	-0,353 (\pm 0,000)	-0,541 (\pm 0,004)	-0,929 (\pm 0,000)
III.27	0,511 (\pm 0,000)	0,075 (\pm 0,001)	-0,145 (\pm 0,004)	-0,361 (\pm 0,003)	-0,827 (\pm 0,006)
IV.28	*	*	*	*	*
IV.29	-0,226 (\pm 0,001)	-0,539 (\pm 0,003)	-0,704 (\pm 0,002)	-0,871 (\pm 0,001)	-1,187 (\pm 0,001)

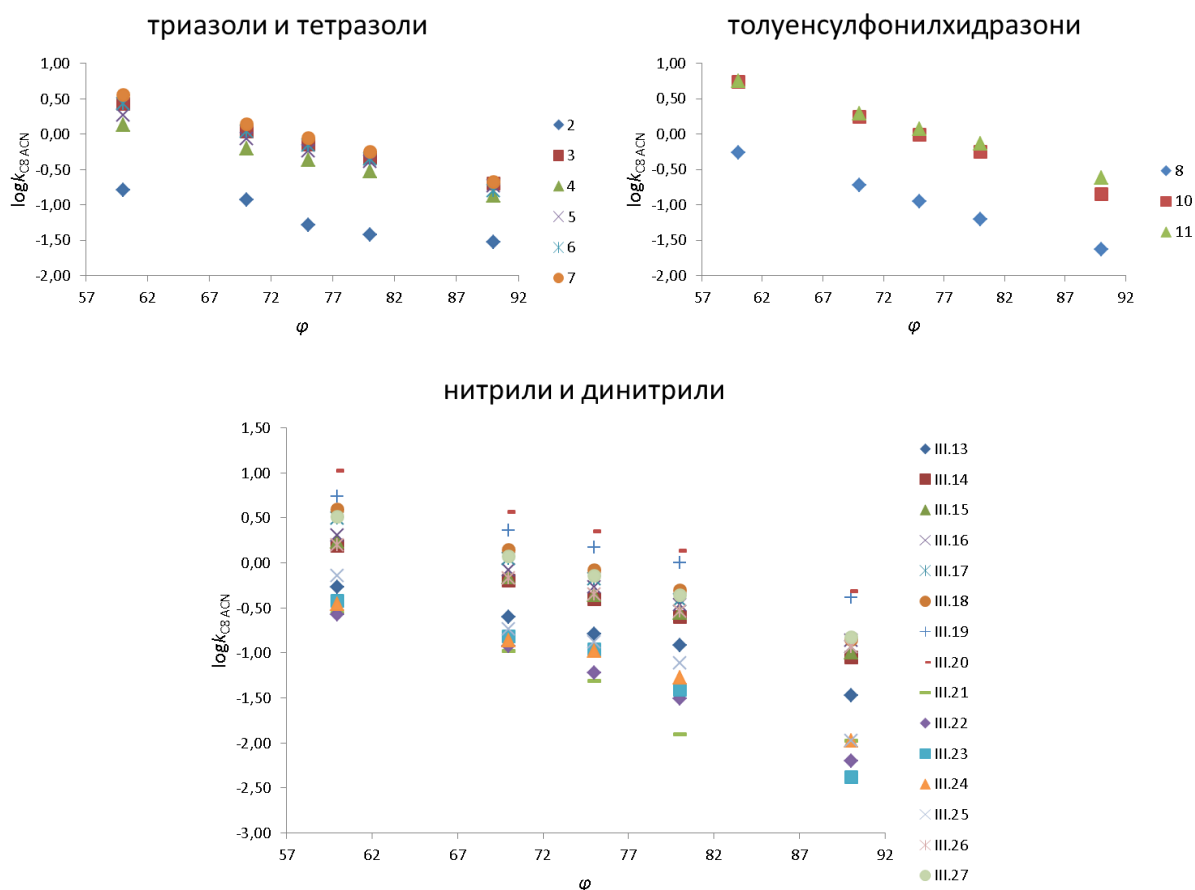
* пик једињења удвојен са пиком растварача

Утицај увођења или замене функционалних група на ретенцију, најбоље се види уколико се упореде парова једињења, која се разликују по присуству појединих супституената. Парови једињења и њихове вредности $\Delta \log k$ параметра приказане су у табели 4.6. Увођење метил групе, као што је случај у паровима **I.4** и **I.5**, **I.6** и **I.7**, **III.14** и **III.15**, **III.14** и **III.16**, **III.17** и **III.18**, доводи до повећања ретенције. Ако се

хидроксидна група у позицији 3 замени бензилокси групом (пар **III.21** и **III.27**) и ацетокси групом (пар **III.22** и **III.26**), ретенција значајно расте.

Табела 4.6. Вредности $\Delta \log k$ за увођење или замену функционалних група

Једињења која се пореде	Разлике	$\Delta \log k$				
		ACN 60 v/v	ACN 70 v/v	ACN 75 v/v	ACN 80 v/v	ACN 90 v/v
I.4 и I.5	17-CH ₃	0,137	0,131	0,133	0,128	0,136
I.6 и I.7	17-CH ₃	0,126	0,110	0,108	0,112	0,121
III.14 и III.15	17-CH ₃	0,049	0,038	0,042	0,040	0,058
III.14 и III.16	17-CH ₃	0,117	0,117	0,129	0,135	0,190
III.17 и III.18	17-CH ₃	0,102	0,099	0,103	0,108	0,076
III.21 и III.27	3-OH → 3-BnO	1,067	1,052	1,162	1,544	1,152
III.22 и III.26	3-OH → 3-AcO	0,766	0,758	0,872	0,966	1,272



Слика 4.4. Зависност $\log k$ параметра од запреминског удела (φ) ацетонитрила за испитиване серије стероидних деривата у систему С8-ацетонитрил-вода

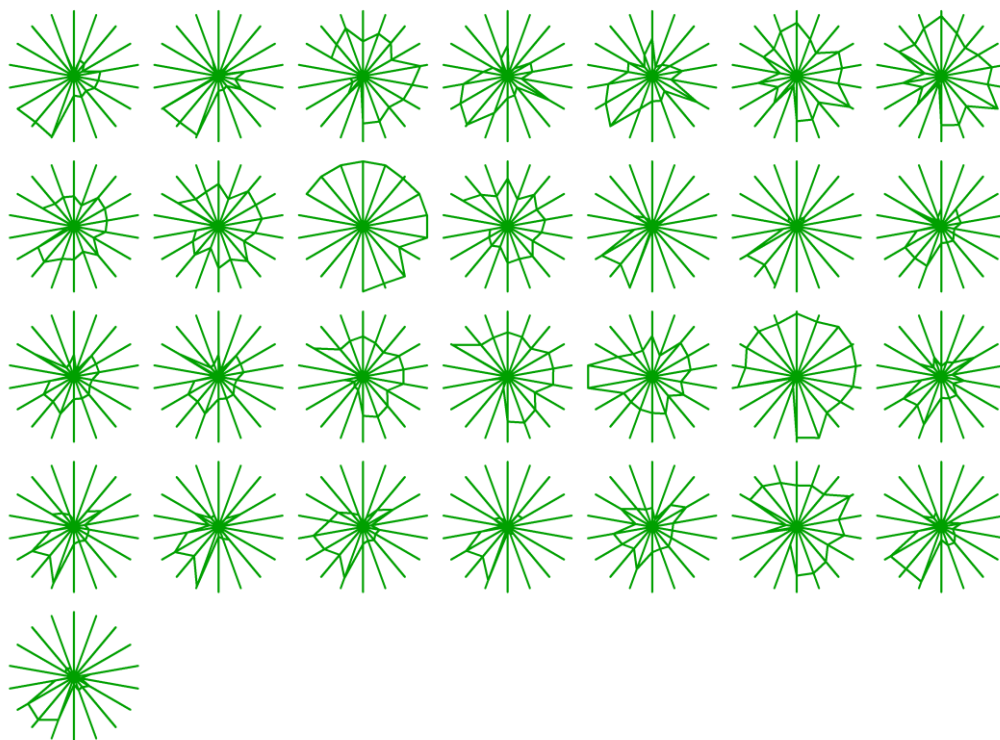
На слици 4.4. приказане су зависности $\log k$ параметра од запреминског удела (φ) ацетонитрила. На основу графичких приказа може се закључити да се $\log k$ параметар

правилно мења са променом запреминског удела модификатора. Параметри линеране зависности између $\log k$ параметра и запреминског удела приказани су у прилогу (Табела П–7.1).

Наведени резултати потврђују да када се говори о ретенцији неког једињења, поред његове молекулске структуре, мора се узети у обзир и утицај мобилне фазе у испитиваном хроматографском систему.

4.1.3. Хроматографска ретенција као алтернативни параметар липофилности

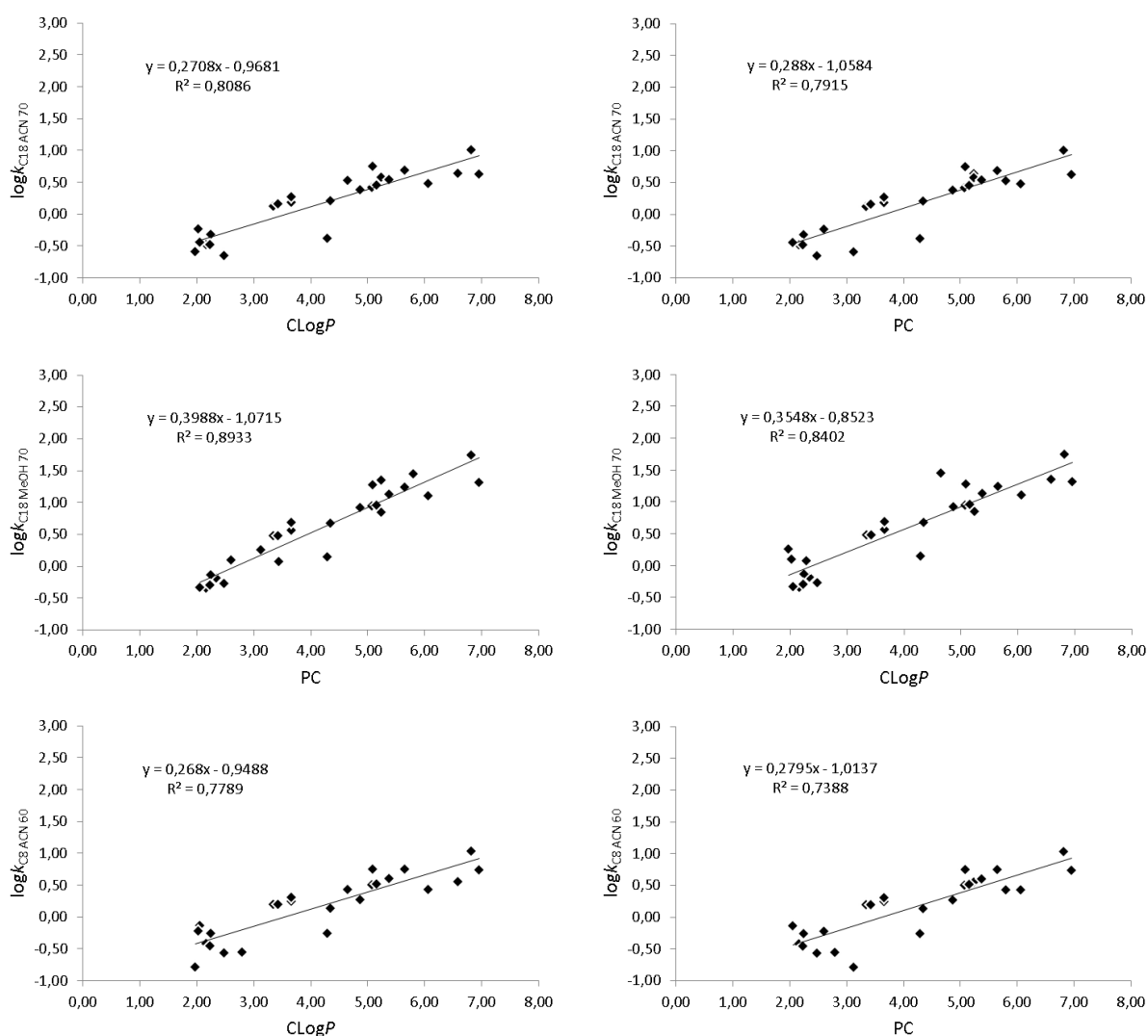
Како је ретенција једињења у RP HPLC одређена хидрофобним интеракцијама, очекује се да постоји линеарна зависност између $\log k$ параметра и параметра липофилности $\log P$. Сет различитих *in silico* вредности параметра липофилности, израчунатих помоћу различитих рачунарских програма, за испитивана једињења приказан је у прилогу (Табела П–7.2).



Слика 4.5. Профили липофилности (у смеру казаљке на сату: $C\log P$, $\log P$, $A\text{LOG}P_s$, $A\text{Clog}P$, $mi\text{Log}P$, $A\text{LOG}P$, $M\text{LOG}P$, $X\text{LOG}P_2$, $X\text{LOG}P_3$, Average $\log P$, $A\text{LOG}P_s$, $A\text{Clog}S$, Average $\log S$, $A\log P$, $A\text{Log}P_2$, Crippen $\text{Log}P$, $M\log P$, $X\text{Log}P$)

Испитивана стероидна једињења се могу сматрати липофилним на основу добијених $\log P$ вредности ($\log P > 1$) (Kovačević и сар., 2016a). Профили липофилности испитиваних стероидних једињења приказани су на слици 4.5.

Линеарне зависности између различитих $\log k$ параметара за сва три хроматографска система и $C\log P/PC$ дескриптора липофилности приказане су на слици 4.6. Изведене корелације ($R^2 > 0,7388$ за PC и $R^2 > 0,7789$ за $C\log P$) између $\log k$ параметара и $C\log P/PC$ вредности указују на то да ретенциони параметар $\log k$, добијен под јасно дефинисаним хроматографским условима, може бити коришћен као алтернативни параметар липофилности (хроматографска липофилност) испитиваних стероидних једињења.

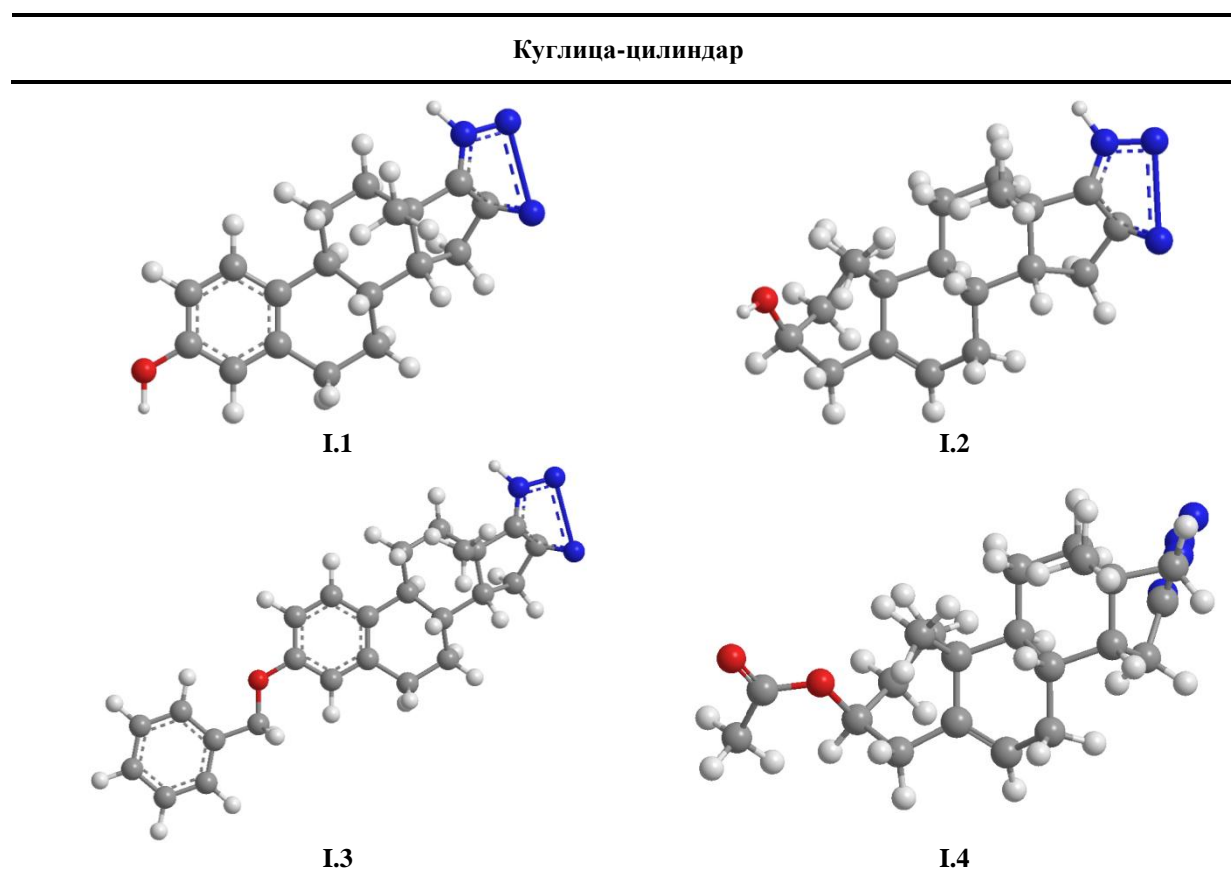


Слика 4.6. Линеарне зависности између $\log k$ параметра и $C\log P/PC$ дескриптора липофилности

4.2. Рачунарско моделовање структуре испитиваних једињења

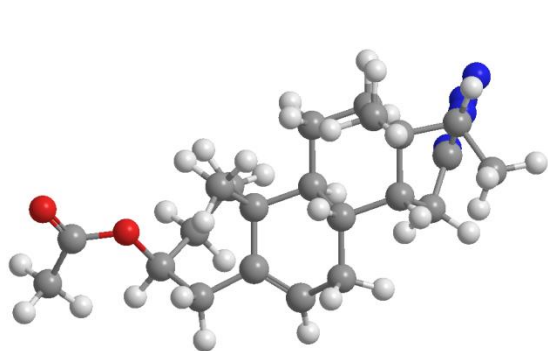
Структура испитиваних стероидних деривата експериментално је потврђена након синтезе помоћу кристалографије рендгенским зрацима (*X-ray*) и спектроскопије (нуклеарне магнетне резонанце (*NMR*), масене спектроскопије високе резолуције (*HRMS*), инфрацрвене спектроскопије (*IR*)) (Gaković, 2008; Sakač и сар., 2008; Sakač и сар., 2009; Penov-Gaši и сар., 2013; Nikolić, 2014; Nikolić и сар., 2015; Oklješa, 2015). Тродимензионалне структуре испитиваних стероидних деривата енергетски су оптимизоване помоћу MM2 методе у програму ChemBio3D и приказане у табели 4.7.

Табела 4.7. 3D модели структуре испитиваних једињења

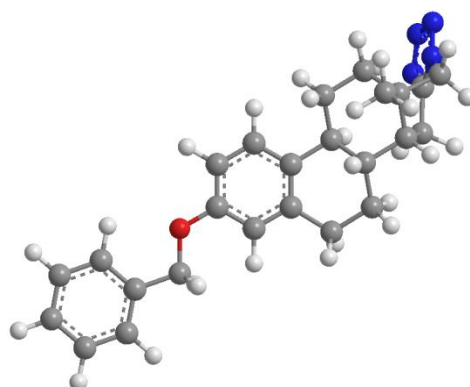


Табела 4.7. 3D модели структуре испитиваних једињења (наставка)

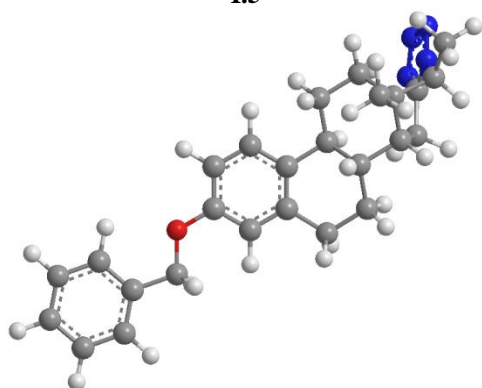
Куглица-цилиндар



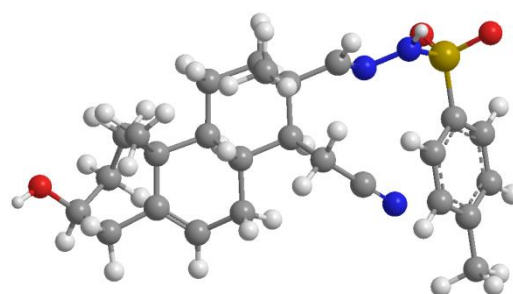
I.5



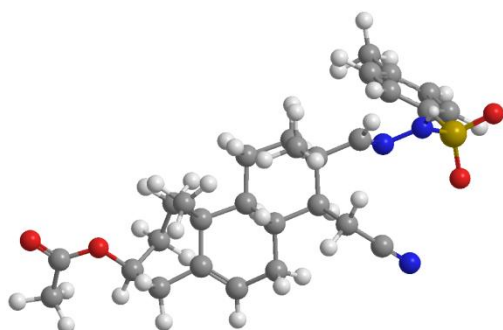
I.6



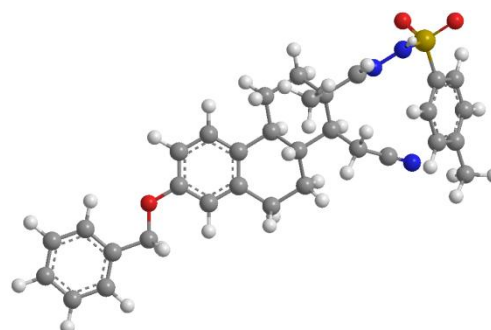
I.7



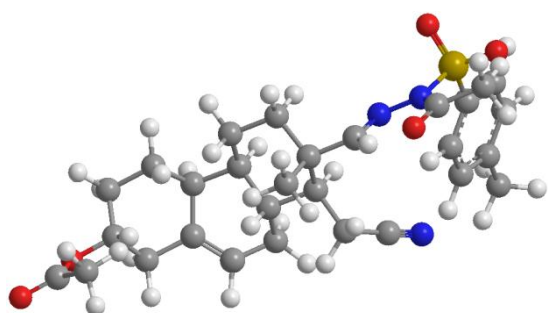
II.8



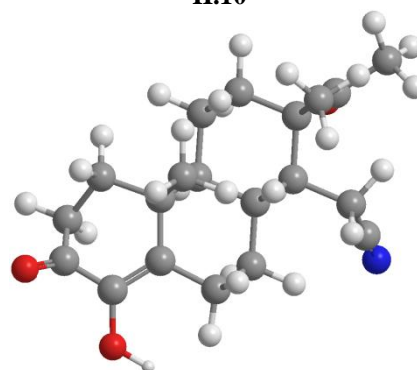
II.9



II.10



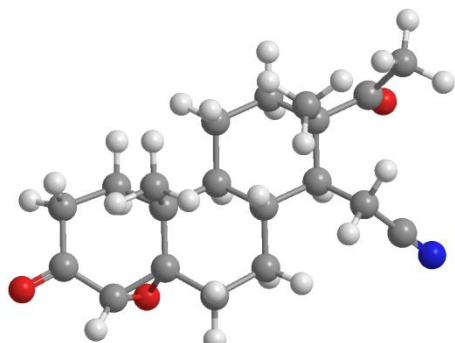
II.11



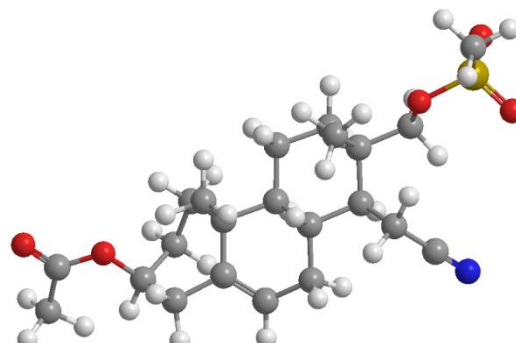
III.12

Табела 4.7. 3D модели структуре испитиваних једињења (наставак)

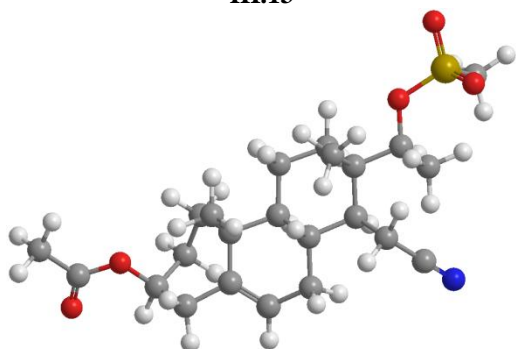
Куглица-цилиндар



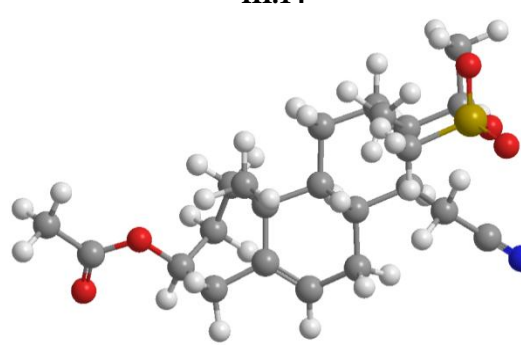
III.13



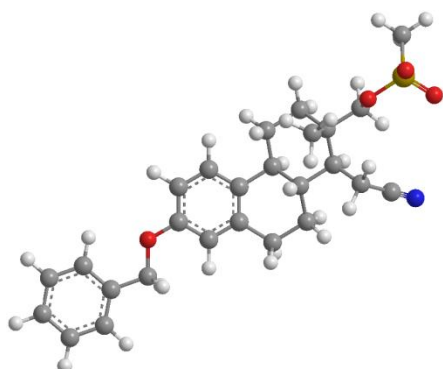
III.14



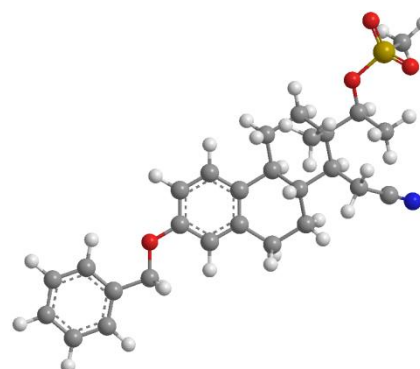
III.15



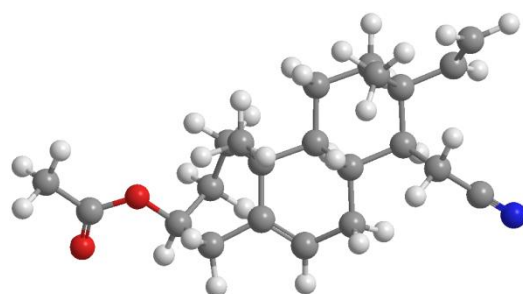
III.16



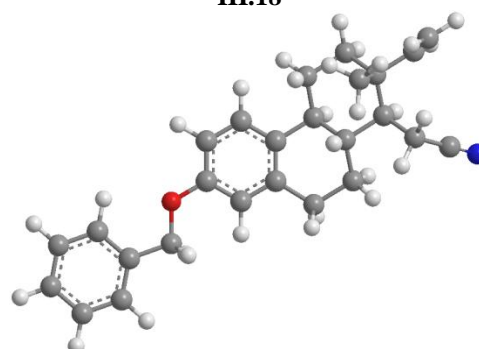
III.17



III.18



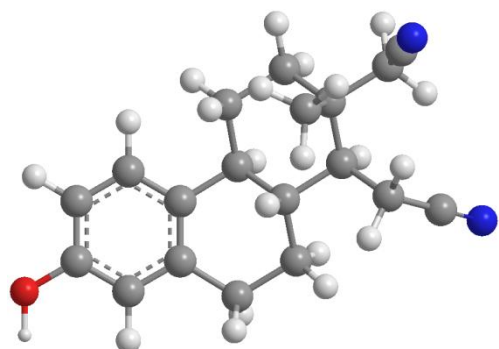
III.19



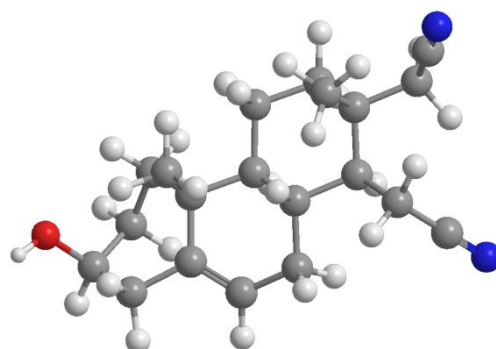
III.20

Табела 4.7. 3D модели структуре испитиваних једињења (наставка)

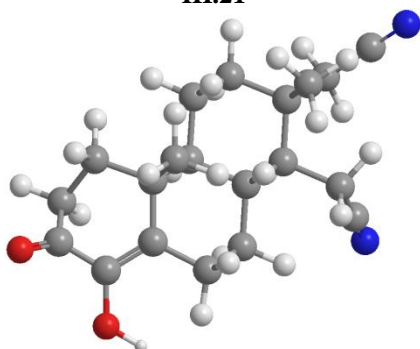
Куглица-цилиндар



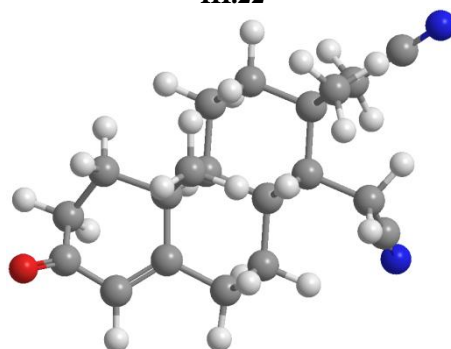
III.21



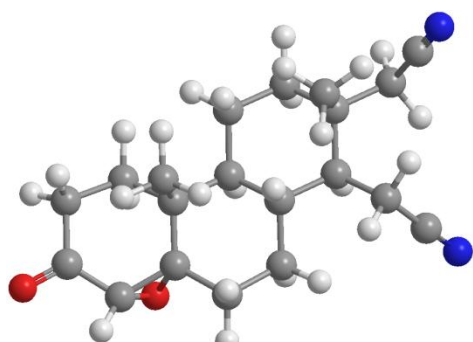
III.22



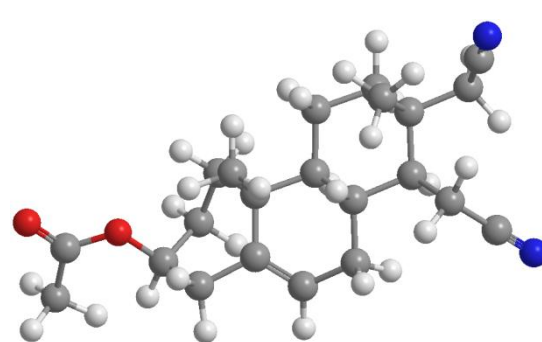
III.23



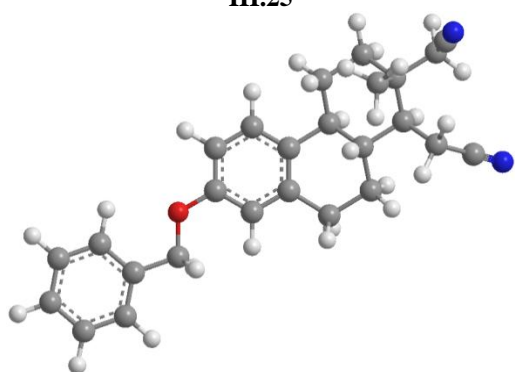
III.24



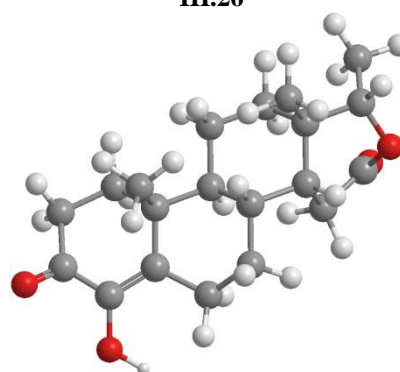
III.25



III.26



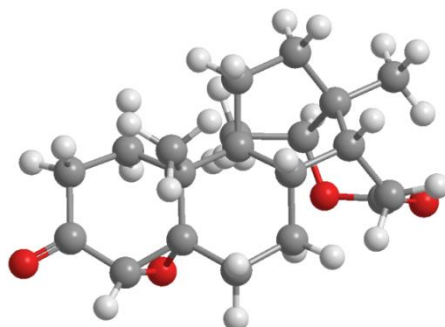
III.27



III.28

Табела 4.7. 3D модели структуре испитиваних једињења (наставак)

Куглица-цилиндар



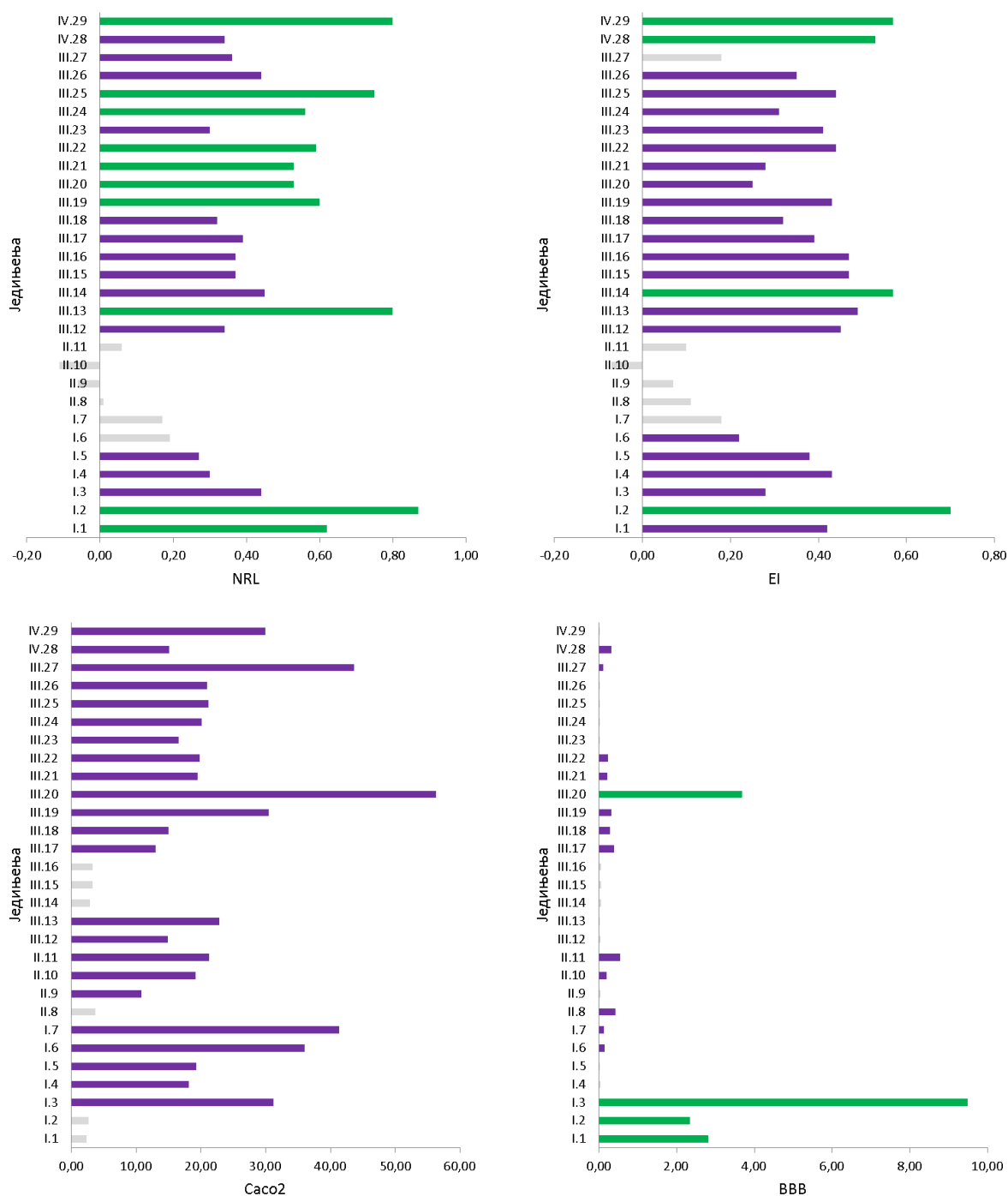
III.29

Након молекулског моделовања, урађено је генерисање сета од 1968 *in silico* молекулских дескриптора. Узимајући у обзир величину сета, у прилогу су приказани само дескриптори коришћени за класификацију и QSRR моделовање. *In silico* молекулски дескриптори, изведени из молекулске структуре испитиваних једињења, представљају независно променљиве величине у даљем QSRR моделовању хроматографске липофилности испитиваних стероидних деривата.

4.3. *In silico* ADMET профили испитиваних стероида

За испитиване стероидне деривате израчунати су *in silico* ADMET молекулски дескриптори (Прилог, Табела II-7.2). Генерално правило гласи: што је добијена вредност биолошког дескриптора већа, испитивано једињење је активније. За вредности способности формирања лиганата са нуклеарним рецептором (NRL) и инхибиције ензима (EI) веће од 0,50 указују на то да постоји висока биолошка активност, вредности од 0,20 до 0,50 указују на средњу активност, док вредности мање од 0,20 указују на ниску активност (Molinspiration Cheminformatics). У односу на референтне вредности, већина једињења поседује средњу биолошку активност (Слика 4.7), осим молекула из групе толуенсулфонилхидразида (II.8 - II.11), што потиче од њихове молекулске структуре односно велике молекулске запремине (438,52 - 510,96). Испитивана једињења се у односу на пропустљивост ћелија аденокарцинома колона према испитиваним једињењима (P_{Caco2}) и апсорпцију кроз крвно-мождану баријеру (BBB) деле на једињења са високом ($P_{Caco2} > 70$ nm/sec; BBB > 2,0), средњом (4 nm/sec

$< P_{\text{Caco2}} < 70 \text{ nm/sec}$; $\text{BBB} = 0,1 - 2,0$) и ниском ($P_{\text{Caco2}} < 4 \text{ nm/sec}$; $\text{BBB} < 0,1$) пропустљивошћу односно апсорпцијом (Yazdaniyan и сар., 1998; Ма и сар., 2005). Већина испитиваних једињења поседује умерену биолошку активност у односу на пропустљивост ћелија аденокарцинома колона и апсорпцију кроз крвно-мождану баријеру (Слика 4.7).



Слика 4.7. *In silico* ADMET профили за NRL, EI, Caco2 и BBB (■ висока активност/пропустљивост/апсорпција; ■ средња активност/пропустљивост/апсорпција; ■ ниска активност/пропустљивост/апсорпција)

4.4. Класификација испитиваних једињења

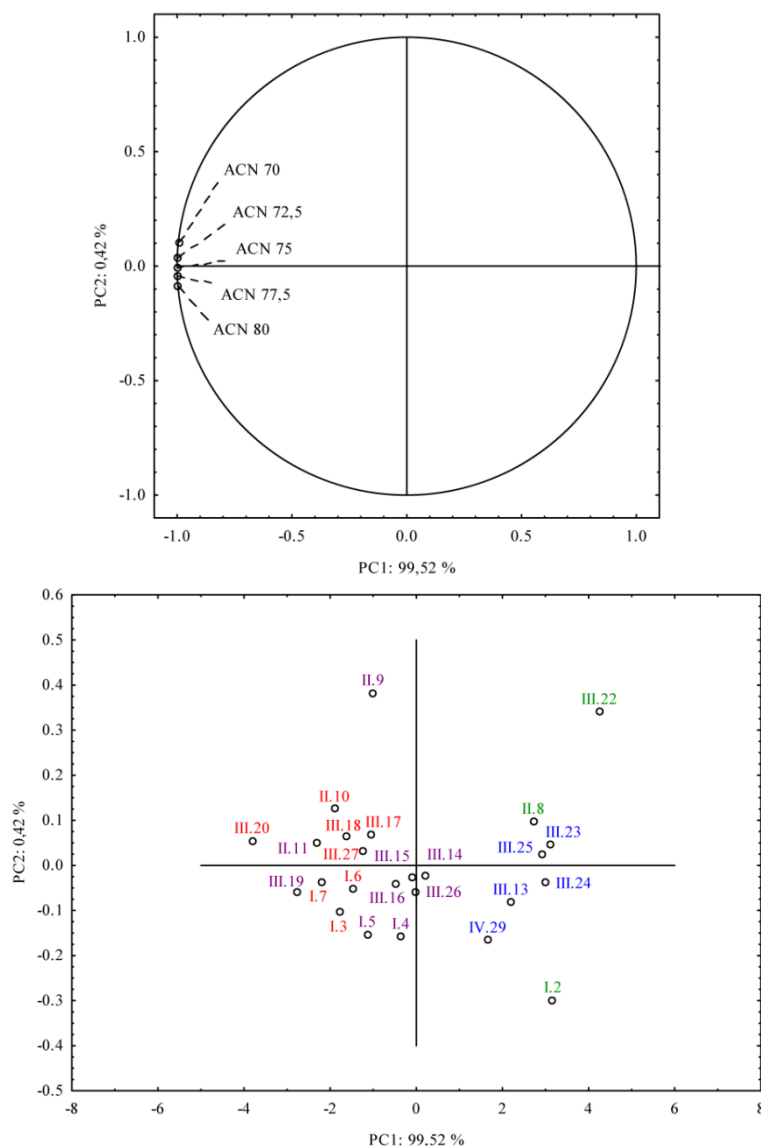
Класификација испитиваних једињења изведена је помоћу две хеометријске технике – анализе главних компоненти (РСА) и хијерархијске кластер анализе (НСА). Класификација је изведена на основу четири сета података – вредности ретенционог параметра $\log k$ за три хроматографска система, као и за *in silico* молекулске дескрипторе липофилности. Циљ примене класификационих техника је да се утврди по којим особинама се испитивана стероидна једињења највише разликују, тј. по којима су најсличнија. РСА анализа је изведена помоћу програма Statistica 10, док је НСА анализа спроведена помоћу програма NCSS 2007.

4.4.1. Анализа главних компоненти

Анализа главних компоненти за вредности $\log k$ параметра у хроматографском систему С18-ацетонитрил-вода (Табела 4.1.) резултовала је моделом са пет главних компоненти. Вредности главних компоненти, проценат њихове укупне варијансе и њихове кумулативне вредности дате су у табели 4.8. За даљу анализу узете су прве две главне компоненте које обухватају 99,94% варијансе, којој РС1 доприноси 99,52%, а РС2 са 0,42%. График коефицијената латентних варијабли и скорова приказан је на слици 4.8.

Табела 4.8. Укупна варијанса објашњена преко својствених вредности

Компонента	Својствене (<i>eigen</i>) вредности			
	Вредност РС	% варијансе	Кумулативна вредност РС	Кумулативни %
1	4,98	99,52	4,98	99,52
2	0,02	0,42	5,00	99,94
3	0,00	0,06	5,00	100,00
4	0,00	0,00	5,00	100,00
5	0,00	0,00	5,00	100,00

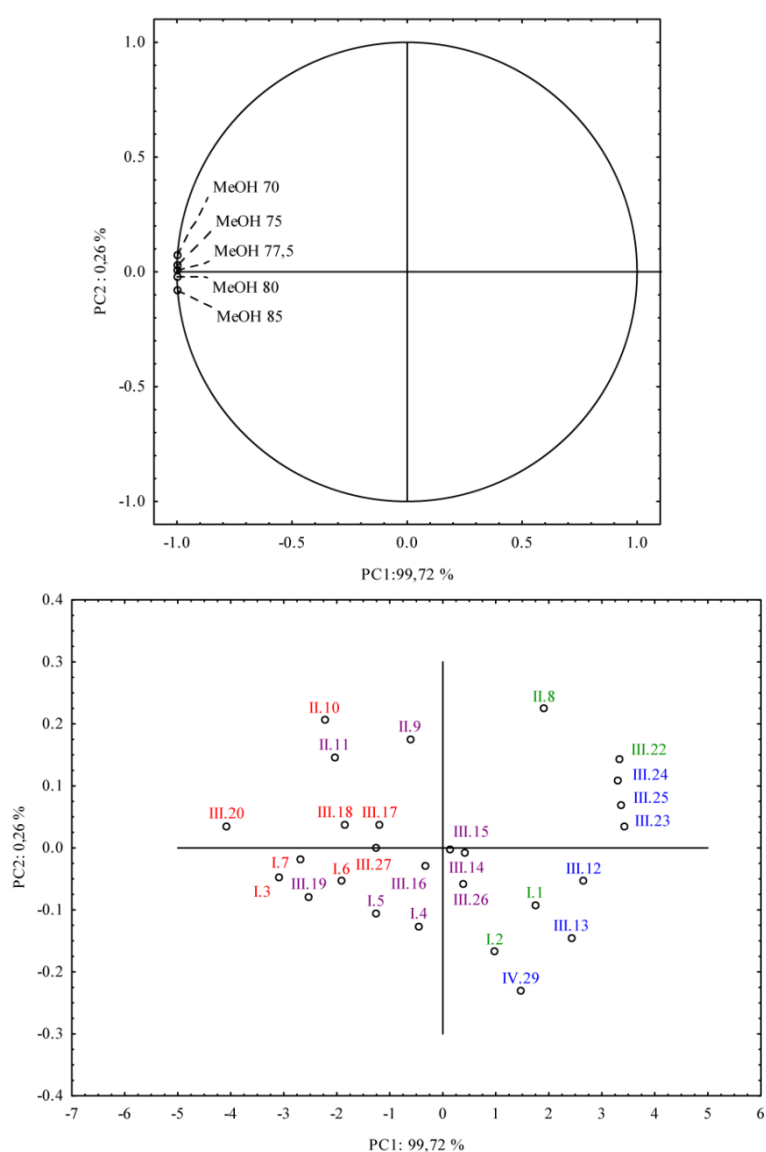


Слика 4.8. Анализа главних компоненти за вредности $\log k$ параметра у хроматографском систему С18-ацетонитрил-вода (зелено - хидрокси, плаво - оксо, љубичасто - ацетокси, црвено - бензилокси функционална група)

Са графика коефицијената латентних варијабли, уочава се, да на положај испитиваних једињења на графику скорова, свих пет запреминских удела имају скоро једнак утицај дуж PC1 и PC2 осе. Свих пет запреминских удела имају негативне коефицијенте латентних варијабли у односу на PC1 осу, док на PC2 осу негативне коефицијенте латентних варијабли имају запремински удели означени са ACN 75, ACN 77,5 и ACN 80. Позитивне коефицијенте латентних варијабли дуж PC2 осе имају ACN 70 и ACN 72,5. Са графика скорова може се закључити да су испитивана једињења груписана у односу на њихову поларност дуж PC1 осе. На позитивном крају PC1 осе налазе се поларнија једињења (са оксо и хидроксидном функционалном групом), док су мање

поларна једињења (са ацетокси и бензилокси функционалном групом) позиционирана на негативном делу РС1 осе. Једињења **I.2**, **II.9** и **III.22** позиционирана су на графику скорова у односу на њихову поларност, као најполарнији представници у оквиру својих група.

Добијени РСА модел за груписање испитиваних једињења на основу вредности $\log k$ параметра у хроматографском систему С18-метанол-вода (Табела 4.2.) састоји се од пет главних компоненти (Табела 4.9). Прве две главне компоненте које описују 99,98% варијансе, којој РС1 доприноси 99,72%, а РС2 са 0,26%. График коефицијената латентних варијабли и скорова приказан је на слици 4.9.



Слика 4.9. Анализа главних компоненти за вредности $\log k$ параметра у хроматографском систему С18-метанол-вода (зелено - хидрокси, плаво - оксо, љубичасто - ацетокси, црвено - бензилокси функционална група)

Табела 4.9. Укупна варијанса објашњена преко својствених вредности

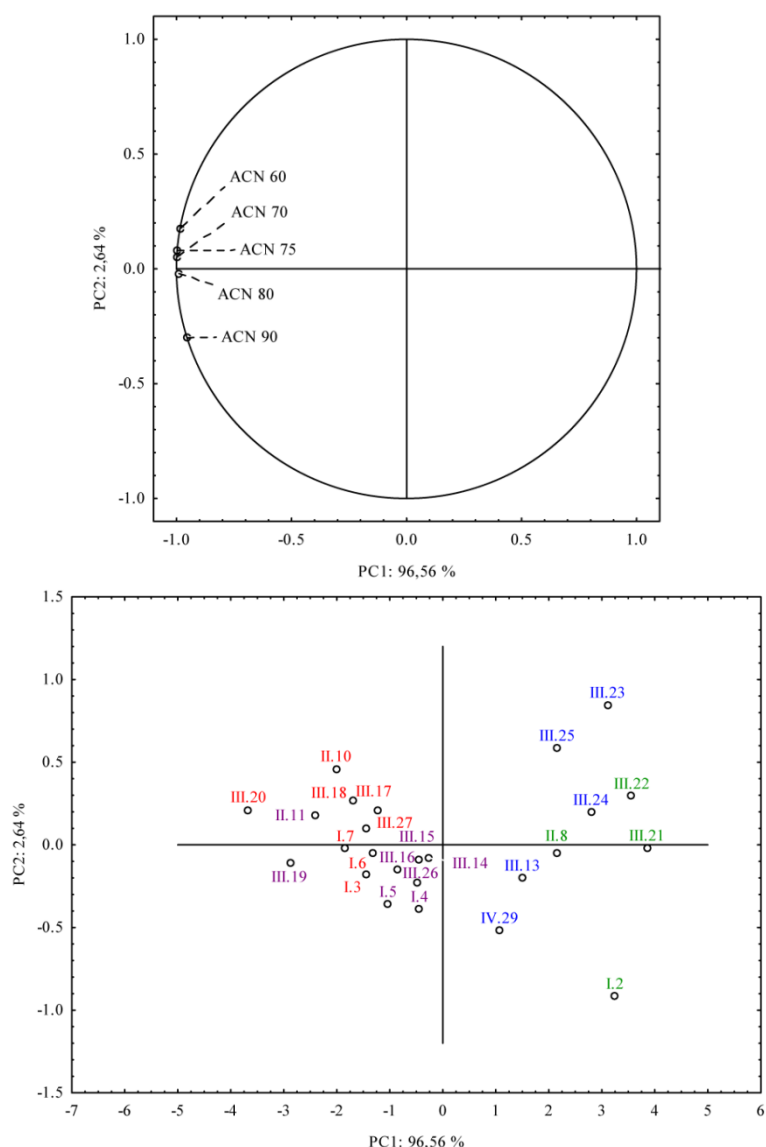
Компонента	Својствене (<i>eigen</i>) вредности			
	Вредност РС	% варијансе	Кумулативна вредност РС	Кумулативни %
1	4,99	99,72	4,99	99,72
2	0,01	0,26	5,00	99,99
3	0,00	0,02	5,00	100,00
4	0,00	0,00	5,00	100,00
5	0,00	0,00	5,00	100,00

Са графика коефицијената латентних варијабли може се закључити да на позиционирање испитиваних једињења на графику скорова свих пет запреминских удела имају скоро једнак утицај у односу на обе осе. Свих пет запреминских удела имају негативне коефицијенте латентних варијабли према РС1 осе, док МеОН 80 и МеОН 85 имају негативне коефицијенте латентних варијабли према РС2 осе. Запремински удели означени као МеОН 70, МеОН 75 и МеОН 77,5 имају позитивне коефицијенте латентних варијабли у односу на РС2 осу. У односу на РС1 осу, на графику скорова, уочава се да су испитивана једињења груписана у односу на њихову поларност. На позитивном крају РС1 осе налазе се поларнија једињења, која имају оксо и хидроксидну функционалну групу. Једињења која садрже ацетокси и бензилокси функционалну групу су, као мање поларна, позиционирана ка негативном крају РС1 осе. Једињења **III.22** – **III.25**, из подгрупе динитрила, имају хидроксидну и оксо групу у положају 3 и груписана су на графику скорова на основу своје поларности.

Резултати спроведене РСА анализе за $\log k$ вредности у хроматографском систему С8-ацетонитрил-вода (Табела 4.5.) изражени су преко пет главних компоненти (Табела 4.10). За даљу анализу узете су прве две главне компоненте које описују 99,20% варијансе, при чему РС1 доприноси 96,56%, а РС2 са 2,64%. График коефицијената латентних варијабли и скорова приказан је на слици 4.10.

Табела 4.10. Укупна варијанса објашњена преко својствених вредности

Компонента	Својствене (<i>eigen</i>) вредности			
	Вредност РС	% варијансе	Кумулативна вредност РС	Кумулативни %
1	4,83	96,56	4,83	96,56
2	0,13	2,64	4,96	99,20
3	0,03	0,64	4,99	99,84
4	0,01	0,10	5,00	99,94
5	0,00	0,06	5,00	100,00



Слика 4.10. Резултати анализе главних компоненти за $\log k$ вредности у хроматографском систему С8-ацетонитрил-вода (зелено - хидрокси, плаво - оксо, љубичасто - ацетокси, црвено - бензилокси функционална група)

На позиционирање испитиваних стероидних једињења, на графику скорова, свих пет запреминских удела имају скоро једнак утицај, осим ACN 90. У односу на PC1 осу, свих пет запреминских удела имају негативне коефицијенте латентних варијабли. Запремински удели означени са ACN 60, ACN 70 и ACN 75 имају позитивне, а ACN 80 и ACN 90 негативне коефицијенте латентних варијабли према PC2 оси. График скорова указује на груписање испитиваних једињења према поларности, у односу на PC1 осу. Поларнија једињења (са оксо и хидроксидном функционалном групом) позиционирана су на позитивном крају PC1 осе, док су мање поларна једињења (са ацетокси и

бензилокси функционалном групом) позиционирана ка негативном крају PC1 осе. Једињење **I.2** позиционирано је на графику скорова на основу своје поларности, као најполарније једињење, односно једињење са најмањим ретенционим временом.

Табела 4.11. Укупна варијанса објашњена преко својствених вредности

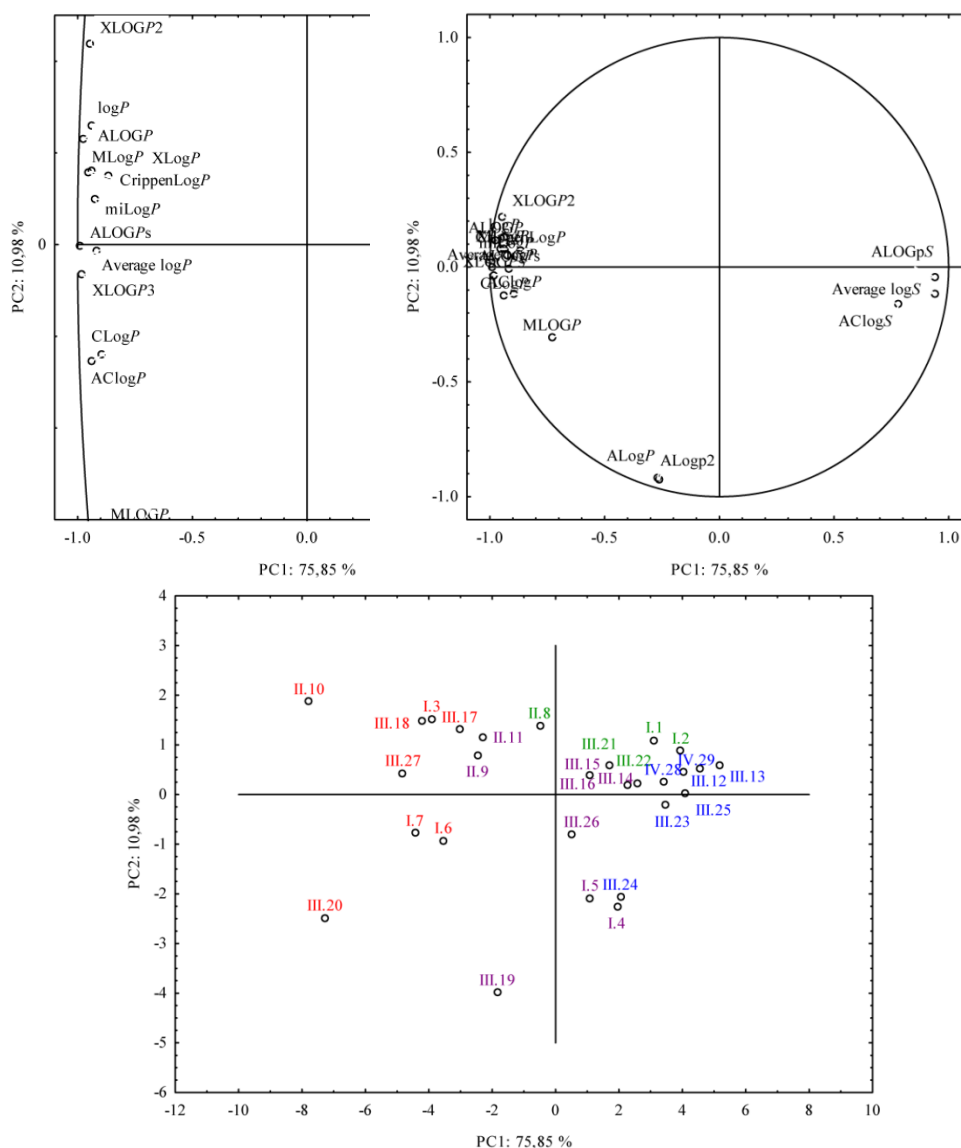
Компонента	Својствене (<i>eigen</i>) вредности			
	Вредност PC	% варијансе	Кумулативна вредност PC	Кумулативни %
1	13,65	75,85	13,65	75,85
2	1,98	10,98	15,63	86,83
3	1,21	6,74	16,84	93,58
4	0,38	2,09	17,22	95,67
5	0,24	1,34	17,46	97,01
6	0,18	0,99	17,64	98,00
7	0,13	0,73	17,77	98,73
8	0,09	0,52	17,86	99,24
9	0,06	0,31	17,92	99,56
10	0,03	0,19	17,95	99,74
11	0,02	0,10	17,97	99,84
12	0,01	0,07	17,98	99,91
13	0,01	0,04	17,99	99,95
14	0,01	0,03	18,00	99,98
15	0,00	0,02	18,00	100,00
16	0,00	0,00	18,00	100,00
17	0,00	0,00	18,00	100,00
18	0,00	0,00	18,00	100,00

PCA модел добијен за вредности *in silico* липофилности (Прилог, Табела П–7.2.) обухвата три главне компоненте са својственим вредностима (*eigenvalues*) већим од 1. За даљу анализу задржане су само прве три компоненте, по Кајзеровом критеријуму (*Kaiser*), пошто су њихове својствене вредности веће од 1, као што је приказано у табели 4.11. (Kaiser, 1960).

Издвојене главне компоненте описују 88,57% варијансе, којој PC1 доприноси са 75,85%, PC2 са 10,98% и PC3 са 6,74%. График коефицијената латентних варијабли и скорова за PC1 и PC2 приказан је на слици 4.11.

График коефицијената латентних варијабли показује да на позиционирање испитиваних једињења на графику скорова дуж PC1 осе најдоминантнији утицај имају ALOGpS, Average logS и AClogS (са позитивним коефицијентима латентних варијабли) и MLOGP са негативним коефицијентом латентних варијабли. На основу графика може се закључити да испитивана једињења позиционирана на позитивном крају PC1 осе имају мању липофилност и већу растворљивост у води у односу на једињења позиционирана на негативном крају PC1 осе. На позиционирање испитиваних

једињења дуж PC2 осе, доминантан утицај имају ALogP и ALogp2, са негативним коефицијентима латентних варијабли. Дуж PC2 осе, на основу графика скорова, може се закључити да испитивана једињења позиционирана ка негативног делу PC2 осе имају веће вредности липофилности од једињења позиционираних на позитивном делу PC2 осе. Једињења **II.10**, **II.19** и **III.20** позиционирана су на графику скорова на основу своје поларности, која је условљена присуством 17-метилен-нитрила (код једињења **II.19** и **III.20**) и бензилокси групом код једињења **II.10**, које је структурно највећи молекул у испитиваној серији.

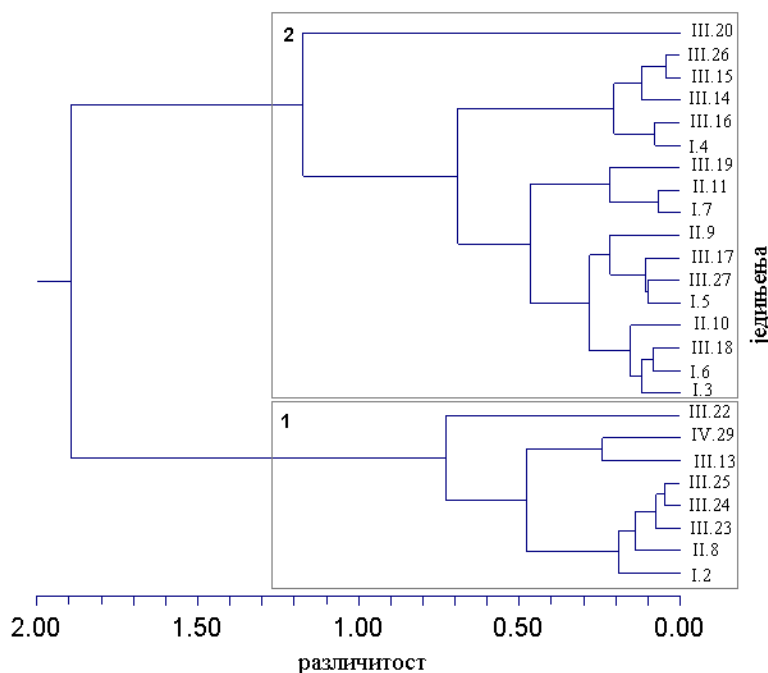


Слика 4.11. Резултати анализе главних компоненти за вредности *in silico* липофилности (зелено - хидрокси, плаво - оксо, љубичасто - ацетокси, црвено - бензилокси функционална група)

На основу спроведених PCA анализа није уочено присуство аутлајера (*outliers*) ни значајнијих разлика између група, тако да је QSRR моделовање изведено помоћу целог сета једињења. Резултати спроведених PCA анализа указују на поларност и липофилност као на факторе дискриминације међу испитиваним стероидним једињењима.

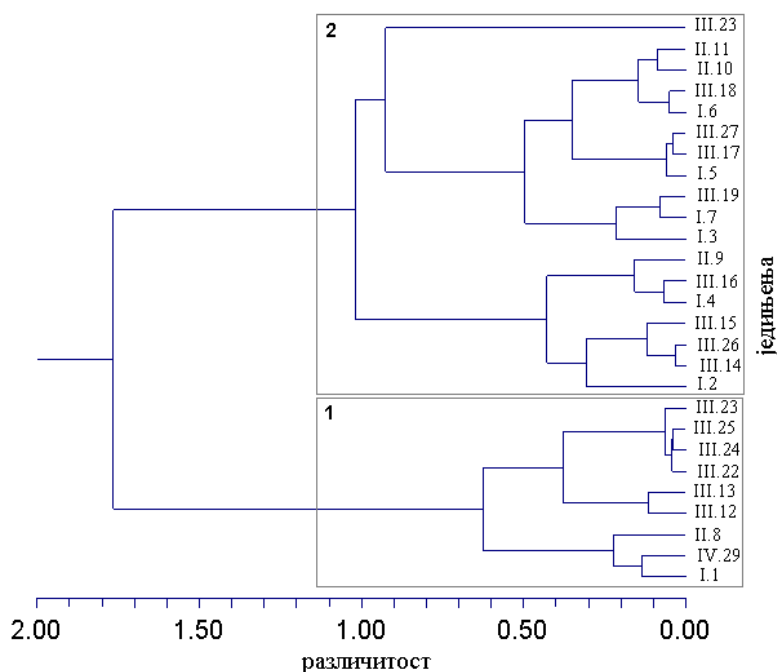
4.4.2. Хијерархијска кластер анализа

Хијерархијска кластер анализа рађена је на истим сетовима података како би се потврдили резултати добијени PCA анализом. Дендрограм кластеровања испитиваних стероидних једињења у хроматографском систему C18-ацетонитрил-вода за вредности $\log k$ (Табела 4.1.) параметра, указује на исто груписање као и код PCA анализе. На основу дендрограма (Слика 4.12.) може да се закључи да су испитивана једињења груписана у два јасно дефинисана кластера са подкластерима. У кластеру 1 налазе се једињења са оксо и хидроксидном функционалном групом (поларнија), док се у кластеру 2 налазе једињења са ацетокси и бензилокси функционалном групом (мање поларна).



Слика 4.12. Дендрограм кластеровања испитиваних једињења у хроматографском систему C18-ацетонитрил-вода за вредности $\log k$ параметра

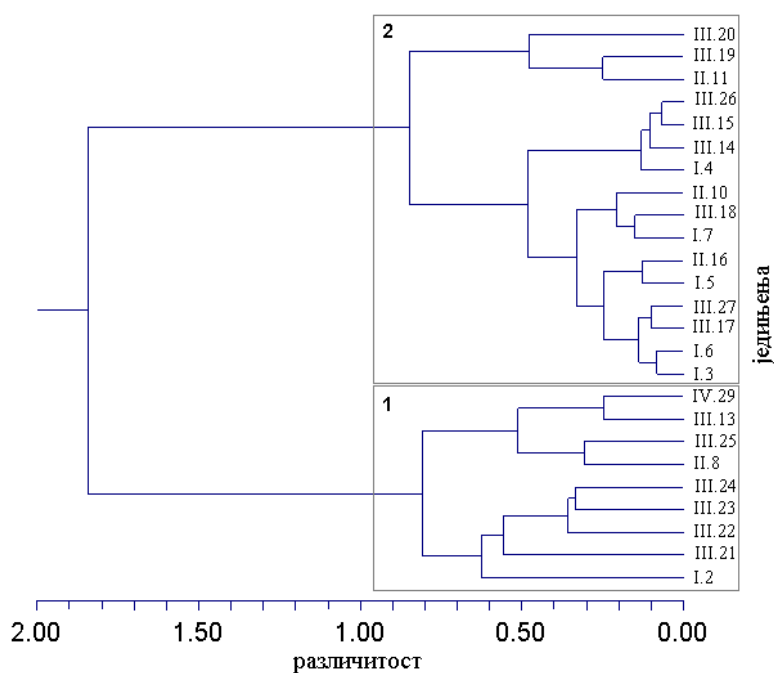
Резултат НСА анализе испитиваних једињења у хроматографском систему С18-метанол-вода за вредности $\log k$ параметра (Табела 4.2.) приказан је на слици 4.13.



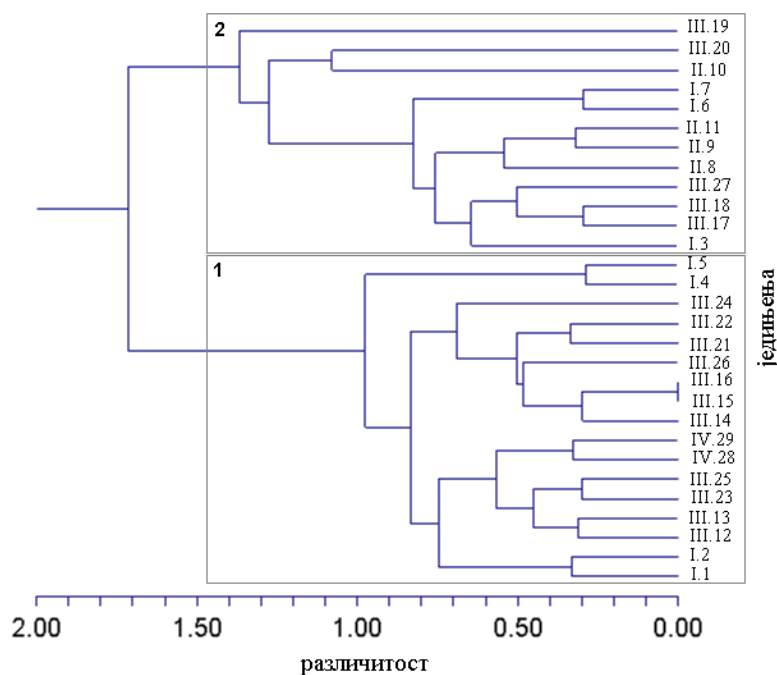
Слика 4.13. Дендрограм кластеровања испитиваних једињења у хроматографском систему С18-метанол-вода за вредности $\log k$ параметра

Дендрограм указује на два јасно дефинисана кластера са подкластерима. У кластеру 1 се налазе поларнија једињења која садрже оксо и хидроксидну функционалну групу, док се у кластеру 2 налазе једињења која су мање поларна (ацетокси и бензилокси функционална група). Резултати добијени НСА анализом потврђују груписање добијено РСА анализом.

Дендрограм добијен као резултат кластеровања испитиваних једињења у хроматографском систему С8-ацетонитрил-вода за вредности $\log k$ параметра (Табела 4.5.) приказан је на слици 4.14. На њему се уочавају два јасно дефинисана кластера са подкластерима и може се закључити да је НСА анализом потврђен резултат добијен РСА анализом. Кластер 1 чине једињења са поларнијим функционалним групама (оксо и хидроксидна) које утичу на поларност самих једињења, док се у кластеру 2 налазе једињења са мање поларним функционалним групама (ацетокси и бензилокси).



Слика 4.14. Дендрограм кластеровања испитиваних једињења у хроматографском систему С8-ацетонитрил-вода за вредности $\log k$ параметра



Слика 4.15. Дендрограм кластеровања испитиваних једињења за вредности *in silico* липофилности

НСА анализа испитиваних једињења за вредности *in silico* липофилности (Прилог, Табела П–7.2.) приказана је помоћу дендрограма на слици 4.15. И у овом случају резултати добијени НСА анализом потврђују резултате добијене РСА анализом. На дендрограму се уочавају два јасно дефинисана кластера са подкластерима, као у

случају груписања код PCA анализе у односу на PC1 осу. У кластеру 1 се налазе једињења која имају мању липофилност и већу растворљивост у води у односу на једињења из кластера 2.

Како ни на основу спроведених HCA анализа није уочено присуство аутлајера (*outliers*) нити значајнијих разлика између група, чиме су потврђени резултати добијени PCA анализом, QSRR моделовање може бити изведено на целом сету једињења. Резултати спроведених HCA анализа такође истичу поларност и липофилност као доминантне факторе приликом дискриминације испитиваних стероидних деривата.

4.5. QSRR моделовање применом линеарне регресије

Да би се добили статистички валидни и значајни модели, који су поуздани за предвиђање ретенционог понашања (хроматографске липофилности) испитиваних једињења, рађена је интерна и екстерна валидација. За линеарно моделовање, узета су следећа једињења подељена у два сета – калибрациони и екстерни тест сет. Калибрациони сет чине:

- 20 једињења у хроматографском систему C18-ацетонитрил-вода (80% од укупног броја једињења) – **I.2 – I.4, I.6 – II.9, II.11, III.14, III.16 – III.20, III.22 – III.27;**
- 22 једињења у хроматографском систему C18-метанол-вода ($\approx 80\%$ од укупног броја једињења) – **I.1 – I.4, I.6 – II.9, II.11, III.12, III.14, III.16 – III.20, III.22 – III.27;**
- 20 једињења у хроматографском систему C8-ацетонитрил-вода (80% од укупног броја једињења) – **I.2 – I.4, I.6 – II.8, II.11, III.14, III.16 – III.27.**

Екстерни тест сет (чине га иста једињења за сва три хроматографска система): 5 једињења ($\approx 20\%$ од укупног броја једињења) – **I.5, II.10, III.13, III.15, IV.29.**

У оквиру линеарног QSRR моделовања карактерише се веза између испитиване зависне променљиве ($\log k$) и једне независне променљиве (молекулског дескриптора). Линеарно моделовање изведено је помоћу програма NCSS 2007. Извдојени су и приказани најбољи LR-QSRR модели за сва три хроматографска система:

- LR1:** $\log k_{C18\ ACN\ 70} = 0,3009 (\pm 0,0330)$ **CLogP** – 1,1026 ($\pm 0,1498$) 4.1.
- LR2:** $\log k_{C18\ ACN\ 70} = 0,3205 (\pm 0,0373)$ **PC** – 1,2013 ($\pm 0,1699$) 4.2.
- LR3:** $\log k_{C18\ ACN\ 80} = 0,3116 (\pm 0,0396)$ **PC** – 1,5383 ($\pm 0,1804$) 4.3.
- LR4:** $\log k_{C18\ ACN\ 80} = 0,2871 (\pm 0,0377)$ **CLogP** – 1,4187 ($\pm 0,1714$) 4.4.
- LR5:** $\log k_{C18\ MeOH\ 70} = 0,4308 (\pm 0,0314)$ **PC** – 1,2050 ($\pm 0,1389$) 4.5.
- LR6:** $\log k_{C18\ MeOH\ 70} = 0,5030 (\pm 0,0444)$ **miLogP** – 1,3614 ($\pm 0,1813$) 4.6.
- LR7:** $\log k_{C18\ MeOH\ 80} = 0,3696 (\pm 0,0312)$ **PC** – 1,5145 ($\pm 0,1380$) 4.7.
- LR8:** $\log k_{C18\ MeOH\ 80} = 0,4334 (\pm 0,0415)$ **miLogP** – 1,6557 ($\pm 0,1696$) 4.8.
- LR9:** $\log k_{C8\ ACN\ 70} = 0,2801 (\pm 0,0349)$ **CLogP** – 1,4132 ($\pm 0,1547$) 4.9.
- LR10:** $\log k_{C8\ ACN\ 75} = 0,2840 (\pm 0,0391)$ **CLogP** – 1,6408 ($\pm 0,1736$) 4.10.

Уочавамо да су као најбољи линеарни модели издвојени они у којима као независна променљива фигуришу дескриптори липофилности (*ClogP*, *PC* и *miLogP*) са позитивним регресионим коефицијентима. На овај начин, још једном је потврђена директна веза између ретенционог параметра $\log k$ и дескриптора липофилности односно, показало се да је RP HPLC погодна алтернатива за одређивање хроматографске липофилности испитиваних деривата. Могуће је закључити и то да липофилност има највећи утицај на дистрибуцију молекула између колоне и мобилне фазе у хроматографском систему.

Како су LR-QSRR модели добијени применом калибрационог сета, изведена је њихова интерна валидација, а потом и екстерна валидација помоћу екстерног тест сета. Статистички параметри интерне и екстерне валидације LR-QSRR модела за предвиђање $\log k$ параметра приказани су у табели 4.12. и табели 4.13.

На основу статистичких параметара сви LR-QSRR модели су валидни. Бољи модели су добијени за систем C18-метанол-вода у односу на моделе за исте запреминске односе за систем C18-ацетонитрил-вода. Додатно, хроматографски систем са мањим запреминским уделом органског модификатора погоднији су за предвиђање вредности $\log k$ параметра. Пошто хроматографски услови на C8 и C18 колони нису били идентични (различити протоци), моделе добијене на ове две колоне није могуће

поредити. Вредности коефицијента детерминације, значајно веће од 0,64, указују на јаку корелацију између варијабли, док високе вредности подешеног коефицијента детерминације и ниске вредности корена средње квадратне грешке указују на добру статистичку валидност модела. Квалитету модела доприносе и релативно ниске вредности суме квадрата одступања од предвиђених вредности, као и ниске вредности стандардне девијације предвиђања.

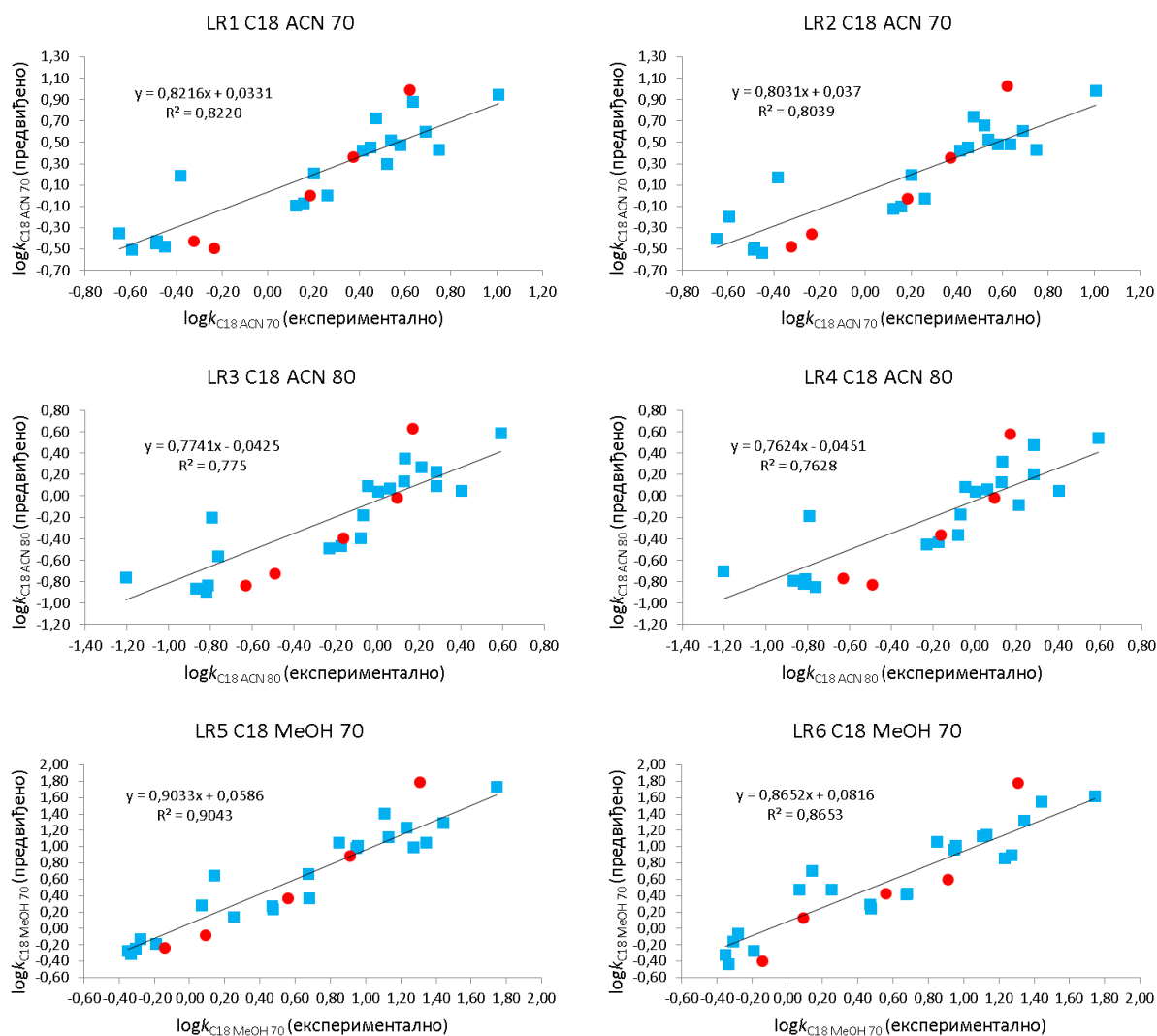
Табела 4.12. Статистички параметри LR-QSRR модела за предвиђање $\log k$ параметра (LR1 – LR5)

Параметри	LR1	LR2	LR3	LR4	LR5
	C18 ACN 70	C18 ACN 70	C18 ACN 80	C18 ACN 80	C18 MeOH 70
R	0,9068	0,8966	0,8801	0,8735	0,9509
R^2	0,8223	0,8038	0,7746	0,7630	0,9042
R^2_{adj}	0,8124	0,7929	0,7621	0,7498	0,8994
F	83,30	73,76	61,86	57,94	188,79
$RMSE$	0,2218	0,2330	0,2474	0,2537	0,2064
p	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
R^2_{cv}	0,7902	0,7695	0,7336	0,7201	0,8896
TSS	4,9820	4,9820	4,8888	4,8888	8,8984
$PRESS$	1,0452	1,1484	1,3026	1,3682	0,9828
$PRESS/TSS$	0,2098	0,2305	0,2664	0,2799	0,1104
SD_{PRESS}	0,2286	0,2396	0,2552	0,2616	0,2114
R_{test}	0,9675	0,9625	0,9290	0,9304	0,9760
R^2_{test}	0,9360	0,9264	0,8630	0,8656	0,9526
$RMSE_{test}$	0,1167	0,1252	0,1505	0,1491	0,1484

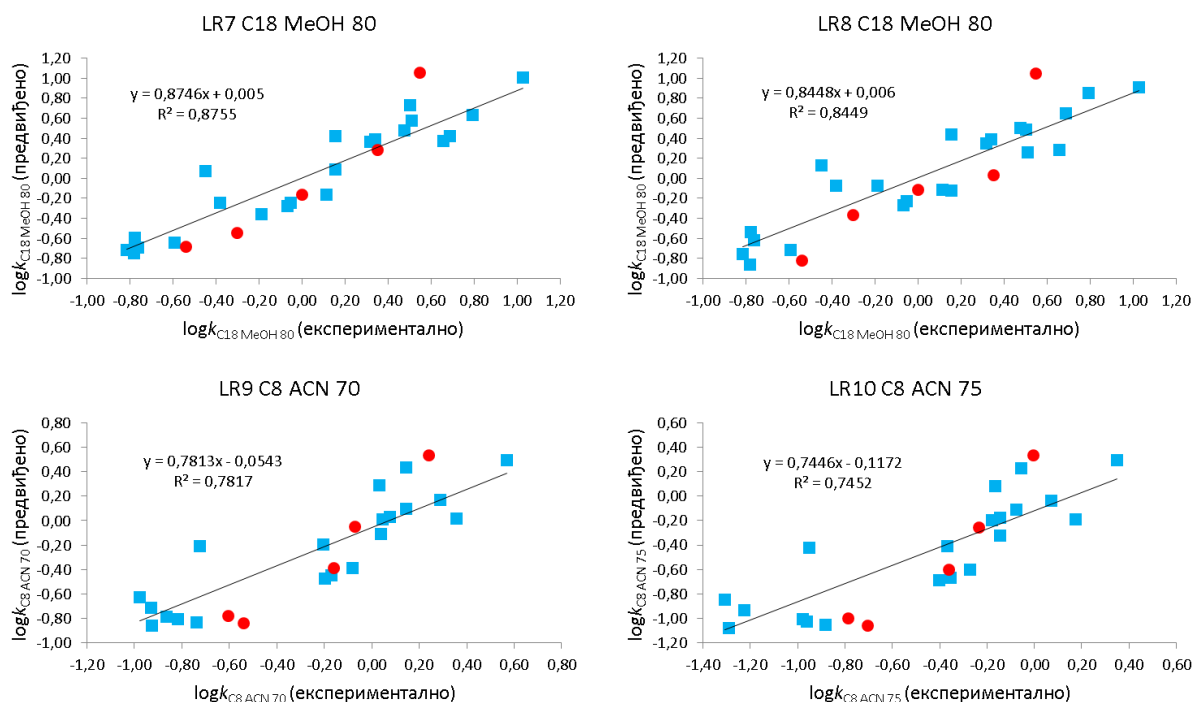
Табела 4.13. Статистички параметри LR-QSRR модела за предвиђање $\log k$ параметра (LR6 – LR10)

Параметри	LR6	LR7	LR8	LR9	LR10
	C18 MeOH 70	C18 MeOH 80	C18 MeOH 80	C8 ACN 70	C8 ACN 75
R	0,9302	0,9357	0,9192	0,8842	0,8633
R^2	0,8652	0,8756	0,8449	0,7817	0,7452
R^2_{adj}	0,8585	0,8694	0,8371	0,7696	0,731
F	128,40	140,78	108,93	64,47	52,64
$RMSE$	0,2449	0,2051	0,2290	0,2373	0,2662
p	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000001
R^2_{cv}	0,8471	0,8569	0,8234	0,7398	0,6945
TSS	8,8984	6,7641	6,7641	4,6428	5,0065
$PRESS$	1,3608	0,9681	1,1947	1,2079	1,5295
$PRESS/TSS$	0,1529	0,1431	0,1766	0,2602	0,3055
SD_{PRESS}	0,2487	0,2098	0,2330	0,2457	0,2765
R_{test}	0,9435	0,9585	0,9208	0,9759	0,9682
R^2_{test}	0,8902	0,9188	0,8479	0,9523	0,9373
$RMSE_{test}$	0,2259	0,1476	0,2021	0,0880	0,0943

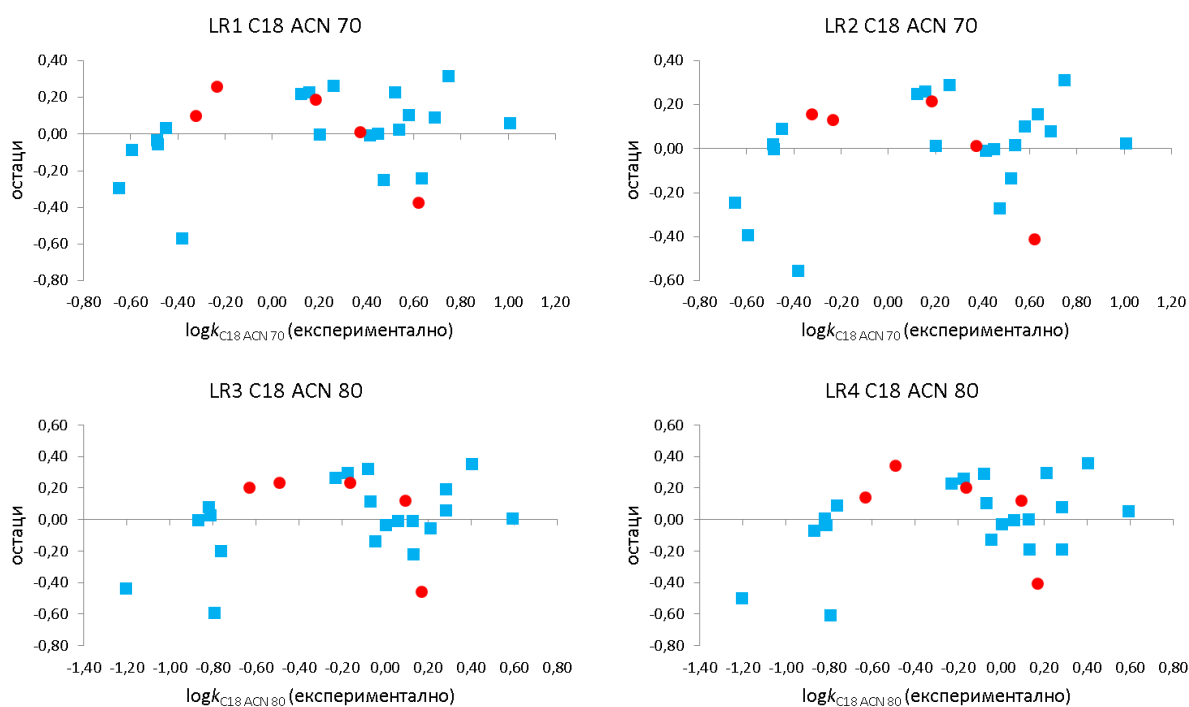
Предиктивна моћ линеарних модела тестирана је помоћу две графичке методе, поређењем експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра (Слика 4.16. и Слика 4.17.) и поређењем експерименталних вредности $\log k$ параметра и остатака (резидуа) за калибрациони и екстерни тест сет (Слика 4.18. и Слика 4.19).



Слика 4.16. Поређење експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра за моделе LR1 – LR6 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)

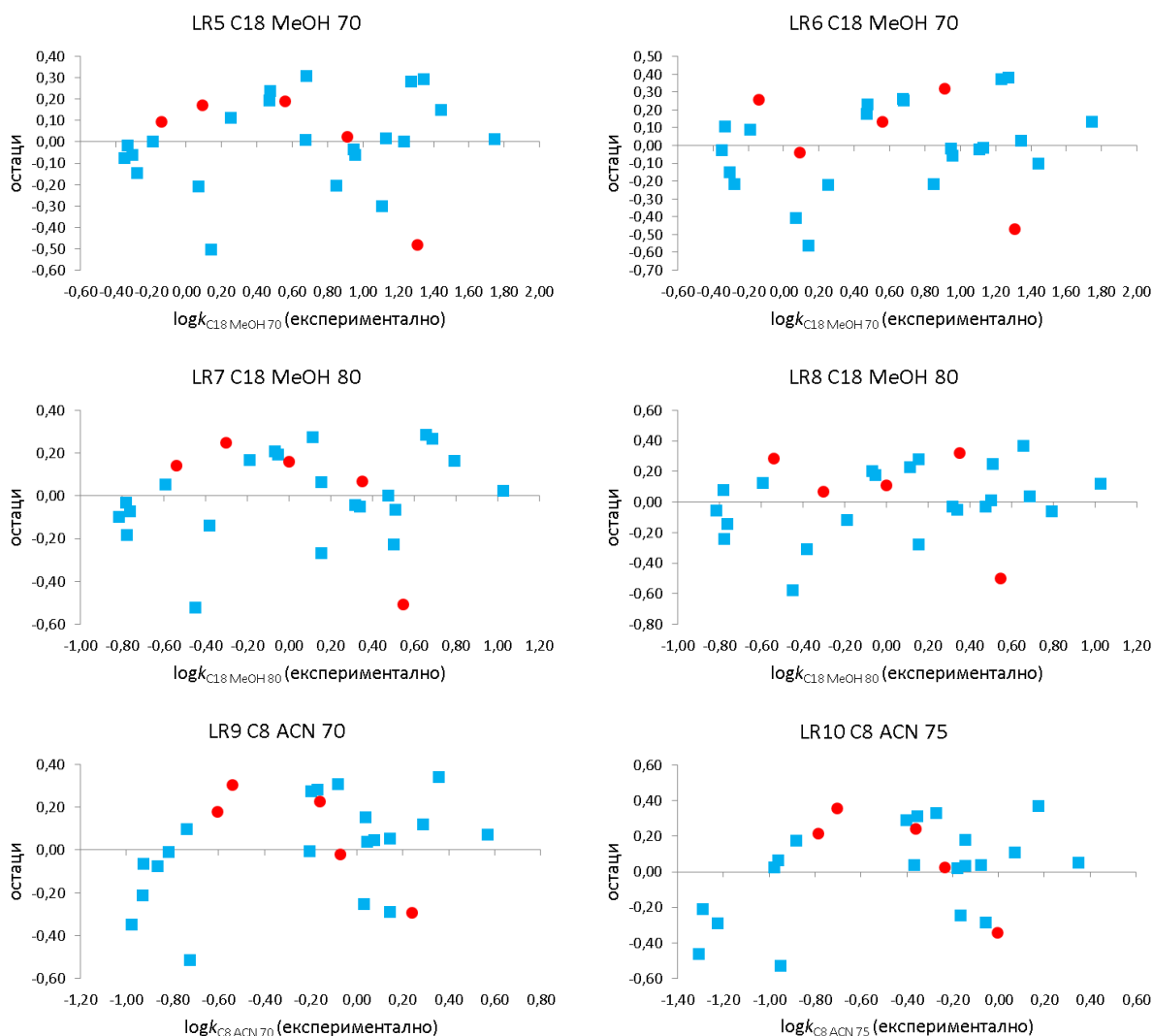


Слика 4.17. Поређење експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра за моделе LR7 – LR10 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)



Слика 4.18. Распореда остатака око $y = 0$ осе за моделе LR1 – LR4 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)

Поређењем експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра може се закључити да се код свих модела јављају високе вредности коефицијента корелације, као и да су вредности нагиба праве теже јединици а вредности одсечка блиске нули. Све наведено указује на добро слагање података код свих модела. Насумичност остатака распоређених око нулте вредности на у осе указује на насумичност грешке предвиђања.



Слика 4.19. Распореда остатака око $y = 0$ осе за моделе LR5 – LR10 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)

Како линеарни QSRR модели дају увид искључиво на утицај једног фактора на $\log k$ параметар испитиваних једињења, неопходно је применити мултипло линеарно моделовање. Узимајући у обзир чињеницу да је хроматографска анализа веома

комплексан процес, неопходно је испитати утицај више од једног фактора на $\log k$ параметар.

4.6. QSRR моделовање применом мултипле линеарне регресије

Пре самог мултиплог линеарног моделовања неопходно је изабрати молекулске дескрипторе. Само моделовање и одабир молекулских дескриптора се врши помоћу програма NCSS 2007. Одабир потенцијалних дескриптора за MLR-QSRR моделе, изведен је помоћу степенасте селекције. У складу са правилима, у моделима је контролисана појава мултиколинearности ($VIF < 10$). Максималан број независно променљивих у моделима је четири што је у складу са Топлис-Костело (*Topliss-Costello*) правилном. Добијени су следећи MLR-QSRR модели за предвиђање вредности $\log k$ параметра у сва три хроматографска система:

$$\text{MLR1: } \log k_{C_{18} \text{ ACN } 70} = 0,3468 (\pm 0,0257) \text{ CLogP} + 0,0688 (\pm 0,0183) \text{ BBB} + 0,0625 (\pm 0,0248) \text{ LPMaxA} - 2,1520 (\pm 0,5404) \text{ FMF} - 1,1275 (\pm 0,2565) \quad 4.11.$$

$$\text{MLR2: } \log k_{C_{18} \text{ ACN } 70} = 0,4187 (\pm 0,0398) \text{ CLogP} + 0,0734 (\pm 0,0194) \text{ BBB} - 0,1057 (\pm 0,0467) \text{ SP} - 3,8572 (\pm 0,8981) \text{ FMF} - 0,5955 (\pm 0,1590) \quad 4.12.$$

$$\text{MLR3: } \log k_{C_{18} \text{ ACN } 80} = 0,4495 (\pm 0,0962) \text{ ALogP} + 0,0091 (\pm 0,0032) \text{ TE} + 0,2006 (\pm 0,0534) \text{ PC} + 0,1587 (\pm 0,0490) \text{ MaxPR} - 3,1153 (\pm 0,3432) \quad 4.13.$$

$$\text{MLR4: } \log k_{C_{18} \text{ ACN } 80} = 0,6644 (\pm 0,0935) \text{ ALogP} + 0,0086 (\pm 0,0033) \text{ TE} + 0,0050 (\pm 0,0014) \text{ MMFF94E} + 0,3004 (\pm 0,0272) \text{ MaxPR} - 4,0835 (\pm 0,3824) \quad 4.14.$$

$$\text{MLR5: } \log k_{C_{18} \text{ MeOH } 70} = 0,4568 (\pm 0,0280) \text{ CLogP} + 0,0916 (\pm 0,0182) \text{ BBB} + 1,1086 (\pm 0,2738) \text{ EI} - 0,8664 (\pm 0,4902) \text{ FMF} - 1,4435 (\pm 0,2373) \quad 4.15.$$

$$\text{MLR6: } \log k_{C_{18} \text{ MeOH } 70} = 0,0171 (\pm 0,0220) \text{ BBB} + 0,7521 (\pm 0,3092) \text{ EI} + 0,5045 (\pm 0,0369) \text{ PC} - 1,0897 (\pm 0,5825) \text{ FMF} - 1,4167 (\pm 0,2798) \quad 4.16.$$

$$\text{MLR7: } \log k_{C_{18} \text{ MeOH } 80} = 0,3957 (\pm 0,0266) \text{ CLogP} + 0,0679 (\pm 0,0147) \text{ BBB} + 1,2719 (\pm 0,2642) \text{ EI} - 2,0876 (\pm 0,1835) \quad 4.17.$$

$$\text{MLR8: } \log k_{C_{18} \text{ MeOH } 80} = 0,0003 (\pm 0,0189) \text{ BBB} + 0,9694 (\pm 0,2991) \text{ EI} + 0,4319 (\pm 0,0349) \text{ PC} - 2,1083 (\pm 0,2217) \quad 4.18.$$

$$\text{MLR9: } \log k_{C8\ ACN\ 90} = 0,0307 (\pm 0,0042) \text{ Caco2} - 0,0048 (\pm 0,0003) \text{ MDCK} + 2,0902 (\pm 0,3849) \text{ EI} + 0,0208 (\pm 0,0062) \text{ MinPA} - 3,2833 (\pm 0,5163) \quad 4.19.$$

$$\text{MLR10: } \log k_{C8\ ACN\ 90} = 0,5783 (\pm 0,0934) \text{ ALogP} - 0,0042 (\pm 0,0005) \text{ MDCK} + 1,4805 (\pm 0,2380) \text{ NRL} + 0,0015 (\pm 0,0003) \text{ ECCEN} - 2,7431 (\pm 0,3095) \quad 4.20.$$

Табела 4.14. Статистички параметри MLR-QSRR модела за предвиђање вредности $\log k$ параметра (MLR1 – MLR5)

Параметри	MLR1	MLR2	MLR3	MLR4	MLR5
	C18 ACN 70	C18 ACN 70	C18 ACN 80	C18 ACN 80	C18 MeOH 70
R	0,9669	0,9648	0,9645	0,9621	0,9792
R^2	0,9348	0,9308	0,9303	0,9257	0,9589
R^2_{adj}	0,9174	0,9123	0,9117	0,9059	0,9492
F	53,77	50,41	50,06	46,72	99,06
$RMSE$	0,1472	0,1516	0,1507	0,1556	0,1467
p	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
	1,4 C_{LogP}	3,1 C_{LogP}	1,2 A_{LogP}	1,1 A_{LogP}	1,9 C_{LogP}
VIF	1,4 BBB	1,5 BBB	1,4 TE	1,4 TE	1,5 BBB
	1,1 LP_{MaxA}	3,0 SP	4,9 PC	1,3 $MMFF94E$	1,8 EI
	1,8 FMF	4,8 FMF	4,2 $MaxPR$	1,2 $MaxPR$	1,7 FMF
R^2_{cv}	0,8193	0,8638	0,8716	0,8507	0,9333
TSS	4,9820	4,9820	4,8888	4,8888	8,8984
$PRESS$	0,9003	0,6785	0,6278	0,7301	0,5938
$PRESS/TSS$	0,1807	0,1362	0,1284	0,1493	0,0667
SD_{PRESS}	0,2122	0,1842	0,1772	0,1911	0,1643
R_{test}	0,9668	0,9574	0,9862	0,9550	0,9824
R^2_{test}	0,9347	0,9166	0,9726	0,9119	0,9650
$RMSE_{test}$	0,1179	0,1332	0,0673	0,1207	0,1275

Сви формирани модели садрже бар по један дескриптор липофилности (C_{LogP} , A_{LogP} и PC), осим модела MLR9, што, као и код LR модела, указује на зависност ретенционог понашања испитиваних једињења од њихове липофилности. Уочава се присуство бар једног ADMET дескриптора (BBB , EI , $Caco2$, $MDCK$, NRL и SP) у свим моделима, осим модела MLR3. ADMET дескриптори који фигуришу у формираним MLR моделима односе се на крвно-мождану баријеру (BBB), инхибицију ензима (EI) и способност формирања лиганата са нуклеарним рецептором (NRL). У исказаним моделима фигуришу и пропустљивост ћелија аденокарцинома колоне ($Caco2$) и Мадин-Дарби (*Madin-Darbi*) епителијалних ћелија псећег бубрега ($MDCK$) према испитиваним једињењима, као и пропустљивост коже према испитиваним једињењима (SP). Појава ADMET дескриптора такође указује на зависност ретенције испитиваних деривата од њихове липофилности, с обзиром на то да липофилност једињења диктира

његово кретање кроз биолошку мембрану и има пресудан утицај на његову апсорпцију, дистрибуцију, метаболизам и елиминацију.

Табела 4.15. Статистички параметри MLR-QSRR модела за предвиђање вредности $\log k$ параметра (MLR6 – MLR10)

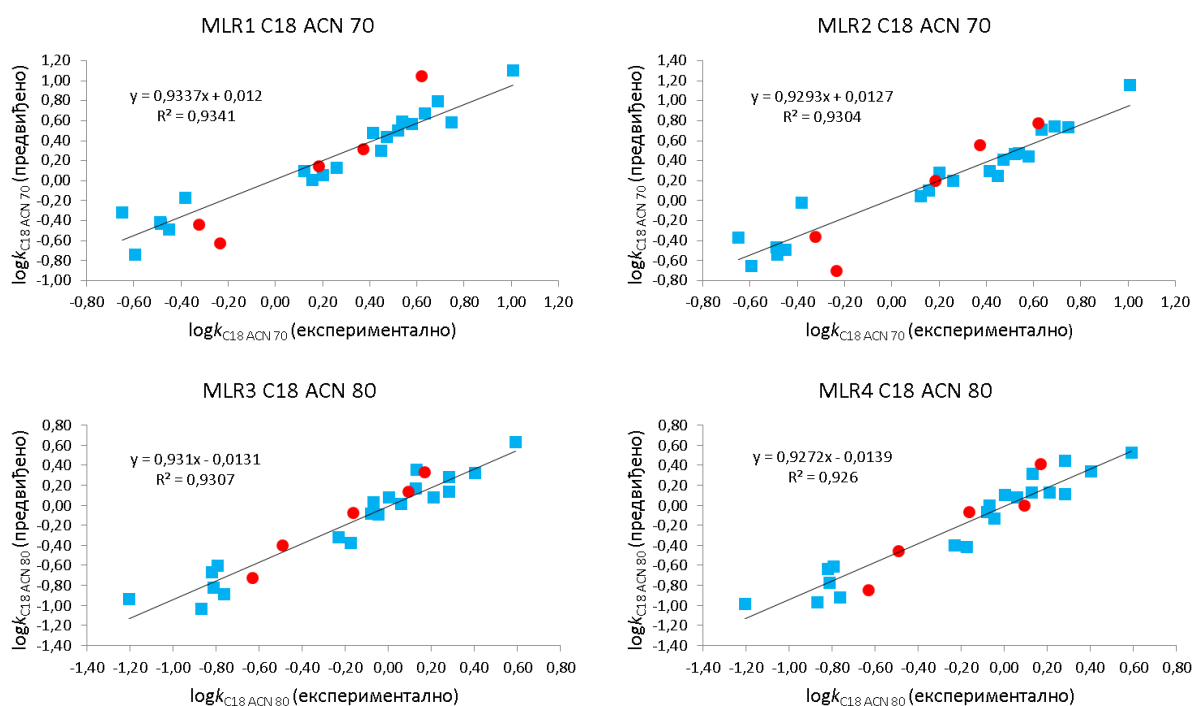
Параметри	MLR6	MLR7	MLR8	MLR9	MLR10
	C18 MeOH 70	C18 MeOH 80	C18 MeOH 80	C8 ACN 90	C8 ACN 90
R	0,9710	0,9723	0,9610	0,9796	0,9793
R^2	0,9428	0,9454	0,9236	0,9596	0,9590
R^2_{adj}	0,9294	0,9363	0,9108	0,9488	0,9481
F	70,06	103,92	72,49	88,99	87,73
$RMSE$	0,1730	0,1432	0,1695	0,1433	0,1442
p	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
VIF	1,6 _{BBB}	1,8 _{CLogP}	1,2 _{BBB}	3,4 _{Caco2}	1,3 _{ALogP}
	1,7 _{EI}			1,2 _{MDCK}	2,5 _{MDCK}
	2,0 _{PC}	1,0 _{BBB}	1,6 _{EI}	3,1 _{EI}	2,4 _{NRL}
	1,8 _{FMF}	1,8 _{EI}	1,8 _{PC}	3,0 _{MinPA}	4,3 _{ECCEN}
R^2_{cv}	0,8703	0,9228	0,8485	0,8990	0,9137
TSS	8,8984	6,7641	6,7641	7,6128	7,6128
$PRESS$	1,1544	0,5225	1,0247	0,7691	0,6569
$PRESS/TSS$	0,1297	0,0772	0,1515	0,1010	0,0863
SD_{PRESS}	0,2291	0,1541	0,2158	0,1961	0,1812
R_{test}	0,9960	0,9835	0,9897	0,8487	0,8418
R^2_{test}	0,9920	0,9673	0,9796	0,7204	0,7086
$RMSE_{test}$	0,0610	0,0937	0,0740	0,1783	0,1820

Поред наведених дескриптора, модели укључују и геометријске (LPMaxA, MaxPR, MinPA и MMFF94E) дескрипторе, као и по један дескриптор из групе физичко-хемијских (FMF), тополошких (ECCEN) и дескриптора величине молекула (TE). Сви дескриптори који фигуришу у моделима имају позитиван регресиони коефицијент, осим фракције молекулског оквира (FMF), пропустљивости коже према испитиваним једињењима (SP) и пропустљивости Мадин-Дарби (*Madin-Darbi*) епителијалних ћелија псећег бубрега према испитиваним једињењима (MDCK), који имају негативан регресиони коефицијент. Валидација MLR модела изведена је применом интерне и екстерне валидације, чији су параметри приказани у табели 4.14. и табели 4.15.

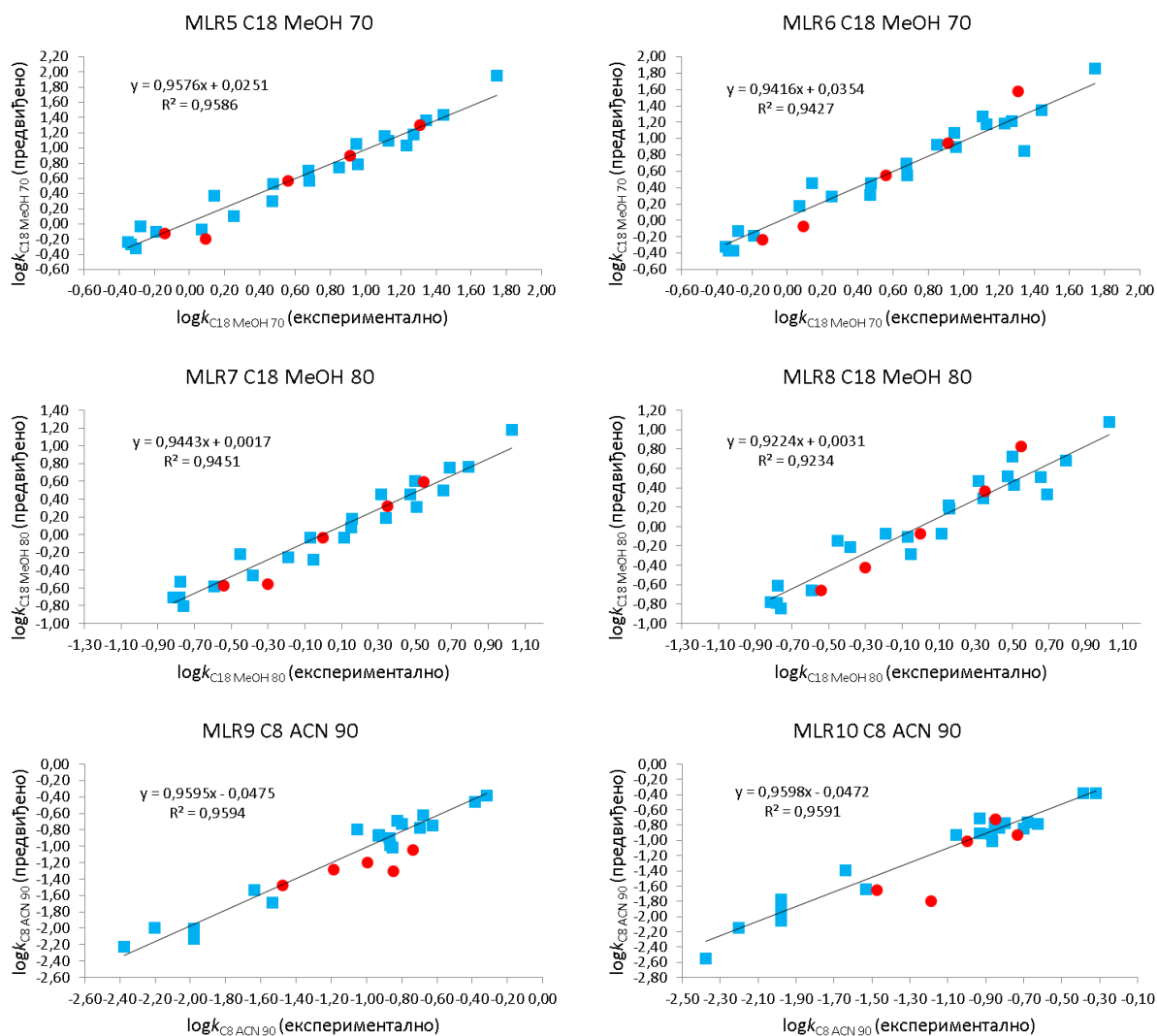
Статистички параметри указују на то да су сви приказани модели су погодни за предвиђање вредности $\log k$ параметра. Као и код LR модела, уочава се да су MLR модели добијени за систем C18-метанол-вода погоднији за предвиђање вредности $\log k$ параметра у односу на моделе са истим запреминским односима за систем C18-ацетонитрил-вода. Такође, хроматографски систем са мањим запреминским уделом органског модификатора погоднији је за предвиђање вредности $\log k$ параметра. Као и

код LR моделовања, modele добијене на C8 и C18 колони није могуће поредити због неидентичних хроматографских услова.

Према вредности VIF параметра, рачунатим за сваку појединачну независну варијаблу у моделима, мултиколинearност је присутна у границама толеранције ($VIF < 10$). Високе вредности коефицијента детерминације (од 0,9236 до 0,9596) и подешеног коефицијента детерминације (од 0,9059 до 0,9492) указују на добру предиктивну моћ формираних модела. Ниске вредности параметара унакрсне валидације, као што су сума квадрата одступања од предвиђених вредности и стандардна девијација предвиђања и високе вредности коефицијента детерминације унакрсне валидације (од 0,8193 до 0,9333) доприносе статистичком квалитету модела. Применом екстерног тест сета добијају се најтачније информације о предиктивној моћи модела. Параметри екстерне валидације, коефицијент детерминације екстерног тест сета и корен средње квадратне грешке екстерног тест сета указују на јаку корелацију између променљивих и на релативно малу грешку предвиђања.

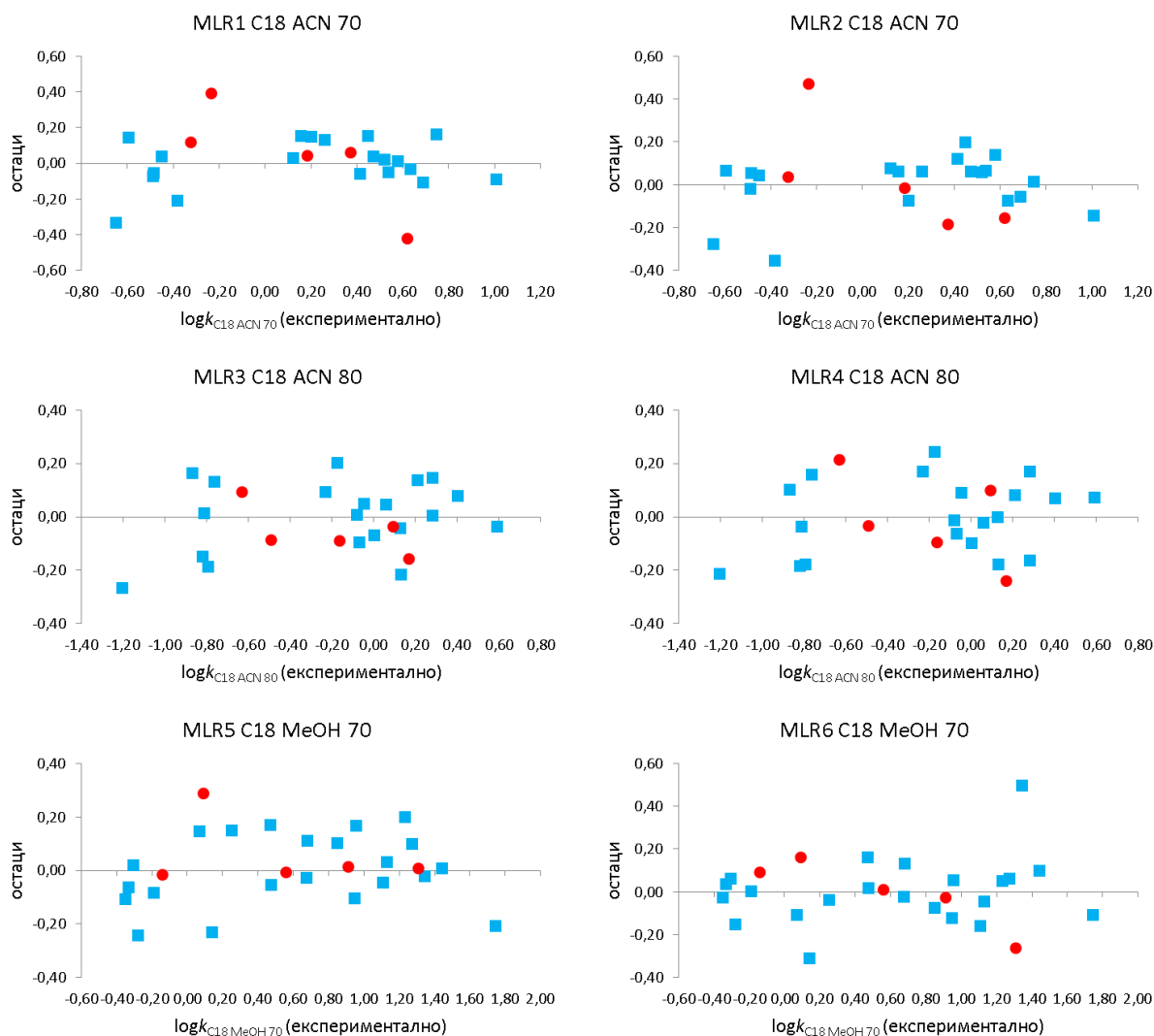


Слика 4.20. Поређење експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра за моделе MLR1 – MLR4 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)



Слика 4.21. Поређење експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра за моделе MLR5 – MLR10 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)

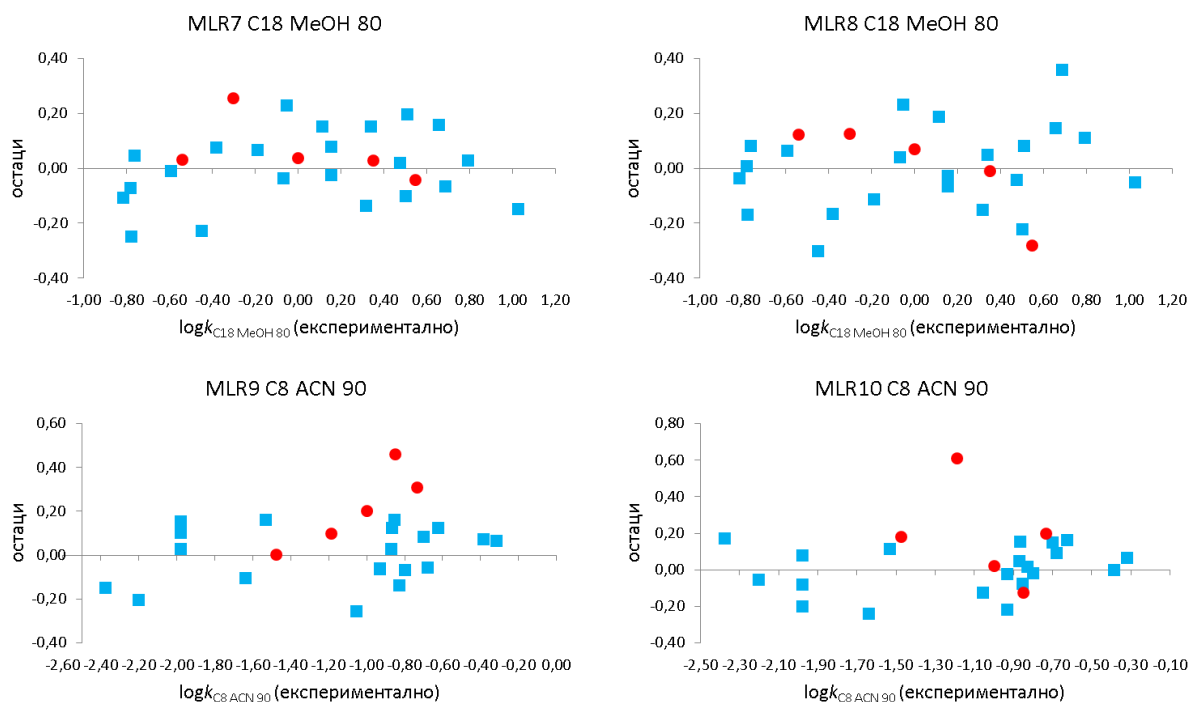
Поређење експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра и поређење експерименталних вредности $\log k$ параметра и остатака (резидуа) за калибрациони и екстерни тест сет приказано је на слици 4.20 – слици 4.23.



Слика 4.22. Распореда остатака око $y = 0$ осе за моделе MLR1 – MLR6 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)

Са графика експерименталних наспрам предвиђених вредности $\log k$ параметра, може се закључити да постоји добро слагање података код свих модела, на основу високих вредности коефицијента корелације, као и вредности нагиба праве блиских јединици и одсечка блиских нули. Предиктивна способност MLR модела потврђује се и на основу остатака, насумично распоређених око нулте вредности на y оси.

Формирани MLR модели имају боље статистичке параметре, а самим тим и бољу моћ предвиђања, што им даје предност при коришћењу за предвиђање вредности $\log k$ параметра, односно хроматографске липофилности испитиваних стероидних једињења.



Слика 4.23. Распореда остатака око $y = 0$ осе за моделе MLR7 – MLR10 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет)

4.7. Генерализована метода корелације парова

У овом раду, GPCM метода коришћена је у сврху постселекције, односно рангирања предикт варијабле након MLR моделовања. Рангиране су предикт варијабле за шест MLR модела формираних за предвиђање вредности $\log k$ параметра (хроматографске липофилности) у три хроматографска система (C18-ацетонитрил-вода, C18-метанол-вода, C8-ацетонитрил-вода). Резултати GPCM рангирања приказани су у табели 4.16. и табели 4.17.

Сва три начина рангирања варијабле, за сваки од формираних MLR модела, рангирала су предикт варијабле истим редоследом, иако се примењују различити критеријуми, осим у случају MLR5 и MLR6. Код ова два модела дошло је до промене места дескриптора у рангу код рангирања на основу разлика у вероватноћи (RP) у односу на рангирање које је постигнуто простим рангирањем на основу победа (SR) и рангирањем на основу разлика (RD). Ово је последица најконзервативнијих критеријума рангирања на основу разлика у вероватноћи (RPD). Предикт варијабле

нису за све моделе рангиране као у самим MLR моделима у односу на њихове регресионе коефицијенте, што је теоријски оправдано (Héberger и Rajkó, 2002a).

Табела 4.16. Рангирање дескриптора који фигуришу у MLR моделима

MLR1 C18 ACN 70														
Просто рангирање на основу победа (SR)					Рангирање на основу разлика (RD)					Рангирање на основу разлика у вероватноћи (RPD)				
Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	р-Победе	р-Губици	Без одлуке	Ранг
CLogP	3	0	0	1	CLogP	3	0	0	1	CLogP	3	0	0	1
BBB	1	1	1	2	BBB	1	1	1	2	BBB	1	1	1	2
FMF	1	1	1	3	FMF	1	1	1	3	FMF	0,98998	1	1	3
LPMaXА	0	3	0	4	LPMaXА	0	3	0	4	LPMaXА	0	2,98998	0	4
Критична сума			4,75	5	Критична сума			2,85	3	Критична сума			2,85	3

MLR2 C18 ACN 80														
Просто рангирање на основу победа (SR)					Рангирање на основу разлика (RD)					Рангирање на основу разлика у вероватноћи (RPD)				
Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	р-Победе	р-Губици	Без одлуке	Ранг
PC	3	0	0	1	PC	3	0	0	1	PC	2,99998	0	0	1
MaxPR	2	1	0	2	MaxPR	2	1	0	2	MaxPR	2	0,99998	0	2
TE	1	2	0	3	TE	1	2	0	3	TE	1	2	0	3
ALogP	0	3	0	4	ALogP	0	3	0	4	ALogP	0	1	0	4
Критична сума			5,7	6	Критична сума			3,8	4	Критична сума			3,8	4

MLR3 C18 MeOH 70														
Просто рангирање на основу победа (SR)					Рангирање на основу разлика (RD)					Рангирање на основу разлика у вероватноћи (RPD)				
Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	р-Победе	р-Губици	Без одлуке	Ранг
CLogP	3	0	0	1	CLogP	3	0	0	1	CLogP	3	0	0	1
BBB	1	1	1	2	BBB	1	1	1	2	BBB	0,98662	1	1	2
EI	0	1	2	3	EI	0	1	2	3	EI	0	1	2	3
FMF	0	2	1	4	FMF	0	2	1	4	FMF	0	1,98663	1	4
Критична сума			3,8	4	Критична сума			2,85	3	Критична сума			2,85	3

зелено - сигурни, плаво - могући, жуто - неутрицајни дескриптори

Табела 4.17. Рангирање дескриптора који фигуришу у MLR моделима

MLR4 C18 MeOH 80															
Просто рангирање на основу победа (SR)					Рангирање на основу разлика (RD)					Рангирање на основу разлика у вероватноћи (RPD)					
Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	р-Победе	р-Губици	Без одлуке	Ранг	
CLogP	2	0	0	1	CLogP	2	0	0	1	CLogP	2	0	0	1	
BBB	0	1	1	2	BBB	0	1	1	2	BBB	0	1	1	2	
EI	0	1	1	3	EI	0	1	1	3	EI	0	1	1	3	
Критична сума			1,9	2	Критична сума			1,9	2	Критична сума			1,9	2	
MLR5 C8 ACN 90															
Просто рангирање на основу победа (SR)					Рангирање на основу разлика (RD)					Рангирање на основу разлика у вероватноћи (RPD)					
Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	р-Победе	р-Губици	Без одлуке	Ранг	
Caco2	1	0	2	1	Caco2	1	0	2	1	MDCK	1	0	2	1	
MDCK	1	0	2	2	MDCK	1	0	2	2	EI	1	0	2	2	
EI	1	0	2	3	EI	1	0	2	3	Caco2	1	0	2	3	
MinPA	0	3	0	4	MinPA	0	3	0	4	MinPA	0	3	0	4	
Критична сума			2,85	3	Критична сума			2,85	3	Критична сума			2,85	3	
MLR6 C8 ACN 90															
Просто рангирање на основу победа (SR)					Рангирање на основу разлика (RD)					Рангирање на основу разлика у вероватноћи (RPD)					
Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	Победе	Губици	Без одлуке	Ранг	Фактор	р-Победе	р-Губици	Без одлуке	Ранг	
ECCEN	3	0	0	1	ECCEN	3	0	0	1	ECCEN	2,99673	0	0	1	
NRL	1	1	1	2	NRL	1	1	1	2	MDCK	0,98923	0,99730	1	2	
MDCK	1	1	1	3	MDCK	1	1	1	3	NRL	0,96380	0,99943	1	3	
ALogP	0	3	0	4	ALogP	0	3	0	4	ALogP	0	2,95303	0	4	
Критична сума			4,75	5	Критична сума			2,85	3	Критична сума			2,85	3	

зелено - сигурни, плаво - могући, жуто - неутрицајни дескриптори

Предикт варијабле (молекулски дескриптори) су у односу на критичну суму подељене у три групе: сигурни, могући и неутрицајни дескриптори. Како је просто рангирање на основу победа (SR) најмање конзервативан метод, очекивано је да се помоћу њега добија највећи број дескриптора из групе сигурних и могућих, док је код рангирања на основу разлика у вероватноћи (RPD) тај број најмањи. У моделима MLR1 - MLR4, сва три начина рангирања истичу дескрипторе липофилности (CLogP и PC) као сигурне за

превиђање вредности $\log k$ параметра као алтернативног параметра липофилности. Дескриптори липофилности (CLogP и PC) су се и у LR моделима показали као најбољи за предвиђање вредности $\log k$ параметра. Исти дескриптори фигуришу и у MLR моделима. У моделу MLR5 као сигурни дескриптори, по најстрожем критеријуму, издвојени су ADMET дескриптори (MDCK и EI), који су такође у директној вези са липофилношћу испитиваних стероидних једињења, с обзиром на то да липофилност једињења диктира њихово кретање кроз биолошку мембрану. Број „без одлука” није велик (≤ 2), што додатно указује на то да су сви дескриптори погодни за предвиђање вредности $\log k$ параметра у наведеним RP HPLC системима.

4.8. QSRR моделовање применом нелинеарне регресије

Нелинеарно моделовање, применом вештачких неуронских мрежа, изведено је помоћу програма Statistica 10, насумичним одабиром и формирањем калибрационог, тест и валидационог сета. За нелинеарно моделовање, испитивана једињења су подељена у три сета:

- калибрациони - 19 једињења (76% од укупног броја једињења) – **I.3 – I.7, II.9, II.10, III.13, III.15 – III.18, III.20 – III.27;**
- тест – 3 једињења (12% од укупног броја једињења) – **II.8, II.11, III.19;**
- валидациони – 3 једињења (12% од укупног броја једињења) – **I.2, III.14, IV.29.**

Тест сет и валидациони сет имају улогу у дефинисању грешке модела, односно у проналажењу најбоље конфигурације мреже. Због широког опсега података, улазне варијабле су нормализоване помоћу *min-max* нормализације. На основу комбинације варијабли у MLR моделима, формиран су ANN модели, тренирањем по 2 000 мрежа за сваку комбинацију варијабли.

Број скривених неурона вариран је од 2 до 200, док је тренирање вишеслојних неуронских мрежа (MLP) изведено помоћу Бројден-Флечер-Голфарб-Шано (*Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno*, BFGS) алгоритма. За активационе функције скривеног и излазног слоја коришћене су следеће функције: логистичка (*Lgt*), хиперболичка тангенс

(*Tanh*), експоненцијална (*Exp*) и функција идентитета (*Idn*). Статистички параметри формираног ANN модела приказани су у табели 4.18. и табели 4.19.

Табела 4.18. Статистички параметри формираног ANN модела (ANN1 – ANN4)

Параметри	ANN1	ANN2	ANN3	ANN4
	C18 ACN 70	C18 ACN 70	C18 ACN 70	C18 ACN 70
Улазне варијабле	MLR1	MLR1	MLR2	MLR2
	CLogP	CLogP	CLogP	CLogP
	BBB	BBB	BBB	BBB
	LPMaхA	LPMaхA	SP	SP
	FMF	FMF	FMF	FMF
Архитектура	MLP 4-40-1	MLP 4-91-1	MLP 4-14-1	MLP 4-40-1
$R_{калиб}$	0,9922	0,9909	0,9984	0,9975
$R_{тест}$	0,9979	0,9998	0,9997	0,9989
$R_{валид}$	0,9966	0,9997	0,9988	1,0000
$RMSE_{калиб}$	0,0006	0,0007	0,0001	0,0002
$RMSE_{тест}$	0,0017	0,0017	0,0011	0,0001
$RMSE_{валид}$	0,0904	0,0216	0,0049	0,0141
Алгоритам*	BFGS 48*	BFGS 69*	BFGS 105*	BFGS 126*
Скривена актив. ф-ја	<i>Lgt</i>	<i>Lgt</i>	<i>Lgt</i>	<i>Tanh</i>
Излазна актив. ф-ја	<i>Idt</i>	<i>Idt</i>	<i>Lgt</i>	<i>Exp</i>
F	53,77	53,77	50,41	50,41
p	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000

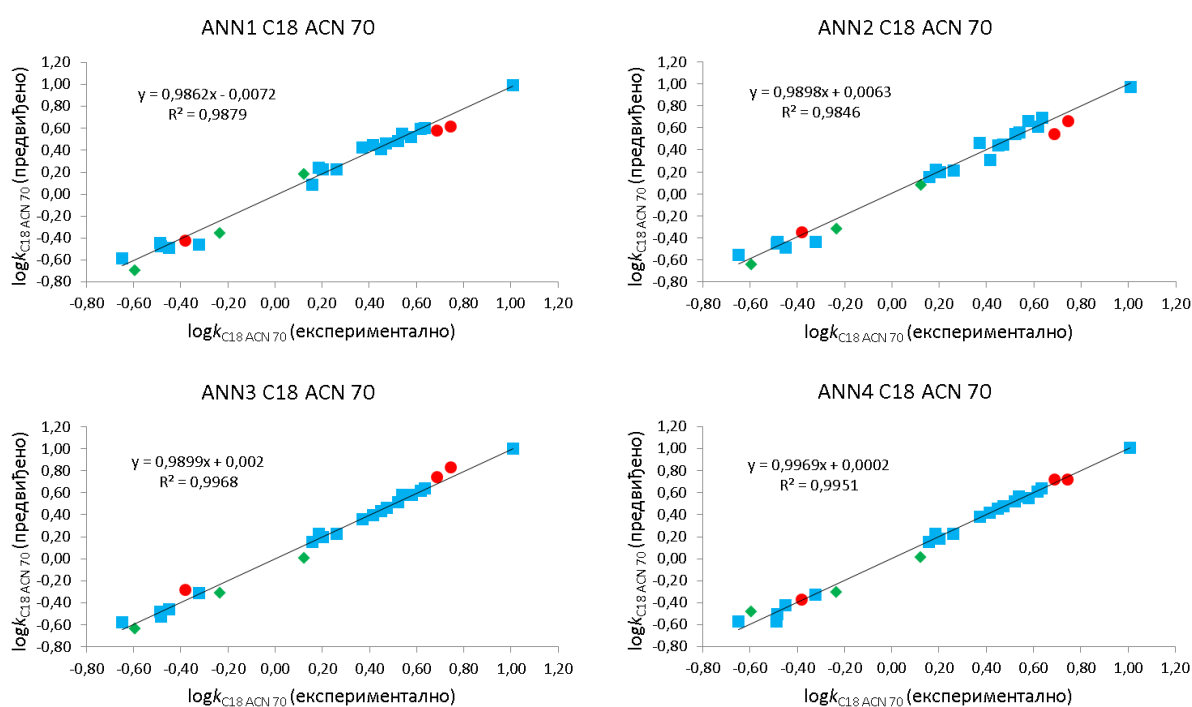
* број циклуса тренирања за који је добијена мрежа оптималне архитектуре

Табела 4.19. Статистички параметри формираног ANN модела (ANN5 – ANN8)

Параметри	ANN5	ANN6	ANN7	ANN8
	C18 ACN 80	C18 ACN 80	C18 ACN 80	C18 ACN 80
Улазне варијабле	MLR3	MLR3	MLR4	MLR4
	ALogP	ALogP	ALogP	ALogP
	TE	TE	TE	TE
	PC	PC	MMFF94E	MMFF94E
	MaxPR	MaxPR	MaxPR	MaxPR
Архитектура	MLP 4-26-1	MLP 4-53-1	MLP 4-148-1	MLP 4-61-1
$R_{калиб}$	0,9899	0,9897	0,9860	0,9899
$R_{тест}$	0,9991	0,9971	0,9925	0,9919
$R_{валид}$	0,9922	0,9972	0,9893	0,9991
$RMSE_{калиб}$	0,0006	0,0007	0,0009	0,0007
$RMSE_{тест}$	0,0009	0,0030	0,0029	0,0007
$RMSE_{валид}$	0,0112	0,0062	0,0026	0,0123
Алгоритам*	BFGS 85*	BFGS 63*	BFGS 63*	BFGS 52*
Скривена актив. ф-ја	<i>Tanh</i>	<i>Tanh</i>	<i>Tanh</i>	<i>Lgt</i>
Излазна актив. ф-ја	<i>Tanh</i>	<i>Idt</i>	<i>Exp</i>	<i>Lgt</i>
F	50,06	50,06	46,72	46,72
p	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000

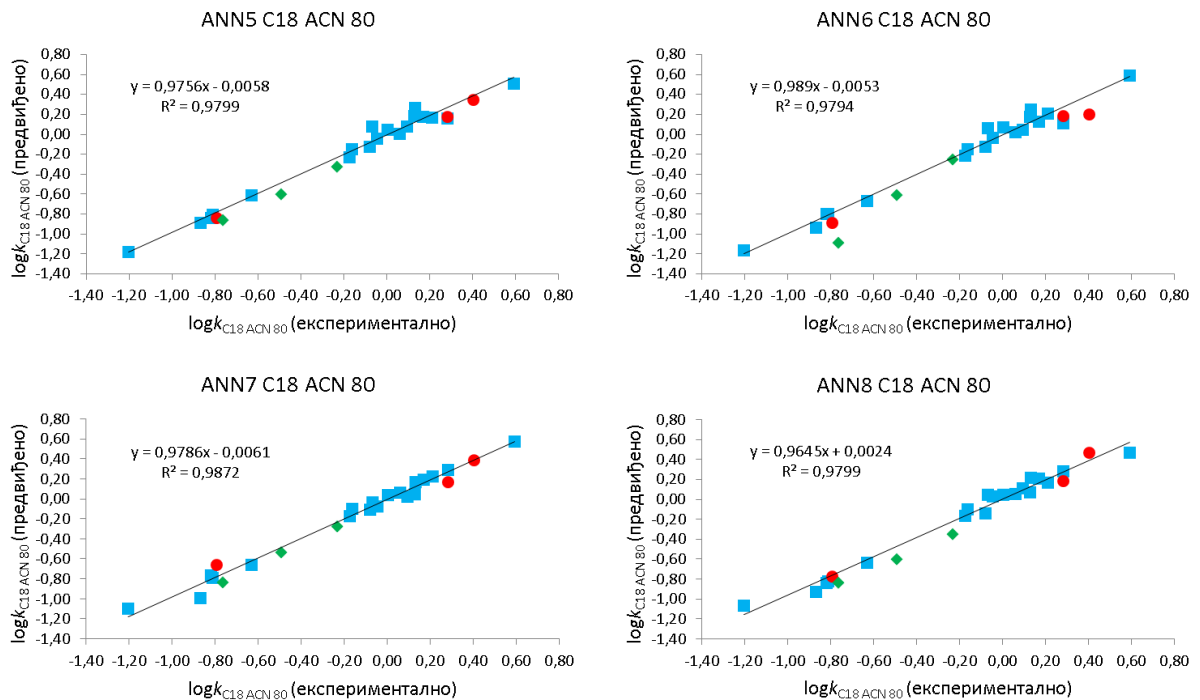
* број циклуса тренирања за који је добијена мрежа оптималне архитектуре

На основу веома високих вредности коефицијената корелације за калибрациони, тест и валидациони сет и веома ниских вредности корена средње квадратне грешке за калибрациони, тест и валидациони сет, може се закључити да формирану нелинеарни модели имају боље статистичке карактеристике од линеарних LR и MLR модела. Квалитет формираних ANN модела потврђен је и поређењем експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра (Слика 4.24. и Слика 4.25.) и поређењем експерименталних вредности $\log k$ параметра и остатака (Слика 4.26. и Слика 4.27.) за сва три сета.

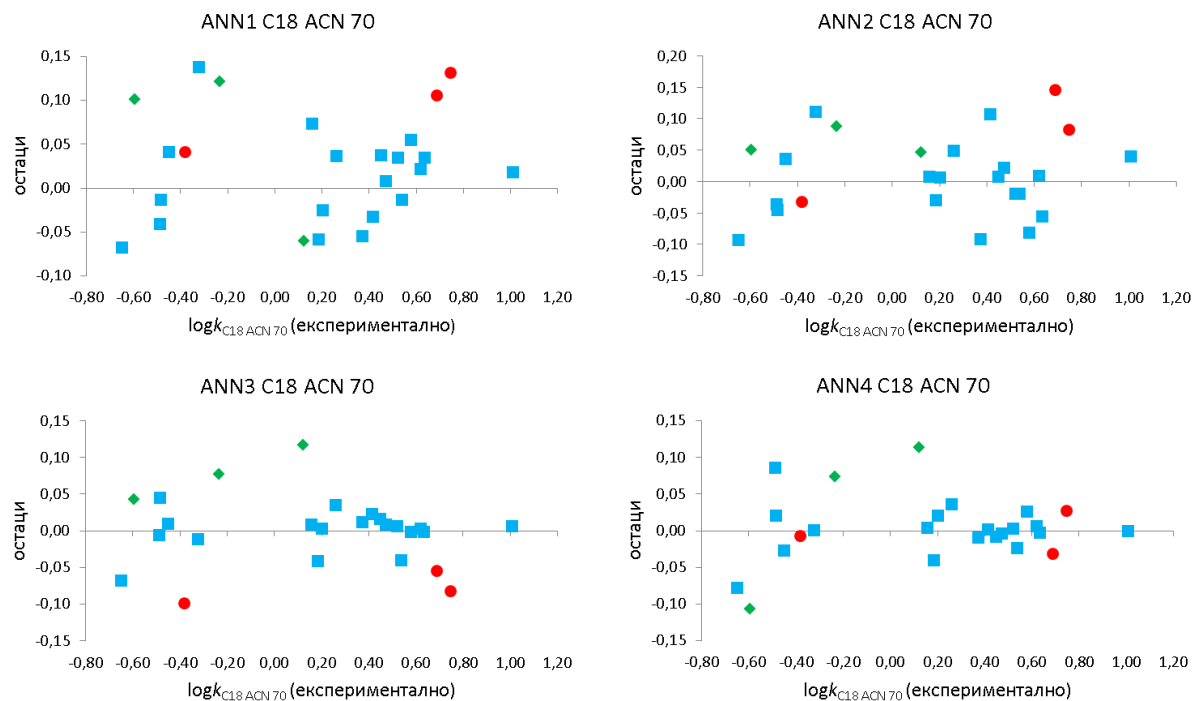


Слика 4.24. Поређење експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра за моделе ANN1 – ANN4 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет, зелено - валидациони сет)

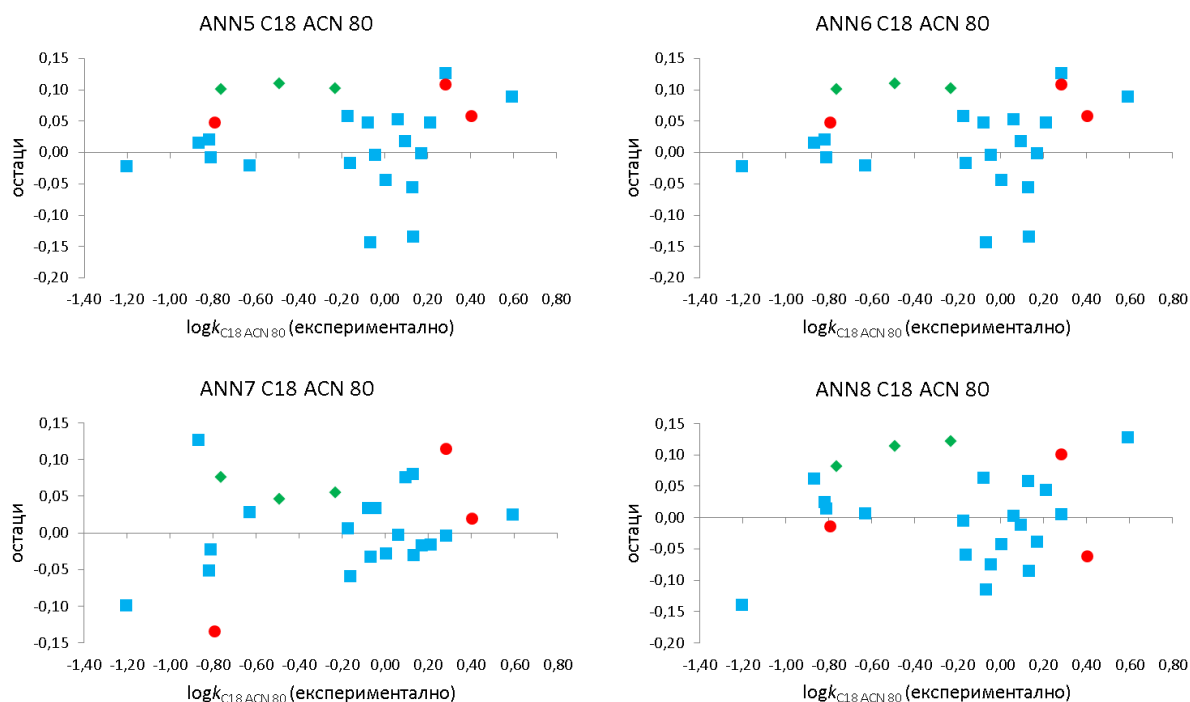
График указује на одлично слагање поређених података на основу високих вредности коефицијената корелације, као и вредности нагиба праве који су веома блиских јединици и одсечци веома блиски нули. Све наведено указује на добро слагање података код дефинисаних модела. Остаци распоређени око нулте вредности на у оси говоре о насумичности грешке предвиђања.



Слика 4.25. Поређење експерименталних и предвиђених вредности $\log k$ параметра за modele ANN5 – ANN8 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет, зелено - валидациони сет)



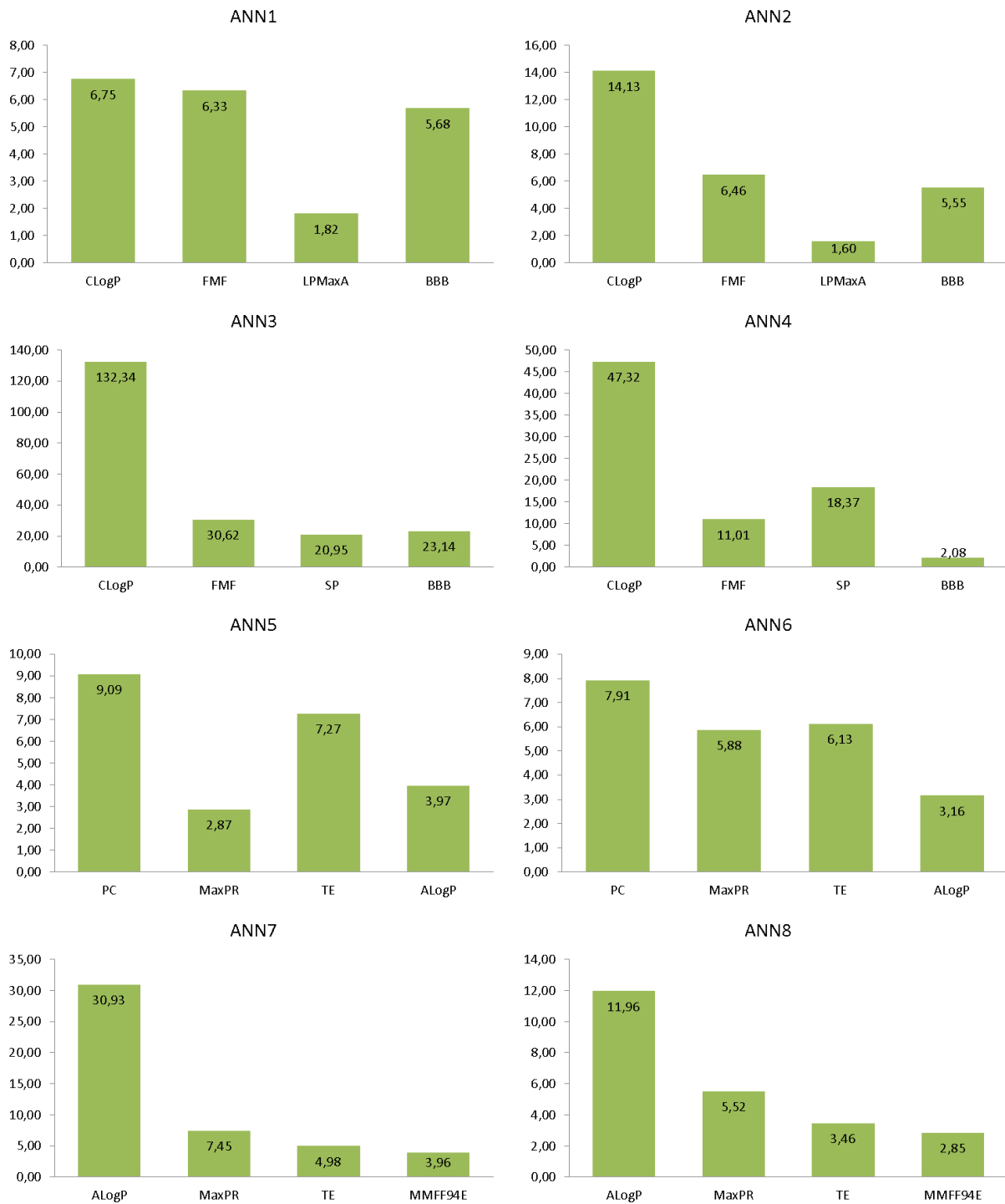
Слика 4.26. Распонеда остатака око $y = 0$ осе за modele ANN1 – ANN4 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет, зелено - валидациони сет)



Слика 4.27. Распореда остатака око $y = 0$ осе за моделе ANN5 – ANN8 (плаво - калибрациони сет, црвено - екстерни тест сет, зелено - валидациони сет)

За предвиђање вредности $\log k$ параметра за испитивана стероидна једињења у хроматографском систему C18-ацетонитрил-вода, нелинеарни ANN модели представљају прецизнији избор у односу на линеарне LR и MLR моделе. ANN моделовањем вредности $\log k$ параметра за хроматографске системе C18-метанол-вода и C8-ацетонитрил-вода нису формиран прихватљиви модели.

Код нелинеарног моделовања помоћу ANN, утицај улазних варијабли на варијације вредности параметара формираних модела, изражава се анализом глобалне осетљивости. На слици 4.28. приказани су утицаји улазних варијабли преко GSA коефицијената и уочава се да све улазне варијабле имају значајан утицај ($GSA > 1$). Највећи утицај на вредности $\log k$ параметра имају дескриптори липофилности (CLogP, PC и ALogP), што на још један начин потврђује да ретенциони параметар $\log k$, добијен под јасно дефинисаним хроматографским условима, може бити коришћен као алтернативан параметар липофилности (хроматографска липофилност) испитиваних стероидних деривата.



Слика 4.28. GSA коефицијенти улазних варијабли за моделе ANN1 – ANN8

4.9. *In vitro* одређивање минималне инхибиторне концентрације

Растворљивост испитиваних једињења у води израчуната је помоћу програма MarvinSketch 15.3.23 (ChemAxon). У односу на референтне вредности задате од стране програма, испитивана једињења су подељена у три групе: једињења са високом (> 0,06 mg/mL), ограниченом (0,01 – 0,06 mg/mL) и ниском растворљивошћу у води (< 0,01 mg/mL). Израчунате вредности растворљивости у води су приказане у табели 4.20.

Табела 4.20. Растворљивост испитиваних једињења у води

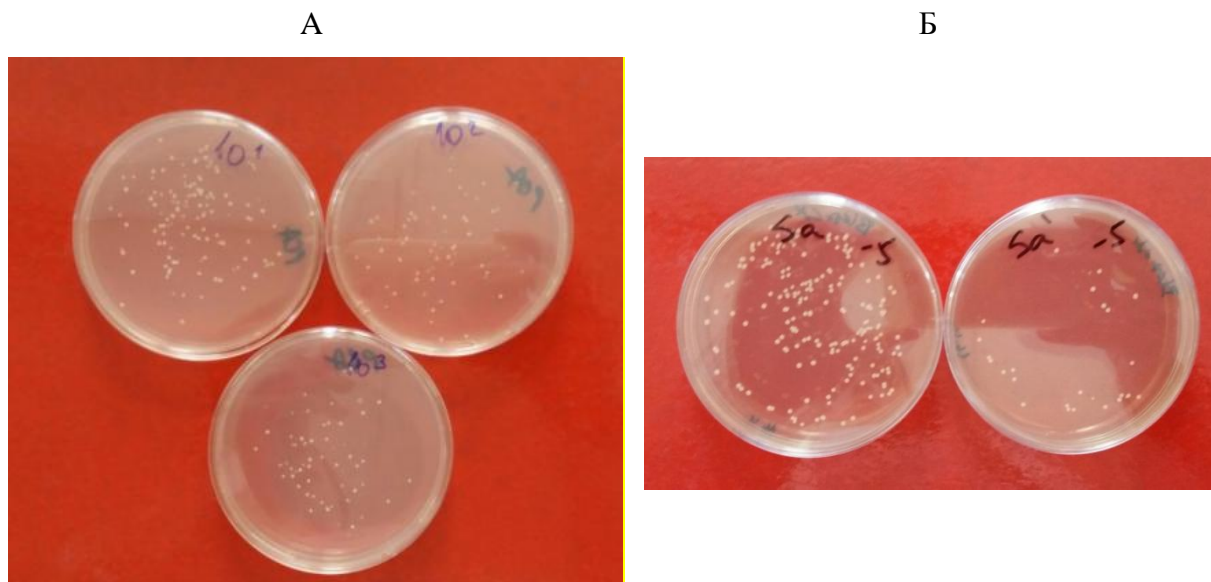
Растворљивост у води	Једињење
Висока	I.4, I.5, I.6, III.13, IV.28, IV.29
Ограничена	III.14, III.15, III.16, III.22, III.23, III.25
Ниска	I.7, II.8, II.9, II.11, III.17, III.19, III.20, III.24



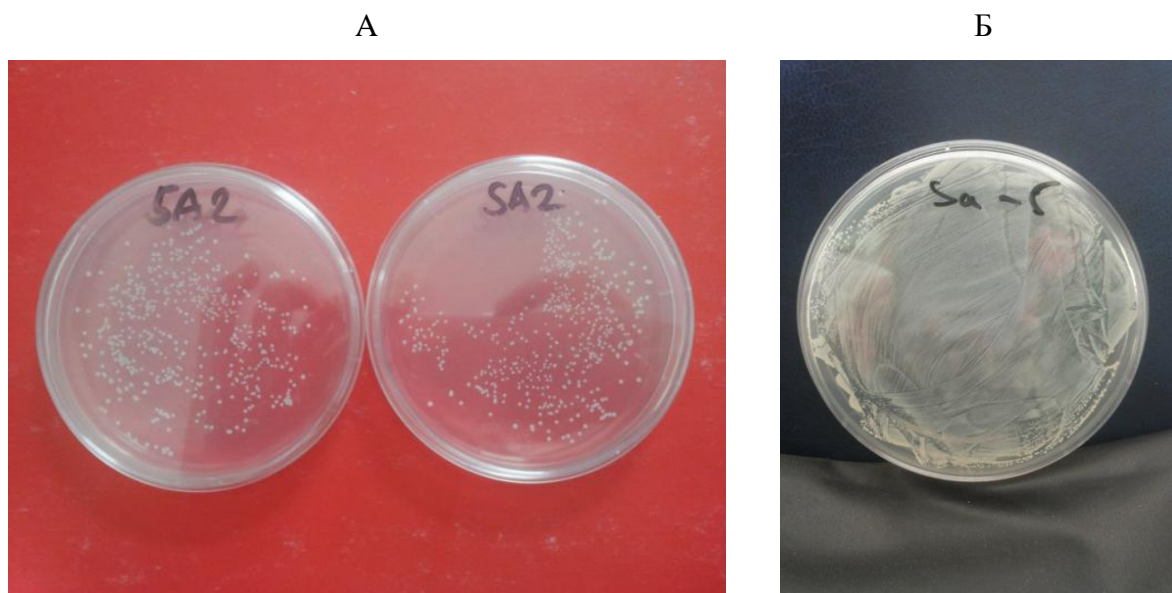
Слика 4.29. Детектована минимална инхибиторна концентрација једињења у односу на *S. aureus*

In vitro антимикуробна активност двадесет испитиваних стероидних деривата анализирана је применом модификоване микродилуционе методе. За микробиолошке тестове коришћени су насумично изабрани деривати из три групе. У слепој проби (неиспарљиве резидуе чистог растварача) и контролној проби (МНВ/SDВ) примећени су интензивирање раст и размножавање, што је потврђено преношењем аликвота на МНА/SDА и инкубацијом 24 – 48 сати на 37°C. Број колонија на површини је био велик и раст је био густ. Овим је утврђен избор адекватног растварача је потврђен и

показано је да неиспарљиве резидуе растварача не утичу на инхибицију тестираних микроорганизама. Резултати минималне инхибиторне концентрације према *S. aureus* приказани су на слици 4.29.



Слика 4.30. А) бактериостатски ефекат једињења **III.25** на *S. aureus* у концентрацији од 0,156 mg/mL и Б) суспензија ћелија засејана из разблажења 10⁻⁵



Слика 4.31. А) бактериостатски ефекат једињења **IV.29** на *S. aureus* у концентрацији од 5 mg/mL и Б) суспензија ћелија засејана из разблажења 10⁻⁵

Само два једињења су испољила бактериостатски ефекат према *S. aureus* – једињење **III.25** (смеша 4 α ,5 α - и 4 β ,5 β -епокси-3-оксо-17 α -хомо-16,17-секоандростан-16,17 α -

динитрил) са ограниченом растворљивошћу у води и једињење **IV.29** (смеша 4 α ,5 α - и 4 β ,5 β -епокси-17 $\alpha\alpha$ -метил-17-окса-17 α -хормоандростан-3,16-дион) чија је растворљивост у води висока. Једињење **III.25** испољило је бактериостатски ефекат при МИС од 0,156 mg/mL (Слика 4.30) и једињење **IV.29** при МИС од 5 mg/mL (Слика 4.31). Оба молекула, која су испољила антимикуробну активност, поседују епоксид, трочлани прстен са кисеоником, који је и најреактивнији део у оба молекула.

Једињење **III.13**, такође, поседује епоксид и његова антимикуробна активност је била предмет истраживања, међутим оно није испољило антимикуробну активност. Претпоставља се да је то последица постојања само β веза у положајима четири и пет, док су једињења **III.25** и **IV.29** заправо смеше које поседују и α и β везе у положајима четири и пет. У будућности, приликом синтезе и испитивања, пажњу треба усмерити на стероидне деривате са епоксидном групом.

Ниједно од испитиваних једињења није испољило инхибиторни ефекат према *E. coli* и *C. albicans* у концентрацији од 10 mg/mL. Одсуство инхибиторног ефекта може да се објасни грађом ћелијског зида који представља баријеру за испитивана стероидна једињења.

4.10. Докинг анализа испитиваних стероидних деривата

Као увод у докинг анализу, прво је урађена визуелизација липофилних и хидрофилних површина испитиваних стероидних једињења (**I.2**, **I.4**, **I.5** и **I.6**) са експериментално одређеном антипролиферативном активношћу према ћелијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. РС-3) (Табела 4.21). Визуелизацијом је могуће дати увид у липофилна и хидрофилна подручја испитиваних једињења која су потенцијална места интеракције са липофилним/хидрофилним деловима активног места протеина. Једињења **I.2** и **I.5** имају задовољавајућу док једињења **I.4** и **I.6** имају умерену антипролиферативну активност према ћелијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. РС-3). Једињења **I.1**, **I.7** и **III.12** изузета су из докинг анализе с обзиром на то да поседују занемарљиву ($IC_{50} > 100 \mu M$) антипролиферативну активност, као и једињења **III.22**, **III.23** и **III.24** јер је њихова докинг анализа објављена у литератури (Nikolić и сар., 2015).

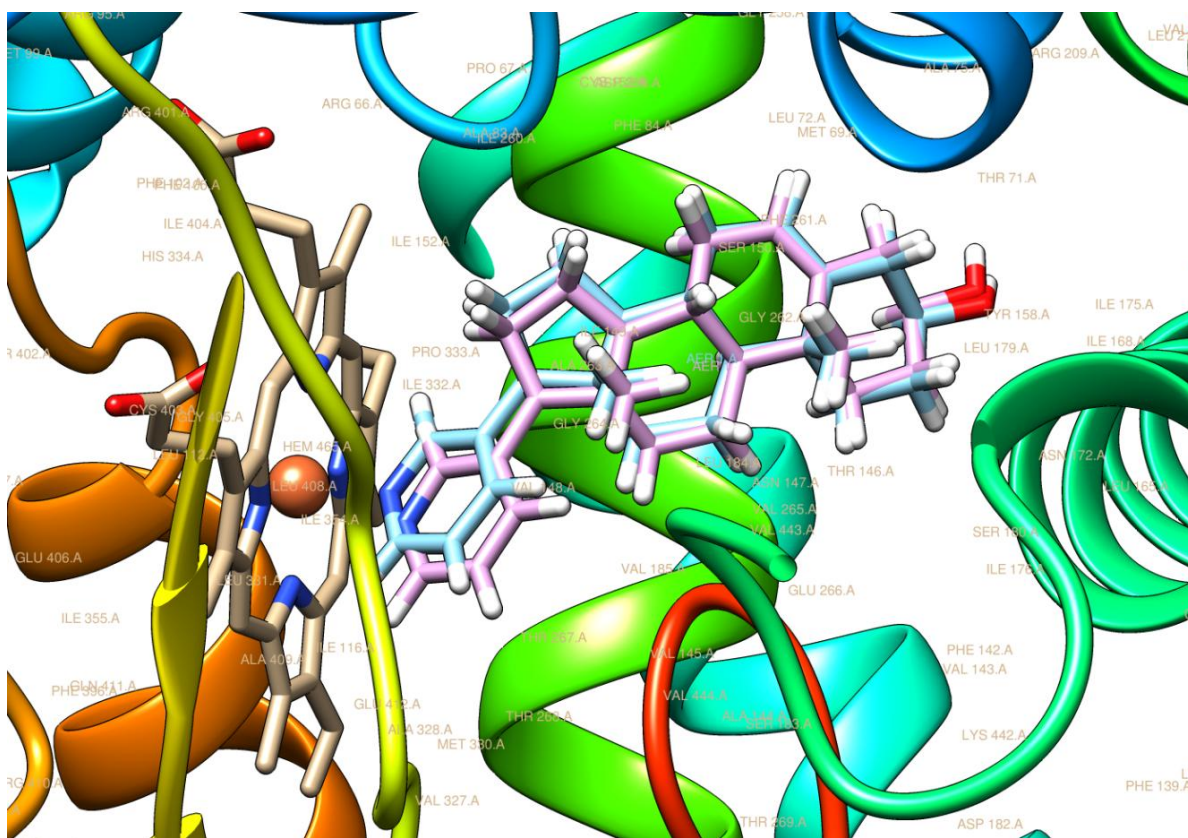
Табела 4.21. Приказ липофилних и хидрофилних површина испитиваних једињења

Јед.	Липофилне и хидрофилне површине	
I.2		
I.4		
I.5		
I.6		

Структура хуманог цитохрома P450 CYP17A1 у комплексу са абиратероном (PDB код: 3RUK) преузета је из Protein Data Bank (PDB) *online* базе података (Berman и сар.,

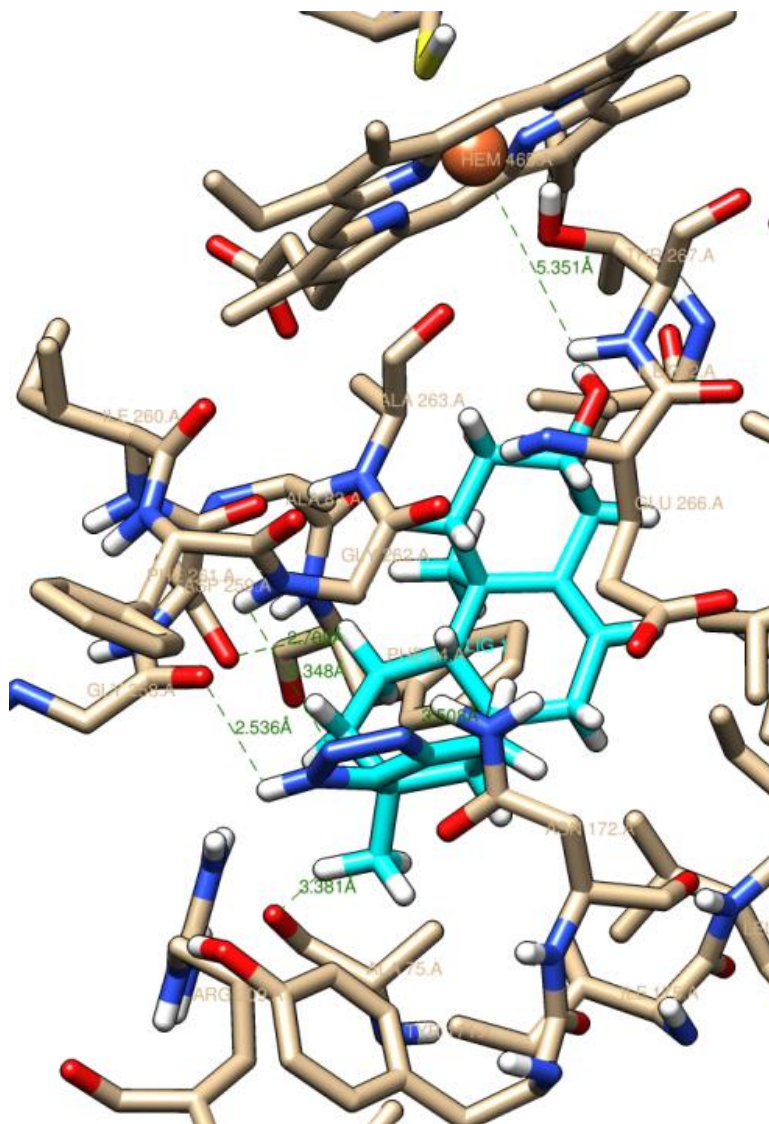
2000). У састав овог комплекса улази макромолекул 17 α -хидроксилаза, из групе оксидоредуктаза, хуманог порекла, као и два мала молекула односно лиганда. Као лиганди јављају се протопорфирин IX који садржи гвожђе (HEM) и абиратерон (AER), који се користи као комерцијални лек за канцер простате. У PDB бази налази се структура комплекса одређена методом кристалографије рендгенским зрацима. Сама докинг анализа иведена је на А ланцу изабраног протеина помоћу DOCK 6.5 софтвера. За визуелизацију резултата коришћен је Chimera софтвер.

Докинг анализа је изведена помоћу DOCK 6.5 софтвера. Процедура докинг анализе валидирана је и абиратерон је успешно редокингован уз употребу кристалографске структуре хуманог цитохрома P450 CYP17A1 у комплексу са абиратероном са вредношћу корена средњег квадратног одступања (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) од 0,494 Å. Валидација процедуре докинг анализе приказана је на слици 4.32. (плавом бојом означена је кристалографски одређена структура абиратерона, а розом редокингован молекул абиратерона). Резултати указују на то да је коришћена метода погодна за симулацију докинг анализе са великом прецизношћу.



Слика 4.32. Провера валидности процедуре докинг анализе, RMSD = 0,494 Å

Резултати докинг анализе приказани су на слици 4.33. На основу докинг анализе, закључује се да само 3 β -хидроксиандрост-5-ено[16,17-d]-1,2,3-триазол (једињење **I.2**) поседује способност интеракције са активним местом протеина градећи водоничне везе. Саме интеракције анализирани су у односу на предложене типичне дистанце интеракција (Bissantz и сар., 2010). Атом кисеоника O3 једињења **I.2** интерагује са јоном гвожђа (Fe²⁺) протопорфирина IX (5,351 Å). Јаке интеракције, остварене преко водоничних веза, јављају се између атома водоника H21 и глицина 258.A (2,536 Å), атома водоника H11 и аспарагинске киселине 259.A (2,709 Å), атома азота N22 и глицина 262.A (3,348 Å), атома водоника H18 и аланина 75.A (3,381 Å), као и атома азота N23 и аспарагина 172.A (3,508 Å).



Слика 4.33. Резултати докинг анализе за једињење **I.2** (ALA - аланин; ASN - аспарагин; ASP - аспарагинска киселина; GLY - глицин)

Преостала три једињења нису погодна за овакву врсту докинг анализе. Једињење **I.5** је дислоцирано изван активног места везивања, док једињења **I.4** и **I.6** не успостављају погодне интерације са јоном гвожђа који се јавља у склопу протопорфирина IX. Структура 3 β -хидроксиандрост-5-ено[16,17-d]-1,2,3-триазола предложена је за даља испитивања антипролиферативне активности као потенцијалног лека за канцер простате.

Компаративном анализом утврђено је да једињења **III.22**, **III.23** и **III.24**, чија је докинг анализа раније објављена (Nikolić и сар., 2015), имају у положајима 3 и/или 4 хидроксидну односно оксо групу, као и једињење **I.2** испитивано у оквиру ове дисертације, које има хидроксидну групу у положају 3. Једињење **I.5** поседује јачу антипролиферативну активност (15,32 μ M) од једињења **III.22** (19,12 μ M), међутим његова поларност, условљена постојањем ацетокси групе у положају 3, диктира његову интеракцију са активним местом протеина.

4. ЗАКЉУЧАК

Резултати хроматографске, микробиолошке и *in silico* анализе стероидних триазола и тетразола, толуенсулфонилхидразида, диона, нитрила и динитрила, који су приказани у овој дисертацији, воде ка следећим закључцима:

- Између ретенционих параметара ($\log k$) испитиваних деривата и запреминског удела органског модификатора у мобилној фази установљена је добра линеарна корелација применом сва три испитана хроматографска система.
- Ретенциони параметри ($\log k$) имају добру линеарну корелацију са *in silico* дескрипторима липофилности, што указује на то да се $\log k$ може сматрати алтернативним параметром липофилности испитиваних стероидних једињења.
- Установљено је да постоји велика предност експерименталног одређивања липофилности применом софистицираних хроматографских метода над *in silico* дескрипторима липофилности за испитивана стероидна једињења.
- Класификационе хеометријске технике, анализа главних компоненти и хијерархијска кластер анализа, групишу испитивана једињења на основу њихове поларности односно липофилности.
- Линеарним QSRR моделовањем формиран су статистички валидни LR модели погодни за предвиђање вредности $\log k$ параметра. Код свих LR модела најзначајнији утицај на ретенцију имају дескриптори липофилности.
- Формирани MLR оцењени су помоћу статистичких параметара као погодни за предвиђање вредности $\log k$ параметра структурно сличних стероидних деривата. Код већине MLR модела најзначајнији утицај на ретенцију имају дескриптори липофилности, као и ADMET дескриптори, што, такође, указује на зависност ретенције испитиваних деривата од њихове липофилности.
- Генерализованом методом корелације парова уочено је да се дескриптори липофилности издвајају као сигурни дескриптори за превиђање вредности

$\log k$ параметра као алтернативног параметра липофилности код већине MLR модела.

- Нелинеарним QSRR моделовањем добијени су ANN модели који су због супериорнијих статистичких параметара у односу на линеарне моделе предложени за предвиђање вредности $\log k$ параметра структурно сличних стероидних деривата.
- *In vitro* микробиолошка анализа извдојила је једињења **III.25** и **IV.29** која су испољила бактериостатски ефекат према *Staphylococcus aureus*. Издвојена једињења поседују епоксид, трочлани прстен са кисеоником у положају 4,5, те потрагу за новим стероидним дериватима са јаком антимикуробном активношћу треба усмерити ка стероидним дериватима са епоксидном групом. Ова једињења представљају добру структурну основу за развој нових стероидних антибиотика.
- Докинг анализом идентификовано је једињења **I.2** са највећим потенцијалом као инхибитор хуманог цитохрома P450 CYP17A1. Окарактерисано је место везивања једињења **I.2** за 17 α -хидроксилазу (CYP17A1) у циљу даљих истраживања једињења **I.2** као потанцијалног лека за андроген-рецептор негативан канцер простате (AR-нег. PC-3).

CONCLUSION

The results of chromatographic, microbiological and *in silico* analysis of steroid derivatives, presented in this dissertation, lead to following conclusions:

- Between retention parameters ($\log k$) of the investigated derivatives and volume fraction of the organic modifier in the mobile phase a good linear correlation is established using all three investigated chromatographic systems.
- Retention parameters ($\log k$) have a good linear correlation with the *in silico* lipophilicity descriptors, indicating that $\log k$ can be considered as an alternative lipophilicity parameter of investigated steroid compounds.
- It was found that there is a great advantage of the experimental determination of lipophilicity using sophisticated chromatographic methods over *in silico* lipophilicity descriptors for investigated steroid compounds.
- The classification chemometric techniques, principal components analysis and hierarchical cluster analysis, group investigated compounds based on their polarity or lipophilicity.
- Linear QSRR modeling formed statistically valid LR models suitable for the $\log k$ parameter value prediction. In all LR models the most significant impact on the retention feature have the lipophilicity descriptors.
- Formed MLR were evaluated using statistical parameters as suitable for predicting the $\log k$ parameter values of the structurally similar steroid derivatives. In the most MLR models the most significant impact on the retention feature have the lipophilicity and ADMET descriptors that also indicates the dependence of the retention of the investigated compounds of their lipophilicity.
- According to the generalized pair correlation method the lipophilicity descriptors are singled out as sure descriptors for the $\log k$ parameter prediction as an alternative lipophilicity parameter in the most MLR models.
- Nonlinear QSRR modeling gave ANN models that are due to superior statistical parameters than the linear models proposed for the $\log k$ parameter prediction of the structurally similar steroid derivative.

- *In vitro* microbiological analysis distinguished the compounds **III.25** and **IV.29** who exhibited bacteriostatic effect against *Staphylococcus aureus*. Selected compounds possess epoxy group, three-membered ring with oxygen in position 4,5, so the search for new steroid derivatives with a strong antimicrobial activity should be directed toward steroid derivatives with epoxy group. These compounds present a good structural basis for the development of new steroid antibiotics.
- Doking analysis identified compound **I.2** with the most promising potential as an human cytochrome P450 CYP17A1 inhibitor. The binding site of the compound **I.2** to 17 α -hydroxylase (CYP17A1) is characterized in order to further research the compound **I.2** as a potential drug for androgen receptor-negative prostate cancer (AR-neg. PC-3).

5. ЛИТЕРАТУРА

Abdelhalim M. M., Kamel E. M., Rabie S. T., Mohamed N. R., *Synthesis and biological evaluation of some nitrogen containing steroidal heterocycles*, Steroids. **2011**, 76, 78-84.

Abonyi J., Feil B., Cluster analysis for data mining and system identification, Birkhauser Verlag, Berlin, Deutschland, **2007**.

Ajduković J, *Sinteza i biološka aktivnost 17-supstituanih androstanskih derivata*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2013**.

Akhtar J., Siddiqui A. A., Khan A. A., Ali A., Dewangan R. P., Pasha S., M. Yar M. S., *Design, synthesis, docking and QSAR study of substituted benzimidazole linked oxadiazole as cytotoxic agents, EGFR and erbB2 receptor inhibitors*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2017**, 126, 853-869.

Andrić F., Bajusz D., Rácz A., Šegan S., Héberger K., *Multivariate assessment of lipophilicity scales - computational and reversed phase thin-layer chromatographic indices*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2016**, 127, 81-93.

Andrić F., Héberger K., *Chromatographic and computational assessment of lipophilicity using sum of ranking differences and generalized pari-correlation*, Journal of Chromatography A, **2015a**, 1380, 130-138.

Andrić F., Héberger K., *Toward better understanding of lipophilicity: Assessment of in silico and chromatographic logP measures for pharmaceutically important compounds by nonparametric rankings*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2015b**, 115, 183-191.

Asath R. M., Premkumar R., Mathavan T., Franklin Benial A. M., *Structural, spectroscopic and molecular docking studies on 2-amino-3-chloro-5-trifluoromethyl pyridine: A potential bioactive agent*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **2017**, 175, 51-60.

Attard G., Belldegrun A.S., de Bono J.S., *Selective blockade of androgenic steroid synthesis by novel lyase inhibitors as a therapeutic strategy for treating metastatic prostate cancer*, BJU International/British Journal of Urology, **2005**, 96, 1241-1246.

Azilawati M. I., Hashim D. M., Jamilah B., Amin I., *RP-HPLC method using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate incorporated with normalization technique in principal component analysis to differentiate the bovine, porcine and fish gelatins*, Food Chemistry, **2015**, 172, 368-376.

Babel, 2010. OpenEye scientific software: Santa Fe, New Mexico, USA <<http://openbabel.org>>.

Balaban A. T., *Chemical graphs: Looking back and glimpsing ahead*, Journal of Chemical Information and Computer Science, **1995**, 35, 339-350.

Balaban A. T., *Chemical application of graph theory*, Academic Press, London, UK, **1976**.

Balcells G., Pozo O. J., Esquivel A., Kotronoulas A., Joglar J., Segura J., Vantura R., *Screening for anabolic steroids in sports: Analytical strategy based on the detection of phase I and phase II intact urinary metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, **2015**, 1389, 65-75.

Bate-Smith E. C., Westell R. G., *Some naturally occurring phenolic substances*, Biochimica et Biophysica Acta, **1950**, 4, 427-440.

Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindayalov I. N., Bourne P. E., *The protein data bank*, Nucleic Acids Research, **2000**, 28, 235-242.

Berthelot M., Jungfleisch E., *On the laws that operate for the partition of a substance between two solvents*, Annales de biologie animale, biochimie, biophysique, **1872**, 26, 396-407.

Berthod A., Carda-Broch S., *Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods*, Journal of Chromatography A, **2004**, 1037, 3-14.

Bertin J., Dury A. Y., Ke Y., Ouellet J., Labrie F., *Accurate and sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous assay of seven steroids in monkey brain*, Steroids, **2015**, 98, 37-48.

Biason-Lauber A., *Molecular medicine of steroid hormone biosynthesis*, Molecular Aspects of Medicine, **1998**, 19, 155-220.

Bieganowska M. L., Szopa A. D., Petruczynik A., *The retention behavior of some sulfonamides on different TLC plates: 2: Comparison of the selectivity of the systems and quantitative determination of hydrophobic parameters*, Journal of Planar Chromatography, **1995**, 8, 122-128.

Bines J., Dienstmann R., Obadia R. M., Branco L. G. P., Quintella D. C., Castro T. M., Camacho P. G., Soares F. A., Costa M. E. F., *Activity of megestrol acetate in postmenstrual women with advanced breast cancer after nonsteroidal aromatase inhibitor failure: a phase II trial*, Annals of Oncology, **2014**, 25, 831-836.

Bissantz C., Kuhn B., Stahl M., *A medicinal chemist's guide to molecular interactions*, Journal of Medicinal Chemistry, **2010**, 53, 5061-5084.

Brandstrom, A., *A rapid method for the determination of distribution coefficient of bases for biological purposes*, Acta Chemica Scandinavica, **1963**, 17, 1218-1224.

Brenner S. E., *A tour of structural genomics*, Nature Reviews: Genetics, **2001**, 2, 801-809.

Brereton R. G., *Chemometrics, Data Analysis for the laboratory and chemical plant*, John Wiley & Sons Inc, **2003**.

Caballero J., Quiliano M., Alzate-Morales J.H., Zimic M., Deharo E., *Docking and quantitative structure–activity relationship studies for 3-fluoro-4-(pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin 4-yloxy)aniline, 3-fluoro-4-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yloxy)aniline, and 4-(4-amino-2-fluorophenoxy)-2-pyridinylamine derivatives as c-Met kinase inhibitors*, Journal of Computer-aided Molecular Design, **2011**, 25, 349-369.

Caballero J., Garriga M., Fernández M., *Genetic neural networks modeling of the selective inhibition of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel by some triarylmethanes using topological charge indexes descriptors*, Journal of Computer-Aided Molecular Design, **2005**, 19, 771-789.

Caron P., Turcotte V., Guillemette C., *A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume*, Steroids, **2015**, 104, 16-24.

Chagnon F., Guay I., Bonin M-A., Mitchell G., Bouarab K., Malouin F., Marsault É., *Unraveling the structure-activity relationship of tomatidine, a steroid alkaloid with unique antibiotic properties against persistent forms of Staphylococcus aureus*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2014**, 80, 605-620.

ChemBioOfficem 2012. Perkin Elmer Informatics <<http://www.cambridgesoft.com/>>.

ChemAxon, Ltd. <<http://www.chemaxon.com/>>.

Chen B., Zhang T., Bond T., Gan Y., *Development of quantitative structure activity relationship (QSAR) model for disinfection byproduct (DBP) research: A review of methods and resources*, Journal of Hazardous Materials, **2015**, 299, 260-279.

Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J. Wu Z., Liu G., Lee P. W., Tang Y., *AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties*, Journal of Chemical Information and Modeling, **2012**, 52, 3099-3105.

Chiesa L. M., Nobile M., Biolatti B., Pavlovic R., Panseri S., Cannizzo F. T., Arioli F., *Detection of selected corticosteroids and anabolic steroids in calf milk replacers by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*, Food Control, **2016**, 61, 196-203.

Chiro N., Gramatica P., *Real external predictivity of QSAR models. Part 2. New intercomparable thresholds for different validation criteria and the need for scatter plot inspection*, Journal of Chemical Information and Modeling, **2012**, 52, 2044-2058.

Chiro N., Gramatica P., *Real external predictivity of QSAR models: How to evaluate it? Comparison of different validation criteria and proposal of using the concordance correlation coefficient*, Journal of Chemical Information and Modeling, **2011**, 51, 2320-2335.

Cirera-Domènech E., Estrada-Tejedor R., Broto-Puig F., Teixidó J., Gassiot-Matas M., Comellas L., Lliberia J. L., Méndez A., Paz-Estivill S., Delgado-Ortiz M. R., *Quantitative structure-retention relationships applied to liquid chromatography gradient elution method for the determination of carbonyl-2,4-dinitrophenylhydrazone compounds*, Journal of Chromatography A, **2013**, 1276, 65-77.

Ciura K., Nowakowska J., Pikul P., Struck-Lewicka W., Markuszewski M. J., *A comparative quantitative structure-retention relationships study for lipophilicity determination of compounds with a phenanthrene skeleton on cyano-, reversed phase-, and normal phase-thin layer chromatography stationary phases*, Journal of AOAC International/Association of Analytical Communities, **2015**, 98, 345-353.

CLSI, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

CLSI, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M27-A2. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2002.

Consonni V., Todeschini R., *Recent advances in QSAR studies: Methods and applications, Molecular descriptors*, Springer, New York, USA, **2009**.

Cui J., Liu L., Zhao D., Gan C., Huang X., Xiao Q., Qi B., Yang L., Huang Y., *Synthesis, characterization and antitumor activities of some steroidal derivatives with side chain of 17-hydrazone aromatic heterocycle*, Steroids, **2015**, 95, 32-38.

Dąbrowska M., Starek M., Komsta Ł., Szafranski P., Stasiewicz-Urban A., Opoka W., *Assessment of the chromatographic lipophilicity of eight cephalosporins on different stationary phases*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, **2017**, 101, 115-124.

Daszykowski M., Walczak B., Massart D., *Looking for natural patterns in data: Part I. Density-based approach*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **2001**, 56, 83-92.

De Bono J. S., Logothetis C. J., Molina A., Fizazi K., M.D., North S., Chu L., M.D., Chi K. M., Jones R. J., Goodman O. B., Saad F., Staffurth J. N., Mainwaring P., Harland S., Flaig T. W., Hutson T.E., Cheng T., Patterson H., Hainsworth J. D., Ryan C. J., Sternberg C. N., Ellard S. L., Fléchon A., Saleh M., Scholz M., Efstathiou E., Zivi A., Bianchini D., Loriot Y., Chieffo N., Kheoh T., Haqq C. M., Scher H.I., *Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer*, The New England Journal of Medicine, **2011**, 364, 1995-2005.

DeVore N. M., Scott E. E., *Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001*, Nature, **2012**, 482, 116-119.

Di L., Kerns E., *Profiling drug-like properties in discovery research*, Current Opinion in Chemical Biology, **2003**, 7, 402-408.

Djurendić E. A., Ajduković J. J., Sakač M. N., Csanádi J. J., Bogdanović G. M., Penov Gaši K. M., *Synthesis and cytotoxic activity of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androstane derivatives*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2012**, 54, 784-792.

Djurendić E. A., Ajduković J. J., Sakač M. N., Čanadi J. J., Kojić V. V., Bogdanović G. M., Penov Gaši K. M., *17-Picolinylidene-substitued steroid derivatives and their antiaromatase and cytotoxic activity*, ARKIVOC, **2009**, 13, 311-323.

Djurendić E., Daljev J., Sakač M., Čanadi J., Jovanović Šanta S., Andrić S., Klisurić O., Kojić V., Bogdanović G., Djurendić-Brenesel M., Novaković S., Penov Gaši K., *Synthesis of some epoxy and/or N-oxy 17-picolyl and 17-picolinylidene-androst-5-ene derivatives and evaluation of their biological activity*, Steroids, **2008**, 73, 129-138.

Dodić J., Grahovac J., Kalajdzija N., Kovačević S., Jevrić L., Podunavac Kuzmanović S., *Chemometric approach to prediction of antibacterial agent production by Streptomyces hygroscopicus*, Applied Biochemistry and Biotechnology, **2014**, 174, 534-541.

Dudek A. Z., Arodz T., Gálvez J., *Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): A review*, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, **2006**, 9, 213-228.

Daković-Sekulić T., Lozanov-Crvenković Z., Mandić A., Ušćumlić G., Keleman S., *Quantitative structure-retention relationship study of some 5-substitued-5-phenylhydantoins*, Chromatographia, **2011**, 73, 51-57.

Elmegeed G. A., Yahya S. M. M., Abd-Elhaim M. M., Mohamed M. S., Mohareb R. M., Elsayed G. H., *Evaluation of heterocyclic steroids and curcumin derivatives as antibreast cancer agents: Studying the effect on apoptosis in MCF-7 breast cancer cells*, Steroids, **2016**, 115, 80-89.

Elmegeed G. A., Khalil W. K. B., Mohareb R. M., Ahmed H. H., Abd-Elhalim M. M., Elsayed G. H., *Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents*, Bioorganic and Medicinal Chemistry, **2011**, 19, 6860-6872.

Epand R. F., Savage P. B., Epand R. M., *Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenesis)*, Biochimica et Biophysica Acta, **2007**, 1768, 2500-2509.

Figueroa-Valverde L., Díaz-Cedillo F., García-Cervera E., Pool-Gómez E., López-Nexticapa M., Hua-Heredia L., Sarabia-Alcocer B., *Synthesis and antibacterial activity evaluation of two androgen derivatives*, Steroids, **2015**, 93, 8-15.

Filipic S., Antic A., Vujovic M., Nikolic K., Agbaba D., *A comparative study of chromatographic behavior and lipophilicity of selected imidazoline derivatives*, Journal of Chromatographic Science, **2016a**, 54, 1137-1145.

Filipic S., Ruzic D., Vucicevic J., Nikolic K., Agbaba D., *Quantitative structure-retention relationship of selected imidazoline derivatives on α 1-acid glycoprotein column*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2016b**, 127, 101-111.

Fragkaki A. G., Farmaki E., Thomaidis N., Tsantili-Kakoulidou A., Angelis Y. S., Koupparis M., Georgakopoulos C., *Comparision of multiple linear regression, partial least squares and artificial neural networks prediction of gas chromatographic relative retention times of trimethylsilylated anabolic androgenic steroids*, Journal of Chromatography A, **2012**, 1256, 232-239.

- Fragkaki A. G., Tsantili-Kokoulidou A., Angelis Y. S., Koupparis M., Georgakopoulos C., *Gas chromatographic quantitative-structure relationships of trimethylsilylated anabolic androgenic steroids by multiple linear regression and partial least squares*, Journal of Chromatography A, **2009**, 1216, 8404-8420.
- Frey A. J., Wang Q., Busch C., Feldman D., Bottalico L., Mesaros C. A., Blair I. A., Vachani A., Snyder N. W., *Validation of highly sensitive simultaneous targeted and untargeted analysis of keto-steroids by Girard P derivatization and stable isotope dilution-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*, Steroids, **2016**, 116, 60-66.
- Fujita T., Iwasa J., Hansch C., *A new substituent constant, π , derived from partition coefficients*, Journal of the American Chemical Society, **1964**, 86, 5175-5180.
- Gadzuric S. B., Podunavac Kuzmanovic S. O., Jokic A. I., Vranes M.B., Ajdukovic N., Kovacevic S. Z., *Chemometric estimation of post-mortem interval based on Na^+ and K^+ concentrations from human vitreous humour by linear least squares and artificial neural networks modeling*, Australian Journal of Forensic Sciences, **2014**, 46, 166-179.
- Gagliardi L., De Orsi D., Del Giudice M. R., Gatta F., Porrà R., Chimenti P., Tonelli D., *Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products*, Analytica Chimica Acta, **2002**, 457, 187-198.
- Gaković A., *Modifikovani A- i D-androstanski derivati i njihova biološka aktivnost*, Magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2008**.
- Gañán J., Morante-Zarcero S., Pérez-Quintanilla D., Sierra I., *Evaluation of functionalized mesoporous silicas for reverse phase high performance liquid chromatography: An application for the separation of steroids*, Microchemical Journal, **2014**, 14, 53-58.
- Garkani-Nejad Z., Jalili-Jahani N., *Modeling the activity of 2-phenyl-naphthalene inhibitors using self-training artificial neural networks*, Central European Journal of Chemistry, **2010**, 8, 877-885.
- Gere A., Sipos L. Héberger K., *Generalized pairwise correlation and method comparison: Impact assessment for JAR attributes on overall liking*, Food Quality and Preferences, **2015**, 43, 88-96.
- Ghavami R., Faham S., *QSRR models for Kováts' retention indices of a variety of volatile organic compounds on polar and apolar GC stationary phases using molecular connectivity indexes*, Chromatographia, **2010**, 72, 893-903.
- Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A., *Alternative measures of lipophilicity: From octanol-water partitioning to IAM retention*, Journal of Pharmaceutical Sciences, **2008a**, 97, 2984-3004.
- Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A., *Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. A review*, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, **2008b**, 31, 79-96.

Golbraikh A., Tropsha A., *Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental dataset for the training and test set selection*, Journal of Computer-Aided Molecular Design, **2002a**, 16, 375-369.

Golbraikh A., Tropsha A., *Beware of $q^2!$* , Journal of Molecular Graphics and Modelling, **2002b**, 20, 269-276.

González-Díaz H., Herrera-Ibatá D. M., Duardo-Sánchez A., Munteanu C. R., Orbegozo-Medina R. A., Pazos A., *ANN multiscale model of anti-HIV drugs activity vs AIDS prevalence in the US at county level based on information indices of molecular graphs and social networks*, Journal of Chemical Information and Modeling, **2014**, 54, 774-755.

Gosetti F., Chiuminatto U., Mazzucco E., Mastroianni R., Marengo E., *Ultra-high-performance liquid chromatography/tandem high-resolution mass spectrometry analysis of sixteen red beverages containing carminic acid: Identification of degradation products by using principal component analysis/discriminant analysis*, Food Chemistry, **2015**, 167, 454-462.

GPCM VBA program, 2001 <<http://www.aki.ttk.mta.hu/gpcm/>>.

Gramatica P., Sangion A., *A historical excursus on the statistical validation parameters for QSAR models: A clarification concerning metrics and terminology*, Journal of Chemical Information and Modeling, **2016**, 56, 1127-1131.

Guo C., Wang K., Hou S., Wan L., Lv J., Zhang Y., Qu X., Chen S., Xu J., *H₂O₂ and/or TiO₂ photocatalysis under UV irradiation for the removal of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes*, Journal of Hazardous Materials, **2017**, 323, 710-718.

Gupta A., Kumar B.S., Heri A.S., *Current status on development of steroids as anticancer agents*, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **2013**, 137, 242-270.

Héberger K., *Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships*, Journal Chromatography A, **2007**, 1158, 273-305.

Héberger K., Rajkó R., *Generalization of pair corelation method (PCM) for non-parametric variable selection*, Journal of Chemometrics, **2002a**, 16, 436-443.

Héberger K., Rajkó R., *Variable selection using pair-correlation method. Environmental applications, SAR and QSAR in Environmental Research*, **2002b**, 13, 541-554.

Heftmann E., *Chromatography of steroids*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **1976**.

Hintze J., NCSS 2007, NCSS, LLC, Kaysville, Utah, USA <<http://www.ncss.com/>>.

Hirst J. J., Kelleher M. A., Walker D. W., Palliser H. K., *Neuroactive steroids in pregnancy: Key regulatory and protective roles in the fetal brain*, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **2014**, 139, 144-153.

Homma T., Saltelli A., *Importance measures in global sensitivity analysis of nonlinear models*, Reliability Engineering System Safety, **1996**, 52, 1-17.

Jayalakshmi T., Santhakumaran A., *Statistical normalization and back propagation for classification*, International Journal of Computer Theory and Engineering, **2011**, 3, 89-93.

Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., *Global cancer statistics*, CA: A Cancer Journal for Clinicians, **2011**, 61, 69-90.

Jevrić L. R., Karadžić M. Ž., Mandić A. I., Podunavac Kuzmanović S. O., Kovačević S. Z., Nikolić A. R., Oklješa A. M., M.N. Sakač, Penov Gaši K. M., Stojanović S. Z., *Lipophilicity estimation and characterization of selected steroid derivatives of biomedical importance applying RP HPLC*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2017**, 134, 27-35.

Jevrić L. R., Podunavac-Kuzmanović S. O., Kovačević S. Z., Kalajdžija N. D., Jovanović B. Ž., *Estimation of the retention behaviour of s-triazine derivatives applying multiple regression analysis of selected molecular descriptors*, Acta Periodica Technologica, **2013**, 44, 229-237.

Kaiser H. F., *The application of electronic computers to factor analysis*, Educational and Psychological Measurement, **1960**, 20, 141-151.

Kakati D., Sarma R.K., Saikia R., Barua N.C., Sarma J.C., *Rapid microwave assisted synthesis and antimicrobial bioevaluation of novel steroidal chalcones*, Steroids **2013**, 78, 321-326.

Kaliszan R., *QSRR: Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships*, Chemical Reviews, **2007**, 107, 3212-3246.

Kaliszan R., Haber P., Bączek T., Siluk D., *Gradient HPLC in determination of drug lipophilicity and acidity*, Pure and Applied Chemistry, **2001**, 73, 1465-1475.

Karadžić M. Ž., Jevrić L. R., Podunavac Kuzmanović S. O., Lončar E. S., Kovačević S. Z., *Structure-retention relationship study of 2,4-dioxotetrahydro-1,3-thiazole derivatives*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **2015a**, 38, 1247-1253.

Karadžić M. Ž., Jevrić L. R., Kovačević S. Z., Podunavac Kuzmanović S. O., *Retention data from normal-phase thin-layer chromatography in characterization of some 1,6-anhydrohexose and D-aldopentose derivatives by QSRR method*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **2015b**, 38, 1044-1051.

Karadžić M. Ž., Jevrić L. R., Podunavac Kuzmanović S. O., Lončar E. S., Kovačević S. Z., *Lipophilicity estimation of some carbohydrate derivatives in TLC with benzene as a diluent*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **2015b**, 38, 1593-1600.

Karadžić M., Podunavac-Kuzmanović S., Jevrić L., Kovačević S., *QSRR analysis in characterization of some benzimidazole derivatives*, Acta Chimica Slovenica, **2015r**, 62, 747-753.

Karadžić M. Ž., Jevrić L. R., Podunavac Kuzmanović S. O., Kovačević S. Z., Lončar E. S., *Structure-retention analysis of some 1,6-anhydrohexose and D-aldopentose derivatives by linear multivariate approach*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **2015d**, 38, 662-669.

- Karelson M., *Molecular descriptors in QSAR/QSPR*, Wiley & Sons, Inc. New York, **2000**.
- Karelson M., Lobanov V. S., Katritzky A. R., *Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies*, Chemical Reviews, **1996**, 96, 1027-1044.
- Katritzky A. R., Kuanar M., Slavov S., Hall C. D., *Quantitative correlation of physical and chemical properties with chemical structure: Utility for prediction*, Chemical Review, **2012**, 110, 5714-5789.
- Katritzky A. R., Karelson M., Lobanov V. S., *QSPR as a means of predicting and understanding chemical and physical properties in terms of structure*, Pure and Applied Chemistry, **1997**, 69, 245-248.
- Kerns E. H., Di L., *Pharmaceutical profiling in drug discovery*, Drug Discovery Today, **2003**, 8, 316-323.
- Keevil B. G., Path F. R. C., *Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids*, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, **2013**, 27, 663-674.
- Khera M., Crawford D., Morales A., Salonia A., Morgentaler A., *A new era of testosterone and prostate cancer: From physiology to clinical implications*, European Urology, **2014**, 65, 115-123.
- King F. D., *Medicinal chemistry principles and practice*, R.S.C., Cambridge, **2002**.
- Kovačević S., Podunavac-Kuzmanović S., Jevrić L., Chapter in: Chemometrics: Methods, applications and new research, *The concept of chemometric guidelines in synthesis and development of new anticancer compounds*, Nova Science, New York, **2017**.
- Kovačević S. Z., Podunavac-Kuzmanović S. O., Jevrić L. R., Jovanov P. T., Djurendić E. A., Ajduković J. J., *Comprehensive QSRR modeling as a starting point in characterization and further development of anticancer drugs based on 17 α -picolyl and 17(E)-picolinylidene androstane structures*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, **2016a**, 93, 1-10.
- Kovačević S. Z., Podunavac-Kuzmanović S. O., Jevrić L. R., Vukić V. R., Savić M. P., Djurendić E. A., *Preselection of A- and B- modified D-homo lactone and D-seco androstane derivatives as potent compounds with antiproliferative activity against breast and prostate cancer cells - QSAR approach and molecular docking study*, European Journal of Pharmaceutical Science, **2016b**, 93, 107-113.
- Kovačević S.Z., Podunavac Kuzmanović S.O., Jevrić L.R., Lončar E.S., *Assessment of chromatographic lipophilicity of some anhydro-D-aldose derivatives on different stationary phases by QSRR approach*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technology, **2015**, 38, 492-500.
- Kovačević S. Z., Podunavac-Kuzmanović S. O., Jevrić L. R., Djurendić E. A., Ajduković J. J., *Non-linear assessment of anticancer activity of 17-picolyl and 17-picolinylidene androstane derivatives - Chemometric guidelines for further syntheses*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, **2014**, 62, 258-266.

Kovačević S. Z., Jevrić L. R., Podunavac Kuzmanović S. O., Kalajdžija D. N., Lončar E. S., *Quantitative structure-retention relationship analysis of some xylofuranose derivatives by linear multivariate method*, Acta Chimica Slovenica, **2013a**, 60, 420-428.

Kovačević S. Z., Jevrić L. R., Podunavac Kuzmanović S. O., Lončar E. S., *Chemometric estimation of the RP TLC retention behaviour of some estrane derivatives by using multivariate regression methods*, Central European Journal of Chemistry, **2013b**, 11, 2031-2039.

Kowalska S., Krupczyńska K., Buszewski B., *Some remarks on characterization and application of stationary phases for RP-HPLC determination of biologically important compounds*, Biomedical Chromatography, **2006**, 20, 4-22.

Kozielewicz P., Paradowska K., Erić S., Wawer I., Zloh M., *Insights into mechanism of anticancer activity of pentacyclic oxindole alkaloids of Uncaria tomentosa by means of a computational revers virtual screening and molecular docking approach*, Monatshefte für Chemie, **2014**, 145, 1201-1211.

Kuroda Y., Tani K., Matsuo Y., Yokoyama S., *Automated search on natively folded protein fragments for high-throughput structure determination in structural genomics*, Protein Science, **2000**, 9, 2313-2321.

Lancel M., Faulhaber J., Schiffelholz T., Romeo E., Di Michele F., Holsboer F., Rupprecht R., *Allopregnanolone affects sleep in a benzodiazepine-like fashion*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **1997**, 282, 1213-1218.

Leardi R., *Nature-inspired methods in chemometrics: Genetic algorithms and artificial neural networks*, Elsevier, Amsterdam, **2003**.

Li D., Meng X., Li B., *Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis*, Journal of Food Composition and Analysis, **2016**, 47, 1-7.

Li Z., Bishop A. C., Alyamani M., Garcia J. A., Dreicer R., Bunch D., Liu J., Upadhyay S. K., Auchus R. J., Sharifi N., *Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumor activity in prostate cancer*, Nature, **2015**, 523, 347-351.

Livingstone D. J., *The characterization of chemical structures using molecular properties. A survey*, Journal of Chemical Information and Computer Science, **2000**, 40, 195-209.

Liu H., Lin T., Cheng X., Li N., Wang L., Li Q., *Simultaneous determination of anabolic steroids and β -agonists in milk by QuEChERS and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, **2017**, 1043, 176-186.

Liu X., Tanaka H., Yamauchi A., Testa B., Chuman H., *Determination of lipophilicity by reversed-phase high performance liquid chromatography. Influence of 1-octanol in the mobile phase*, Journal of Chromatography A, **2005**, 1091, 51-59.

Luilo G. B., Cabaniss S. E., *Quantitative structure-property relationship for predicting chlorine demand by organic molecules*, Environmental Science & Technology, **2010**, 44, 2503-2508.

Ma X., Chen C., Yang J., *Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds*, Acta Pharmacologica Sinica, **2005**, 26, 500-512.

Mannhold R., Ostermann C., *Prediction of log P with substituent-based methods. U: Molecular drug properties measurement and prediction*, Wiley-VHC, Weinheim, **2008**.

Marciniec B., Ogrodowczyk M., Dettlaff K., *Search for the effect of E-beam irradiation on some steroids*, Radiation Physics and Chemistry, **2005**, 72, 517-524.

Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., de Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, **1997**.

Mellon S. H., Griffin L. D., *Neurosteroids: biochemistry and clinical significance*, Trends in Endocrinology and Metabolism, **2002**, 13, 35-43.

McKenna J. E., *An enhanced cluster analysis program with bootstrap significance testing for ecological community analysis*, Environmental Modelling & Software, **2003**, 18, 205-220.

McIlroy J. W., Waddell Smith R., McGuffin V. L., *Assessing the effect of data pretreatment procedures for principal components analysis of chromatographic data*, Forensic Science International, **2015**, 257, 1-12.

Mehraein I., Riahi S., *The QSPR models to predict the solubility of CO₂ in ionic liquids based on least-squares support vector machines and genetic algorithm-multi linear regression*, Journal of Molecular Liquids, **2017**, 225, 521-530.

Mi X., Li S., Li Y., Wang K., Zhy D., Chen G., *Quantitative determination of 26 steroids in eggs from various species using liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, **2014**, 1356, 54-63.

Microsoft, Microsoft Excel, Computer Software, Redmond, Washington.

Miller J. N., Miller J. C., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson Education Limited, Harlow, England, **2010**.

Milošević N. P., Stojanović S. S., Penov-Gaši K., Perišić-Janjić N., Kaliszan R., *Reversed- and normal-phase liquid chromatography in quantitative structure retention-property relationships of newly synthesized seco-androstene derivatives*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2014**, 88, 636-642.

Minovski N., Jezierska-Mazzarello A., Vračko M., Šolmajer T., *Investigation of 6-fluoroquinolones activity against Mycobacterium tuberculosis using theoretical molecular descriptors: a case study*, Central European Journal of Chemistry, **2011**, 9, 855-866.

Mizera M., Talaczyńska A., Zalewski P., Skibiński R., Cielecka-Piontel J., *Prediction of HPLC retention times of tebipenem pivoxyl and its degradation products in solid state by*

applying adaptive artificial neural network with recursive features elimination, *Talanta*, **2015**, 137, 174-181.

Molinspiration Cheminformatics <<http://www.molinspiration.com/>>.

Montgomery D. C., Runger G. C., *Applied statistics and probability for engineers*, John Wiley & Sons, USA, **2014**.

Moreira V.M.A., Vasaitis T.S., Njar V.C.O., Salvador J.A.R., *Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors*, *Steroids*, **2008**, 72, 939-948.

Moroy G., Martiny V. Y., Vayer P., Villoutreix B. O., Miteva M. A., *Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery*, *Drug Discovery Today*, **2012**, 17, 44-55.

Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Meriin A.B., Sherman M. Y., Morimoto R. I., Massie B., *The chaperone function of hsp70 is required forp against stress-induced apoptosis*, *Molecular and Cellular Biology*, **2000**, 20, 7146-7159.

Napoli N., Donepudi S., Sheikh S., Rini B. G., Armamento-Villareal R., *Increased 2-hydroxylation of estrogen in women with a family history of osteoporosis*, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **2005**, 90, 2464-2471.

Natalini B., Sardella R., Camaioni E., Natalini S., Pellicciari R., *Dominant factors affecting the chromatographic behaviour of bile acids*, *Chromatographia*, **2006**, 64, 343-349.

Nikolić A. R., Petri E. T., Klisurić O. R., Ćelić A. S., Jakimov D. S., Djurendić E. A., Penov-Gaši K. M., Sakač M. N., *Synthesis and anticancer cell potential of steroidal 16,17-seco-16,17a-dinitriles: Identification of a selective inhibitor of hormone-independent breast cancer cells*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2015**, 23, 703-711.

Nikolić A., *Sinteza novih steroidnih jedinjenja od potencijalnog biomedicinskog značaja*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2014**.

Novák M., Palya D., Bodai Z., Nyiri Z., Magyar N. Kovács J., Eke Z., *Combined cluster and discriminant analysis: An efficient chemometric approach in diesel fuel characterization*, *Forensic Science International*, **2017**, 270, 61-69.

Novaković A, *Biopotencijal autohtonih gljiva u funkciji nutraceutika*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2015**.

Nowakowska J., Pikul P., Ciura K., Piotrowicz J., *A simple TLC and HPTLC method for separation of selected steroid drugs*, *Central European Journal of Chemistry*, **2013**, 11, 1297-1308.

O'Brien R. M., *A caution regarding rules of thumb for variance inflation factor*, *Quality & Quantity*, **2007**, 41, 673-690.

Odović J. V., Trbojević-Stanković J. B., *Hromatografske metode u proučavanju lipofilnosti biološki aktivnih supstanci*, Hemijska industrija, **2009**, 63, 33-37.

Oklješa A., *Sinteza i biološka aktivnost novih steroidnih heterocikličnih jedinjenja*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2015**.

Patani N., Martin L.A., *Understanding response and resistance to oestrogen deprivation in ER-positive breast cancer*, Molecular and Cellular Endocrinology, **2014**, 382, 683-694.

Penov-Gaši K. M., Oklješa A. M., Petri E. T., Čelić A. S., Djurendić E. A., Klisurić O. R., Csanadai J. J., Batta G., Nikolić A. R., Jakimov D. S., Sakač M. N., *Selective antitumour activity and ERα molecular docking studies of newly synthesized D-homo fused steroidal tetrazoles*, MedChemComm, **2013**, 4, 317-323.

Perišić-Janjić N. U., Đaković-Sekulić T. Lj., Stojanović S. Z., Penov-Gaši K. M., *HPTLC chromatography of androstene derivatives. Application of normaln phase thin-layer chromatographic retention data in QSAR studies*, Steroids, **2005**, 70, 137-144.

Perišić-Janjić N., Đaković-Sekulić T., Stojanović S., Penov-Gaši K., *Evaluation of the lipophilicity of some dehydroepiandrosterone derivatives using RP-18 HPTLC chromatography*, Chromatographia, **2004**, 60, S201-S205.

Pliška V., Testa B., van de Waaterbeemd, *Lipophilicity in drug action and toxicology*, Wiley-VHC, Weinheim, **1996**.

Podunavac-Kuzmanović S., Jevrić L., Švarc-Gajić J., Kovačević S., Vasiljević I., Kevojević I., Ivanović E., *Artificial neural network approach to modeling of metal contents in different types of chocolates*, Acta Chimica Slovenica, **2015**, 62, 190-195.

Podunavac-Kuzmanović S. O., Cvetković D. D., Jevrić L. R., Uzelac N. J., *Quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of a series of benzimidazole derivatives as inhibitors of Saccharomyces cerevisiae*, Acta Chimica Slovenica, **2013**, 60, 26-33.

Podunavac-Kuzmanović S. O., Jevrić L. R., Kovačević S. Z., Kalajdžija N. D., *A chemometric approach for prediction of antifungal activity of some benzoxazole derivatives against Candida albicans*, Acta Periodica Technologica, **2012**, 43, 273-282.

Podunavac-Kuzmanović S. O., Cvetković D. D., Gadžurić S. B., *Prediction of the inhibitory activity of benzimidazole derivatives against Bacillus spp.*, Acta Periodica Technologica, **2011**, 42, 251-261.

Podunavac-Kuzmanović S. O., Cvetković D. D., Barna D. J., *QSAR analysis of 2-amino or 2-methyl-1-substituted benzimidazoles against Pseudomonas aeruginosa*, International Journal of Molecular Sciences, **2009**, 10, 1670-1682.

Poole S. K., Poole F. C., *Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients*, Journal of Chromatography B, **2003**, 797, 3-19.

Pourbasheer E., Riahi S., Ganjali M. R., Norouzi P., *Quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of interleukin-1 receptor associated kinase 4 (IRAK-4) inhibitor activity by the genetic algorithm and multiple linear regression (GA-MLR) method*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, **2010**, 25, 844-853.

PreADMET <<http://preadmet.bmdrc.org/>>.

Quanson J., Stander M. A., Pretorius E., Jenkinson C., Taylor A. E., Storbeck K-H., *High-throughput analysis of 19 endogenous androgenic steroids by ultra-performance convergence chromatography tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, **2016**, 1031, 131-138.

Rajkó R., Héberger K., *Conditional Fisher's exact test as a selection criterion for pair-correlation method. Type I and type II errors*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **2001**, 57, 1-14.

Raro M., Portolés T., Pitarch E., Sancho J. V., Hernández F., Garrosta L., Marcos J., Ventura R., Segura J., Pozo O. J., *Potential of atmospheric pressure chemical ionization source in gas chromatography tandem mass spectrometry for the screening of urinary exogenous androgenic anabolic steroids*, Analytica Chimica Acta, **2016**, 906, 128-138.

RCSB PDB Data Base <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/>>.

Reddy D. S., *Role of neurosteroids in catamenial epilepsy*, Epilepsy Research, **2004**, 62, 99-118.

Ryan C. J., Smith M. R., de Bono J. S., Molina A., Logothetis C. J., de Souza P., Fizazi K., Mainwaring P., Piulats J. M., Ng S., Carles J., Mulders P. F. A., Basch E., Small E. J., Saad F., Schrijvers D., Van Poppel H., Mukherjee S. D., Suttman H., Gerritsen W. R., Flaig T. W., George D. J., Yu E. Y., Efstathiou E., Pantuck A., Winquist E., Higano C. S., Taplin M-E., Park Y., Kheoh T., Griffin T., Scher H. I., Rathkopf D. E., *Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy*. The New England Journal of Medicine, **2013**, 368, 138-148.

Richmond V., Careaga V.P., Sacca P., Calvo J.C., Maier M.S., *Synthesis and cytotoxic evaluation of four new 6E-hydroximinosteroids*, Steroids, **2014**, 84, 7-10.

Rybka M., Mercader A. G., Castro E. A., *Predictive QSAR study of chanolone derivatives cytotoxicity activity against HT-29 human colon adenocarcinoma cell lines*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **2014**, 132, 18-29.

Sakač M. N., Gaković A. R., Csanádi J. J., Djurendić E. A., Klisurić O., Kojić V., Bogdanović G., Penov-Gaši K. M., *An intramolecular one-pot synthesis of steroidal triazoles via 1,3-dipolar cycloadditions of in situ generated diazo compounds*, Tetrahedron Letters, **2009**, 50, 4107-4109.

Sakač M., Gaković A., Stojanović S., Djurendić E., Kojić V., Bogdanović G., Penov-Gaši K., *Synthesis and biological evaluation of a series of A,B-ring modified 16,17-secoandrostane derivatives*, Bioorganic and Medicinal Chemistry, **2008**, 36, 128-132.

Sârbu C., Naşcu-Briciu R. D., Casoni D., Kot-Wasik A., Wasik A., Namieśnik J., *Chromatographic lipophilicity determination using large volume injections of the solvent non-miscible with the mobile phase*, Journal of Chromatography A, **2012**, 1266, 53-60.

Sârbu C., Onişor C., Poša M., Kevrešan S., Kuhajda L., *Modeling and prediction (correction) of partition coefficients of bile acids and their derivatives by multivariate regression methods*, Talanta, **2008**, 75, 651-657.

Sârbu C., Kuhajda K., Kevrešan S., *Evaluation of the lipophilicity of bile acids and their derivatives by thin-layer chromatography and principal component analysis*, Journal of Chromatography A, **2001**, 917, 361-366.

Sastre F., Ferreira F., Pedreschi F., *MALDI-TOF mass spectrometry and reversed-phase HPLC-ELSD chromatography for structural and quantitative studies of major steroid saponins in commercial extracts of Yucca schidigera Roez.*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2016**, 120, 270-282.

Savage P.B., Li C., Taotafe U., Ding B., Guan Q., *Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics*, FEMS Microbiology Letters, **2002**, 217, 1-7.

Savić M. P., Djurendić E. A., Petri E. T., Ćelić A., Klisurić O. R., Sakač M. N., Jakimov D. S., Kojić V. V., Penov Gaši K. M., *Synthesis, structural analysis and antiproliferative activity of some novel D-homo lactone androstane derivatives*, RSC Advances, **2013**, 3, 10385-10395.

Schultz H. P., Schultz E. B., Schultz T. P., *Topological organic chemistry. 2. Graph theory, matrix determinants and eigenvalues, and topological indices of alkanes*, Journal of Chemical Information and Computer Science, **1990**, 30, 27-29.

Shahlaei M., *Descriptor selection methods in quantitative structure-activity relationship studies: A review study*. Chemicals Reviews, **2013**, 113, 8093-8103.

Sharma M. C., Sharma S., Bhadoriyaca K. S., *QSAR studies on pyrazole-4-carboxamide derivatives as Aurora A kinase inhibitors*, Journal of Taibah University for Science, **2016**, 10, 107-114.

Shingate B. B., Hazra B. G., Salunke D. B., Pore V. S., Shirazi F., Deshpande M. V., *Synthesis and antimicrobial activity of novel oxysterols from lanosterol*, Tetrahedron, **2013**, 69, 11155-11163.

Siegfried J. M., Stabile L. P., *Estrogenic steroid hormones in lung cancer*, Seminars in Oncology, **2014**, 41, 5-16.

Simpson D. A., *Mechanisms of retention on porous graphitic carbon: Chromatographic and computational chemistry studies*, PhD thesis, University of Nottingham, School of Pharmaceutical Sciences, United Kingdom, **2000**.

Simon L., Nazmul Karim N., *Probabilistic neural networks using Bayesian decision strategies and a modified Gompertz model for growth phase classification in the batch culture of Bacillus subtilis*, Biochemical Engineering Journal, **2001**, 7, 41-48.

SlideShare <<https://www.slideshare.net>>.

SRPS ISO11133:2014, Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media (ISO 11133:2014, Corrected version 2014-11-01).

StatSoft Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, Oklahoma, USA <<http://www.statsoft.com>>.

Sztanke M., Tuzimski T., Janicka M., Sytanke K., *Structure–retention behaviour of biologically active fused 1,2,4-triazinones - Correlation with in silico molecular properties*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, **2015**, 68, 114-126.

Šegan S., Opsenica I., Zlatović M., Milojković-Opsenica D., Šolaja B., *Quantitative structure retention/activity relationships of biologically relevant 4-amino-7-chloroquinoline based compounds*, Journal of Chromatography B, **2016**, 1012-1013, 144-152.

Tache F., Naşcu-Briciu R. D., Sârbu C., Micăle F., Medvedovici A., *Estimation of the lipophilic character of flavonoids from the retention behavior in reversed phase liquid chromatography on different stationary phases: A comparative study*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2012**, 57, 82-93.

Taleb-Contini S. H., Salvador M. J., Watanabe E., Ito I. Y., Rodrigues de Oliveira D. C., *Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two Chromolaena species*, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, **2003**, 39, 403-408.

Tang H., Yang L., Li J., Chen J., *Molecular modelling studies of 3,5-dipyridyl-1,2,4-triazole derivatives as xanthine oxidoreductase inhibitors using 3D-QSAR, Topomer CoMFA, molecular docking and molecular dynamic simulations*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, **2016**, 68, 64-73.

Tenover F. C., *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*, American Journal of Infection Control, **2006**, 34, S3-S10.

Tetko I. V., Poda G. I., *Prediction of log P with property-based methods. U: Molecular drug properties measurement and prediction*, Wiley-VHC, Meihem, **2008**.

Todeschini R., Consonni V., *Handbook of molecular descriptors*, Wiley-VHC, Weinheim, **2000**.

Topliss J. G., Costello R. J., *Chance correlations in structure-activity studies using multiple regression analysis*, Journal of Medicinal Chemistry, **1972**, 15, 1066-1068.

Trifković J., Andrić F., Ristivojević R., Andrić D., Tešić Ž. Lj., Milojković Opsenica D. M., *Structure-retention relationship study of arylpiperazines by linear multivariate modeling*, Journal of Separation Science, **2010**, 33, 2619-2628.

Tuccinardi T., Poli G., Romboli V., Giordano A., Martinelli A., *Extensive consensus docking evaluation for ligand pose prediction and virtual screening studies*, Journal of Chemical Information and Modeling, **2014**, 54, 2980-2986.

Tuğrul Zeyrek C., Boyacioglu B., Temiz-Arpaci Ö., Ünver H., Elmali A., *Spectroscopic, quantum mechanical and molecular docking studies of a new benzoxazole compound with an oxidoreductase enzyme and DNA*, Journal of Molecular Structure, **2017**, 1136, 112-126.

UCSF Chimera, Resource for biocomputing, visualization and informatics, University of California, San Francisco, USA <<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>>.

UCSF DOCK 6.5, Molecular design institute, University of California, San Francisco, California, USA <<http://dock.compbio.ucsf.edu/>>.

Valkó K., *Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution*, Journal of Chromatography A, **2004**, 1037, 299-310.

Valkó K., Slégel P., *New chromatographic hydrophobicity index (ϕ_0) based on the slope and the intercept of the $\log k'$ versus organic phase concentration plot*, Journal of Chromatography A, **1993**, 631, 49-61.

Van de Waterbeemd H., Rose H., *The practice of medicinal chemistry. Chapter 23, Quantitative approaches to structure activity relationships*. Academic Press, **2008**.

Van de Waterbeemd H., Carter R. E., Grassy G., Kubinyi H., Martin Y. C., Tute M. S., Willet P., *Glossary of terms used in computational drug design*, Pure and Applied Chemistry, **1997**, 69, 1137-1152.

Varmuza K., Filzmoser P., *Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics*. Taylor & Francis Group, CRC Press, Florida, USA, **2009**.

Vejrazkova D., Vcelak J., Vankova M., Lukasova P., Bradnova O., Halkova T., Kancheva R., Bendlova B., *Steroids and insulin resistance in pregnancy*, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **2014**, 139, 122-129.

VCCLAB, 2005. Virtual Computational Chemistry Laboratory <<http://www.vcclab.org/>>.

Wang L., Wang C., Pan Z., Sun Y., Zhu X., *Application of pyrolysis-gas chromatography and hierarchical cluster analysis to the discrimination of the Chinese traditional medicine *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.*, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, **2011**, 90, 13-17.

Ward J. H., *Hierarchical grouping to optimize an objective function*, Journal of American Statistical Association, **1963**, 58, 236-244.

Waring M. J., *Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates-Molecular weight dependent lower $\log D$ limits based on permeability*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2009**, 19, 2844-2851.

Weill-Engerer S., David J-P., Sazdovitch V., Liere P., Eychenne B., Pianos A., Schumacher M., Delacourte A., Baulieu E-E., Akwa Y., *Neurosteroid quantification in human brain regions: Comparison between Alzheimer's and nondemented patients*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **2002**, 87, 5138-5143.

Werteker M., Huber S., Kuchling S., Rossmann B., Schreiner M., *Differentiation of milk by fatty acid spectra and principal component analysis*, Measurement, **2017**, 98, 311-320.

WHO, World Health Organization, <<http://www.who.int/en/>>.

Wold S., *Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it?* Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **1995**, 30, 109-115.

Xu M., Dong P., Tiann X., Wang C., Huo X., Zhang B., Wu L., Deng S., Ma X., *Drug interaction study of natural steroids from herbs specifically toward human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 and their quantitative structure activity relationship (QSAR) analysis for prediction*, Pharmacological Research, **2016**, 110, 139-150.

Yazdani M., Glynn S. L., Wright J. L., Hawi A., *Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds*, Pharmaceutical Research, **1998**, 15, 1490-1494.

Young T. M., Shaffer L. B., Guess F. M., Bensmail H., León R. V., *A comparison of multiple linear regression and quantile regression for modeling the internal bond of medium density fiberboard*, Forest Product Journal, **2008**, 58, 39-48.

Yu B., Shi X-J., Zheng Y-F., Fang Y., Zhang E., Yu D-Q., Liu H-M., *A novel [1,2,4] triazolo [1,5-a] pyrimidine-based phenyl-linked steroid dimer: Synthesis and its cytotoxic activity*, European Journal of Medicinal Chemistry, **2013**, 69, 323-330.

Zhao Y., Zhou X., Chen H-G., Gong X-J., Cai Z-W., Zhou C-Y., *Determination of dehydroevodiamine in Evodia rutaecarpa (Juss.) Benth by high performance liquid chromatography and classification of the samples by using hierarchical clustering analysis*, Fitoterapia, **2009**, 80, 415-420.

6. ПРИЛОГ

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{П-7.1.}$$

$$R_{adj}^2 = 1 - (R^2) \cdot \left(\frac{n-1}{n-p-1} \right) \quad \text{П-7.2.}$$

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,pred} - \bar{y})^2}{p} \cdot \frac{n-p-1}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2} \quad \text{П-7.3.}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2}{n-p-1}} \quad \text{П-7.4.}$$

$$R_{cv}^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{PRESS}{TSS} \quad \text{П-7.5.}$$

$$TSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad \text{П-7.6.}$$

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2 \quad \text{П-7.7.}$$

$$SD_{PRESS} = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad \text{П-7.8.}$$

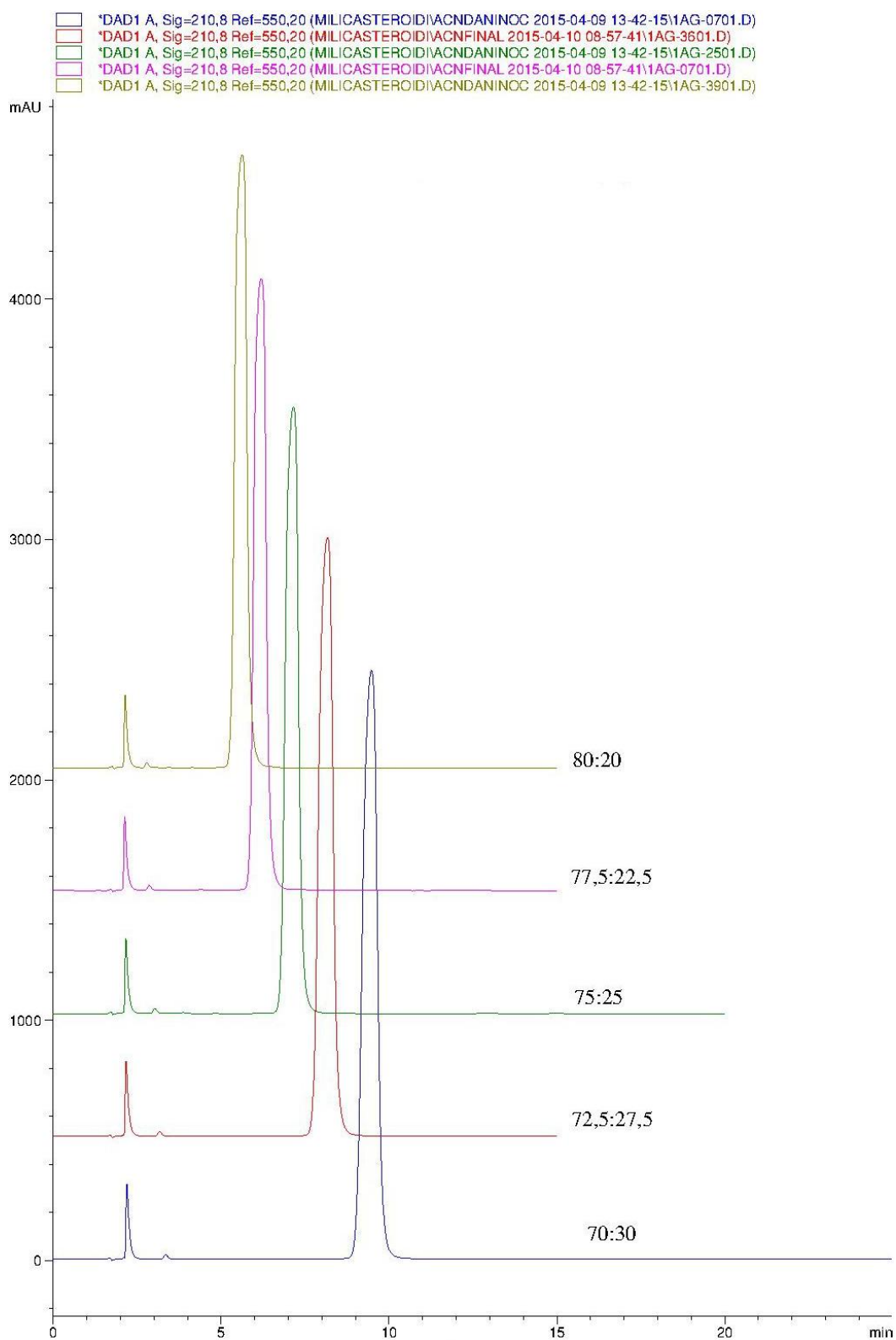
y_i – експерименталне вредности;

\bar{y} – средња вредност експерименталних вредности;

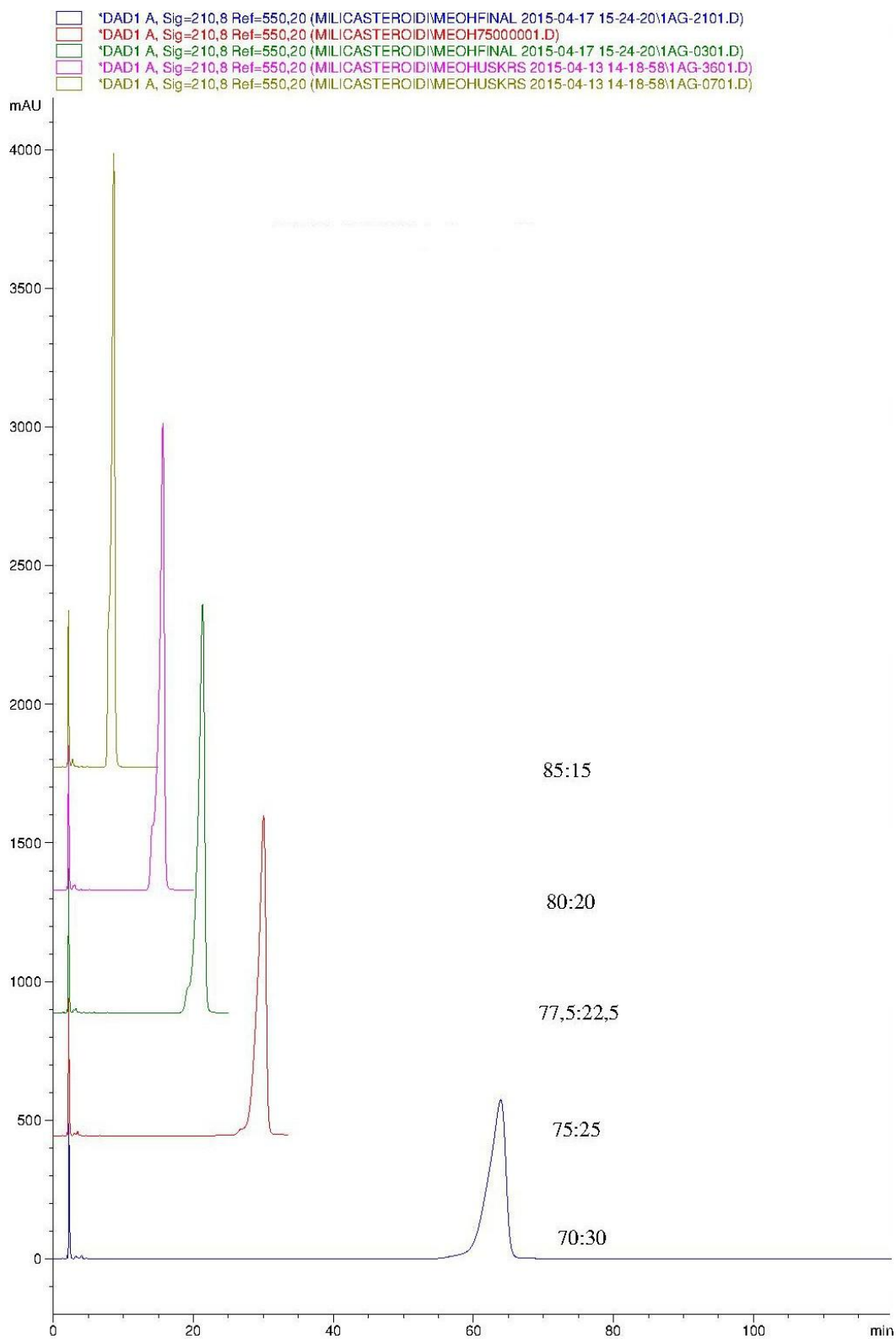
$y_{i,pred}$ – предвиђена вредност;

n – број компоненти;

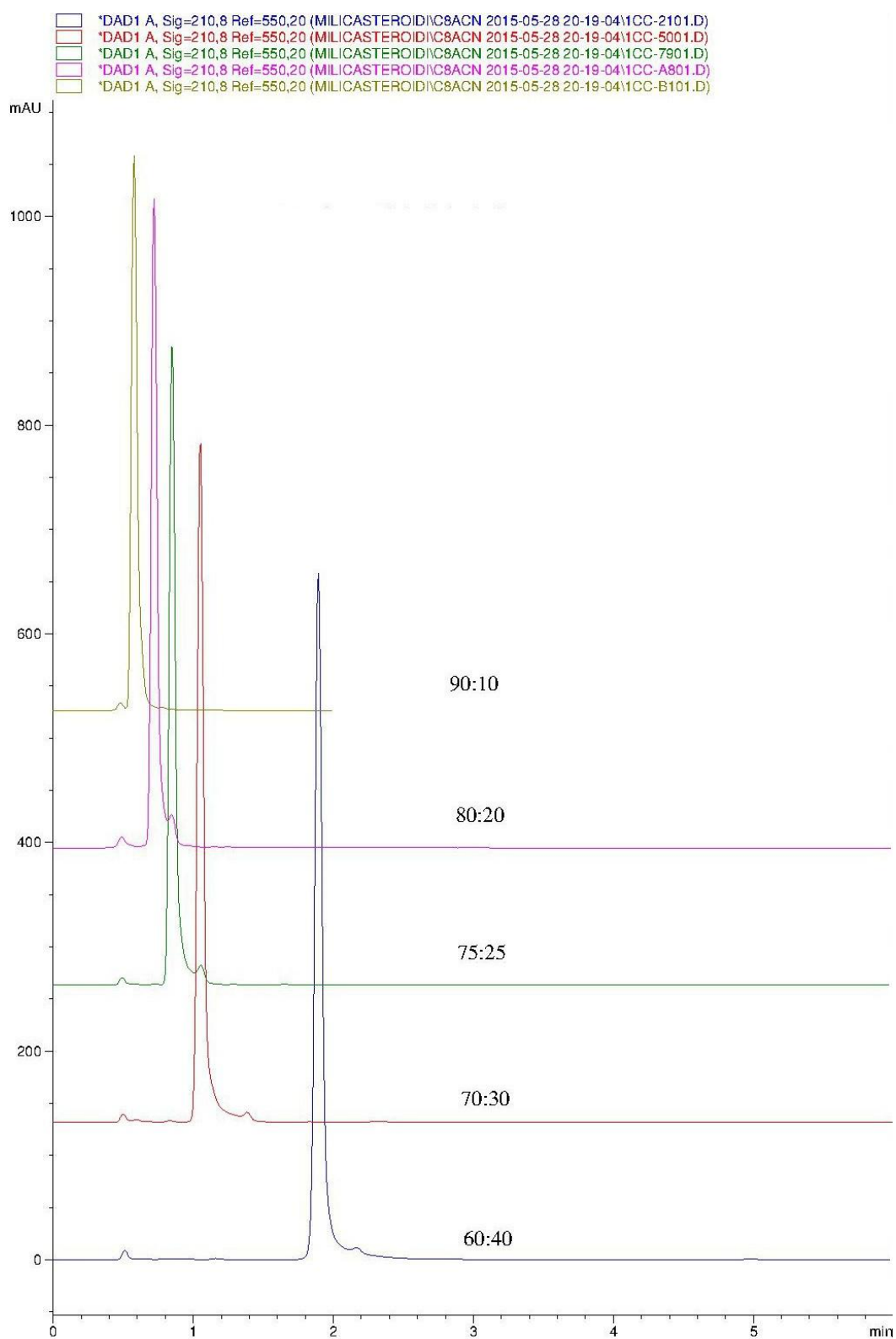
p – број степени слободе.



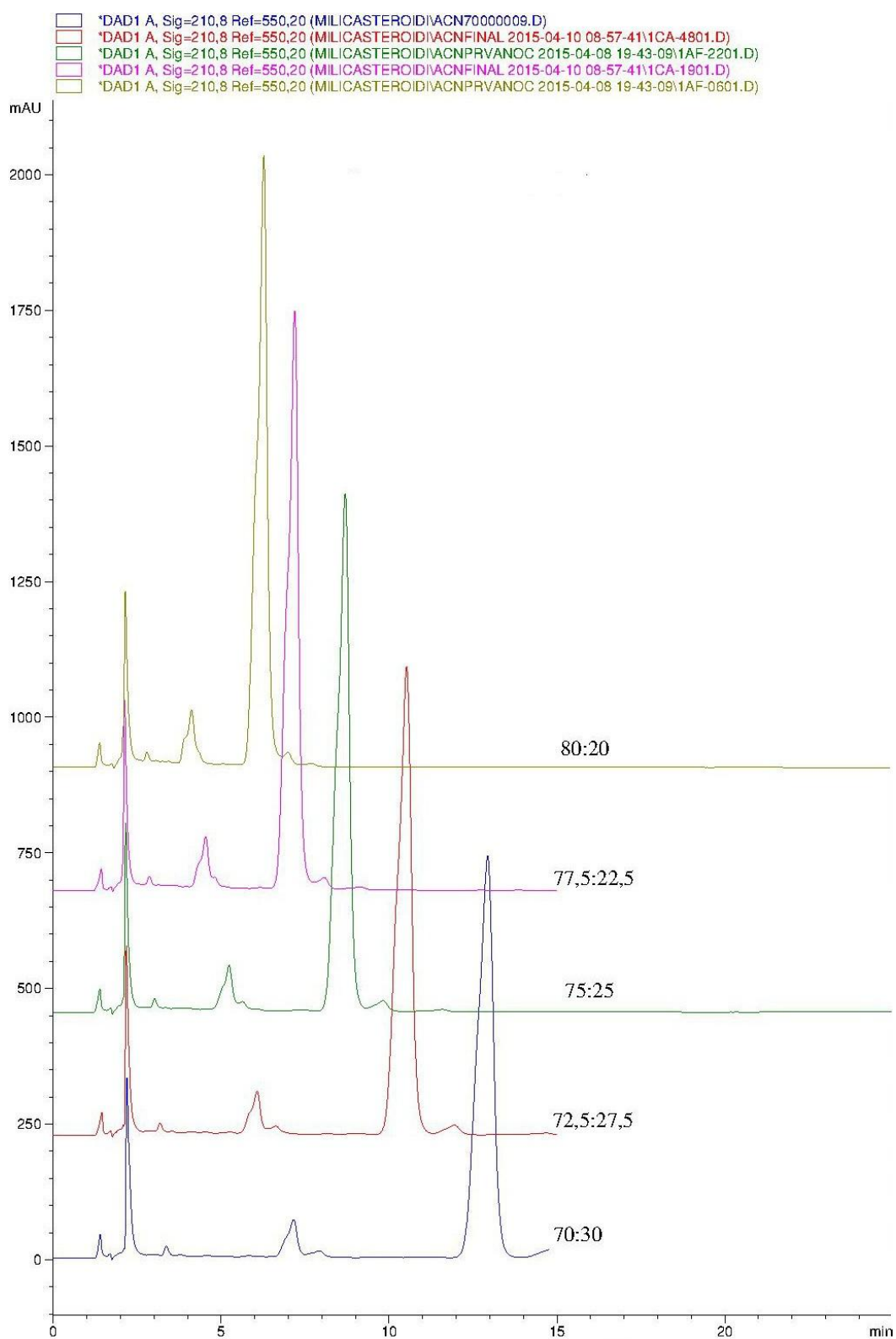
Слика П-7.1. Хроматограми за једињење I.3 у систему C18-ацетонитрил-вода



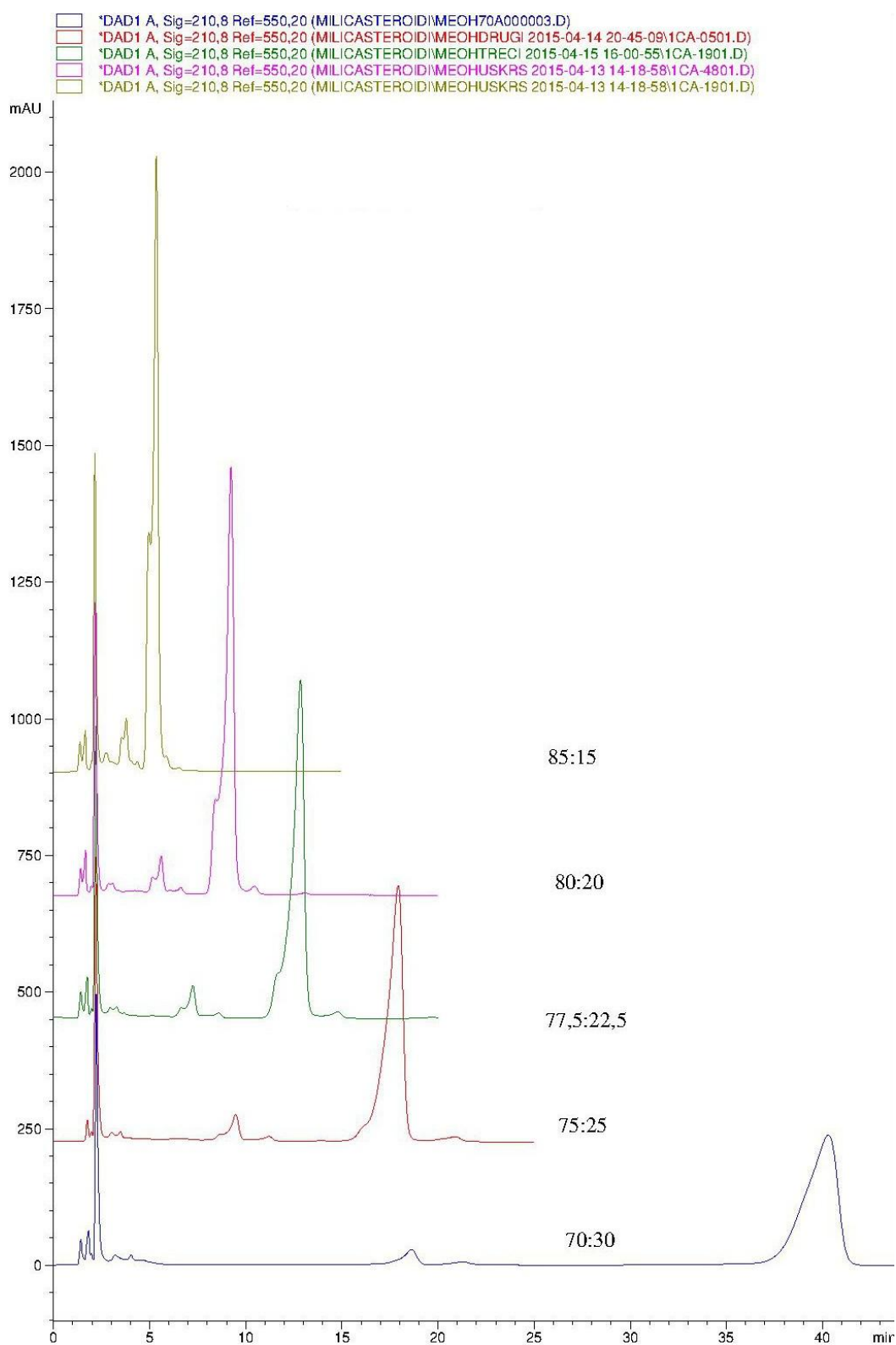
Слика П-7.2. Хроматограми за једињење I.3 у систему С18-метанол-вода



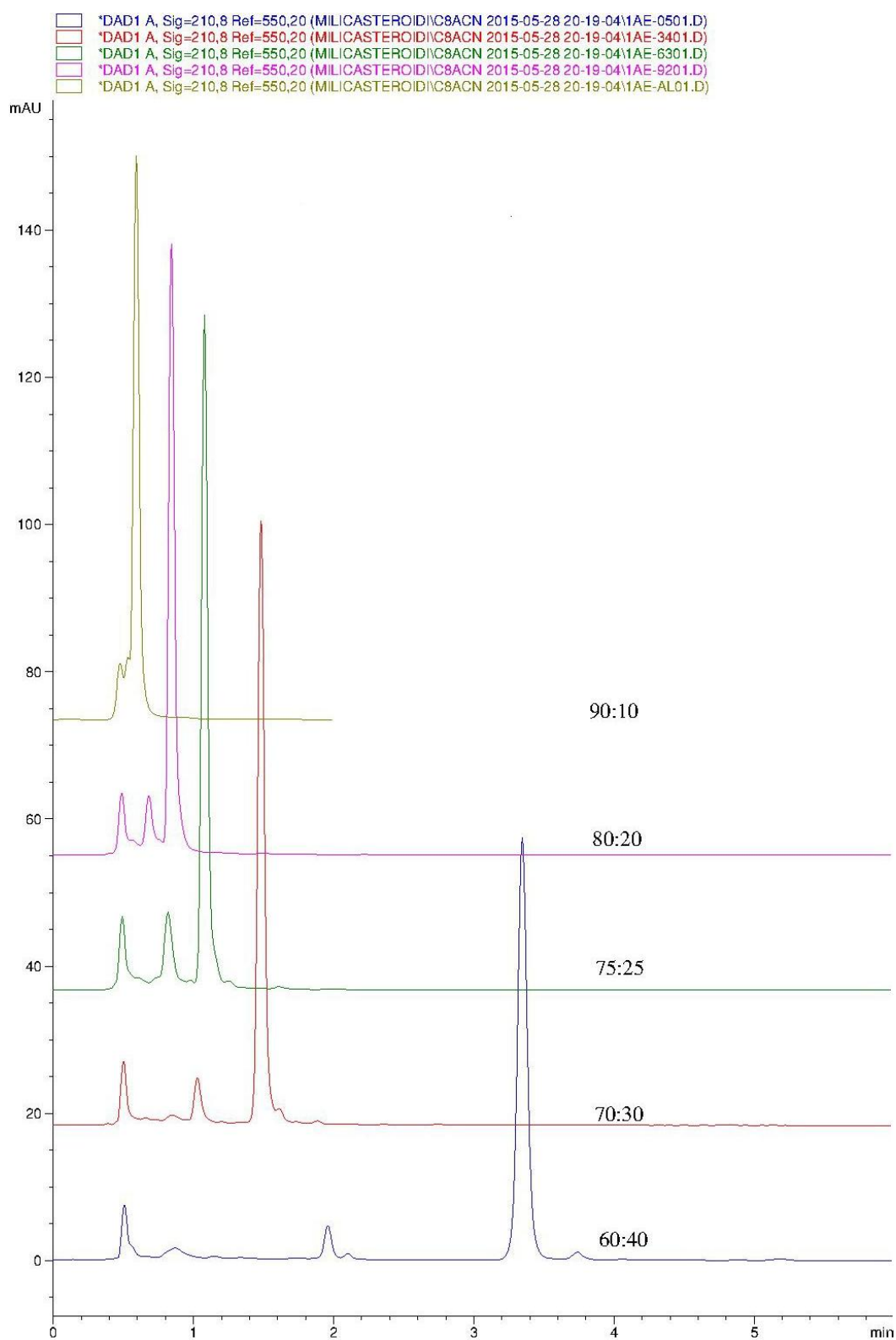
Слика П-7.3. Хроматограми за једињење I.3 у систему C8-ацетонитрил-вода



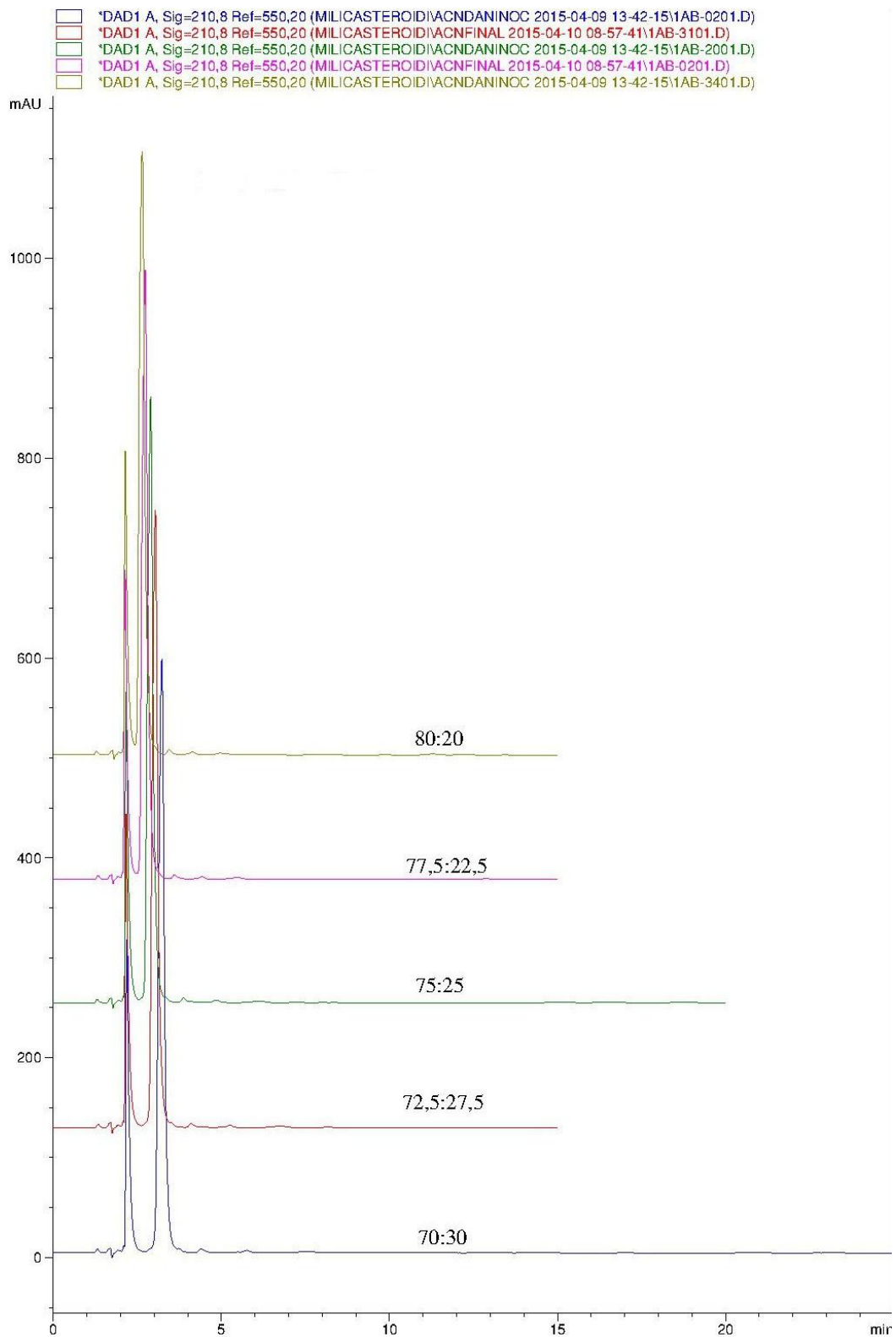
Слика П-7.4. Хроматограми за једињење П.11 у систему C18-ацетонитрил-вода



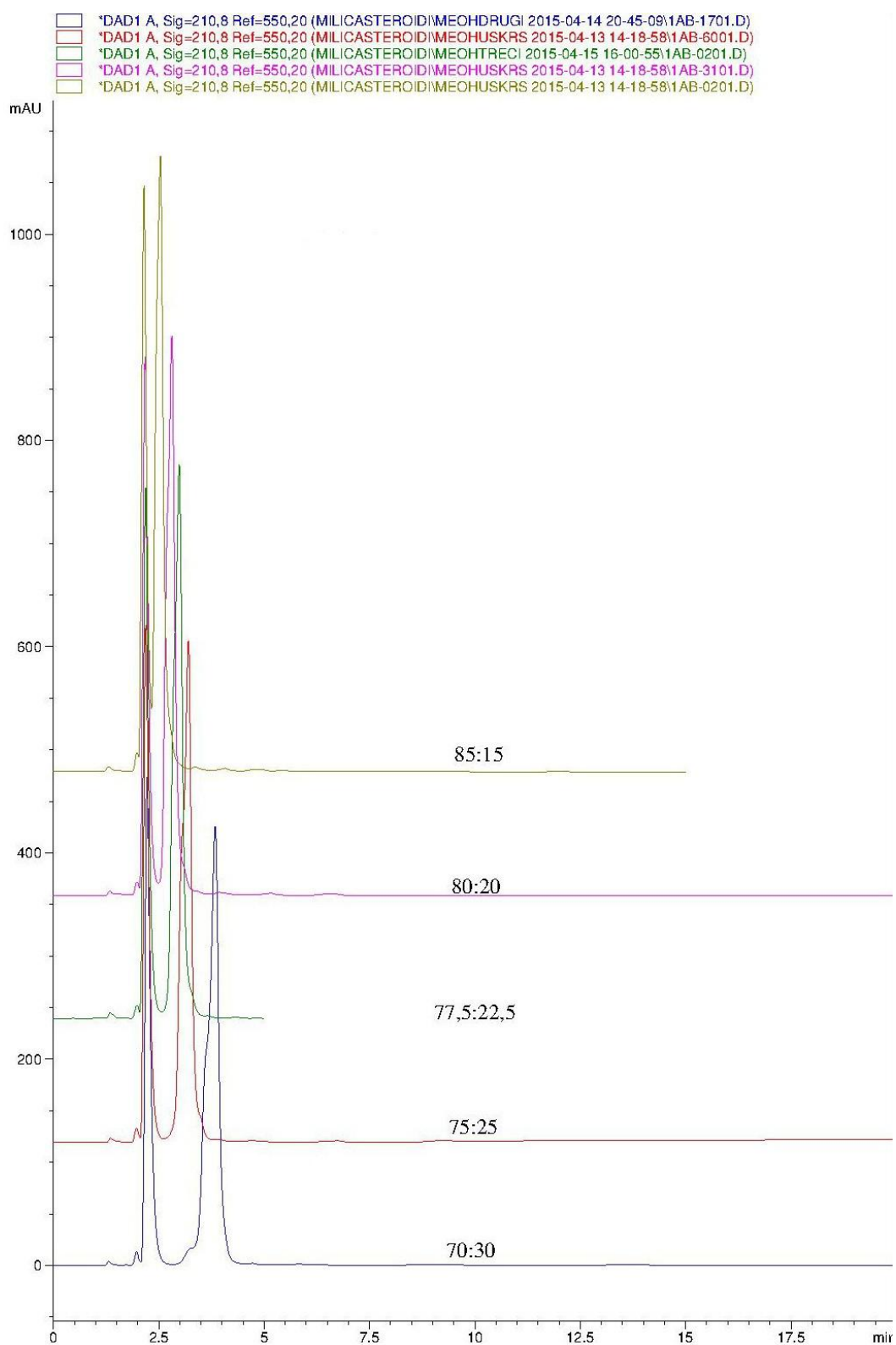
Слика П-7.5. Хроматограми за једињење П.11 у систему C18-метанол-вода



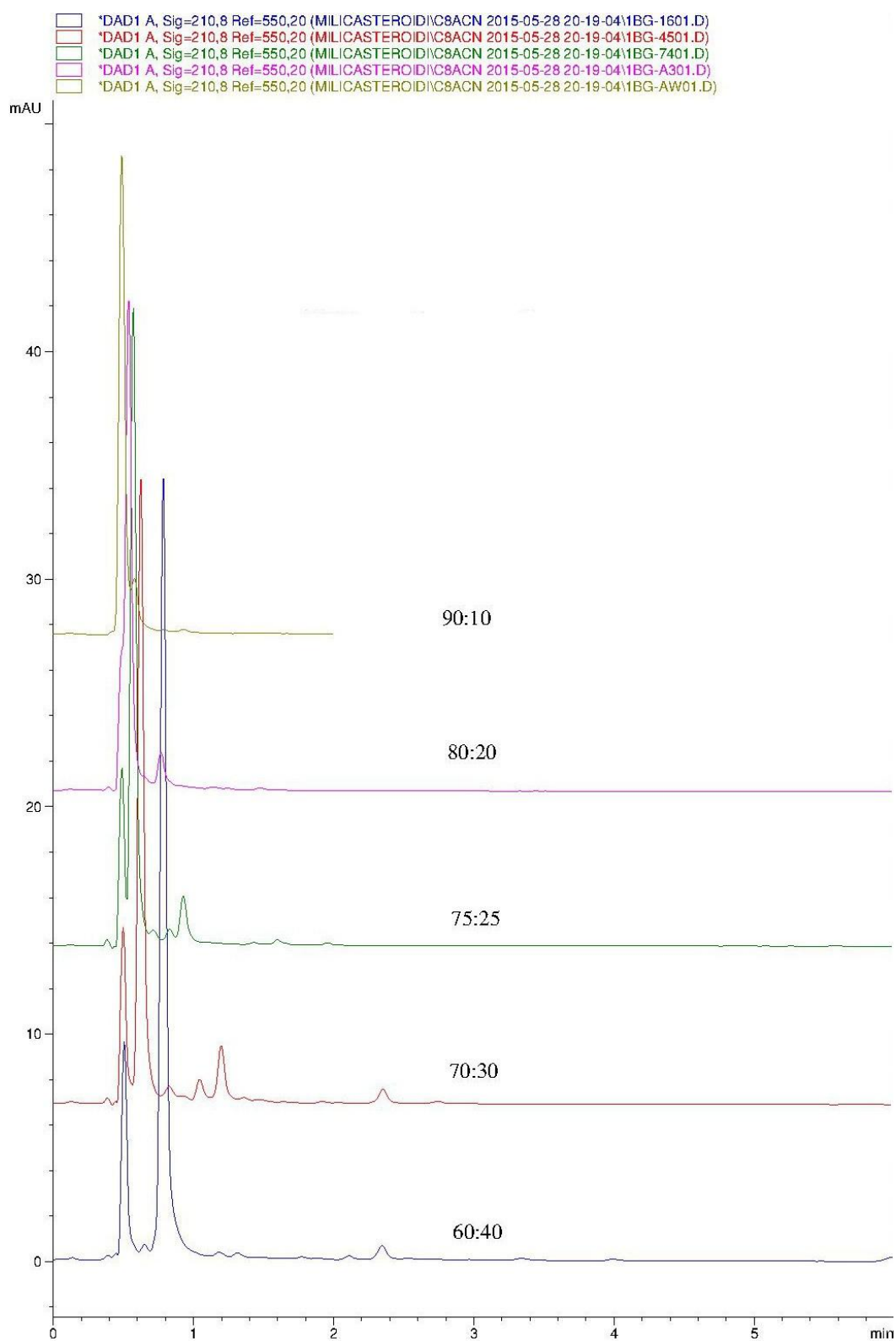
Слика П-7.6. Хроматограми за једињење П.11 у систему C8-ацетонитрил-вода



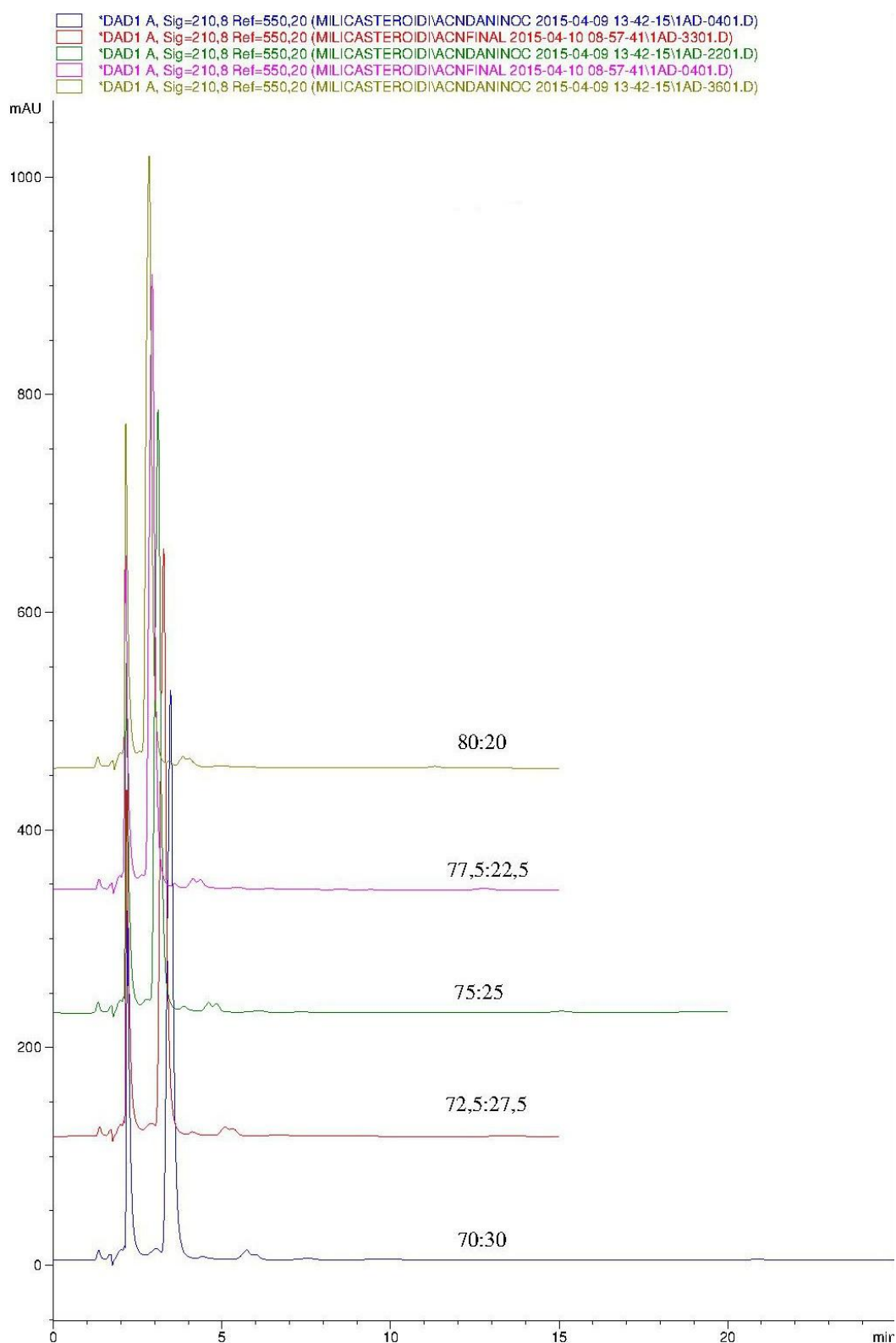
Слика П-7.7. Хроматограми за једињење III.13 у систему C18-ацетонитрил-вода



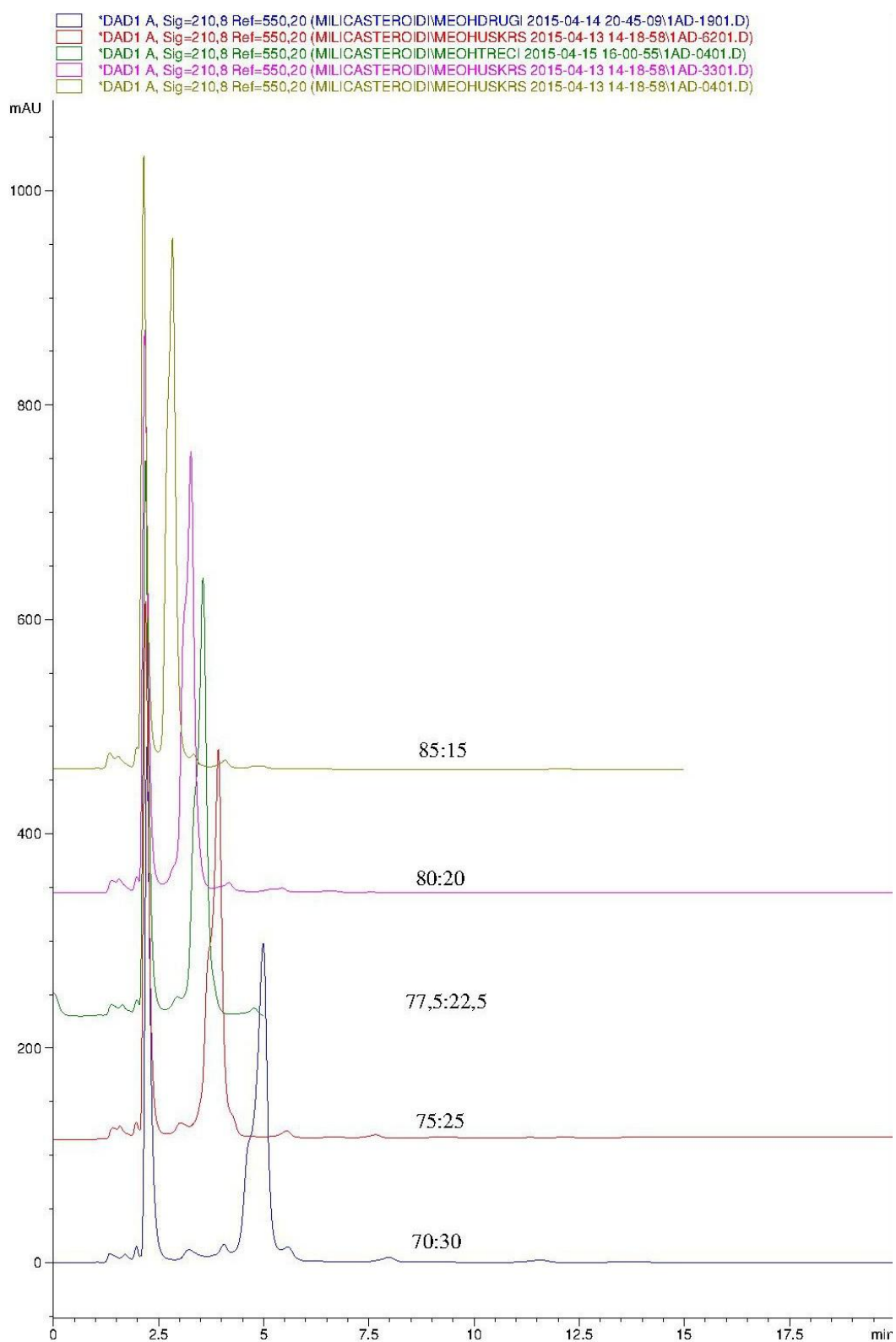
Слика П-7.8. Хроматограми за једињење III.13 у систему C18-метанол-вода



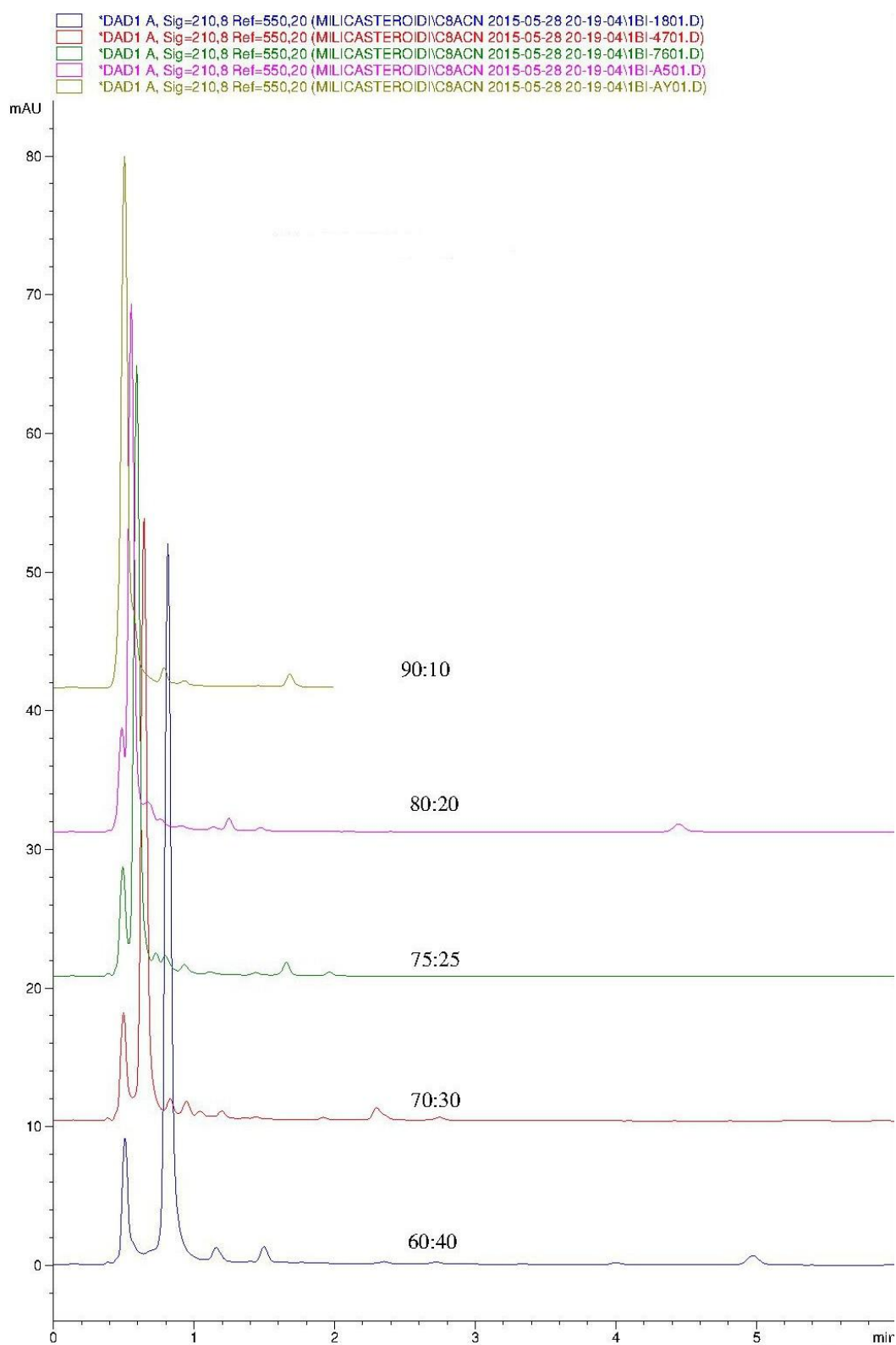
Слика П-7.9. Хроматограми за једињење III.13 у систему С8-ацетонитрил-вода



Слика П-7.10. Хроматограми за једињење IV.29 у систему C18-ацетонитрил-вода



Слика П-7.11. Хроматограми за једињење IV.29 у систему C18-метанол-вода



Слика П-7.12. Хроматограми за једињење IV.29 у систему C8-ацетонитрил-вода

Табела П–7.1. Параметри линеарне зависности између вредности $\log k$ параметра и удела мобилне фазе (φ)

Једињење	$y = a \cdot x + b$								
	ZORBAX SB-C18 ACN			ZORBAX SB-C18 MeOH			ZORBAX Eclipse Plus C8 ACN		
	a	b	R^2	a	b	R^2	a	b	R^2
I.1	-	-	-	-0,0454	3,2513	0,9999	-	-	-
I.2	-0,0169	0,5839	0,9922	-0,0442	3,3488	0,9999	-0,0274	0,8624	0,9018
I.3	-0,0312	2,7011	0,9993	-0,0641	5,9171	0,9994	-0,0375	2,6744	0,9998
I.4	-0,0271	2,0990	0,9993	-0,0512	4,2519	0,9993	-0,0333	2,1322	0,9997
I.5	-0,0277	2,3104	0,9990	-0,0550	4,7536	0,9988	-0,0333	2,2681	0,9999
I.6	-0,0341	2,8585	0,9995	-0,0598	5,2842	0,9997	-0,0407	2,8829	0,9991
I.7	-0,0352	3,0961	0,9993	-0,0643	5,8332	0,9994	-0,0409	3,0079	0,9996
II.8	-0,0415	2,5228	0,9998	-0,0607	4,4001	0,9994	-0,0460	2,4907	0,9995
II.9	-0,0584	4,5815	0,9243	-0,0673	5,5482	0,9989	-	-	-
II.10	-0,0451	3,7767	0,9996	-0,0742	6,4880	0,9990	-0,0525	3,9142	0,9974
II.11	-0,0407	3,5321	0,9995	-0,0705	6,1524	0,9990	-0,0453	3,4668	0,9995
III.12	-	-	-	-0,0439	2,9020	0,9948	-	-	-
III.13	-0,0307	1,8289	0,9998	-0,0404	2,6924	0,9999	-0,0393	2,1413	0,9783
III.14	-0,0352	2,5838	0,9998	-0,0543	4,2709	1,0000	-0,0413	2,6832	0,9983
III.15	-0,0352	2,6476	0,9998	-0,0555	4,4416	0,9998	-0,0410	2,7053	0,9993
III.16	-0,0343	2,6658	0,9997	-0,0557	4,5713	0,9996	-0,0389	2,6423	0,9999
III.17	-0,0412	3,3004	0,9997	-0,0620	5,2761	0,9994	-0,0473	3,3510	0,9983
III.18	-0,0413	3,4247	0,9998	-0,0642	5,6133	0,9994	-0,0480	3,4995	0,9966
III.19	-0,0341	3,1325	0,9995	-0,0606	5,5063	0,9994	-0,0373	2,9753	0,9998
III.20	-0,0416	3,9202	0,9996	-0,0715	6,7420	0,9996	-0,0447	3,7023	0,9998
III.21	-	-	-	-	-	-	-0,0520	2,5517	0,9157
III.22	-0,0560	3,2884	0,9933	-0,0528	3,3500	0,9947	-0,0547	2,8139	0,9779
III.23	-0,0383	2,2007	0,9976	-0,0463	2,8926	0,996	-0,0647	3,6541	0,9319
III.24	-0,0331	1,8315	0,9995	-0,0499	3,2084	0,9945	-0,0496	2,6125	0,9614
III.25	-0,0369	2,1405	0,9985	-0,0478	3,0236	0,9967	-0,0590	3,4532	0,9704
III.26	-0,0331	2,4725	0,9998	-0,0518	4,0894	0,9995	-0,0374	2,4463	0,9997
III.27	-0,0393	3,1988	0,9997	-0,0604	5,1771	0,9996	-0,0445	3,1877	0,9997
IV.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV.29	-0,0258	1,5705	0,9999	-0,0394	2,8482	1,0000	0,0322	1,7061	0,9999

Табела П–7.2. Вредности *in silico* молекулских дескриптора коришћених за класификацију и QSRR моделовање

Јед.	Липофилност								
	CLogP	logP	ALOGPs	AClogP	miLogP	ALOGP	MLOGP	XLOGP2	XLOGP3
I.1	2,29	3,45	3,50	2,70	3,65	3,80	3,44	3,65	3,53
I.2	1,98	2,50	3,44	2,28	3,65	3,22	3,58	3,06	2,99
I.3	4,65	5,32	5,16	4,26	5,78	5,63	4,73	5,68	5,35
I.4	4,35	2,55	3,12	3,83	3,53	3,03	4,82	3,21	3,41
I.5	4,86	2,97	3,42	3,41	3,89	3,41	5,03	3,67	3,81
I.6	6,07	4,93	4,35	5,32	4,95	5,07	5,57	5,09	5,20
I.7	6,59	5,34	4,79	4,91	5,32	5,44	5,78	5,55	5,60
II.8	4,29	3,81	4,80	4,46	4,11	4,33	3,38	5,40	3,86
II.9	5,24	4,25	5,33	4,95	4,82	4,70	3,76	6,14	4,43
II.10	6,96	6,63	6,33	6,44	6,24	6,74	4,45	8,02	6,22
II.11	5,65	4,24	5,05	4,32	4,42	4,50	3,73	5,53	4,40
III.12	2,35	2,80	2,63	3,13	2,16	2,32	2,09	2,59	2,40
III.13	2,25	2,81	3,23	2,56	1,92	1,99	2,18	1,85	2,00
III.14	3,35	2,33	3,91	3,36	3,19	2,95	2,92	3,60	3,18
III.15	3,66	2,74	4,19	3,76	3,56	3,33	3,13	4,06	3,61
III.16	3,66	2,74	4,19	3,76	3,56	3,33	3,13	4,06	3,61
III.17	5,07	4,70	4,45	4,85	4,62	4,99	3,67	5,48	4,97
III.18	5,38	5,12	4,75	5,26	4,98	5,36	3,87	5,94	5,40
III.19	5,10	3,81	5,22	4,84	4,48	4,13	4,15	4,21	4,73
III.20	6,82	6,19	6,49	6,34	5,91	6,16	4,96	6,30	6,52
III.21	2,80	3,36	3,64	4,62	2,59	3,68	2,86	4,12	3,60
III.22	2,49	2,41	3,75	4,20	2,59	3,11	2,99	3,53	3,06
III.23	2,16	2,46	3,19	3,77	2,07	2,64	2,09	3,41	2,87
III.24	2,24	2,98	3,87	4,36	2,40	3,21	2,90	3,49	3,02
III.25	2,06	2,47	3,46	3,21	1,83	2,31	2,18	2,68	2,48
III.26	3,44	2,85	4,26	4,69	3,29	3,49	3,35	4,27	3,63
III.27	5,16	5,23	5,10	6,18	4,72	5,52	4,12	6,15	5,42
IV.28	2,14	3,02	2,69	2,60	3,20	2,84	2,99	3,80	3,34
IV.29	2,04	3,03	2,51	2,04	2,97	2,50	3,09	3,06	2,95

Табела П–7.2. Вредности *in silico* молекулских дескриптора коришћених за класификацију и QSRR моделовање (наставак)

Јед.	Липофилност								
	Average logP	ALOGpS	AClogS	Average logS	ALogP	ALogp2	CrippenLogP	MLogP	XLogP
I.1	3,47	-3,74	-3,91	-3,82	-0,28	0,08	3,37	3,00	5,05
I.2	3,17	-3,80	-3,90	-3,85	-0,21	0,04	2,99	3,11	4,05
I.3	5,23	-5,69	-5,54	-5,62	0,03	0,01	4,94	3,77	8,48
I.4	3,62	-4,59	-3,76	-4,18	0,81	0,65	3,90	3,11	4,32
I.5	3,83	-4,74	-3,68	-4,21	0,80	0,64	4,46	3,22	4,79
I.6	5,08	-5,58	-5,00	-5,29	0,67	0,45	5,04	3,66	8,02
I.7	5,34	-5,67	-4,91	-5,29	0,66	0,44	5,60	3,77	8,48
II.8	4,33	-4,74	-4,50	-4,62	-0,11	0,01	4,93	3,55	5,89
II.9	4,88	-5,13	-4,91	-5,02	0,27	0,07	5,50	3,66	6,63
II.10	6,35	-5,89	-6,15	-6,02	0,13	0,02	6,47	4,21	10,33
II.11	4,56	-5,17	-5,44	-5,30	0,15	0,02	5,76	3,77	6,03
III.12	2,47	-3,72	-4,38	-4,05	0,16	0,03	4,11	3,22	2,63
III.13	2,25	-3,80	-4,34	-4,07	0,05	0,01	3,50	3,22	1,85
III.14	3,30	-4,49	-4,73	-4,61	0,32	0,10	5,05	3,11	3,12
III.15	3,66	-4,58	-5,11	-4,84	0,31	0,09	5,44	3,22	3,58
III.16	3,66	-4,58	-5,11	-4,84	0,31	0,09	5,44	3,22	3,58
III.17	4,72	-5,42	-5,97	-5,69	0,18	0,03	6,03	3,66	6,81
III.18	5,08	-5,49	-6,34	-5,92	0,17	0,03	6,41	3,77	7,27
III.19	4,54	-4,73	-5,09	-4,91	1,30	1,70	5,11	3,55	5,47
III.20	6,10	-5,53	-6,33	-5,93	1,17	1,36	6,08	4,10	9,16
III.21	3,59	-4,20	-4,90	-4,55	0,21	0,05	4,35	3,22	4,54
III.22	3,32	-3,89	-4,89	-4,39	0,29	0,08	4,34	3,33	3,53
III.23	2,86	-3,78	-4,87	-4,32	0,49	0,24	4,43	3,22	3,45
III.24	3,32	-4,08	-4,94	-4,51	0,94	0,89	4,54	3,33	3,52
III.25	2,59	-3,99	-4,84	-4,41	0,38	0,14	3,83	3,22	2,68
III.26	3,85	-4,39	-5,30	-4,85	0,67	0,44	4,91	3,44	4,27
III.27	5,32	-5,26	-6,54	-5,90	0,53	0,28	5,88	3,99	7,96
IV.28	3,07	-3,95	-4,13	-4,04	0,29	0,09	4,11	3,22	3,84
IV.29	2,73	-4,37	-4,10	-4,23	0,18	0,03	3,50	3,22	3,06

Табела П–7.2. Вредности *in silico* молекулских дескриптора коришћених за класификацију и QSRR моделовање (наставак)

Јед.	Лип.		ADMET					Геометријски		
	PC	BVB	Caco2	MDCK	SP	NRL	EI	MinPA	MaxPR	LPMaxA
I.1	3,44	2,82	2,37	129,69	-4,52	0,62	0,42	40,73	7,52	6,41
I.2	3,13	2,34	2,70	176,95	-4,56	0,87	0,70	43,47	7,56	6,49
I.3	5,80	9,48	31,20	5,90	-3,27	0,44	0,28	46,61	10,27	7,04
I.4	4,34	0,04	18,17	0,39	-4,45	0,30	0,43	44,86	8,99	7,40
I.5	4,86	0,03	19,29	0,50	-4,38	0,27	0,38	41,24	8,84	8,06
I.6	6,07	0,15	36,01	1,37	-3,64	0,19	0,22	47,88	10,13	8,40
I.7	5,24	0,14	41,33	0,98	-3,50	0,17	0,18	49,27	10,24	8,41
II.8	4,29	0,42	3,70	0,05	-1,01	0,01	0,11	67,90	8,33	3,19
II.9	5,24	0,04	10,80	0,04	-1,00	-0,06	0,07	68,03	9,01	9,29
II.10	6,96	0,20	19,18	0,06	-1,03	-0,11	-0,07	73,84	11,14	10,78
II.11	5,65	0,55	21,30	0,04	-1,12	0,06	0,10	80,68	9,82	9,44
III.12	2,35	0,04	14,89	290,64	-3,28	0,34	0,45	42,82	6,97	8,31
III.13	2,25	0,02	22,84	177,85	-4,03	0,80	0,49	45,47	6,78	8,61
III.14	3,35	0,07	2,82	0,11	-0,99	0,45	0,57	58,12	9,04	8,67
III.15	3,66	0,06	3,25	0,14	-0,86	0,37	0,47	48,41	9,81	7,36
III.16	3,66	0,06	3,25	0,14	-0,86	0,37	0,47	58,39	9,93	7,19
III.17	5,07	0,39	12,95	1,79	-0,79	0,39	0,39	57,33	10,97	9,07
III.18	5,38	0,29	15,02	1,82	-0,77	0,32	0,32	56,31	10,70	8,78
III.19	5,10	0,32	30,42	1,36	-1,28	0,60	0,43	48,27	8,21	7,36
III.20	6,82	3,68	56,32	42,04	-1,06	0,53	0,25	41,15	9,92	7,04
III.21	2,80	0,21	19,46	193,61	-2,32	0,53	0,28	46,01	6,77	8,06
III.22	2,49	0,24	19,81	252,31	-2,10	0,59	0,44	47,24	6,87	8,38
III.23	2,16	0,03	16,59	281,14	-2,85	0,30	0,41	50,60	6,58	8,99
III.24	2,24	0,03	20,16	244,60	-2,07	0,56	0,31	51,47	6,58	8,52
III.25	2,06	0,01	21,15	275,47	-3,71	0,75	0,44	50,14	6,70	9,10
III.26	3,43	0,02	20,95	0,42	-2,06	0,44	0,35	50,30	7,90	7,67
III.27	5,16	0,12	43,62	23,59	-1,59	0,36	0,18	47,88	9,82	7,32
IV.28	2,71	0,32	15,08	291,63	-3,50	0,34	0,53	49,52	7,10	8,02
IV.29	2,61	0,03	29,94	237,24	-4,23	0,80	0,57	49,93	7,28	9,29

Табела П–7.2. Вредности *in silico* молекулских дескриптора коришћених за класификацију и QSRR моделовање (наставак)

Јед.	Геометријски	Физичко-хемијски	Тополошки	Величине молекула
	MMFF94E	FMF	ECSEN	TE
I.1	101,10	0,47	420	34,60
I.2	113,01	0,40	435	53,85
I.3	147,86	0,50	817	41,99
I.4	76,47	0,37	598	52,75
I.5	81,78	0,35	621	55,96
I.6	116,49	0,50	850	37,37
I.7	122,52	0,48	879	46,23
II.8	136,06	0,35	911	41,23
II.9	132,23	0,33	1079	46,23
II.10	169,55	0,43	1377	24,29
II.11	135,01	0,31	1164	53,90
III.12	73,43	0,27	386	43,34
III.13	74,06	0,29	400	92,21
III.14	48,35	0,23	631	59,75
III.15	56,63	0,22	654	67,24
III.16	55,43	0,22	654	63,92
III.17	87,24	0,35	886	38,57
III.18	94,60	0,33	915	47,30
III.19	116,47	0,25	473	58,06
III.20	116,11	0,39	703	30,67
III.21	68,30	0,32	381	25,15
III.22	79,77	0,27	396	50,80
III.23	89,40	0,28	415	42,19
III.24	69,84	0,29	396	40,87
III.25	85,45	0,30	431	87,95
III.26	75,82	0,25	524	54,64
III.27	115,33	0,39	758	32,79
IV.28	73,16	0,35	405	47,70
IV.29	83,27	0,37	419	104,35

БИОГРАФИЈА

Милица Карацић је рођена 1989. године у Новом Саду. Завршила је природно-математички смер у гимназији „Јован Јовановић Змај” у Новом Саду 2008. године. Основне и мастер академске студије на студијском програму Биотехнологија – Биохемијско инжењерство завршила је 2013. године на Технолошком факултету Нови Сад, Универзитета у Новом Саду.

Запослена је на Технолошком факултету Нови Сад у звању истраживач-сарадник. Тренутно је део тима пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја 172025.

Коаутор је 21 научне публикације у области примене хеометријских метода у анализи резултата из домена аналитичке хемије, хроматографије биолошки активних једињења и прехранбеног инжењерства. Поред научног рада, ангажована је и у извођењу наставе на основним студијама на предмету Динамика и контрола биопроцеса.

Била је учесник 3 међународне летње школе, у Марибору 2014. године (инструменталне анализе), Петници 2015. године (хроматографија и масена спектрометрија) и Пизи 2016. године (рачунарски асистирано дизајнирање лекова).

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број:
РБР

Идентификациони број:
ИБР

Тип документације: **Монографска документација**
ТД

Тип записа: **Текстуални штампани материјал**
ТЗ

Врста рада (дипл., маг., докт.): **Докторска дисертација**
ВР

Име и презиме аутора: **Милица Ж. Карацић, маг. инж. технол.**
АУ

Ментор (титула, име, презиме, звање): **Др Лидија Јеврић, ванредни професор**
МН

Наслов рада: **Хроматографска, микробиолошка и *in silico* анализа стероидних једињења од потенцијалног биомедицинског значаја**
НР

Језик публикације: **Српски (ћирилица)**
ЈП

Језик извода: **Српски / енглески**
ЈИ

Земља публикавања: **Република Србија**
ЗП

Уже географско подручје: **АП Војводина**
УГП

Година: **2017.**
ГО

Издавач: **Ауторски репринт**
ИЗ

Место и адреса:
МА Булевар цара Лазара 1, 21000 Нови Сад,
Србија

Физички опис рада:
ФО Број поглавља: 7
Број страна: 155
Литературних цитата: 227
Табела: 31
Слика/графикона: 44

Научна област:
НО Технолошко инжењерство

Научна дисциплина:
НД

Предметна одредница, кључне речи:
ПО Хемометрија, класификација, липофилност, антимикуробна активност, докинг анализа, регресија, стероидни деривати, течна хроматографија, QSRR анализа

УДК 543.544.3:547.92:579.6 (043.3)

Чува се:
ЧУ У библиотеци Технолошког факултета
Нови Сад, Булевар цара Лазара 1, 21000
Нови Сад, Србија

Важна напомена:
ВН -

Извод:
ИЗ

Испитивано је хроматографско понашање (хроматографска липофилност) 29 стероидних једињења (триазола и тетразола, толуенсулфонилхидразида, диона, нитрила и динитрила) од потенцијалног биомедицинског значаја, испитивано је помоћу течне хроматографије високих перформанси на обрнутим фазама, применом две стационарне и две мобилне фазе. Липофилност, изражена преко ретенционог параметра $\log k$, моделована је QSRR приступом. Формирани линеарни и нелинеарни модели омогућили су испитивање односа између ретенционих параметара и *in silico* молекулских дескриптора, који су израчунати на основу структуре испитиваних једињења. Добра предиктивна моћ формираних модела, добијених за калибрациони сет, потврђена је и применом екстерног тест сета и валидационог сета. Предиктивна моћ формираних модела потврђује могућност њиховог коришћења за предвиђање липофилности нових, структурно сличних, једињења. Примењене су и класификационе хемометријске методе (анализа главних компоненти и хијерархијска кластер анализа) како би се уочиле сличности и разлика између једињења. Поред тога, представљена је *in vitro* анализа антимикуробног потенцијала

испитиваних стероидних једињења према *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Два једињења, са епоксидном групом у положају 4,5, испољила су бактериостатски ефекат према *S. aureus*. Такође, приказана је докинг анализа одабраних испитиваних једињења са антипролиферативном активношћу према ћелијама андроген-рецептор негативног канцера простате (AR-нег. РС-3). На основу визуелизације оптималних положаја и анализе постојећих интеракција, идентификовано је једињење са највећим потенцијалом као инхибитор хуманог цитохрома P450 CYP17A1.

Датум прихватања теме од стране **22.12.2016.**

Сената:

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

(име и презиме / титула / звање /
назив организације / статус)

КО

Председник:

**Др Синиша Марков, редовни професор,
Технолошки факултет Нови Сад,
Универзитет у Новом Саду**

Члан – Ментор:

**Др Лидија Јеврић, ванредни професор,
Технолошки факултет Нови Сад,
Универзитет у Новом Саду**

Члан:

**Др Сања Подунавац Кузмановић, редовни
професор, Технолошки факултет Нови
Сад, Универзитет у Новом Саду**

Члан:

**Др Радомир Малабаша, редовни
професор, Технолошки факултет Нови
Сад, Универзитет у Новом Саду**

Члан:

**Др Анамарија Мандић, научни саветник,
Научни институт за прехранбене
технологије у Новом Саду, Универзитет у
Новом Саду**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monographic documentation

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

Doctoral disertation

Author:

AU

MSc Milica Ž. Karadžić

Mentor:

MN

Dr. Lidija Jevrić, associate proffesor

Title:

TI

Chromatographic, microbiological and in silico analysis of steroid compounds with potential biomedical importance

Language of text:

LT

Serbian (cyrilic)

Language of abstract:

LA

Serbian / English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:

LP

AP Vojvodina

Publication year:

PY

2017.

Publisher:

PU

Author's reprint

Publication place: PP	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Physical description: PD	Chapters: 7 Pages: 155 References: 227 Tables: 31 Figures/Graphs: 44
Scientific field SF	Technology Engineering
Scientific discipline SD	
Subject, Key words SKW	Chemometrics, classification, lipophilicity, antimicrobial activity, docking analysis, regression, steroid derivatives, liquid chromatography, QSRR analysis
UDC	543.544.3:547.92:579.6 (043.3)
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	-
Abstract: AB	

Chromatographic behavior (chromatographic lipophilicity) of 29 steroid compounds (triazole and tetrazole, toluenesulfonylhydrazide, dione, dinitrile and nitrile) with potential biomedical importance was investigated by reversed-phases high-performance liquid chromatography using two stationary and two mobile phases. The lipophilicity expressed through the retention parameter $\log k$ was modeled using QSRR approach. Formed linear and non-linear models enabled the study of the relationship between the retention parameters and *in silico* molecular descriptors calculated from the structure of the investigated compounds. Good predictive power of the established models obtained for the calibration set was confirmed by the application of an external test set and validation set. The predictive power of the established model confirms the possibility of their use for lipophilicity prediction of new, structurally similar compounds. The classification chemometric methods (principal components analysis and hierarchical cluster analysis) were applied in order to recognize the similarities and differences between the compounds. This dissertation presents the *in vitro* analysis of the antimicrobial potentials of the investigated steroid compounds against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

Two compounds, with epoxy group in the position 4,5, exhibited bacteriostatic effect against *S. aureus*. The docking analysis of selected test compounds with antiproliferative activity toward cells of androgen receptor-negative prostate cancer (AR-neg. PC-3) is showed. Based on the optimal position visualization and analysis of existing interactions a compound with the most promising potential as human cytochrome P450 CYP17A1 inhibitor is identified.

Accepted on Senate on:
AS

22nd December 2016

Defended:
DE

Thesis Defend Board:
DB

President:

Dr. Siniša Markov, full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

Member – Mentor:

Dr. Lidija Jevrić, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

Member:

Dr. Sanja Podunavac Kuzmanović, full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

Member:

Dr. Radomir Malbaša, full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

Member:

Dr. Anamarija Mandić, principal research fellow, Institute of Food Technology, University of Novi Sad