

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Žarko P. Gagić

**ODREĐIVANJE STRUKTURE FARMAKOFORE,
DIZAJN, SINTEZA I ISPITIVANJE
ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI DERIVATA
 α -TOKOFEROLA I γ -TOKOTRIENOLA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Žarko P. Gagić

**PHARMACOPHORE STRUCTURE
DETERMINATION, DESIGN, SYNTHESIS AND
ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF
 α -TOCOPHEROL AND γ -TOCOTRIENOL
DERIVATIVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR

Dr sc. Katarina Nikolić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr sc. Branka Ivković, docent, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr. sc. Tatjana Srdić-Rajić, viši naučni saradnik,
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru naučnoistraživačkog projekta „Sinteza, kvantitativni odnosi između strukture i dejstva, fizičko-hemijska karakterizacija i analiza farmakološki aktivnih supstanci“ čiji je rukovodilac prof. dr Danica Agbaba.

Želim da se zahvalim svom mentoru dr. sci. Katarini Nikolić, koja mi je pomogla u svim segmentima izrade doktorske disertacije, na posvećenom vremenu, velikoj količini prenesenog znanja, izuzetnoj organizovanosti, ali i na razumevanju, ohrabrenjima i srdačnosti.

Ogromnu zahvalnost dugujem prof. dr Danici Agbabi koja me je zajedno sa mentorom vodila kroz ovu doktorsku disertaciju i bila velika podrška.

Hvala mojoj dragoj dr sc. Branki Ivković što mi je pružila nesebičnu pomoć u eksperimentalnom radu, naučila dragocnim laboratorijskim tehnikama, ostajala do kasno da mi pomogne, nosila uzorke na NMR analizu, terala me da jedem, bila velika moralna podrška i dobar drug.

Hvala dr. sc Tatjani Srdić-Rajić na izuzetnoj saradnji u toku in vitro ispitivanja na ćelijskim linijama i na pomoći u tumačenju dobijenih rezultata.

Hvala prof. dr Soteu Vladimirovu na korisnim savetima i podršci, dr sc. Bojanu Markoviću na pomoći u masenoj analizi, kao i kompletnom osoblju Instituta za farmaceutsku hemiju na uvek srdačnom dočeku i gostoprimstvu.

Hvala dr sc. Milošu Petkoviću na svesrdnoj pomoći u NMR analizi i tumačenju spektara kao i na korisnim savetima iz organske sinteze.

Hvala Jelici Vučićević, Vladimiru Dobričiću, Dušanu Ružiću i Mariji Popović na pomoći i lepom druženju.

Hvala mojim prijateljima Sanji, Nati, Marini, Anđi i Ireni, svim kolegama sa Farmacije i Bilji Tubić, što su uvek tu za mene.

Hvala mojim najbližima, porodici i rodbini, na bezuslovnoj ljubavi. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem majci.

ODREĐIVANJE STRUKTURE FARMAKOFORE, DIZAJN, SINTEZA I ISPITIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI DERIVATA α -TOKOFEROLA I γ -TOKOTRIENOLA

REZIME

Vitamin E je generičko ime koje obuhvata dve klase jedinjenja, tokoferole i tokotrienole, od kojih svaka klasa sadrži 4 izomera (α , β , γ , δ). Analози vitamina E putem različitih mehanizama mogu ispoljiti snažnu citotoksičnu aktivnost na više tipova tumorskih ćelija, a da pritom ne remete u velikoj meri aktivnost zdravih ćelija.

Ovu doktorsku disertaciju čine tri celine čiji će rezultati imati potencijalni značaj za primenu derivata vitamina E u terapiji malignih bolesti.

Prva celina obuhvata studije kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (*Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) derivata vitamina E i određivanje strukture farmakofore.

U drugoj celini opisani su: (1) sinteza estara α -tokoferola sa aminokiselinama lizinom, prolinom, glutaminom, asparaginom i estara γ -tokotrienola sa lizinom, prolinom, glutaminom; (2) *in vitro* ispitivanja biološke aktivnosti sintetisanih estara na MCF-7 i MDA-MB 231 ćelijskim linijama tumora dojke, A549 ćelijskoj liniji tumora pluća i MRC-5 zdravoj ćelijskoj liniji fetalnih fibroblasta pluća; (3) ispitivanje ćelijskih mehanizama antiproliferativne aktivnosti i sinergističkog efekta najaktivnijeg sintetisanog jedinjenja sa doksorubicinom na multirezistentnoj MDA-MB 231 ćelijskoj liniji; (4) studije stabilnosti u humanoј plazmi; (5) pretraživanje ChEMBL baze bioaktivnih molekula primenom metode virtelnog skrininga zasnovanog na strukturi liganda.

Treću celinu predstavlja dizajn novih analoga vitamina E sa potencijalno snažnijim antitumorskim dejstvom.

2D-QSAR i 3D-QSAR modeli su formirani upotrebom PLS statističke metode na datasetu formiranom od derivata vitamina E sa eksperimentalno određenom antitumorskom aktivnošću na MCF-7 ćelijskoj liniji. Sve molekulske strukture su prethodno optimizovane upotrebom PM3 (*Parametric Method 3*) i Hartree-Fock/3-21G metode. Statistički parametri: $R^2=0,798$; $Q^2=0,772$; $R^2_{pred}=0,685$ (2D-QSAR) i $R^2=0,960$; $Q^2=0,830$; $R^2_{pred}=0,649$ (3D-QSAR), kao i dodatni parametri eksterne validacije, su potvrdili pouzdanost i dobru moć predviđanja oba modela.

Rezultati 2D-QSAR studije su pokazali da esterifikacija fenolne grupe sa kiselinama koje poseduju minimalno jedan jonizujući centar (kao što su aminokiseline) dovodi do povećanja antitumorske aktivnosti.

3D-struktura farmakofore najaktivnijih jedinjenja uključuje prisustvo dva akceptora vodoničnih veza predstavljena sa dva karbonilna kiseonika na optimalnom rastojanju, prisustvo hidrofobnog regiona, akceptora i donora vodonične veze u estarskom lancu na položaju C6 dihidrohromanskog prstena.

Estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa aminokiselinama su sintetisani u dve faze. U prvoj fazi sintetisani su estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa Cbz (benziloksikarbonil) zaštićenim aminokiselinama. U drugoj fazi, zaštitne Cbz grupe su uklonjene katalitičkom hidrogenacijom. Sintetisana jedinjenja prečišćena su kolonskom i preparativnom tankoslojnom hromatografijom, a strukture i stepen čistoće potvrđeni su spektroskopskim metodama.

In vitro antitumorska aktivnost sintetisanih estara na malignim ćelijskim linijama je ispitana upotrebom MTT metode. Estar γ -tokotrienola sa lizinom je pokazao antitumorsku aktivnost na sve tri ispitivane ćelijske linije sa IC_{50} vrednostima 20,6 μ M (MCF-7), 28,6 μ M (MDA-MB-231) i 19 μ M (A549). Estar α -tokoferola sa lizinom je pokazao citotoksičnost na MCF7 ($IC_{50}=8,6$ μ M) i A549 ($IC_{50}=8,6$ μ M) ćelijama. Na multirezistentnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji tumora dojke najaču aktivnost je pokazao estar α -tokoferil asparagin nitril ($IC_{50}=9,2$ μ M) koji je indukovao apoptozu i inhibiciju ćelijskog ciklusa MDA-MB-231 ćelija i pokazao sinergistički efekat sa doksorubicinom.

Studija stabilnosti u humanoj plazmi pokazala je da se nakon 6 sati primene koncentracija α -tokoferil asparagin estra u plazmi smanjila na oko 83 % od početne koncentracije, odnosno na 39 % nakon 24 sata, ukazujući na prihvatljivu metaboličku stabilnost.

Virtuelni skrining biblioteke bioaktivnih jedinjenja je identifikovao 10 jedinjenja sa visokim potencijalom za ispoljavanje antitumorske aktivnosti na MCF7 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama.

Integrisanjem informacija o strukturnim karakteristikama bitnim za antitumorsku aktivnost dobijenih iz 2D- i 3D-QSAR studija, dizajnirani su novi aktivniji analozi vitamina E.

Vrednosti *in silico* izračunatih ADMET parametara (MWt, MlogP, PrUnbnd, HBD, HBA, RuleOf5, CYP_Risk, TOX_hERG, TOX_Risk) dizajniranih jedinjenja su upotrebljene za finalni odabir i predlaganje najboljih jedinjenja za buduću sintezu i ispitivanje na ćelijama tumora dojke.

Ključne reči: estri vitamina E, sinteza, aminokiseline, tumor, antitumorska aktivnost, virtuelni skrining, QSAR, farmakofora, dizajn lekova

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 615.07:577.161.3(043.3)

PHARMACOPHORE STRUCTURE DETERMINATION, DESIGN, SYNTHESIS AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF α - TOCOPHEROL AND γ -TOCOTRIENOL DERIVATIVES

ABSTRACT

Vitamin E is a generic name comprising of two classes of compounds, tocopherols and tocotrienols, each class containing 4 isomers (α , β , γ , δ). Analogs of vitamin E, via different mechanisms, may exhibit strong cytotoxic activity to many types of malignant cells, while not disrupting in a greater extent activity of healthy cells.

This doctoral thesis includes three sections whose results will have potential importance for the use of vitamin E derivatives in the treatment of malignant diseases.

The first section includes Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) study of vitamin E analogues and pharmacophore structure determination.

The second section covers: (1) synthesis of α -tocopherol esters with amino acids lysine, proline, glutamine, asparagine, and γ -tocotrienol esters with lysine, proline, glutamine; (2) *in vitro* testing of biological activities of the synthesized esters on the MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cell lines, A549 lung cancer cell line, and the MRC-5 healthy fetal lung fibroblasts cell line; (3) testing of cellular mechanisms which underlie the antiproliferative activity and synergistic effect of the most active compound with doxorubicin on multidrug-resistant MDA-MB 231 cell line; (4) stability study in human plasma; (5) filtering of the ChEMBL database of bioactive molecules using the ligand based virtual screening protocol.

The third section represents design of new analogues of vitamin E with enhanced antitumor activity.

2D- and 3D-QSAR studies were conducted on a series of vitamin E analogues with experimentally determined antiproliferative activity on MCF7 cell line, using PLS

statistical method. All molecular structures were previously optimized by use of PM3 (*Parametric Method 3*) and Hartree-Fock/3-21G methods. Statistical parameters: $R^2=0,798$; $Q^2=0,772$; $R^2_{pred}=0,685$ (2D-QSAR) i $R^2=0,960$; $Q^2=0,830$; $R^2_{pred}=0,649$ (3D-QSAR), as well as additional parameters for external validation, indicated on good predictive ability and reliability of both models.

The 2D-QSAR studies results have shown that the esterification of the phenolic group with acids having at least one ionizable center (such as amino acids) lead to an increase of antitumor activity.

3D-pharmacophore structure of most active compounds includes presence of two hydrogen bond acceptor groups, represented by two carbonyl oxygens at optimal distance, presence of the hydrophobic region, hydrogen bond donor and hydrogen bond acceptor group in the ester chain at C6 position of dihydrochromane ring.

Amino acid esters of α -tocopherol and γ -tocotrienol were synthesized in two steps. In the first step, esters of α -tocopherol and γ -tocotrienol with Cbz (benzyloxycarbonyl)-protected amino acids were prepared. In the second stage, protective Cbz groups were removed by catalytic hydrogenation. Synthesized compounds were purified by column and preparative thin layer chromatography and chemical structures and purity were confirmed by spectroscopic methods.

In vitro antitumor activity of synthesized esters was evaluated on cancer cell lines using the MTT method. Ester of γ -tocotrienol with lysine showed an activity against all three cell lines (IC_{50} : 20,6 μ M; 28,6 μ M and 19 μ M for the MCF7, MDA-MB-231 and A549 cells, respectively), while α -tocopheryl lysine ester showed cytotoxic effect on MCF-7 ($IC_{50}=8,6$ μ M) and A549 cells ($IC_{50}=8,6$ μ M). Ester α -tocopheryl asparagine nitrile, exerted strong antiproliferative activity against the estrogen unresponsive, multi-drug resistant MDA-MB-231 breast cancer cell line ($IC_{50}=9,2$ μ M) and led to apoptosis and cell cycle inhibition of MDA-MB-231 cells, thereby exerting a synergistic effect with doxorubicin.

Stability study in human plasma showed that concentration of α -tocopheryl asparagine ester decreased to about 83% of the initial concentration, within the 6 hours

incubation. After 24 h, 39% of the initial concentration was determined in plasma, indicating on acceptable metabolic stability.

The ligand based virtual screening of the chemicals library identified 10 compounds with high potential for exerting activity on MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cells.

By integrating information obtained from 2D and 3D-QSAR studies about the structural features that are important for antitumor activity, new more active analogues of vitamin E were designed.

In silico ADMET properties (MWt, MlogP, PrUnbnd, HBD, HBA, RuleOf5, CYP_Risk, TOX_hERG, TOX_Risk) of designed compounds were used for the final selection and the most promising candidates were proposed for further synthesis and biological studies.

Keywords: esters of vitamin E, synthesis, amino acids, cancer, antitumor activity, virtual screening, QSAR, pharmacophore, drug design

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDK number: 615.07:577.161.3(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. VITAMIN E: OTKRIĆE, HEMIJA, METABOLIZAM I BIOLOŠKA ULOGA	2
1.2. ANTITUMORSKA AKTIVNOST PRIRODNIH IZOMERA VITAMINA E...	6
1.2.1. Antitumorska aktivnost tokoferola	6
1.2.2. Antitumorska aktivnost tokotrienola	9
1.3. POLUSINTETSKI ANALOZI VITAMINA E	11
1.3.1. Odnos strukture i aktivnosti analoga vitamina E (<i>Structure Activity Relationship, SAR</i>).....	11
1.3.2. Derivati nastali modifikacijom funkcionalne oblasti.....	12
1.3.3. Uticaj signalne oblasti na aktivnost derivata vitamina E.....	16
1.3.4. Derivati vitamina E nastali modifikacijom hidrofobne oblasti	17
1.4. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DEJSTVA VITAMINA E I ANALOGA .	19
1.4.1. Apoptoza.....	19
1.4.2. Inhibicija ćelijskog ciklusa	21
1.4.3. Inhibicija biosinteze holesterola	23
1.4.4. Inhibicija angiogeneze	23
1.5. KOMPJUTERSKE METODE U DIZAJNU LEKOVA	25
1.5.1. Molekulsko-mehaničke metode.....	25
1.5.2. Kvantno-mehaničke metode	26
1.6. STUDIJE KVANTITATIVNOG ODNOSA STRUKTURE I DEJSTVA (QSAR).....	28
1.6.1. Priprema podataka za QSAR studiju	30
1.6.2. Formiranje QSAR modela – metode statističke analize	32
1.6.3. Validacija modela	34
1.6.4. QSAR studije derivata vitamina E.....	38
1.7. VIRTUELNI SKRINING	39

2. CILJ RADA.....	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO	44
3.1. QSAR STUDIJE DERIVATA VITAMINA E.....	45
3.1.1. Kompjuterski programi.....	45
3.1.2. Dataset	45
3.1.3. Izračunavanje molekulskih deskriptora	46
3.1.4. 2D-QSAR	46
3.1.5. 3D QSAR.....	47
3.1.6. Validacija QSAR modela	48
3.2. SINTEZA ESTARA α -TOKOFEROLA I γ -TOKOTRIENOLA	54
3.2.1. Reagensi i rastvarači	54
3.2.2. Oprema	55
3.2.3. Hromatografski sistem.....	56
3.2.4. Priprema rastvora hlorovodonične kiseline u suvom dietil etru	57
3.2.5. Sinteza estara α -tokoferola	57
3.2.6. Sinteza estara γ -tokotrienola.....	59
3.3. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI I MEHANIZMA DEJSTVA SINTETISANIH ESTARA	62
3.3.1. Reagensi i rastvarači	62
3.3.2. Oprema	63
3.3.3. Čelijske linije.....	63
3.3.4. Uslovi gajenja čelijskih linija	64
3.3.5. MTT-test.....	64
3.3.6. Citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	66
3.3.7. Citometrijska analiza apoptoze ćelija	66
3.4. STUDIJE STABILNOSTI U HUMANOJ PLAZMI	67
3.4.1. Reagensi i rastvarači	67
3.4.2. Oprema	67
3.4.3. Priprema osnovnog rastvora ispitivanog jedinjenja (1 mg/ml)	68

3.4.4.	Postupak ispitivanja stabilnosti u plazmi.....	68
3.5.	VIRTUELNI SKRINING.....	69
3.5.1.	Kompjuterski programi.....	69
3.5.2.	Priprema baze podataka.....	69
3.5.3.	Procedura za virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda.....	70
3.5.4.	Validacija LBVS modela.....	71
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	72
4.1.	QSAR STUDIJE DERIVATA VITAMINA E.....	73
4.1.1.	Dataset	73
4.1.2.	2D-QSAR	77
4.1.3.	3D-QSAR	84
4.2.	SINTEZA I FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ESTARA α - TOKOFEROLA I γ -TOKOTRIENOLA	92
4.2.1.	Sinteza estara α -tokoferola i γ -tokotrienola upotrebom EDC/DMAP uslova reakcije.....	92
4.2.2.	Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih estara i njihovih intermedijera	96
4.3.	<i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI I MEHANIZMA DEJSTVA SINTETISANIH ESTARA	102
4.3.1.	Uticaj sintetisanih estara α -tokoferola i γ -tokotrienola na preživljavanje tumorskih ćelija	102
4.3.2.	Uticaj α -tokoferil asparagin estra na distribuciju MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.....	106
4.3.3.	Uticaj α -tokoferil asparagin estra na apoptozu MDA-MB-231 ćelija.....	108
4.3.4.	Stabilnost α -tokoferil asparagina u humanoj plazmi	110
4.4.	VIRTUELNI SKRINING ZASNOVAN NA STRUKTURI LIGANDA	112
4.5.	DIZAJNIRANJE NOVIH JEDINJENJA	115

5. ZAKLJUČAK.....	120
6. LITERATURA.....	125
7. PRILOZI	148

LISTA SKRAĆENICA

AD	<i>Apliccability Domain</i> (domen primenjivosti)
ADMET	apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost
ANN	eng. <i>Artificial Neural Networks</i> (veštačke neuronske mreže)
	eng. <i>Attenuated total reflection- Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
ATR-FTIR	(refleksiona infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom)
AUC	eng. <i>Area Under the Curve</i> (Površina ispod ROC krive)
Cbz	benziloksikarbonil grupa
CEHC	2-karboksietil-6-hidroksihroman
CLACC	eng. <i>Consistently Large Auto and Cross Correlation</i> (statistički metod ukrštene i auto-korelacije)
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DCM	dihlormetan
DFT	eng. <i>Density Functional Theory</i> (teorija funkcionala gustine)
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilpiridin-4-amin
DMSO	dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
eNOS	eng. <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i> (endotelna azot monoksid sintetaza)
FCS	serum fetusa govečeta
FFD	frakcijski faktorijalni dizajn
FITC	fluorescein izotiocijanat
FLICE	eng. <i>Fas-associated death domain-Like Interleukin 1beta-Converting Enzyme</i> (sinonim za kaspazu 8)
FLIP	eng. <i>FLICE-inhibitory protein</i> (protein koji inhibira aktivaciju kaspaze 8)
GRIND	eng. <i>GRid-INdependent Descriptors</i> (deskriptori nezavisni od načina superimpozicije molekulskih struktura)
GTO	eng. <i>Gaussian Type Orbital</i> (Gaussian orbitale)

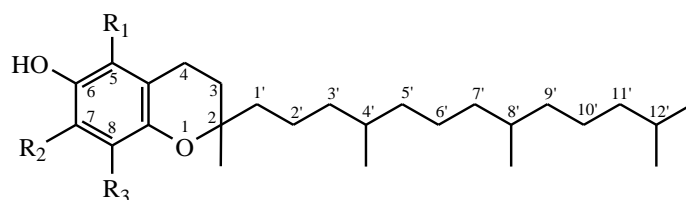
HER2	eng. <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> (receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2)
HF	eng. <i>Hartree-Fock</i> (<i>ab initio</i> kvantno-mehanička metoda)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A
HPLC	eng. <i>High-performance liquid chromatography</i> (tečna hromatografija pod visokim pritiskom)
IC ₅₀	polovina maksimalne inhibitorne koncentracije
LBVS	eng. <i>Ligand-Based Virtual Screening</i> (virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda)
LOO-CV	eng. <i>Leave-One-Out Cross Validation</i> (metoda ukrštene validacije)
LV	latentna varijabla
MIF	eng. <i>Molecular Interaction Field</i> (molekulsko polje interakcija)
MLR	eng. <i>Multiple Linear Regression</i> (multipla linearna regresija)
MS-TOF	masena spektroskopija preciznih masa
MTT	3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-terazolijum bromid
NF-κB	eng. <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (proteinski kompleks koji kontroliše transkripciju DNK i učestvuje u procesu apoptoze)
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
OECD	eng. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj)
PDB	eng. <i>Protein Data Bank</i> (elektronska baza trodimenzionalnih struktura velikih bioloških molekula, kao što su proteini i nukleinske kiseline)
PDK	eng. <i>Phosphoinositide-Dependent protein Kinase</i> (fosfoinozimid-zavisna protein kinaza)
PI	propidijum jodid
PKC	protein kinaza C
PLS	eng. <i>Partial Least Square Regression</i> (metoda parcijalnih najmanjih kvadrata)
PPAR γ	peroksizom proliferator-aktivirani γ receptor

PRESS	eng. <i>Predicted Residual Sum of Squares</i> (predviđena rezidualna suma kvadrata)
PV	pufer za vezivanje
QSAR	eng. <i>Quantitative Structure Activity Relationship</i> (kvantitativni odnos strukture i aktivnosti)
RDA	eng. <i>Recommended Daily Amount</i> (preporučena dnevna doza)
RMSEE	<i>Root Mean Square Error of Estimation</i> (srednja kvadratna greška procene)
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> (srednja kvadratna greška predviđanja)
ROS	eng. <i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktivne vrste kiseonika)
SBVS	eng. <i>Structure-Based Virtual Screening</i> (virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mesta)
SDS	Natrijum dodecil sulfat
STO	eng. <i>Slater Type Orbital</i> (vodonikov tip orbitala)
T	tokoferol
T3	tokotrienol
THF	tetrahidrofuran
TLC	eng. <i>Thin layer chromatography</i> (hromatografija na tankom sloju)
TNF	eng. <i>Tumor necrosis factor</i> (receptori za faktor nekroze tumora)
TRF	eng. <i>Tocotrienol Rich Fraction</i> (tokotrienolom bogata frakcija palminog ulja)
VEGF	eng. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (vaskularni endotelni faktor rasta)
VIP	eng. <i>Variable Importance in the Projection</i> (značaj varijable u projekciji)
VS	virtuelni skrining
α -TTP	α -tokoferol transportujući protein
γ -TmT	γ -tokoferolom bogata smeša tokoferola

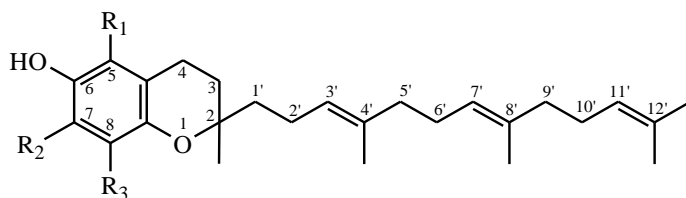
1. UVOD

1.1. VITAMIN E: OTKRIĆE, HEMIJA, METABOLIZAM I BIOLOŠKA ULOGA

Vitamin E (VE) je liposolubilni vitamin koji su 1922. godine otkrili naučnici Herbert Evans i Katherine Bishop i opisali ga kao „supstancu X“ ključnu za održavanje fertiliteta kod miševa.¹ Slične rezultate potvrdio je i Sure 1924. godine koji je supstancu nazvao vitamin E, budući da su do tada bili poznati vitamini A, B, C i D. Kada je izolovan 1936. godine nazvan je tokoferol, od grčkih reči tocos (rođenje deteta) i feroin (nositi)², a dve godine kasnije je prvi put sintetisan.



$R_1=R_2=R_3=CH_3$	α -tokoferol
$R_1=R_3=CH_3, R_2=H$	β -tokoferol
$R_2=R_3=CH_3, R_1=H$	γ -tokoferol
$R_1=R_2=H, R_3=CH_3$	δ -tokoferol



$R_1=R_2=R_3=CH_3$	α -tokotrienol
$R_1=R_3=CH_3, R_2=H$	β -tokotrienol
$R_2=R_3=CH_3, R_1=H$	γ -tokotrienol
$R_1=R_2=H, R_3=CH_3$	δ -tokotrienol

Slika 1. Izomeri vitamina E.

Danas se pod pojmom vitamina E podrazumevaju dve klase jedinjenja, tokoferoli (T) i tokotrienoli (T3), koje karakteriše 2,3-dihidrohromanski prsten i ugljovodonični lanac od 13 ugljenikovih atoma na položaju C-2 (fitil ostatak).³ Tokoferoli poseduju zasićen ugljovodonični lanac dok tokotrienoli imaju nezasićen fitil ostatak sa tri dvostruke veze u položajima 3', 7' i 11'. Svaka klasa je sačinjena od 4

izomera koji su označeni kao alfa (α), beta (β), gama (γ) ili delta (δ), u zavisnosti od broja i rasporeda metil grupa vezanih za hromanski deo molekula (Slika 1).

Vitamini E su narandžasta viskozna ulja nerastvorljiva u vodi, a rastvorljiva u alkoholu i organskim rastvaračima. Stajanjem na vazduhu polako se oksiduju do odgovarajućih *para*-hinona. U prirodi su dominantno zastupljeni u biljkama, dok ih ima malo u namirnicama životinjskog porekla. Tokoferoli se dominantno nalaze u maslinama, suncokretovom, kukuruzovom i sojinom ulju, dok su tokotrienoli prisutni u palminom ulju, ječmu i rižinim mekinjama.⁴

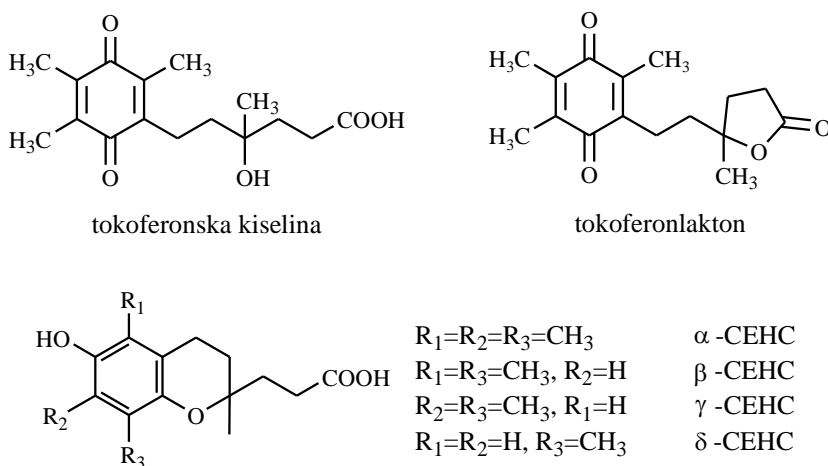
Tokoferoli poseduju 3 hiralna centra na položajima C-2, C-4' i C-8'(Slika 1), što omogućava postojanje osam stereoizomera. Prirodni α -tokoferol ima *RRR*-konfiguraciju na položajima 2, 4' i 8', dok sintetski *all-rac*- α -tokoferol predstavlja racemsku smešu svih 8 stereoizomera. Iako svi stereoizomeri ispoljavaju jednaku antioksidativnu aktivnost *in vitro*, kod čoveka samo izomeri sa *2R* konfiguracijom ispoljavaju vitaminsku aktivnost.⁵ Tokotrienoli poseduju samo jedan hiralan centar na C-2 (Slika 1) i u prirodi se javljaju u *2R*, *3'E*, *7'E* konfiguraciji.

Osnovna biološka funkcija vitamina E je sprečavanje peroksidacije fosfolipida koji su sastavni deo ćelijskih membrana.⁶ Zbog svoje sposobnosti da prenose fenolni vodonik na peroksidni radikal tokoferoli i tokotrienoli predstavljaju naj snažnije prirodne lipidne antioksidanse. Nakon reakcije sa peroksil radikalom formira se hromanoksil radikal, koji zahvaljujući svojoj stabilnosti prekida lančanu reakciju peroksidacije nezasićenih masnih kiselina. Hidrosolubilni antioksidansi kao što je vitamin C su sposobni da redukuju hromanoksil radikal i regenerišu vitamin E.⁷

Vitamin E se koncentriše u membranama eritrocita i ćelija respiratornog trakta, kao i u drugim lipidnim regijama koje su izložene velikom parcijalnom pritisku kiseonika, štiteći ih od oksidacije. Efikasnost ovakve zaštite zavisi od dva faktora: (i) mobilnosti molekule u membranama na koju utiče alifatični lanac, (ii) broja metil grupa na hromanskom prstenu pri čemu svaka metil grupa, zahvaljujući elektron-donorskim karakteristikama, doprinosi dodatno antioksidativnoj aktivnosti molekule. Zbog bolje distribucije u ćelijskim membranama, bolje interakcije hromanskog prstena sa lipidnim radikalima i bolje sposobnosti regeneracije iz hromanoksil radikala, tokotrienoli

generalno ispoljavaju jači antioksidativni potencijal od tokoferola.^{8,9} Komparativna *in vitro* studija je pokazala da su od svih izomera vitamina E, γ - i δ -tokotrienol najefikasniji inaktivatori peroksil radikala, čak 4 puta aktivniji od α - i β -tokotrienola.¹⁰

Kao i ostala lipofilna jedinjenja, tokoferoli i tokotrienoli se apsorbuju iz tankog creva u prisustvu žuči i u vidu hilomikrona transportuju do jetre. U jetri se vezuju za α -tokoferol transportujući protein (α -TTP) preko kojeg dospevaju u cirkulaciju i dalje prenose do raznih tkiva. α -TTP je selektivan isključivo za 2R izomere tokoferola. Afinitet pojedinačnih formi VE za α -TTP je ključan za njihovo zadržavanje u organizmu i biološku aktivnost. Eksperimentalno određeni relativni afiniteti α -TTP za pojedinačne oblike iznose 100% za α -T, 38% za β -T, 9% za γ -T, 2% za δ -T i 12% za γ -T3.¹¹ Prema tome, α -T predstavlja daleko najzastupljeniji oblik vitamina E u ljudskom organizmu dok se ostale izoforme brzo metabolišu u jetri od strane citohrom P450 enzima i izlučuju putem urina u vidu glukuronida i sulfata 2-karboksietil-6-hidroksihromana (*2-CarboxyEthyl-6-HydroxyChroman*, CEHC) (Slika 2) kao hidrosolubilnih metabolita.^{12,13} Prvi izolovani metaboliti nastali oksidacijom α -T u *in vitro* uslovima su derivati α -tokohinona, tokoferonska kiselina i njen lakton.¹⁴



Slika 2. Metaboliti vitamina E.

Pokazano je i da α -T u organizmu podleže fosforilaciji, pri čemu nastaje α -tokoferil fosfat (α -TP) koji nema antioksidativnu funkciju ali ispoljava druge biološke aktivnosti.^{15,16}

Preporučena dnevna doza (*Recommended Daily Amount*, RDA) vitamina E varira između 3 i 15 mg u različitim zemljama i u zavisnosti od starosti.¹⁷ Nedostatak vitamina E se retko javlja kod ljudi, budući da se unosi u organizam preko velikog broja namirnica i ima sposobnost deponovanja.¹⁸ Uglavnom se javlja kod osoba sa poremećenom gastrointestinalnom funkcijom, genetski naslednom mutacijom α -TTP-a i prevremeno rođenih beba. Kod životinja se manifestuje pojavom abortusa i degeneracijom germinativnog epitela dok je kod ljudi dominantna hemolitička anemija (posledica skraćenog života eritrocita sa fragilnim membranama), retinopatija, ataksija i mišićna slabost sa kreatinurijom.^{18,19}

Pored antioksidativnog dejstva vitamin E deluje i na kardiovaskularni sistem. Tokoferoli inhibiraju agregaciju trombocita putem inhibicije protein kinaze c (PKC)²⁰ pri čemu je pokazano da je smeša tokoferola efektivnija u odnosu na čisti α -tokoferol.²¹ Gama-tokoferol povećava nivo azot monoksida koji izaziva dilataciju krvnih sudova.²² Tokotrienoli u životinjskim ćelijama inhibiraju biosintezu holesterola blokadom 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaze (HMG-CoA), ključnog enzima u putu biosinteze sterola, što dovodi do smanjene produkcije holesterola u ćelijama jetre i smanjenja rizika od ateroskleroze.^{23,24} Iako je petpostavljeno da bi na osnovu ovih efekata suplementacija vitaminom E bila efikasna u prevenciji kardiovaskularnih bolesti kao što je infarkt miokarda, randomizirane, placebo-kontrolisane studije to nisu pokazale.²⁵

Postoji veliki broj studija koje ukazuju na višestruku biološku aktivnost pojedinačnih formi vitamina E koja ne zavisi od njihove antioksidativne aktivnosti, kao što je antiinflamatorna²⁶⁻³⁰, fotoprotektivna³¹⁻³³, imunomodulatorna³⁴⁻³⁶ i neuroprotektivna³⁷⁻⁴⁰ aktivnost.

Danas se posebna pažnja posvećuje upotrebi vitamina E i njegovih derivata u prevenciji i terapiji malignih oboljenja. Specifične forme vitamina E ispoljavaju snažnu apoptotsku aktivnost protiv različitih tipova tumorskih ćelija, dok ne deluju, ili u maloj meri deluju, na aktivnost zdravih ćelija.^{41,42}

1.2. ANTITUMORSKA AKTIVNOST PRIRODNIH IZOMERA VITAMINA E

Na hemoprotektivne karakteristike vitamina E se prvi put posumnjalo kada je studijama pokazano da ljudi iz Mediteranske oblasti, koji konzumiraju namirnice bogate izoformama vitamina E, imaju manji rizik od nastanka tumora debelog creva u odnosu na stanovnike Severne Evrope ili Sjedinjenih Američkih Država.⁴³ U prospektivnoj studiji sprovedenoj na 2974 muškaraca u periodu 1971 do 1973. godine merena je koncentracija vitamina C, E, retinola i karotena. Nakon 17 godina ocenjen je vitalni status ispitanika, pri čemu su niski nivoi vitamina E u plazmi dovedeni u vezu sa povećanim rizikom od tumora pluća i prostate.⁴⁴ Nakon ovih otkrića pa sve do danas sproveden je veliki broj studija u kojima je ispitivana antitumorska aktivnost vitamina E na različitim tipovima malignih ćelija.

1.2.1. Antitumorska aktivnost tokoferola

Prirodni tokoferoli imaju različitu distribuciju u tkivima pri čemu α -T, zbog najvećeg afiniteta za α -TTP, predstavlja daleko najzastupljeniji oblik vitamina E u ljudskom organizmu kao i u vitaminskim suplementima.⁴⁵ Zbog toga je α -T, odnosno njegovi analozi, najčešće ispitivan izomer u studijama prevencije tumora. Međutim, i pored snažnog antioksidativnog dejstva, literaturni podaci ukazuju da sam prirodni α -T nije jak induktor apoptoze, ali može da ispolji antiproliferativni efekat putem inhibicije ćelijskog ciklusa.⁴⁶

Campbell i saradnici nakon tretiranja SW480, HCT-15, HCT-116 i HT-29 kancerskih ćelija debelog creva α -tokoferolom nisu uočili da dolazi do ćelijske smrti, za razliku od γ -T, koji je u značajnoj meri indukovao apoptozu.⁴⁷ Analiza pet prospektivnih studija je pokazala da je visok nivo α -T u serumu povezan sa neznatnim smanjenjem incidence kolorektalnog tumora.⁴⁸

Najzastupljeniji dijetarni oblik vitamina E u SAD, γ -T, je sam a naročito u kombinaciji sa δ -T indukovao apoptozu u androgen-osetljivim humanim LNCaP

ćelijama tumora prostate, dok α -T nije imao isti efekat.⁴⁹ Regulacijom peroksizom proliferator-aktiviranih γ receptora (PPAR γ) γ -T je indukovao sprečavanje rasta i u androgen-rezistentnim humanim PC3 tumorskim ćelijama prostate i A549 ćelijama tumora pluća.^{50,51}

Od svih izomera tokoferola, samo je δ -T ispoljio antiproliferativnu aktivnost na humanim MCF7 i MDA-MB-435 ćelijama tumora dojke.⁵² Kasnija studija je pokazala da i γ -T ispoljava antitumorsku aktivnost na ovim ćelijskim linijama indukujući njihovu apoptozu.⁵³ U studiji koju su sprovedli Yu i saradnici ispitana je antitumorska aktivnost prirodnog α -T i γ -T, sintetskog *all-rac*- α -T kao i etarski povezanog acetatnog analoga α -tokoferola (α -TEA). Studije su vršene *in vitro* na malignoj MDA-MB-231 ćelijskoj linji kao i *in vivo* na ksenograft modelu iste ćelijske linije kod miševa. Ispitivani su i efekti kombinacije α -T i γ -T. Rezultati su pokazali da γ -T i α -TEA ispoljavaju antitumorsku aktivnost *in vitro* kao i *in vivo*, dok je *all-rac*- α -T ispoljio antitumorska svojstva samo na ksenograft modelu. Sam α -T nije ispoljio antitumorska svojstva, a u kombinaciji sa γ -T i α -TEA je umanjio antitumorski efekat γ -T *in vivo* kao i γ -T i α -TEA *in vitro*.⁵⁴

Primena γ -tokoferolom bogate smeše tokoferola (γ -TmT) je u značajnoj meri umanjila napredovanje tumora dojke koji je indukovano kod miševa.⁵⁵⁻⁵⁷ Dijetarni unos γ -TmT je redukovao rast hemijski indukovano tumora pluća kod miševa kao i humanih H1299 ćelija tumora pluća na ksenograft modelu.⁵⁸ U drugoj studiji na H1299 ksenograft modelu je potvrđena veća efikasnost δ -T u odnosu na γ -T u inhibiciji tumorigeneze (α -T nije ispoljio aktivnost).⁵⁹

1.2.1.1. Kliničke studije

Rezultati studija na ljudima su nekonzistentni što se tiče uticaja tokoferola na rizik od nastanka tumora dojke, međutim većina studija je pokazala da ne postoji inverzna zavisnost.⁶⁰⁻⁶² Meta-analiza podataka prikupljenih iz 40 studija iz literature je dovela u vezu težak nedostatak α -T sa povećanim rizikom od nastanka tumora dojke.⁶³

U prospektivnoj studiji sprovedenoj na 72 829 žena nepušača starosti 40-70 godina, praćen je uticaj unosa tokoferola iz hrane i iz suplemenata na rizik od nastanka tumora pluća. Utvrđeno je da unos tokoferola putem hrane može smanjiti rizik od nastanka tumora pluća, ali da suplementacija tokoferolima može povećati rizik od adenokarcinoma pluća.⁶⁴

U prospektivnoj studiji sprovedenoj na oko 300 000 muškaraca starosti 50-71 godinu, praćen je uticaj vitamina E (u vidu α , β , γ i δ tokoferola) unetog putem hrane i u vidu suplemenata na rizik pojave tumora prostate. Rezultati ove studije pokazali su da suplementacija vitaminom E nije sprečila nastanak tumora, ali da je povećan unos γ -tokoferola i u manjoj meri δ -tokotrienola putem hrane značajno smanjio rizik od pojave tumora prostate.⁶⁵ Druga randomizirana studija je takođe pokazala da dugotrajna suplementacija vitaminom E ne sprečava nastanak tumora i da kod ljudi sa vaskularnim bolestima ili dijabetes melitusom može dovesti do srčane insuficijencije.⁶⁶

Efekat suplementacije α -tokoferolom (50 mg) i β -karotenom (20 mg) na rizik od nastanka tumora pluća i ostalih tumora je ispitan na oko 29 000 muškaraca pušača starosti 50-69 godina. U ATBC (*Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention*) randomiziranoj, placebo kontrolisanoj studiji dugotrajna suplementacija (5-8 godina) sa 50 mg α -T dnevno (u formi α -tokoferil acetata) dovedena je u vezu sa značajnom redukcijom incidence tumora prostate kao i smanjenjem mortaliteta.⁶⁷

Kako ATBC studija nije bila dizajnirana da prati isključivo tumor prostate i bila je ograničena samo na muškarce iz Finske, 2001. godine započeta je nova SELECT (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*) klinička studija. U SELECT studiji praćeno je oko 35 000 muškaraca sa različitih geografskih područja starosti iznad 50 godina kako bi se utvrdilo da li suplementacija vitaminom E i selenom, pojedinačno ili u kombinaciji, ima značaj u prevenciji tumora prostate.⁶⁸ Ispitanici su uzimali 400 mg vitamina E dnevno u formi α -tokoferil acetata. Studija je prekinuta 2008. godine nakon što je utvrđeno da suplementacija vitaminom E nije smanjila rizik od tumora prostate i da je u nekim grupama ispitanika koji su uzimali vitamin E ovaj rizik bio povećan, ali bez statističke značajnosti.⁶⁹ Podaci objavljeni 2011. godine koji uključuju 18 meseci dodatnog praćenja ispitanika su pokazali za 17 % povećan nastanak karcinoma kod ispitanika koji su uzimali vitamin E, što ukazuje da je suplementacija vitaminom E

dovela do statistički značajnog porasta incidence tumora prostate.⁷⁰ Jedno od mogućih objašnjenja ovakvih rezultata koji su bili u potpunoj suprotnosti sa rezultatima ATBC studije, jeste što je doza korišćena u SELECT (400 mg) bila mnogo veća od doze korišćene u ATBC (50 mg) i da je pri toj dozi vitamin E mogao da ispolji toksične efekte.

1.2.2. Antitumorska aktivnost tokotrienola

U svim dosadašnjim studijama dokazan je jači antiproliferativni efekt tokotrienola u odnosu na tokoferole, što se barem delom može objasniti boljim preuzimanjem tokotrienola u ćelije zahvaljujući nezasićenom bočnom lancu.⁷¹

In vitro studije sprovedene na MDA-MB-435 estrogen-rezistentnoj (ER-) humanoј ćelijskoј liniji tumora dojke su pokazale da tokotrienolom bogata frakcija palminog ulja (*Tocotrienol Rich Fraction*, TRF) inhibira proliferaciju ćelija za 50% u koncentraciji od 180 µg/ml, dok alfa-T nije imao dejstvo pri koncentracijama nižim od 500 µg/ml.⁷² Ispitana je efikasnost kombinacije TRF, α-T i pojedinačnih tokotrienola sa tamoksifenom (antineoplastični lek koji se koristi u hemoterapiji tumora dojke) na MCF-7 estrogen-osetljivoj (ER+) i MDA-MB-435 estrogen-rezistentnoj (ER-) ćelijskoј liniji. Na MDA-MB-435 ćelijama sve kombinacije su pokazale sinergistički efekt, dok je na MCF-7 ćelijskoј liniji samo 1:1 kombinacija γ- i δ-T3 sa tamoksifenom imala sinergistički efekt u inhibiciji proliferacije i rasta ćelija. Ova inhibicija nije prevaziđena dodavanjem viška estradiola u medijum, što je ukazalo na različit mehanizam delovanja tamoksifena i tokoferola/tokotrienola.⁷³

Antiproliferativni efekat TRF je takođe pokazan na MDA-MB-231 ćelijskoј liniji tumora dojke, pri čemu su od pojedinačnih izomera najaču aktivnost imali γ- i δ-T3.⁷⁴ U studiji na mišjim i humanim ćelijskim linijama tumora dojke (sa ili bez prekomerene ekspresije HER2) ispitan je antitumorski efekt α-, γ- i δ-T3 u odnosu na sintetski derivat α-tokoferil sukcinat (α-TOS). I u ovoj studiji najaču aktivnost imali su γ-T3 i δ-T3, koji su smanjili preživljavanje ćelija sa upola manjom IC₅₀ vrednošću u

odnosu na α -T3 i α -TOS.⁷⁵ Ono što je značajno, tokotrienoli nisu ispoljili citototoksično dejstvo na zdravim epitelnim ćelijama dojke.⁷⁶

Tokotrienoli iz palminog ulja su doveli do apoptoze i inhibicije rasta na humanim ćelijskim linijama tumora prostate (LNCaP, DU145 i PC-3), dok pri istim dozama nisu imali dejstvo na zdravim ćelijama.⁷⁷ Značajno su smanjili napredovanje tumora prostate kod miševa i doveli do inhibicije ćelijskog ciklusa na ksenograft modelu.^{78,79}

Na humanim Hep3B ćelijama hepatoma γ -T3 je ispoljio antitumorsko dejstvo pri nižim koncentracijama u odnosu na α -T3 i kraćem trajanju tretmana.⁸⁰ Oralna administracija TRF *in vivo* je dovela do značajnog smanjenja tumorigeneze jetre i pluća kod miševa. U istoj studiji δ -T3 je pokazao jači antiproliferativni efekat *in vitro* na HepG2 ćelijama u odnosu na α , β i γ -T3.⁸¹

Tretman RKO ćelija tumora kolona tokotrienolom bogatom frakcijom palminog ulja je imao za rezultat dozno i vremenski zavisnu inhibiciju rasta i formiranja kolonije.⁸² Proliferaciju SW620 ćelija tumora kolona inhibisali su δ -T3 i γ -T3, takođe na dozno-zavisan način.^{83,84}

Kliničke studije sprovedene na ljudima potvrdile su da tokotrienoli mogu umanjiti rizik od tumora dojke⁸⁵, a da sinergistički efekat tokotrienola i tamoksifena može doprineti smanjenju smrtnosti i rekurencije tumora dojke.⁸⁶ Na osnovu sprovedenih studija u kojima je ispitana antiproliferativna aktivnost prirodnih tokoferola, (*in vivo* i *in vitro*), može se izvesti zaključak da γ - i δ -tokotrienoli poseduju veći antitumorski potencijal od ostalih prirodnih izomera vitamina E.

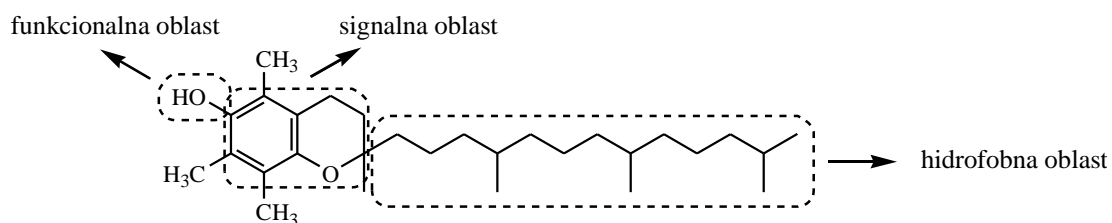
1.3. POLUSINTETSKI ANALOZI VITAMINA E

Od otkrića da prirodni izomeri vitamina E ispoljavaju antitumorsku aktivnost pa do danas, sintetisan je veliki broj analoga od kojih je većina nastala modifikacijom fenolne grupe na hromanskom prstenu, a koji su imali u značajnoj meri poboljšanu aktivnost i farmakokinetičke osobine u odnosu na polazne prirodne proizvode.

1.3.1. Odnos strukture i aktivnosti analoga vitamina E (*Structure Activity Relationship, SAR*)

Jedinjenja iz grupe vitamina E imaju tri glavne strukturne oblasti (Slika 3) opisane kao:

- funkcionalna oblast, koju predstavlja hidroksilna grupa na položaju C-6 koja je prisutna kod svih tokoferola i tokotrienola. Ova grupa je odgovorna za antioksidativna svojstva vitamina E. Može biti modifikovana (esterifikovana), pri čemu nastaju derivati tokoferola i tokotrienola. Ova oblast se takođe smatra odgovornom za proapoptotičke osobine vitamina E.
- signalna oblast, koju predstavlja dihidrohromanski prsten i koja je odgovorna za regulaciju signalnih puteva, uključujući signalni put protein kinaze C (PKC).
- hidrofobna oblast, koju čini ugljovodonični lanac na položaju C-2, odgovorna za vezivanje za lipoproteine plazme i biološke membrane.⁸⁷

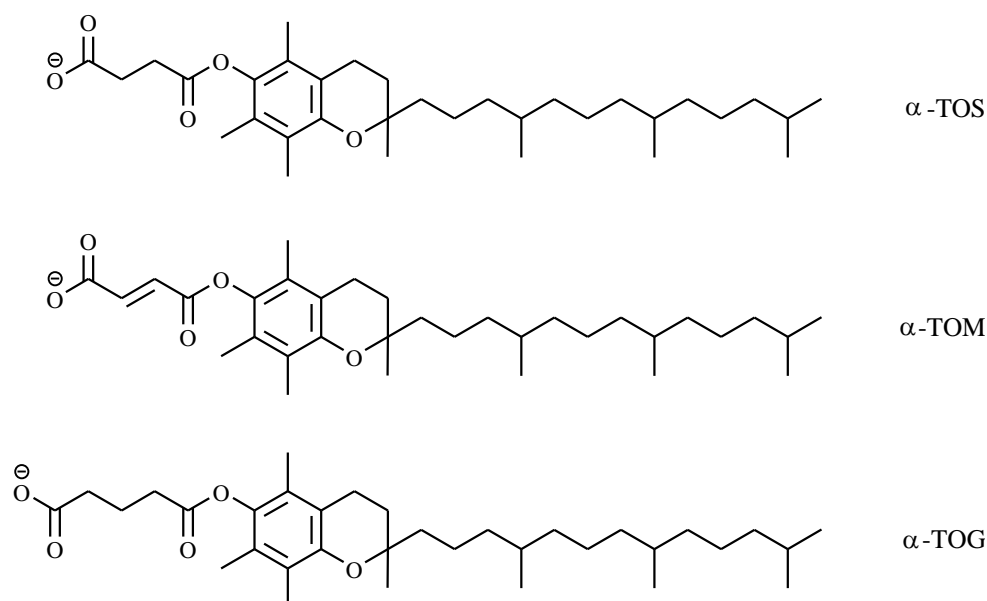


Slika 3. Strukturne oblasti vitamina E na primeru α -tokoferola.

1.3.2. Derivati nastali modifikacijom funkcionalne oblasti

Najveću grupu analoga vitamina E sa modifikovanom fenolnom grupom na položaju C6 predstavljaju estri, od kojih je najistaknutiji i najviše proučavan α -tokoferil sukcinat (α -TOS) (Slika 4). Antitumorska aktivnost α -TOS-a je ispitana na više malignih ćelijskih linija (ćelije tumora dojke, pluća, prostate, želudca, osteosarkoma, mezotelioma, leukemije i druge).⁸⁸⁻⁹⁴

Na testiranim ćelijskim linijama α -TOS je pokazao selektivno dejstvo za maligne ćelije, ne delujući na normalne ćelije. Mehanizam selektivnog dejstva mogao bi se objasniti na dva načina: (i) zbog veće aktivnosti esteraza u normalnim ćelijama u odnosu na maligne, α -TOS u normalnim ćelijama biva hidrolizovan do α -T koji nema citotoksični efekat; (ii) u kiselijoj sredini tumorskih ćelija u odnosu na normalne ćelije α -TOS je potpuno protonovan i ponaša se kao površinski aktivna materija koja dovodi do destabilizacije membrane mitohondrija.



Slika 4. Estri tokoferola.

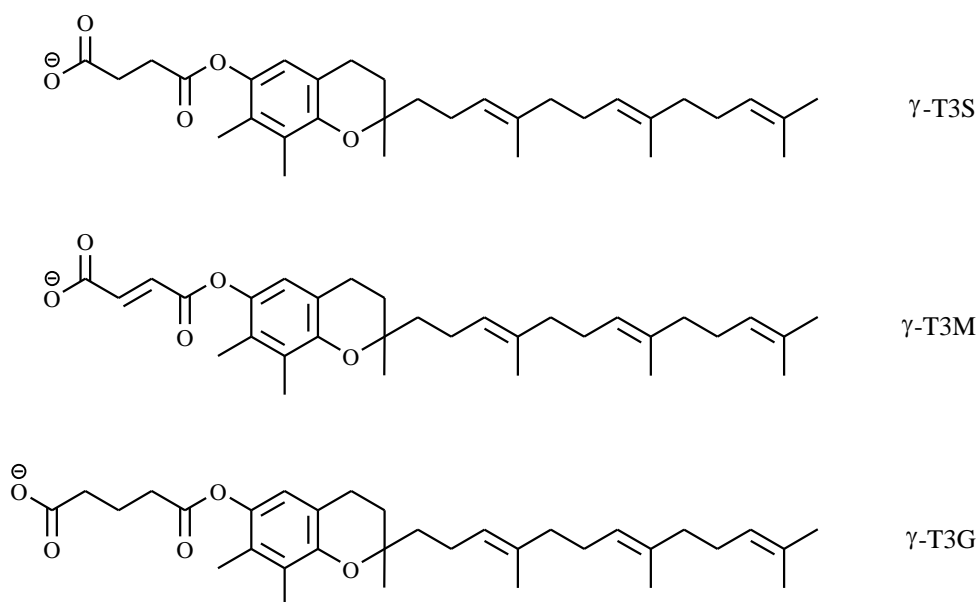
Oksalatni i malonatni ester α -tokoferola su takođe pokazali proapoptogenu aktivnost na više ćelijskih linija tumora, ali su za razliku od α -TOS ispoljili citotoksičnost i na zdravim ćelijama, naročito oksalatni ester koji je u *in vivo* uslovima doveo do smrti eksperimentalnih miševa.⁹⁵

Estar za nezasićenom dikarboksilnom kiselinom, α -tokoferil maleat (α -TOM), ima jaču proapoptogenu aktivnost u odnosu na α -TOS dok glutaratni ester koji ima duži lanac na C6 (α -TOG) pokazuje slabiju aktivnost od α -TOS.⁹³

Esterifikacijom karboksilne grupe sukcinatnih estara α -T i δ -T dobijeni su metil estri koji su inaktivni, što ukazuje na značaj slobodne karboksilne grupe kod estara sa dikarboksilnim kiselinama.⁹³

Literaturni podaci pokazuju da je α -TOS ispoljio antitumorsku aktivnost i u *in vivo* uslovima na modelima miševa, ali samo prilikom intraperitonealne primene. Oralna primena nije imala efekta budući da je dolazilo do hidrolize pod dejstvom crevnih esteraza.⁹⁶

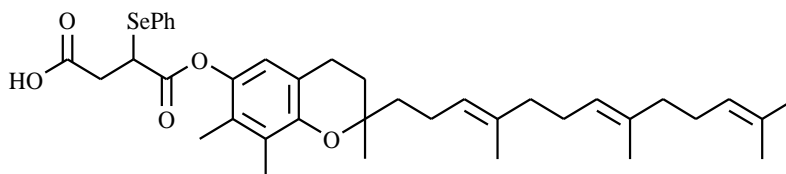
Sukcinatni ester γ -tokotrenola (γ -T3S) je pokazao bolju antitumorsku aktivnost u odnosu na α -TOS na svim testiranim ćelijskim linijama.⁹³



Slika 5. Estri tokotrienola.

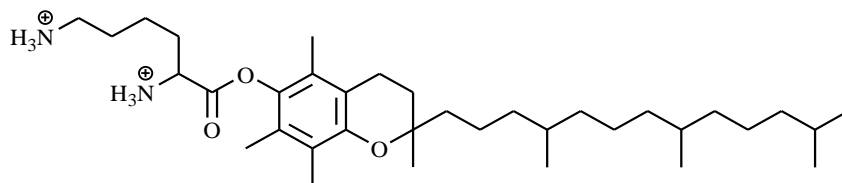
Esterifikacijom α -, γ - i δ -T3 sa 1,2,4-benzotrikarboksilnom kiselinom kao i γ -T3 sa maleinskom (γ -T3M) i glutarnom kiselinom (γ -T3G) dobijeni su estri sa jakim antitumorskim dejstvom na ćelijama tumora dojke. Esterifikacijom je postignuta veća rastvorljivost i bioraspoloživost u odnosu na prirodne izomere (Slika 5).⁹⁷

Budući da dosadašnja istraživanja ukazuju da α -T i selen imaju sinergistički efekat u hemoprevenciji tumora, sintetisani su sukcinatni estri sa selenom (Slika 6). Organoselenski estri su u manjoj koncentraciji doveli do inhibicije proliferacije androgen rezistentnih ćelija raka prostate u poređenju sa sukcinatnim estrima.⁹⁸



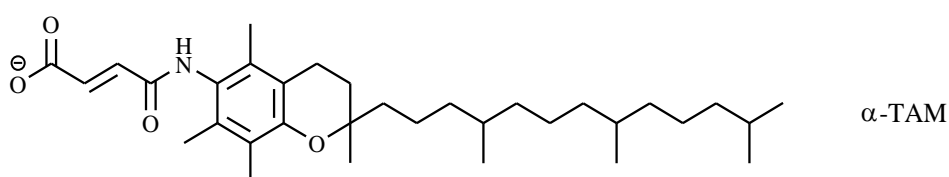
Slika 6. Organoselenski estar γ -T3.

Slaba rastvorljivost vitamina E u vodi predstavlja ograničavajući faktor u njegovoj farmakokinetici i distribuciji u tkiva. Esterifikacijom sa aminokiselinama u molekul se uvodi primarna alifatična amino grupa koja je u biosredini protonovana, što povećava polarnost i rastvorljivost molekule. Sintetisani su analozi α -T sa aminokiselinama glicinom i lizinom (Slika 7), ispitana je njihova antitumorska aktivnost na MCF7 humanoј ćelijskoј liniji tumora dojke i rezultati su upoređeni sa komercijalno dostupnim derivatima vitamina E (α -T, α -tokoferil acetat, α -TOS i Trolox). Estar α -T sa lizinom je pokazao daleko bolju antitumorsku aktivnost u odnosu na komercijalno dostupne derivate.⁹⁹



Slika 7. Estar α -T sa aminokiselinom lizinom.

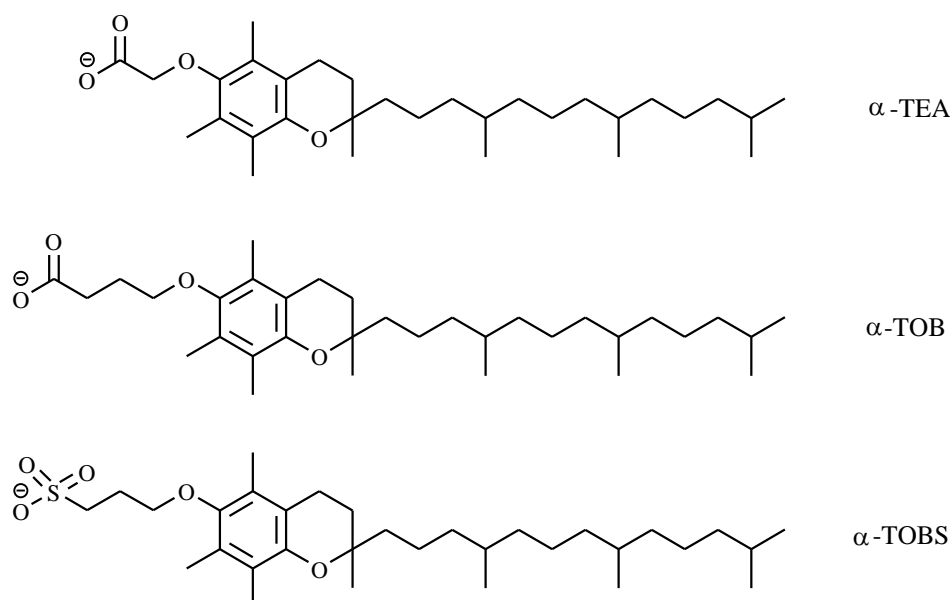
Zamenom estarske grupe amidskom, koja je stabilnija prema hidrolizi, dobijeni su derivati sa boljom proapoptogenom aktivnošću. Kao i kod estara, derivati sa nezasićenim kiselinama su pokazali bolju aktivnost, pa je tako α -tokoferil maleil amid (α -TAM) ispoljio jak citotoksični efekat na testiranim ćelijskim linijama leukemije i mezotelioma (Slika 8).¹⁰⁰ Slično kao kod estara, metilovanje slobodne karboksilne grupe je kod amidskih derivata dovela do potpunog gubitka aktivnosti, ukazujući na značaj prisustva jonizujućeg centra u funkcionalnom domenu molekule vitamina E za antitumorsku aktivnost.¹⁰⁰ Studije sa α -TAM su pokazale njegovu ekstremnu toksičnost *in vivo* koja je prevaziđena formulacijom lipozomalnih preparata. Lipozomalna formulacija α -TAM je dovela do jake supresije rasta tumora kod miševa u 10 puta manjoj dozi u odnosu na α -TOS, pri čemu nije detektovana akutna imunotoksičnost.¹⁰¹



Slika 8. Amidski analog α -T.

U cilju daljeg povećanja stabilnosti i dobijanja analoga za oralnu primenu sintetisani su derivati vitamina E sa etarskom vezom koja je otporna na hidrolizu. Predstavnik ove grupe je derivat α -T sa etarski vezanim ostatkom sirćetne kiseline, α -

tokoferiloksisirćetna kiselina ili α -TEA (Slika 9). Studije su pokazale da je α -TEA induktor apoptoze ćelija epitelijalnog tumora, uključujući tumor dojke, prostate, pluća, creva, kože, jajnika, cerviksa i materice, kao i da je efikasniji od α -TOS u smanjivanju i sprečavanju metastaze tumora *in vivo*, bez obzira na način primene.^{76,102-106} Pored α -TEA i etar sa buternom kiselinom, α -tokoferiloksibuterna kiselina (α -TOB), je ispoljio antitumorsku aktivnost na ćelijama tumora dojke i prostate.^{107,108} Sulfonski derivat α -TOB, α -tokoferiloksibutilsulfonska kiselina (α -TOBS) je pokazao *in vitro* i *in vivo* antitumorsku aktivnost na ćelijama tumora prostate (Slika 9).¹⁰⁹



Slika 9. Etarski analozi vitamina E.

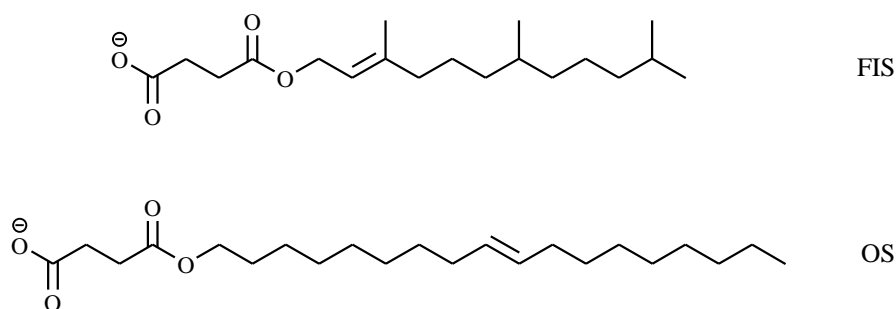
1.3.3. Uticaj signalne oblasti na aktivnost derivata vitamina E

Signalna oblast (dihidrohromanski prsten sa različitim brojem i rasporedom metil grupa) doprinosi različitoj apoptogenoj aktivnosti derivata vitamina E. Studije su pokazale da su sukcinatni estri β -, γ - i δ -tokoferola manje apoptogeni u odnosu na α -TOS, a da među njima δ -TOS ima najmanju aktivnost, što ukazuje da veći stepen

metilovanja signalne oblasti ima pozitivan uticaj na antitumorsku aktivnost.⁹³ Broj i raspored metil grupa ima uticaja i na stepen degradacije bočnog lanca budući da γ - i δ -T bivaju mnogo brže degradirani na kulturi ćelija u odnosu na α - i β -T. Osim toga, α -TTP selektivno prepoznaje α -T i sa smanjenjem metilacije signalne oblasti opada i afinitet za ovaj protein, što dovodi do kraćeg zadržavanja ostalih izomera tokoferola u organizmu.¹¹

Kod tokotrienola se sa povećanjem stepena metilacije smanjuje apoptogena aktivnost, pa je tako δ -T3 najaktivniji izomer.¹¹⁰

Sukcinil estri masnih kiselina dugog lanca, fitil sukcinat (FIS) i oleil sukcinat (OS) nisu pokazali apoptogenu aktivnost, što ukazuje na činjenicu da samo prisustvo jonizujuće grupe na jednoj strani i hidrofobnog ostatka na drugoj nije dovoljno za indukciju apoptoze, te je prisustvo dihidrohromanskog prstena neophodno da bi se ispoljila antitumorska aktivnost vitamina E i njegovih analoga (Slika 10).⁹³



Slika 10. Sukcinatni estri masnih kiselina.

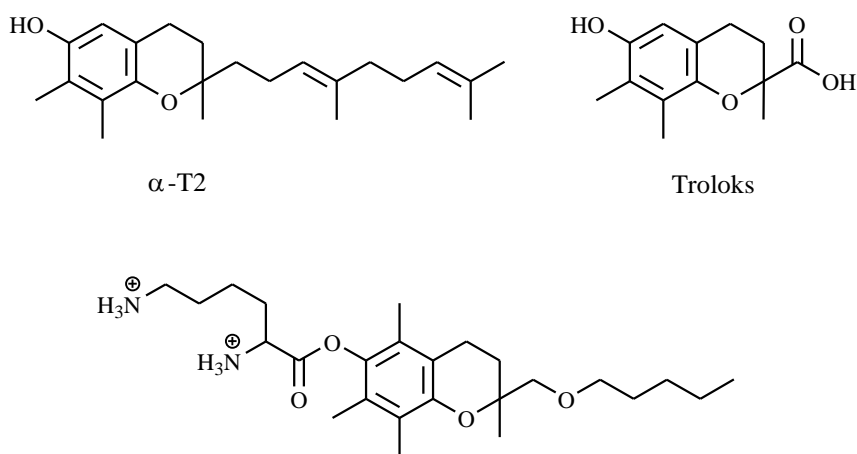
1.3.4. Derivati vitamina E nastali modifikacijom hidrofobne oblasti

Sintetisano je nekoliko analoga sa modifikovanim bočnim nizom u položaju C2 (Slika 11). Kao i kod prirodnih izomera, derivati sa nezasićenom bočnim nizom (tokotrienoli) su generalno aktivniji od tokoferola, pa je tako γ -T3S apoptogeniji od α -TOS na ćelijskim linijama tumora dojke.⁹³

Derivat α -tokotrienola (α -T2) sa jednom izoprenskom jedinicom manje u bočnom nizu je pokazao bolju antitumorsku aktivnost u odnosu na γ -T3.⁹³

Estri α -T2 sa aminokiselinom lizinom, koji su na položaju C2 imali alifatični lanac od 5 C-atoma vezan preko etarske (Slika 11) ili estarske veze ili estarski vezan ostatak holne kiseline, su ispoljili sličnu aktivnost kao i α -tokoferil lizin estar na MCF7 ćelijskoj liniji tumora dojke.⁹⁹

Analog vitamina E sa karboksilnom grupom u položaju C2 umesto fitilnog ostatka (Trolox), kao ni njegov sukcinatni estar, nisu pokazali apoptogenu aktivnost.^{93,99}



2,6-Diamino-heksanska kiselina 2,5,7,8-tetrametil-2-pentiloksimetil-hroman-6-il estar

Slika 11. Analozi vitamina E sa modifikovanom hidrofobnom oblasti.

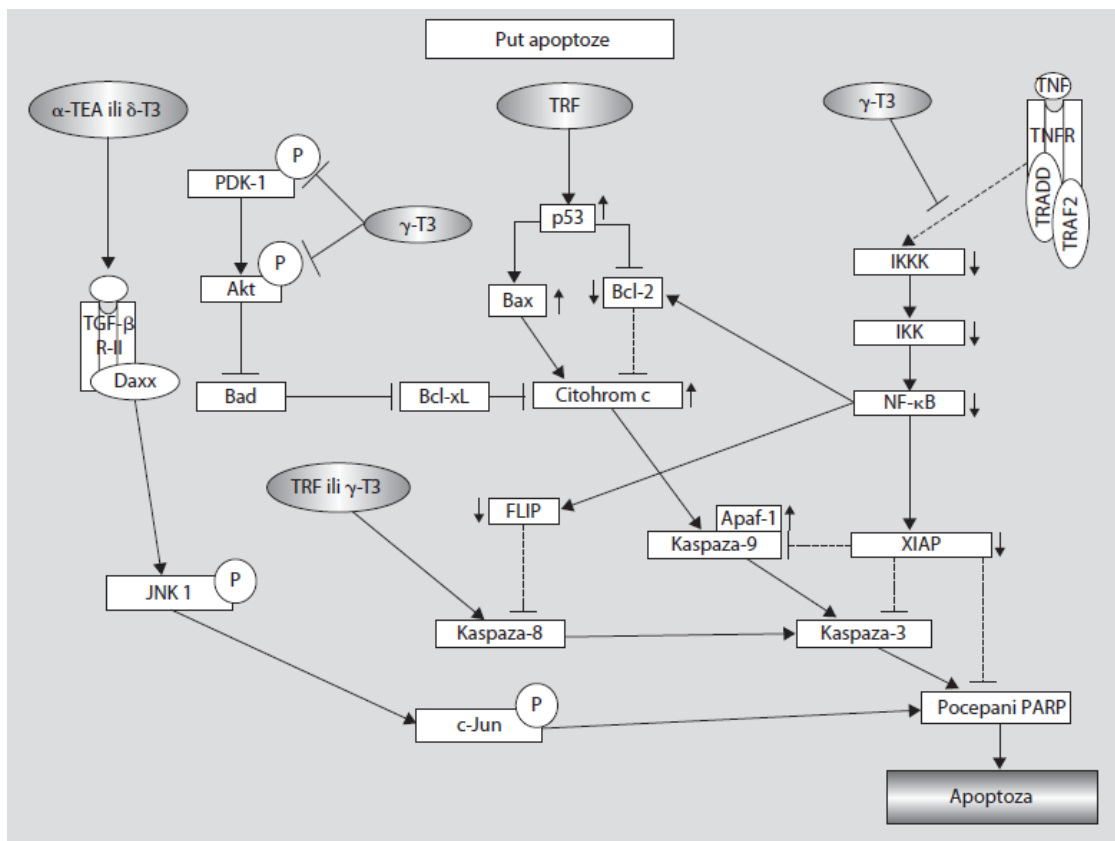
1.4. MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DEJSTVA VITAMINA E I ANALOGA

Predloženo je nekoliko mehanizama kojima bi se mogla objasniti antitumorska aktivnost vitamina E i njegovih analoga: indukcija apoptoze, inhibicija ćelijskog ciklusa, inhibicija biosinteze holesterola i inhibicija angiogeneze.

1.4.1. Apoptoza

Apoptoza je put ćelijske smrti regulisan mrežom gena, u kome ćelija određena za umiranje aktivira enzime sposobne za degradaciju sopstvene jedarne DNK-a i jedarnih i citoplazmatskih proteina. Apoptoza započinje aktiviranjem specifičnih enzima koji se nazivaju kaspaze, i to aktivacijom kaspaze-8 ili kaspaze-9 (Slika 12). Aktivacija kaspaze-9 vezana je za poremećaj funkcije mitohondrija, dok je aktivacija kaspaze-8 povezana sa vezivanjem liganda za tzv. receptore smrti, koji pripadaju grupi TNF receptora (receptori za faktor nekroze tumora). Unutrašnji, mitohondrijalni put apoptoze može biti indukovano nakupljanjem reaktivnih vrsta kiseonika (*Reactive Oxygen Species*, ROS) koje nastaju kao ćelijski odgovor na agens ili aktivacijom enzima sfingomijelinaze (Smase) koji konvertuje sfingomijelin u apoptogeni ceramid.

Tretman tumorskih ćelija α -TOS-om uzrokuje promenu u strukturi mitohondrija putem stvaranja ROS-a i to u formi superoksida, konverzije sfingomijelina, relokalizacije citohroma c i aktivacije multiplih kaspaza.¹¹¹



Slika 12. Mogući putevi indukcije apoptoze derivatima vitamina E.¹¹²

Proapoptotičke karakteristike α -, β -, γ -, δ -tokoferola, α -, γ -, δ -tokotrienola i α -tokoferil acetata su ispitane na MCF-7 i MDA-MB-435 humanim ćelijskim linijama tumora dojke. α -TOS, poznat kao induktor apoptoze u raznim ćelijskim linijama, uključujući i humane ćelije tumora dojke, je poslužio kao pozitivna kontrola. MCF-7 ćelije su se pokazale podložnije apoptozi u odnosu na MDA-MB-435 ćelije. Tokotrienoli su indukovali apoptozu na obe ćelijske linije dok su se tokoferoli (sa izuzetkom δ -T) i α -tokoferil acetat pokazali kao neefektivni testirani u granicama njihove rastvorljivosti (10-200 μ g/ml).⁵²

Na mišjim visoko malignim (+SA) epitelnim ćelijama dojke utvrđeno je da se tokotrienolima indukovana apoptoza odvija preko receptor-zavisne aktivacije kaspaze-8 i da ne zavisi od aktivacije kaspaze-9.¹¹³ Studije koje su nastavljene na istoj ćelijskoj liniji da se odredi tačan receptor/ligand uključen u mehanizam aktivacije kaspaze-8, su

pokazale da α -T3 dovodi do značajnog smanjenja intracelularnog nivoa FLICE (*Fas-associated death domain-Like Interleukin 1beta-Converting Enzyme*) - inhibitornog proteina (FLIP) koji inhibira aktivaciju kaspaze-8.¹¹⁴

Na humanim ćelijama tumora želudca α -TOS je indukovao apoptozu spoljašnjim putem preko receptora smrti, modulacijom NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) signalnog puta.⁹⁰ Pokazano je da i γ -T3 indukuje apoptozu preko istog signalnog puta na više ćelijskih linija tumora.¹¹⁵

Proapoptotički efekt γ -T3 na ćelijskim linijama tumora dojke povezan je i sa supresijom Id1 proteina koji ima ulogu u ćelijskom rastu i diferencijaciji, a njegova povećana ekspresija je pronađena kod mnogih tumora.¹¹⁶

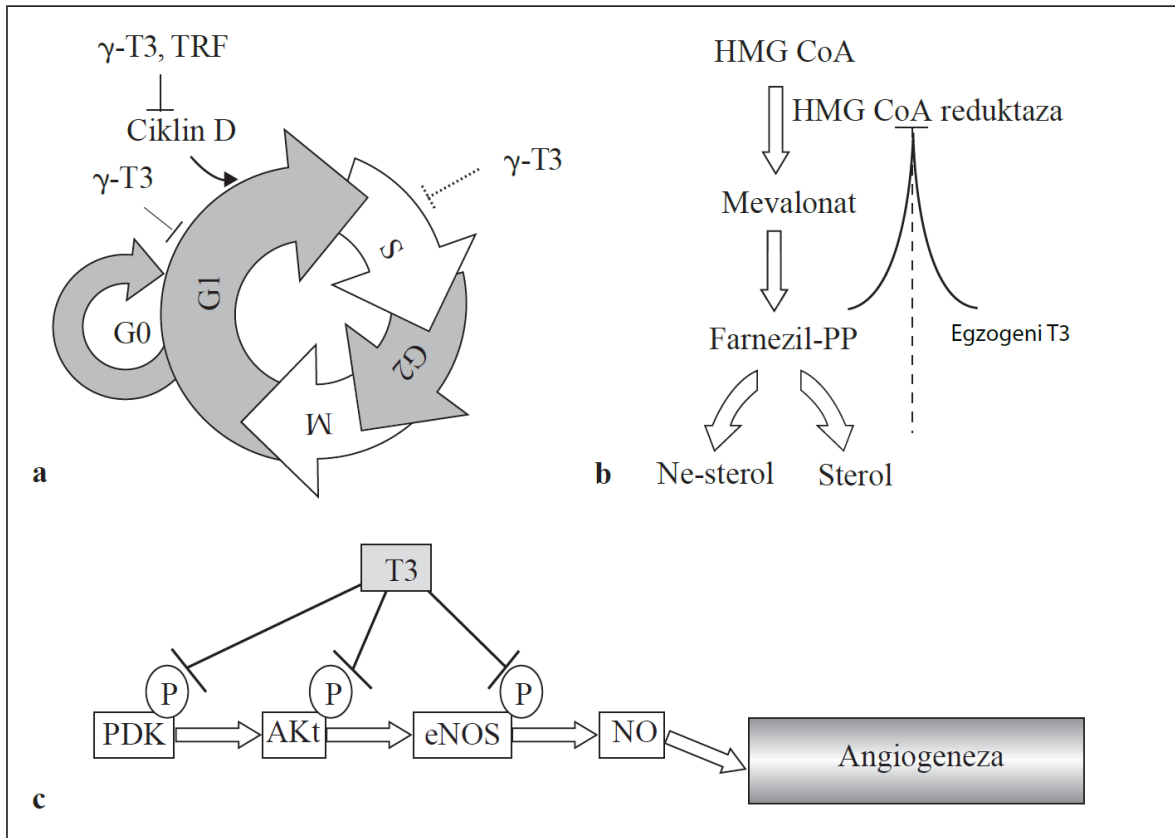
1.4.2. Inhibicija ćelijskog ciklusa

Ćelijski ciklus podrazumeva seriju događaja u kojima dolazi do podele matične ćelije na dve ćerke ćelije. Sistem koji reguliše ćelijski ciklus je poremećen kod tumora pa dolazi do nekontrolisane deobe ćelija. Sam ciklus se može podeliti na osnovne faze:

- G_0 – faza mirovanja, ovom fazom započinje ćelijski ciklus.
- G_1 – u ovoj fazi dolazi do rasta ćelije.
- S – sinteza, u ovoj fazi dolazi do replikacije DNK.
- G_2 – u ovoj fazi ćelija nastavlja da raste.
- M- mitozu, u ovoj fazi dolazi do podele ćelije na dve ćerke ćelije.

G_1 i G_2 predstavljaju kontrolne faze u kojima se osigurava da je ćelija spremna da pređe u narednu fazu. Za praćenje ćelijskog ciklusa koristi se metoda protočne citometrije koja prati sadržaj DNK unutar ćelije prilikom njihovog protoka kroz aparat. Ćelije se prethodno tretiraju sa DNK vezujućom fluorescentnom bojom kao što je propidijum jodid (PI), nakon čega se emitovana fluorescencija, koja direktno zavisi od sadržaja DNK, detektuje u aparatu i analizira kompjuterskim softverom.

Na humanim ćelijama osteosarkoma α -TOS je zaustavio prelazak ćelija iz S u G₂ fazu što ih je učinilo osjetljivim na metotreksat, antineoplastik čija je aktivnost zavisna od ćelijskog ciklusa, ukazujući na moguću adjuvantnu terapiju.⁸⁸



Slika 13. Mehanizmi antitumorskog dejstva tokotrienola. a) modulacija ćelijskog ciklusa; b) inhibicija biosinteze holesterola; c) angiogeneza.¹¹²

Western-blot analizom i protočnom citometrijom je utvrđeno da γ -T na ćelijskoj liniji tumora prostate dovodi do redukcije ciklina D1, proteina koji je ključan za prelazak ćelije iz G₁ u S fazu i ima značajnu ulogu u nastanku i razvoju tumora.¹¹⁷

Pored indukcije apoptoze δ -T3 je izazvao zastoje u G₁ fazi ćelijskog ciklusa i smanjenu ekspresiju ciklin-zavisne kaspaze 4 na ćelijama melanoma kod miša, ne delujući pritom na zdrave ćelije.¹¹⁸

Inkubacija sa TRF u toku 24 h je rezultovala dozno zavisnim prekidom G₀/G₁ faze na tri ćelijske linije humanog tumora prostate (LNCaP, DU145 i PC-3), ali ne i na normalnim epitelnim ćelijama.⁷⁷

1.4.3. Inhibicija biosinteze holesterola

Put sinteze holesterola ima direktan efekt na tumorigenezu. Tumorske ćelije proizvode mnogo više holesterola nego normalne ćelije. Statini kao inhibitori sinteze holesterola smanjuju rast tumorskih ćelija, a pokazano je da na sličan način mogu delovati i tokotrienoli.¹¹⁹ Međutim, statini nisu selektivni, i u dozama koje su potrebne da bi se ispoljio ovaj efekt, proizvode brojne neželjene efekte koji mogu biti vrlo ozbiljni.

Tokotrienoli su selektivni kada se radi o tumorskim ćelijama. Tokom sinteze holesterola proizvodi se farnezol koji, kada se nakupi u velikim količinama, aktivira enzim 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktazu (HMG-CoA reduktaza) što dovodi do povećanog stvaranja holesterola. Tokotrienoli koji imaju izoprensku subjedinicu imitiraju farnezol i blokiraju prekomerenu proizvodnju holesterola koja je prisutna u tumorskim ćelijama.

Dokazano je da kombinacije statina i tokotrienola ispoljavaju sinergistički efekat u tretiranju tumora. γ -T3 u kombinaciji sa manjim dozama statina potencira inhibitornu aktivnost statina na mišjim +SA visoko malignim epitelnim ćelijama dojke¹²⁰ kao i na humanim ćelijama tumora debelog creva.¹²¹

1.4.4. Inhibicija angiogeneze

Jedan od osnovnih faktora rasta tumora je stvaranje novih krvnih sudova ili angiogeneza, pa je inhibicija ovog procesa bitna u sprečavanju metastaziranja tumora. Male doze γ -T3 dovele su do supresije angiogeneze u *in vivo* i *in vitro* modelima, što ukazuje na još jedan od mogućih mehanizama antitumorske aktivnosti tokotrienola.¹²² U

in vivo uslovima δ -tokotrienol je inhibirao fosforilaciju fosfoinozimid-zavisne protein kinaze (*Phosphoinositide-Dependent protein Kinase*, PDK) i serin/treonin protein kinaze Akt, što je posledično inhibiralo aktivaciju endotelne azot monoksid sintetaze (*endothelial Nitric Oxide Synthase*, eNOS). To je dovelo do smanjene produkcije azot monoksida (NO) u krvnim sudovima i inhibicije angiogeneze (Slika 13).¹²³

Rezultati skorijih istraživanja pokazali su da tretiranje mišjih ćelija tumora dojke sa γ -T3 i δ -T3, kao i TRF, dovodi do smanjenja nivoa interleukina IL-8 i IL-6, dva proangiogena citokina, što potvrđuje njihovu antiangiogenu aktivnost. Istovremeno, tretiranje tokotrienolima je dovelo do smanjenja nivoa vaskularnog endotelnog faktora rasta (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF).¹²⁴

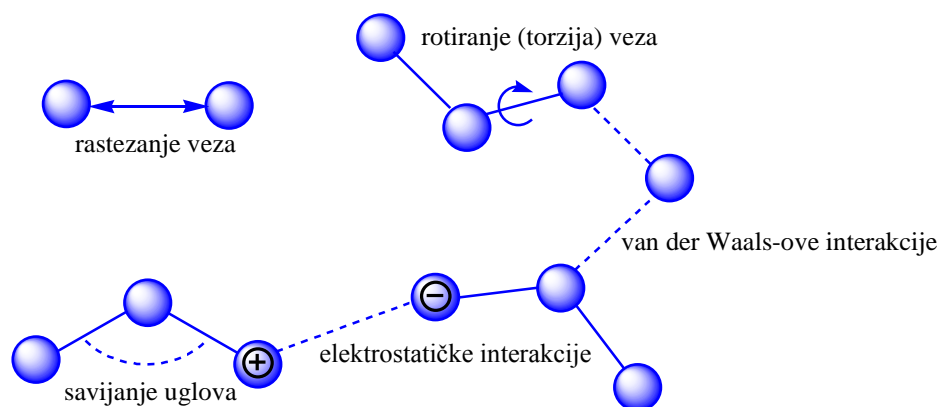
1.5. KOMPJUTERSKE METODE U DIZAJNU LEKOVA

Napredak kompjuterske tehnologije u kombinaciji sa primenjivim softverom, po pristupačnoj ceni, je doveo do selektivnijeg pristupa u razvoju novih lekova. Kompjuterske metode za dizajn lekova uključuju matematičke jednačine koje povezuju strukturu sa biološkom aktivnošću, pretraživanje hemijske baze podataka u potrazi za vodećim molekulama, kao i brzi doking liganda u odnosu na receptor (zahteva poznavanje 3D strukture receptora).¹²⁵

Metode koje se koriste u kompjuterskoj hemiji za dobijanje podataka o strukturi i fizičko hemijskim karakteristikama ispitivane molekule mogu se podeliti u dve velike kategorije: molekulsko-mehaničke i kvantno-mehaničke.

1.5.1. Molekulsko-mehaničke metode

Molekulsko-mehaničke metode koriste jednačine koje prate zakone klasične fizike i primenjuju ih na jezgro molekule bez razmatranja uticaja elektrona. Molekula se posmatra kao serija sfera (atoma) povezanih oprugama (vezama), a energija koja se izračunava je rezultat istezanja veza, savijanja uglova, ne-veznih interakcija (van der Waals-ove i elektrostatičke interakcije) i torzionih energija (Slika 14). Takve energije nemaju apsolutne vrednosti ali su korisne za poređenje različitih konformacija unutar iste molekule. Prednost molekulsko-mehaničkih metoda je brzina, jednostavnost i mogućnost rada sa molekulama koje sadrže hiljade atoma.¹²⁶



Slika 14. Molekulske vibracije i interakcije iz kojih se računa energija u molekulsko-mehaničkom modelu.

1.5.2. Kvantno-mehaničke metode

Kvantna mehanika za računanje molekulskih osobina koristi talasne funkcije koje se zasnivaju na Schrödinger-ovoj jednačini i za razliku od molekulske mehanike uzimaju u obzir uticaj elektrona. Poznato je da Schrödinger-ova jednačina može biti rešena samo u sistemima sa jednim elektronom, tako da se koriste njene aproksimacije. U kvantnoj mehanici polazi se od pretpostavke da distribucija elektrona unutar molekule može biti opisana kao linearna suma funkcija koje predstavljaju atomsku orbitalu. Kvantno-mehaničke metode obuhvataju *ab initio* (*Hartree-Fock*, HF) i metodu teorije funkcionala gustine (*Density Functional Theory*, DFT).¹²⁷

Ab initio metod ne zahteva prethodno pohranjivanje podataka koji bi se mogli koristiti u proračunu nego se svi podaci računaju "od početka", što zahteva mnogo vremena i veliku snagu računara. Najčešće korišćen metod je Hartree-Fock (HF) u kome se koristi izvorna Schrödinger-ova jednačina bez aproksimacija, budući da se kretanje svakog elektrona posmatra posebno u statičkom polju ostalih elektrona. Talasna funkcija se prvo procenjuje a zatim modifikuje na način da se vrši veliki broj linearnih kombinacija orbitala do postizanja sistema sa minimumom energije. Najpreciznije modelovane atomske orbitale preslikavaju analitički izvedene orbitale za

vodonikov atom i to je vodonikov tip orbitala (*Slater Type Orbital*, STO). Međutim, HF metod u svojim proračunima uključuje i preklapanje orbitala, što je u slučaju STO sporo. Zbog toga se u HF proračunima koriste manje precizne Gaussian orbitale (*Gaussian Type Orbital*, GTO) koje su efikasnije u proračunima, ali zahtevaju kombinaciju najmanje tri funkcije koje daju prihvatljivu reprezentaciju orbitale. U zavisnosti od broja i tipa Gaussian funkcija koje se primenjuju na svaku orbitalu, postoji više baznih setova (3-21G, 4-31G, 6-31G* i drugi). Oznaka za bazni set 3-21G govori da je u takvom setu unutrašnji omotač predstavljen sa jednom funkcijom koju čine 3 GTO, dok je spoljašni (valencioni) omotač opisan sa dve funkcije, od kojih prvu čine 2 GTO a drugu 1 GTO.¹²⁶

Da bi se pojednostavili proračuni i skratilo vreme potrebno za računanje, razvijene su semi-empirijske metode koje za proračune uzimaju u obzir samo valencione elektrone i mogu koristiti poznate empirijske podatke bez potrebe za izračunavanjem. Ove metode, iako manje precizne budući da koriste aproksimacije Schrödinger-ove jednačine, su mnogo brže i mogu se primeniti na veće molekule. Većina ovih metoda se bazira na smanjenju proračuna koji potiču od diferencijalnih preklapanja orbitala, odnosno preklapanja dve orbitale različitih atoma. Iz prvog takvog metoda koji je potpuno zanemarivao preklapanje orbitala, CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*), je proistekao MNDO metod (*Modified Neglect of Differential Overlap*) čije se forme AM1 i PM3 danas najviše upotrebljavaju.¹²⁶

Za razliku od HF teorije u kojoj je distribucija elektrona predstavljena setom talasnih funkcija, DFT metoda se zasniva na činjenici da je energija molekula jedinstvena funkcija elektronske gustine. U praksi se često koriste kombinacije DFT i HF metoda, kao što je B3LYP/6-31G* kombinacija. Ove metode su generalno kompjuterski manje zahtevne od klasičnih *ab initio* metoda.¹²⁸

1.6. STUDIJE KVANTITATIVNOG ODNOSA STRUKTURE I DEJSTVA (QSAR)

Studije kvantitativnog odnosa strukture i dejstva (*Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR) podrazumevaju formiranje matematičke veze između biološkog dejstva i kvantitativno definisanih hemijskih karakteristika koje opisuju analiziranu molekulu (deskriptora), unutar seta strukturno sličnih jedinjenja. Koncept QSAR-a je nastao u periodu 1865-1870. godine, kada su naučnici *Crum-Brown* i *Fraser* izložili ideju da je fiziološko dejstvo supstance (Φ) u određenom biološkom sistemu funkcija njene hemijske konstitucije (C)¹²⁹:

$$\Phi = f(C) \quad (1)$$

Ovakva analiza omogućava da se na osnovu informacija o hemijskim karakteristikama relativno malog broja strukturno sličnih jedinjenja predvidi aktivnost mnogo većeg broja jedinjenja. To je naročito značajno kod jedinjenja čija biološka aktivnost uključuje etička pitanja vezana za eksperimente na životinjama. Pored aktivnosti, kao odgovor može da se prati odgovarajuća osobina jedinjenja, kada govorimo o kvantitativnom odnosu strukture i osobina (*Quantitative Structure Property Relationship*, QSPR) ili toksičnost, kada govorimo o kvantitativnom odnosu strukture i toksičnosti (*Quantitative Structure Toxicity Relationship*, QSTR). U zavisnosti od kompleksnosti podataka, postoji više tipova QSAR studija, kao što su dvodimenzionalni (2D) QSAR koji je nezavisan od konformacije molekula, trodimenzionalni (3D) QSAR za koji je neophodna informacija o položaju atoma u prostoru, i višedimenzionalne (4D, 5D i 6D) QSAR studije.¹³⁰ Budući da u velikom broju slučajeva biološki odgovor zavisi od specifične konformacije molekula u odnosu na receptor, 3D-QSAR daje pouzdanije informacije o strukturnim karakteristikama bitnim za dejstvo, u odnosu na 2D-QSAR.

U 3D-QSAR studijama molekule bivaju smeštene unutar trodimenzionalne koordinatne mreže (*grid*). Mreža je izgrađena od grid tačaka koje su postavljene na međusobnom rastojanju najčešće od 1 do 3 angstroma. Nakon smeštanja ispitivane molekule u 3D mrežu, u svakoj tački oko atoma se računaju sterne i elektrostatičke interakcije koje definišu tzv. molekulsko polje interakcija (*Molecular Interaction Field*,

MIF). Na ovom principu se zasniva i jedna od najčešće korišćenih 3D-QSAR metoda, komparativna analiza molekulskih polja (*Comparative Molecular Field Analysis*, CoMFA) koja poredi molekulska polja interakcija ispitivanih molekula poravnatih u 3D mreži i identifikuje ona koja su značajna za aktivnost.¹³¹

Još jedna 3D-QSAR metoda koja se zasniva na poređenju MIF-ova je komparativna analiza pokazatelja molekulske sličnosti (*Comparative Molecular Similarity Index Analysis*, CoMSIA) koja izražava polja u vidu parametara molekulske sličnosti. CoMSIA pored sternih i elektrostatičkih karakteristika razmatra i hidrofobne osobine, prisustvo donora vodonične veze (HBD) i prisustvo akceptora vodonične veze (HBA), za koje smatra da zajedno pokrivaju najvažnije strukturne determinante koje utiču na vezivanje liganda za receptor.¹³²

Najveći nedostatak CoMFA i CoMSIA metoda je što su u velikoj meri zavisne od načina superimpozicije molekulskih struktura unutar mreže. Da bi se izbegao ovaj problem razvijene su savremenije metode koje ne zavise od superimpozicije i koje koriste tzv. grid-nezavisne deskriptore (*GRid-INdependent Descriptors*, GRIND).¹³³

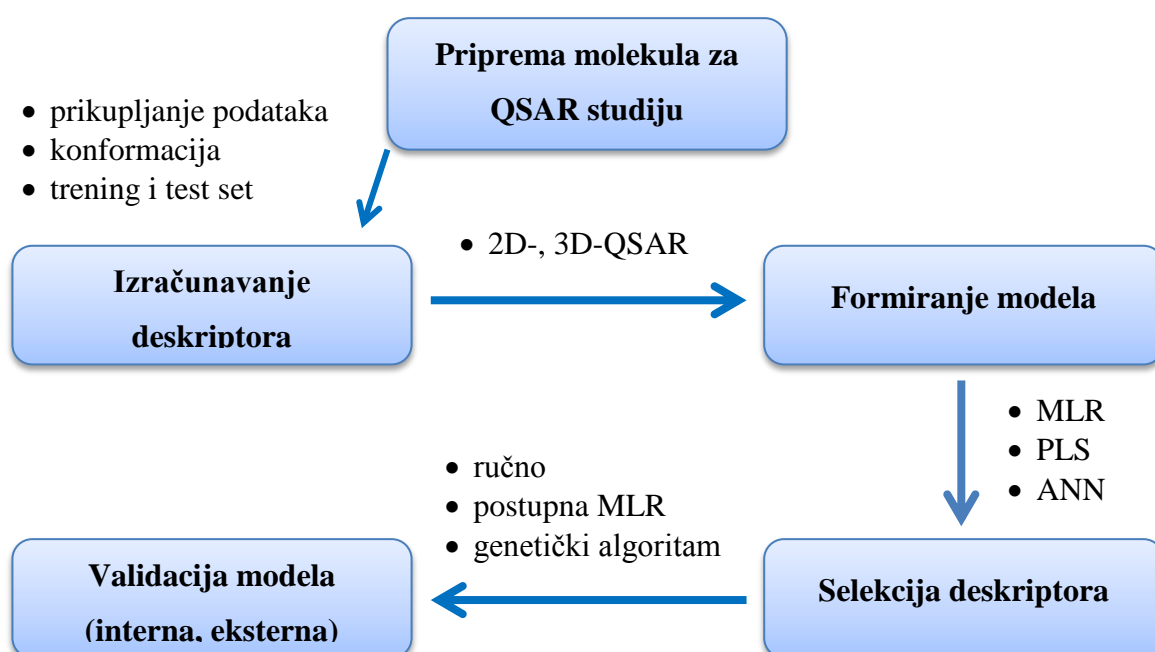
Najvažnija oblast primene QSAR modelovanja jeste dizajniranje i razvoj lekova. Ovi procesi zahtevaju velike investicije u pogledu vremena, ljudi i novca, pri čemu jako mali broj lekova na kraju dospe do tržišta. QSAR studijama se, na osnovu podataka o hemijskoj strukturi ispitivanog molekula i njenom uticaju na farmakološko ponašanje, ADME karakteristike i toksičnost, mogu u značajnoj meri ubrzati i smanjiti troškovi ovih procesa.

Proces formiranja QSAR modela se generalno može podeliti u tri faze: priprema podataka, analiza podataka i validacija modela (Šema 1). Da bi se pristupilo QSAR modelovanju neophodno je prisustvo sledećih komponenti¹²⁶:

- serija odgovora za grupu jedinjenja koja se isputuju.
- set molekulskih deskriptora koji kvantitativno opisuju strukturne karakteristike svakog jedinjenja.
- matematička funkcija ili algoritam koji će povezati podatke o odgovoru sa jednim ili više molekulskih deskriptora.

1.6.1. Priprema podataka za QSAR studiju

Prvi korak u procesu QSAR modelovanja jeste prikupljanje eksperimentalnih podataka koji moraju biti tačni, precizni i konzistentni za set molekula koji se ispituje (dataset) i ovi podaci u modelu predstavljaju nezavisne (Y) varijable. Informacije o strukturi molekula se zatim prevode u numeričke vrednosti (deskriptore) koji u modelu predstavljaju zavisne (X) varijable.



Šema 1. Faze QSAR modelovanja.

Molekulski deskriptori predstavljaju izračunate ili eksperimentalno dobijene numeričke vrednosti koje opisuju određenu karakteristiku molekule. Postoji više tipova molekulskih deskriptora u zavisnosti od metode izračunavanja, odnosno određivanja: fizičko-hemijski, strukturni, topološki, geometrijski, elektronski, ili jednostavni pokazni. Na osnovu dimenzionalnosti prikaza molekule, deskriptori se mogu grupisati u nulte (0D), jednodimenzionalne (1D), dvodimenzionalne (2D), trodimenzionalne (3D)

deskriptore i višedimenzionalne deskriptore.¹³⁴ U Tabeli 1 navedeni su najčešće korišćeni molekularni deskriptori, podeljeni na osnovu dimenzionalnosti.

Tabela 1. Tipovi deskriptora koji se koriste u QSAR studijama u zavisnosti od dimenzije.¹³⁵

Dimenzija deskriptora	Parametri
0D-deskriptori	konstitucijski pokazatelji, molekulska osobina, broj atoma ili veza
1D-deskriptori	broj fragmenata, otisci (<i>fingerprints</i>)
2D-deskriptori	topološki parametri, strukturni parametri, fizičko-hemijski parametri uključujući termodinamičke deskriptore
3D-deskriptori	elektronski parametri, prostorni parametri, parametri analize molekularnog oblika, molekularnog polja i površine receptora

Odabir deskriptora je od presudne važnosti za formiranje dobrog QSAR modela. Neke od karakteristika koje čine deskriptor idealnim za QSAR studiju su¹³⁵:

- deskriptor mora biti u korelaciji sa strukturnim karakteristikama specifičnog ciljnog mesta i pokazivati zanemarljivu korelaciju sa ostalim deskriptorima.
- deskriptor treba biti primenjiv na široku klasu jedinjenja.
- deskriptori koji se mogu brzo izračunati i ne zavise od eksperimentalnih osobina su pogodniji od onih koji su kompjuterski zahtevni za izračunavanje i oslanjaju se na eksperimentalne rezultate.
- deskriptor treba generisati različite vrednosti za strukturno različita jedinjenja, čak i kada je razlika u strukturi mala.
- deskriptor mora posedovati mogućnost interpretacije.

Budući da su 3D-deskriptori strogo zavisni od rasporeda atoma u molekuli (konformacije), pre izračunavanja deskriptora potrebno je (bez obzira na to koji je program korišćen za generisanje 3D-strukture molekula) izvršiti proces energetske minimizacije kojim se pronalazi najstabilnija konformacija (konformacija sa minimumom energije). Ovaj proces je naročito značajan, budući da se prilikom prevođenja iz 2D- u 3D-strukturu mogu javiti nepovoljne dužine veza, uglovi veza, torzioni uglovi kao i nepovoljne ne-vezne interakcije. U svrhu energetske minimizacije se često koriste programi koji koriste principe molekulske mehanike, zbog brzine i jednostavnosti procesa kao i mogućnosti primene na velike molekule. Za preciznije rezultate, a samim tim i posledično bolji kvalitet deskriptora, mogu se primeniti semi-empirijske ili preciznije (ali i sporije i kompjuterski zahtevnije) kvantno-mehaničke metode (HF, DFT).

Danas postoje softveri kojima je moguće izračunati ogroman broj deskriptora. U tim slučajevima je često poželjno umanjiti njihov broj i ukloniti one sa konstantnom vrednošću za sve opservacije i veoma malom varijansom. U grupi deskriptora koji pokazuju visoku vrednost interkorelacije poželjno je izdvojiti samo jedan za QSAR studiju, a ostale eliminisati.

Najzad, potrebno je odabrati molekule koje će biti korišćene za formiranje QSAR modela, odnosno konstruisati trening set. Najčešće se iz originalnog datasea jedan deo molekula izdvoji kao trening set, a od preostalih molekula (oko jedna trećina) se formira test set koji služi za eksternu validaciju modela.¹³⁶

1.6.2. Formiranje QSAR modela – metode statističke analize

Prema preporukama za formiranje i validaciju QSAR modela, svaki QSAR model mora imati jednoznačno definisan algoritam.¹³⁷ Samo u slučajevima jednoznačno definisanog algoritma i precizno zabeležene parametrizacije i podešavanja modela, podaci mogu biti sa sigurnošću replikovani. Postoji više statističkih metoda koje se koriste u QSAR studijama za formiranje modela od kojih su najčešće multipla linearna regresija (*Multiple Linear Regression*, MLR), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

(*Partial Least Squares regression*, PLS) i veštačke neuronske mreže (*Artificial Neural Network*, ANN).¹³⁵

1.6.2.1. Multipla linearna regresija

MLR se koristi u slučajevima kada postoji mnogo veći broj jedinjenja u odnosu na broj deskriptora, budući da je izrazito osetljiva na slučajne korelacije u prisustvu velikog broja deskriptora. Ova metoda sve deskriptore tretira kao značajne za model i podrazumeva da su sve varijable nezavisne jedna od druge, što je retko slučaj. Ako broj deskriptora postane suviše velik, MLR će sa velikom verovatnoćom kreirati model koji savršeno fituje podatke, fenomen koji se naziva *overfitting*. Međutim, MLR algoritam u toku modelovanja dozvoljava pravljenje koraka napred ili koraka nazad, procese u kojima su deskriptori sekventno dodani ili elminisani iz modela, što olakšava selekciju onih koji su bitni za formiranje dobrog modela i interpretaciju rezultata.^{138,139}

1.6.2.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

PLS je linearni regresioni metod koji je manje osetljiv od MLR na slučajne korelacije u datasetovima gde postoji mnogo veći broj deskriptora u odnosu na broj jedinjenja. PLS omogućava istovremeno modelovanje više zavisnih varijabli odnosno odgovora koji se prati. Princip metode se zasniva na transformaciji originalnih deskriptora u manji broj međusobno nezavisnih tzv. latentnih varijabli koje predstavljaju ponderovane linearne kombinacije originalnih varijabli, a sam metod se zbog toga često naziva projekcija na latentne strukture (*Projection to Latent Structures*). Na ovaj način se ostvaruje maksimalna korelacija nezavisnih varijabli sa odgovorom koji se prati. PLS statistička metoda daje robustne rezultate čak i kada postoji visok stepen korelacije između nezavisnih varijabli.^{140,141}

1.6.2.3. Veštačke neuronske mreže

ANN predstavlja paralelne sisteme za izračunavanje koji se sastoje od grupe visoko povezanih elemenata za procesiranje podataka, nazvanih neuroni, raspoređenih u nizu slojeva. Prvi sloj se naziva ulazni sloj i svaki od njegovih neurona prima podatke u vidu nezavisnih varijabli koje se koriste za QSAR studiju. Posle ulaznog sloja postoji jedan ili više slojeva koji se zajedničkim imenom označavaju kao skriveni. Poslednji sloj je izlazni sloj i njegovi neuroni računaju izlazne podatke iz mreže. Svaki od slojeva može vršiti nezavisna izračunavanja i proslediti ih drugom sloju. ANN metodologija se zasniva na sledećem principu:

- vrednost svakog ulaznog deskriptora biva pomnožena odgovarajućom težinskom vezom (*connection weight*) koja zavisi od njegovog značaja.
- ovi ulazi se zatim sabere i prosleđuju u skrivene slojeve gde nelinearna prenosna funkcija vrši sva neophodna računanja.
- rezultati prenosne funkcije se predaju neuronima u izlaznom sloju koji vrše njihovu interpretaciju i prezentuju ih korisniku.^{142,143}

1.6.3. Validacija modela

Validacija je proces kojim se ispituje pouzdanost i relevantnost formiranog QSAR modela i predstavlja osnovu svake QSAR studije. U cilju priznavanja QSAR studija od strane regulatornih tela kao zamene za eksperimentalne studije (naročito modela koji se bave procenom toksičnosti i uticaja na životnu sredinu), Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) je definisala principe dobre prakse za validaciju QSAR modela, koji podrazumevaju¹³⁷:

- jednoznačno definisan odgovor koji se prati.
- jednoznačno definisan algoritam.

- definisana oblast primenjivosti.
- odgovarajuće mere za procenu fitovanja, robustnosti i moći predviđanja modela.
- mehanistička interpretacija, ukoliko je moguće.

U Principu 4 OECD smernica se navodi potreba za obezbeđivanjem dva tipa informacija:

- a) interna performansa modela (u vidu kvaliteta fitovanja i robustnosti), koja se procenjuje upotrebom trening seta;
- b) moć predviđanja modela, koja se procenjuje upotrebom odgovarajućeg test seta.

1.6.3.1. Interna validacija

Najčešće upotrebljavani parametri koji se koriste za internu validaciju modela su:

- koeficijent determinacije, R^2 , koji se računa metodom najmanjih kvadrata između modelom predviđenih i stvarnih vrednosti jedinjenja iz trening seta i ukazuje na kvalitet fitovanja modela (koliko dobro model reprodukuje eksperimentalne podatke).
- validacioni regresioni faktor, Q^2 , dobijen metodom ukrštene validacije (*Leave-One-Out Cross Validation*, LOO-CV) i računa se metodom najmanjih kvadrata između modelom LOO-predviđenih i stvarnih vrednosti jedinjenja iz trening seta. Ukazuje na internu moć predviđanja modela.
- srednja kvadratna greška procene, RMSEE (*Root Mean Square Error of Estimation*), ukazuje na grešku između stvarnih i modelom predviđenih vrednosti jedinjenja iz trening seta.

Prediktivna moć modela je loša ukoliko posmatrane vrednosti nisu dovoljno nezavisne jedna od druge. Jedan od načina da se to proveriti jeste randomizacija zavisnih varijabli, tzv. Y-randomizacija, kojom se potvrđuje robustnost modela, odnosno da formirani model nije rezultat slučajnih korelacija.

1.6.3.2. Eksterna validacija

Visoke vrednosti parametara R^2 ($>0,7$) i Q^2 ($>0,5$) kao i niske vrednosti RMSEE, su polazni pokazatelji dobrog kvaliteta QSAR modela. Međutim, da bi se procenila prava moć predviđanja modela neophodno je uporediti predviđene i stvarne vrednosti dovoljno velike eksterne grupe jedinjenja koja nisu korišćena u formiranju modela (test set), odnosno, potrebno je izvršiti eksternu validaciju.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Najčešće upotrebljavani parametri koji se koriste za eksternu validaciju modela su:

- r^2 (koeficijent determinacije) modela za test set;
- predikcioni R^2 (R^2_{pred});
- srednja kvadratna greška predviđanja, RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*), ukazuje na grešku između stvarnih i modelom predviđenih vrednosti jedinjenja iz test seta;
- r_m^2 metrički parametri, koje su uveli Roy i saradnici. Predstavljaju rigorozniji kriterijum eksterne validacije i naročito su korisni u slučajevima kada test set sadrži mali broj jedinjenja.^{147,148}

Golbraikh i Tropsha su uveli kriterijume po kojima bilo koji od koeficijenata determinacije za regresione linije koje prolaze kroz centar koordinatnog sistema (bez odsečka na y-osi), predstavljeni sa r_0^2 (za korelaciju predviđenih naspram stvarnih vrednosti jedinjenja iz test seta) i $r_0'^2$ (za korelaciju stvarnih naspram predviđenih vrednosti jedinjenja iz test seta), treba da bude blizak vrednosti r^2 (koeficijent determinacije) modela za test set. Vrednosti nagiba ovih regresionih linija, k i k' , prema redosledu, treba da budu što bliži jedinici.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

1.6.3.3. Domen primenjivosti

Bez obzira na to koliko je QSAR model robustan, značajan ili validiran, ne može se očekivati od njega da pouzdano predviđa modelovanu osobinu celog univerzuma hemikalija. Prema tome, pre upotrebe modela za skrining jedinjenja potrebno je definisati njegov domen primenjivosti (*Apliccability Domain*, AD) pri čemu samo osobine onih jedinjenja koja su obuhvaćena domenom primenjivosti mogu biti pouzdano predviđene.¹⁴⁹

Domen primenjivosti je teorijski region hemijskog prostora koji je definisan deskriptorima i modelovanim odgovorom, dakle prirodom trening seta. Zbog toga, prilikom odabira jedinjenja za trening set, treba voditi računa da pokrivaju celi hemijski prostor molekula originalnog dataseta. Postoji nekoliko pristupa za definisanje domena primenjivosti QSAR modela od kojih se najčešće upotrebljavani zasnivaju na^{150,151}:

- granicama u prostoru deskriptora;
- geometrijskim metodama;
- metodama zasnovanim na merenju udaljenosti;
- metodama zasnovanim na funkciji raspodele verovatnoće;
- granicama u vrednostima zavisne varijable.

Prva četiri pristupa su zasnovana na vrednostima deskriptora koji su se koristili za formiranje QSAR modela dok se poslednji pristup oslanja isključivo na prostor definisan odgovorom molekula trening seta.¹⁵¹

1.6.4. QSAR studije derivata vitamina E

Svega nekoliko studija je sprovedeno do danas sa ciljem da se ispita kvantitativna veza između strukture i antitumorskog dejstva derivata vitamina E.¹⁵²⁻¹⁵⁴

U PLS 2D-QSAR studijama na datasetu sastavljenom od estara α -tokoferola sa lizinom, α -tokoferiloksi buterne kiseline, holesteril-sukcinata i holesteriloksi buterne kiseline, koji su ispoljili aktivnost na MCF7 ćelijskim linijama tumora dojke, izračunata su parcijalna naelektrisanja na atomima upotrebom hibridne B3LYP/6-31G metode. Pokazano je postoji relativno visok stepen korelacije između parcijalnog naelektrisanja karboksilnog kiseonika i ugljenika kiselinskih estara sa antiproliferativnom aktivnošću, identifikujući slobodnu karboksilnu grupu kao aktivno mesto, dok su parcijalna naelektrisanja na vodoniku i azotu ukazala na amino grupu lizinskih derivata kao značajnu za aktivnost. Od izabranih deskriptora, najveći uticaj na model imali su broj metil grupa i dipolni momenat, dok su parcijalno naelektrisanje na kiseoniku dihidrohromanskog prstena i $\log D_{pH5.0}$ imali umeren značaj. Na osnovu rezultata ovih QSAR studija dizajniran je estar γ -T3 sa lizinom i lizin/ α -tokoferol/holesterol konjugati koji su pokazali bolju predviđenu antiproliferativnu aktivnost na MCF7 ćelijskoj liniji u odnosu na *in vitro* ispitanu aktivnost jedinjenja iz dataseta.^{152,153}

CoMFA i CoMSIA 3D QSAR studije su sprovedene na seriji sintetisanih etarskih i karbamatnih analoga α -, γ - i δ -tokotrienola da bi se objasnila snažna antiproliferativna aktivnost najaktivnijih derivata na ćelijskoj liniji tumora dojke. U CoMFA modelu su razmatrane sterne i elektrostatičke interakcije, pri čemu zeleni region označava oblast u kojoj se predviđa da će voluminozni suspstituent imati pozitivan uticaj na aktivnost, plavo obojen region označava oblast u kojoj se predviđa da će elektro pozitivne grupe imati pozitivan uticaj na aktivnost dok crveno obojen region označava oblast u kojoj se predviđa da će elektronegativne grupe imati pozitivan uticaj na aktivnost. Najaktivniji derivati su posedovali voluminozni benzenov ili p-toluensulfonil radikal u zelenoj oblasti, elektro pozitivno naelektrisanje oko NH-grupe u blizini plave oblasti i elektronegativno naelektrisanje u blizini crvene oblasti, čime je

objašnjena njihova dobra citotoksična aktivnost. CoMSIA je ukazala na značaj hidrofobne oblasti koju predstavlja izoprenski lanac.¹⁵⁴

Nijedna od dosadašnjih QSAR studija nije izvedena na datasetu koji bi uključivao i derivate tokoferola i tokotrienola, čime bi se dobio detaljan uvid u najvažnije strukturne karakteristike koje su odgovorne za antitumorsku aktivnost široke grupe analoga vitamina E.

1.7. VIRTUELNI SKRINING

Termin virtuelni skrining (VS) se odnosi na grupu *in silico* metoda koje se koriste za pretraživanje ogromnih baza jedinjenja, kako bi bio izabran manji broj kandidata koji će imati najveću verovatnoću da ispoljavaju željenu biološku aktivnost. Na ovaj način, odabirom manjeg broja tzv. vodećih (*lead*) molekula za sintezu i dalja eksperimentalna testiranja, potencijalno se ostvaruje velika ušteda u vremenu i novcu i povećava šansa da kandidat dospe do prekliničkih odnosno kliničkih studija.¹⁵⁵

Postoje dva pristupa virtuelnog skrininga molekulskih biblioteka: virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mesta ili receptora (*Structure-Based Virtual Screening*, SBVS) i virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda (*Ligand-Based Virtual Screening*, LBVS).¹⁵⁶

Ukoliko je poznata kristalografska struktura ciljnog receptora sprovodi se SBVS, koji se zasniva na dokingu jedinjenja virtuelne biblioteke unutar aktivnog mesta receptora. Kvalitet fitovanja procenjuje se tzv. *scoring* funkcijama koje vrše rangiranje jedinjenja u zavisnosti od afiniteta vezivanja. Jedna od najčešće korišćenih biblioteka za SBVS koja sadrži preko sto hiljada kristalografski određenih struktura receptora je PDB (*Protein Data Bank*) baza podataka (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).¹⁵⁷

Kada nije poznato ciljno mesto delovanja jedinjenja ili nije određena kristalografska struktura receptora, ali je poznato jedinjenje sa dokazanom aktivnošću koja se ispituje (npr. citotoksična aktivnost na određenoj vrsti malignih ćelija), moguće je sprovesti LBVS. LBVS se zasniva na principu sličnosti koji kaže da slična jedinjenja

ispoljavaju sličnu aktivnost.¹⁵⁸ Za svako jedinjenje iz virtuelne biblioteke se računa sličnost sa poznatim aktivnim jedinjenjem. Razvijeno je mnogo različitih strategija za merenje sličnosti, uključujući *Cosine*-ov koeficijent, *Euclidean*-ovu razdaljinu, *Soergel*-ovu razdaljinu i *Tanimoto*-ov koeficijent.¹⁵⁹ Na osnovu skorova sličnosti jedinjenja se rangiraju i ona u vrhu liste se biraju za dalja ispitivanja.

Danas su dostupne virtuelne biblioteke koje sadrže milione komercijalno dostupnih jedinjenja, kao što su ZINC (<http://zinc.docking.org>), ChemSpider (<http://www.chemspider.com>), ChemDB (<http://www.chemdb.com/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) itd.¹⁵⁵

Da bi se povećala mogućnost za dobijanje pouzdanih vodećih jedinjenja, pre samog procesa skrininga može se izvršiti prefiltracija virtuelne biblioteke kako bi se, na primer, izdvojila samo ona jedinjenja koja poseduju tzv. *druglike* karakteristike, odnosno zadovoljavaju kriterijume Lipinskog.¹⁶⁰

Zahvaljujući karakteristikama današnjih kompjutera kao i sve većem broju novih i širenju postojećih baza jedinjenja, razvoj novih, efikasnijih metoda za uspešnu primenu VS u oblasti dizajna lekova je u konstantnom porastu.

2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Izvođenje studija kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva derivata vitamina E
 - Formiranje i validacija 2D-QSAR i 3D-QSAR modela.
 - Određivanje strukture farmakofore: identifikacija najvažnijih strukturnih karakteristika koje utiču na antitumorsku aktivnost derivata vitamina E.
- Sintaza estara α -tokoferola sa lizinom, prolinom, glutaminom, asparaginom i estara γ -tokotrienola sa lizinom, prolinom, glutaminom.
 - Optimizacija uslova za uklanjanje zaštitne Cbz (benziloksikarbonil) grupe aminokiselina nakon esterifikacije.
 - Optimizacija hromatografskih uslova (TLC, HPLC, hromatografija na koloni) za praćenje sinteze i prečišćavanje proizvoda.
 - Identifikacija i strukturna karakterizacija sintetisanih jedinjenja upotrebom ^1H NMR, ^{13}C NMR, ATR-FTIR, MS TOF i MS-MS spektroskopskih metoda.
- Ispitivanje aktivnosti sintetisanih jedinjenja *in vitro* na MCF-7, MDA-MB 231 ćelijskim linijama tumora dojke, A549 ćelijskoj liniji tumora pluća i MRC-5 normalnoj ćelijskoj liniji fetalnih fibroblasta pluća.
 - Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}) upotrebom MTT-testa.
 - Ispitivanje sposobnosti indukcije apoptoze najaktivnijeg jedinjenja na multirezistentnoj MDA-MB 231 ćelijskoj liniji.
 - Ispitivanje uticaja na ćelijski ciklus najaktivnijeg jedinjenja na multirezistentnoj MDA-MB 231 ćelijskoj liniji.

- Ispitivanje sinergizma najaktivnijeg jedinjenja sa doksorubicinom na multirezistentnoj MDA-MB 231 ćelijskoj liniji.
- Ispitivanje stabilnosti najaktivnijeg jedinjenja na MDA-MB 231 ćelijskoj liniji u humanoj plazmi.
- Pretraživanje ChEMBL baze bioaktivnih jedinjenja metodom virtuelnog skrininga zasnovanog na strukturi najaktivnijih liganada na MCF7 i MDA-MB 231 ćelijskim linijama tumora dojke.
 - Identifikacija jedinjenja sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću na MCF7 i MDA-MB 231 ćelijama.
- Kompjutersko dizajniranje novih analoga vitamina E sa unapređenom antitumorskom aktivnošću.
 - ADMET karakterizacija (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost) dizajniranih jedinjenja.
 - Selekcija dizajniranih jedinjenja sa najvećom predviđenom aktivnošću i najboljim ADMET osobinama i predlaganje za buduću sintezu i biološka ispitivanja.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. QSAR STUDIJE DERIVATA VITAMINA E

3.1.1. Kompjuterski programi

- ChemDrawUltra 7.0.0 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, SAD, 2002)
- Chem3DUltra 7.0.0 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, SAD, 2002)
- MarvinSketch 15.9.21.0 (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska 2015)
- Gaussian 98 (Revision A.7) (Gaussian, Inc., Pittsburgh, SAD 1998)
- Dragon 6.0 (TALETE srl., Milano, Italija 2010)
- SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics AB, Umea, Švedska 2008)
- Pentacle 1.0.7 (Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italija 2013)
- ADMET Predictor 6.5 (Simulations Plus, Inc., Lancaster, SAD 2013)

3.1.2. Dataset

Dataset od 30 jedinjenja, sa eksperimentalno određenom antitumorskom aktivnošću na MCF7 ćelijskoj liniji tumora dojke, je preuzet iz literature.^{99,154,161-163} Set se sastojao od 23 derivata tokoferola i tokotrienola kao i 5 analoga hromana koji ne pripadaju familiji vitamina E i 2 analoga holesterola, koji su uključeni u dataset da bi se povećala strukturna različitost a samim tim i proširio domen primene QSAR modela.

Inicijalni dataset podeljen je trening set koji se sastojao od 20 molekula i test set koji se sastojao od 10 molekula. Izbor jedinjenja za trening i test set je izvršen na način da su sva jedinjenja poredana po opadajućoj aktivnosti, nakon čega je svako treće jedinjenje izabrano za test set, a od preostalih jedinjenja je formiran trening set. Na ovaj način je osigurano da jedinjenja iz oba seta pokrivaju širog opseg aktivnosti.

Sva jedinjenja iz dataseta su testirana na MCF 7 ćelijskoj liniji koristeći istu (MTT) metodu za određivanje antitumorske aktivnosti koja je izražena u vidu IC₅₀ vrednosti. Za QSAR modelovanje izračunat je negativni dekadni logaritam IC₅₀ vrednosti, čime su dobijene pIC₅₀ vrednosti koje su predstavljale zavisnu (Y) varijablu.

Za sva jedinjenja su u programu MarvinSketch 15.9.21.0 određeni dominantni oblici pri fiziološkoj pH vrednosti. U narednom koraku, generisana je 3D struktura dominantnih oblika jedinjenja u programu Chem3DUltra 7.0.0 i izvršena energetska minimizacija generisanih struktura koristeći Gaussian softver u sklopu Chem3DUltra. Energetska minimizacija je izvršena upotrebom semiempirijske PM3 metode,^{164,165} a zatim i preciznije Hartree-Fock/3-21G metode.^{166,167}

3.1.3. Izračunavanje molekulskih deskriptora

Molekulski deskriptori za 2D-QSAR studiju su izračunati iz geometrijski optimizovanih struktura upotrebom Dragon 6.0 softvera. Izračunato je više od 4800 deskriptora podeljenih u nekoliko kategorija, uključujući konstitucijske deskriptore, ring deskriptore, topološke pokazatelje, konekcijske pokazatelje, deskriptore bazirane na 2D matriksu, 2D autokorelacije, geometrijske deskriptore, deskriptore bazirane na 3D matriksu, 3D-MoRSE deskriptore, GATEWAY deskriptore, molekulske osobine, i ostale.¹⁶⁸

Proverena je interkorelacija između parova deskriptora, i ukoliko je korelacioni koeficijent imao vrednost veću od 0,9 jedan od deskriptora je isključen iz matriksa, dok je drugi zadržan.¹⁶⁹ Kao rezultat, broj deskriptora je smanjen na 389 deskriptora koji su upotrebljeni u QSAR studiji.

3.1.4. 2D-QSAR

2D-QSAR model je formiran u SIMCA-P+ 12.0 (*The Soft Independent Modeling of Class Analogy*) programu upotrebom PLS regresione metode. PLS metoda

ima sposobnost da analizira podatke kada postoji veliki broj kao i kolinearna zavisnost između X -varijabli.¹⁷⁰

Selekcija deskriptora je izvršena na osnovu izračunate vrednosti značaja varijable u projekciji (*Variable Importance in Projection*, VIP) koja predstavlja uticaj svake X -varijable (X_k) na Y i X matrice. VIP vrednost je izračunata za svaku varijablu i one varijable sa VIP vrednošću većom od 1 su selektovane kao najznačajnije za dobijanje modela sa dobrom sposobnosti predviđanja.¹⁷¹ Deskriptori sa VIP vrednošću manjom od 0,5 nemaju velik uticaj na aktivnost i isključeni su iz PLS modelovanja. Svaki put kada je varijabla isključena, kreiran je novi model i izračunati su statistički parametri modela. Procedura je ponavljana, sve dok nije pronađena kombinacija 5 deskriptora koji imaju značajan uticaj na aktivnost (imaju visoku VIP vrednost), a koji daju model sa najboljim statističkim parametrima.

3.1.5. 3D QSAR

3D QSAR model je razvijen u Pentacle 1.0.7 programu. Pentacle računa GRID nezavisne deskriptore (GRIND i GRIND2) iz molekulskih polja interakcija. Ovi deskriptori su nezavisni od superimpozicije molekulskih struktura u 3D prostoru, što je često vremenski zahtevan proces i može bitno uticati na kvalitet QSAR modela.^{133,172}

Molekulska polja interakcija su izračunata upotrebom 4 različite probe: DRY proba (predstavlja hidrofobne interakcije), O proba (karbonilni kiseonik, predstavlja akceptore vodoničnih veza), N1 proba (amidski azot, predstavlja donore vodoničnih veza) i TIP proba (predstavlja oblik molekule). Rastojanje između tačaka 3D mreže je postavljeno na 0,5 Å.

Nakon izračunavanja molekulskih polja interakcija, izdvojeni su oni regioni unutar polja koji predstavljaju povoljne interakcije između probe i liganda, tzv. čvorni regioni ili nodovi (*nodes*). Ekstrakcija regiona je izvršena na osnovu dva kriterijuma: intenzitet polja u svakom čvornom regionu i rastojanje između izabranih regiona. Za ekstrakciju je upotrebljen ALMOND algoritam, sa brojem ekstrahovanih čvornih regiona podešenim na 100 i relativnim težinskim faktorima na 50 %.

GRIND deskriptori su izračunati upotrebom CLACC (*Consistently Large Auto and Cross Correlation*) algoritma koji računa energiju interakcija između dva čvorna regiona, koji potiču od istih proba (auto-korelacija) ili različitih proba (kros-korelacija). Ova energija predstavlja zbir Lennard-Jones energije, energije vodoničnih veza, energije elektrostatičkih interakcija i entropije.

Vrednosti dobijene iz ove analize su prezentovane u vidu korelograma, na kojima je predstavljena energija interakcije između dva čvorna regiona u odnosu na njihovu razdaljinu. Svaki pik u korelogramu predstavlja jednu varijablu, odnosno interakciju dva čvorna regiona. Visina pika je određena razdaljinom između regiona, a širina pika intenzitetom reakcije.

Upotrebom CLACC algoritma generisano je 1150 varijabli. Da bi se izdvojile najinformativnije varjable, izvršena je selekcija varijabli upotrebom frakcijskom faktorijalnog dizajna (FFD).¹⁷³ Nakon FFD-selekcije varijabli formiran je novi QSAR model sa redukovanim setom varijabli i izračunati su statistički parametri modela. Procedura je ponovljena, sve dok smanjenje broja varijabli više nije imalo uticaja na poboljšanje statističkih parametara modela. Kao rezultat, dobijen je broj od 260 aktivnih varijabli i njihov uticaj na Y -varijablu (pIC_{50}) je analiziran PLS regresionom metodom. Broj PLS komponenti ili latentnih varijabli (LV) je podešen na 5 i izabran je model sa optimalnim brojem LV.

3.1.6. Validacija QSAR modela

Interna validacija modela izvršena je računanjem sledećih statističkih parametara: R^2 , Q^2 , RMSEE, F odnos i p vrednost.

Kvalitet fitovanja modela (odstupanje modelom izračunatih od stvarnih vrednosti Y za jedinjenja iz trening seta) procenjen je izračunavanjem kvadratnog koeficijenta korelacije regresione linije tj. koeficijenta determinacije R^2 :

$$R^2 = \frac{\sum(\hat{Y}_{training} - \bar{Y}_{training})^2}{\sum(Y_{training} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (2)$$

gde je: Y stvarna (eksperimentalno određena) vrednost, \bar{Y} srednja vrednost Y , i \hat{Y} modelom izračunata (predviđena) vrednost.

Interna moć predviđanja modela ispitana je računanjem validacionog regresionog faktora Q^2 . Ovaj parametar je izračunat primenom LOO (*leave-one-out*) ukrštene validacije na način da se iz trening seta izostavi jedno jedinjenje a od preostalih jedinjenja se formira novi model kojim se predviđa aktivnost izostavljenog jedinjenja (\hat{Y}_{LOO}). Nakon što je svako jedinjenje iz trening seta izostavljeno jednom, izračunata je predviđena rezidualna suma kvadrata ili PRESS (*Predicted Residual Sum of Squares*). PRESS parametar predstavlja kvadratnu sumu razlika ($e_{(i)}$) između stvarnih (Y) i LOO-predviđenih (\hat{Y}_{LOO}) vrednosti:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_i^2 \quad (3)$$

gde n predstavlja broj jedinjenja u trening setu.

Na osnovu PRESS parametra definisani su regresioni faktor (Q^2) i srednja kvadratna greška procene (RMSEE):

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum(Y_{training} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (4)$$

$$\text{RMSEE} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n-1}} \quad (5)$$

Da bi se dokazalo da QSAR model ima dobru internu moć predviđanja, vrednost Q^2 treba da bude veća od 0,5.^{144,174}

Robustnost 2D-QSAR modela je proverena testom Y-randomizacije kojim se potvrđuje da model nije prefitovan. Princip testa se zasniva na randomiziranoj preraspodeli Y varijabli dok se X varijable održavaju konstantnim. PLS model se fituje na permutovane Y vrednosti i računaju se R^2 i Q^2 statistički parametri. Nakon ponavljanja procesa 100 puta, kreiran je isti broj paralelnih PLS modela i postignute su referentne distribucije vrednosti R^2 i Q^2 . Rezultati testa su prikazani na validacionom grafiku formiranom u SIMCA programu. Regresione linije su fitovane kroz R^2 i Q^2 vrednosti. Vrednost odsečka za R^2 regresionu liniju ne bi trebalo da bude veća od 0,3-0,4 odnosno od 0,05 za Q^2 regresionu liniju.¹⁴¹

Visoka vrednost Q^2 je neophodan, ali ne i dovoljan uslov za dobru moć predviđanja QSAR modela. Da bi se zaista procenila moć predviđanja modela neophodno je izvršiti eksternu validaciju. Test set od 10 jedinjenja je korišćen za računanje srednje kvadratne greške predviđanja (RMSEP) i koeficijenta determinacije za test set (R^2_{pred}), kao parametara eksterne validacije:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}} \quad (6)$$

$$R^2_{pred} = 1 - \frac{\sum(Y_{test} - \hat{Y}_{test})^2}{\sum(Y_{test} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (7)$$

Prema kriterijumima za eksternu validaciju koje su uveli *Tropsha* i *Golbraikh*, model se može smatrati zadovoljavajućim ako je ispunjen svaki od sledećih uslova:¹⁴⁴

146

- a) $Q^2 > 0,5$
- b) $R_{pred}^2 > 0,6$
- c) $\frac{r^2 - r_0'^2}{r^2} < 0,1$ i $0,85 \leq k \leq 1,15$ ili $\frac{r^2 - r_0^2}{r^2} < 0,1$ i $0,85 \leq k \leq 1,15$
- d) $|r_0^2 - r_0'^2| < 0,3$

gde su r_0^2 i $r_0'^2$ koeficijenti determinacije regresionih prava koji prolaze kroz centar koordinativnog sistema, dobijeni zamenom X i Y ose. Navedeni parametri izračunati su prema sledećim jednačinama:

$$r = \frac{\sum(Y_{test} - \bar{Y}_{test})(\hat{Y}_{test} - \bar{\hat{Y}}_{test})}{\sqrt{\sum(Y_{test} - \bar{Y}_{test})^2 \times \sum(\hat{Y}_{test} - \bar{\hat{Y}}_{test})^2}} \quad (8)$$

$$r_0^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{test} - k \times \hat{Y}_{test})^2}{\sum(Y_{test} - \bar{Y}_{test})^2} \quad (9)$$

$$k = \frac{\sum Y_{test} \times \hat{Y}_{test}}{\sum \hat{Y}_{test}^2} \quad (10)$$

$$r_0'^2 = 1 - \frac{\sum(\hat{Y}_{test} - k' \times Y_{test})^2}{\sum(\hat{Y}_{test} - \bar{\hat{Y}}_{test})^2} \quad (11)$$

$$k' = \frac{\sum Y_{test} \times \hat{Y}_{test}}{\sum Y_{test}^2} \quad (12)$$

Kao dodatna potvrda za dobru moć predviđanja i pouzdanost formiranih QSAR modela izračunati su i r_m^2 metrički parametri (r_m^2 , $r_m'^2$, $\overline{r_m^2}$ i Δr_m^2) za eksternu validaciju:^{147,148}

$$r_m^2 = r^2 \left(1 - \sqrt{|r^2 - r_0^2|} \right) \quad (13)$$

$$r_m'^2 = r^2 \left(1 - \sqrt{|r^2 - r_0'^2|} \right) \quad (14)$$

$$\overline{r_m^2} = \frac{r_m^2 + r_m'^2}{2} \quad (15)$$

$$\Delta r_m^2 = |r_m^2 - r_m'^2| \quad (16)$$

Da bi model bio prihvaćen, srednja vrednost parametara r_m^2 i $r_m'^2$ ($\overline{r_m^2}$) treba da bude veća 0,5, a njihova razlika (Δr_m^2) manja od 0,2. Nedavnom studijom je pokazano da, među različitim parametrima za eksternu validaciju, Δr_m^2 zajedno sa r_m^2 predstavljaju najstrožije kriterijume validacije.¹⁴⁸

Domen primenjivosti QSAR modela je izračunat upotrebom aplikacije „*Applicability domain using standardization approach*“ (dostupna na <http://dtclab.webs.com/software-tools>) koja za računanje koristi pristup teorije standardizacije.¹⁷⁵ Za formiranje domena primenjivosti ova aplikacija koristi dve vrste

ulaznih podataka: vrednosti deskriptora za jedinjenja iz trening seta, pri čemu se detektuju mogući autlajeri, i vrednosti deskriptora za test set, pri čemu se detektuju jedinjenja koja su izvan domena primenjivosti QSAR modela.

ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost) karakteristike dizajniranih jedinjenja su predviđene u programu ADMET Predictor 6.5.

3.2. SINTEZA ESTARA α -TOKOFEROLA I γ -TOKOTRIENOLA

3.2.1. Reagensi i rastvarači

- α -tokoferol
- γ -tokotrienol (ExcelVite Sdn Bhd., Perak, Malezija)
- N-Cbz-L-asparagin, > 98% (
- N-Cbz-L-glutamin,
- N,N'-Di-Cbz-L-lizin,
- N-Cbz-D-prolin, > 98%
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid, EDC, \geq 98% (Across Organics, Geel, Belgija)
- N,N-Dimetilpiridin-4-amin, DMAP, \geq 98 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Dihlormetan suhi, DCM, p.a. (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Tetrahidrofuran, THF, \geq 99,9% (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)
- Natrijum sulfat, anhidrovani (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- *n*-Heksan 95% (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija)
- Etil acetat, p.a. (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Metanol Chromasolv HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Metanol, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)

- Acetonitril HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- 10% Paladijum na ugljeniku p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Vodonik, H₂ (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija)
- Azot, N₂ (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija)
- Etanol, 96% (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-hlorid, p.a. (ZorkaPharm, Šabac, Srbija)
- Silikagel za preparativnu tankoslojnu hromatografiju (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Silikagel 60 za *dry flash* hromatografiju na koloni (veličina čestica 0,035-0,075 mm, veličina pore 60 Å) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)

3.2.2. Oprema

- NMR spektrometar, Gemini 200 (Varian, Palo Alto, SAD)
- NMR spektrometar, Ascend 400 (Bruker Biospin GmbH, Billerica, SAD)
- ATR-FTIR spektrofotometar, Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, SAD)
- Tečni hromatograf spregnut sa masenim detektorom preciznih masa, Agilent 6210 Time-of-Flight (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD)
- UHPLC-MS-MS tečni hromatograf pod ultra visokim pritiskom sa maseno masenim detektorom, Accela 6000 TSQ Quantum Access Max (ThermoScientific, Madison, SAD)
- HPLC tečni hromatograf pod visokim pritiskom sa UV detektorom, HP 1100 (Hewlett-Packard, Beaverton, SAD)

- Kolona, Zorbax Eclipse XDB-C18 100 mm x 4,6 mm; dijametar čestica 3,5 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD)
- Analitička vaga, Adventurer-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- UV lampa, UV-CABINET II (Camag, Muttenz, Švajcarska)
- Magnetna mešalica, Tehnica Rotamix SHP-10 (Zelezniki, Slovenia)
- Vakuumpumpa, KifLab, Laboport (KNF NeubergerGmb, Nemačka)
- Rotacioni vakuum uparivač, ROTAVAPOR-R (Büchi, Švajcarska)
- Vakuumsušnica, Heraeus Vacutherm VT 6025 (Thermo Fisher Scientific, UK)

3.2.3. Hromatografski sistem

Priprema ploče za preparativnu tankoslojnu hromatografiju: Odmeri se 22 g silikagela, suspenduje u 55 mL vode i meša kružnim pokretima ruke oko 5 minuta kako bi se istisnuo inkorporirani vazduh. Masa se nanosi na staklenu ploču 20 cm x 20 cm koja je prethodno prebrisana acetonom i ostavi da se osuši na sobnoj temperaturi. Aktivacija silikagela vrši se grejanjem u sušnici na 105 °C, tokom jednog sata.

Priprema kolone za dry flash hromatografiju: Odmeri se količina silikagela koja je 25 do 50 puta veća u odnosu na količinu sirovog uzorka za razdvajanje i aktivira u sušnici na 105 °C tokom jednog sata. Aktiviranim silikagelom se napuni stakleni levak sa dnom od sinterovanog stakla, a zatim pipetom dodaje *n*-heptan kao rastvarač manje polarnosti i njime natapa adsorbens. Rastvarač se kroz silikagel istisne pomoću vakuuma, a zatim pipetom ravnomerno nanese uzorak rastvoren u eluentu na vrh stuba adsorbensa.

HPLC analiza je izvedena na Zorbax Eclipse XDB-C18 koloni uz mobilnu fazu metanol/voda (97:3, v/v) i UV detekcijom na 210 nm. Za preparativnu TLC i *dry flash* hromatografiju koriste se mobilne faze koje su prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2. Mobilne faze korišćene za hromatografsko prečišćavanje sintetisanih jedinjenja.

Mobilna faza	Sastav
(A)	<i>n</i> -heksan/etil acetat, 3:1,2, v/v
(B)	<i>n</i> -heksan/etil acetat, 3:0,8, v/v
(C)	etil acetat/ <i>n</i> -heksan: 7:3, v/v
(D)	<i>n</i> -heksan/etil acetat, 3:0,6, v/v
(E)	dihlormetan/metanol, 100:0 → 99:1, v/v
(F)	etil acetat

Hromatografske zone se detektuju pod UV lampom na 254 nm ili uranjanjem TLC-pločice u rastvor kalijum permanganat/sumporna kiselina i zagrevanjem.

3.2.4. Priprema rastvora hlorovodonične kiseline u suvom dietil etru

Balon sa predestilovanim suvim etrom se poveže putem cevi za uvođenje gasova sa aparaturom u koje se generiše gasovita hlorovodonična kiselina. Aparatura se sastoji od erlenmajera u kome se nalazi natrijum hlorid, na koji je postavljena cilindrična kapalica u kojoj se nalazi 85 % sumporna kiselina. Budući da je reakcija egzotermna, erlenmajer se postavlja u posudu sa ledom, a razvijeni gas hlorovodonične kiseline se putem staklene cevi uvodi u rastvor suvog dietil etra.

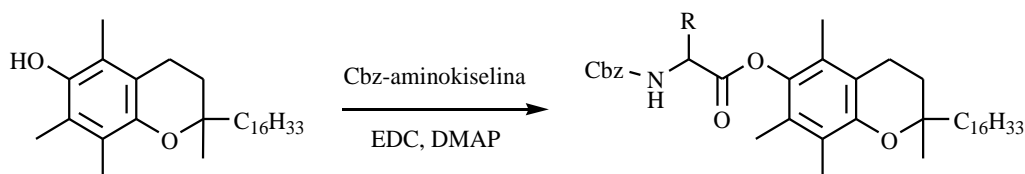
3.2.5. Sinteza estara α -tokoferola

U prvoj fazi sintetisani su estri α -tokoferola sa Cbz-zaštićenim aminokiselinama, zajedničkog naziva α -tokoferil- α -(N-benziloksikarbonilamino) karboksilati.

U drugoj fazi, katalitičkom hidrogenacijom su uklonjene zaštitne Cbz-grupe da bi se dobili slobodni amini, odnosno α -tokoferil- α -aminokarboksilati.

3.2.5.1. Opšti postupak sinteze α -tokoferil- α -(N-benziloksikarbonilamino) karboksilata

Opšti postupak za sintezu α -tokoferil- α -(N-benziloksikarbonilamino) karboksilata je prikazan na Šemi 2.

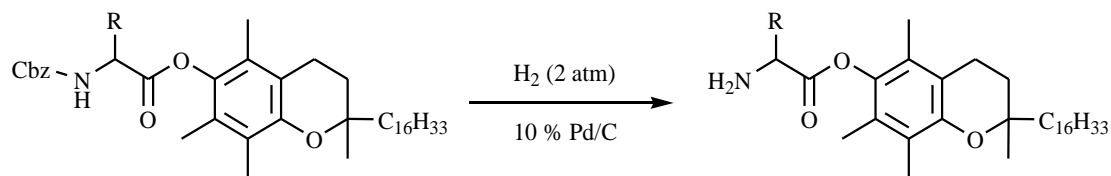


Šema 2. Sinteza α -tokoferil- α -(N-benziloksikarbonilamino) karboksilata.

U rastvor α -tokoferola (2,2 mmol) u 20 ml suvog DCM (estara sa lizinom i prolinom) ili u smeši 10 ml suvog DCM i 10 ml THF (estara sa glutaminom i asparaginom) dodaje se DMAP (0,5 mmol), EDC (1,3 mmol) i Cbz-zaštićena aminokiselina (1 mmol) uz mešanje. U reakcionu smešu se uvodi azot i štiti se od svetlosti. Reakciona smeša se ostavi na magnetnoj mešalici preko noći, na sobnoj temperaturi. Nakon toga se prenese u levak za odvajanje, ispira 3 puta sa vodom i organski sloj filtrira preko anhidrovanog natrijum sulfata. Rastvarač se ukloni na rotacionom vakuum uparivaču do suva, a ostatak prečišćava preparativnom TLC koristeći mobilne faze (A), (B), (C) i (D) za dobijanje estara α -tokoferola sa Cbz-zaštićenim lizinom, prolinom, glutaminom i asparaginom, prema redosledu.

3.2.5.2. Opšti postupak sinteze α -tokoferil- α -aminokarboksilata

Opšti postupak za sintezu α -tokoferil- α -aminokarboksilata katalitičkom hidrogenacijom je prikazan na Šemi 3.



Šema 3. Sinteza α -tokoferil- α -aminokarboksilata.

Prečišćeni ester α -tokoferola sa Cbz-aminokiselinom (1 mmol) se rastvori u anhidrovanom etanolu (estar sa lizinom, prolinom, asparaginom) ili anhidrovanom metanolu (estar sa glutaminom) i postavi na magnetnu mešalicu. Kroz reakcionu smešu se propušta azot u trajanju od 10 minuta kako bi se postigla inertna atmosfera, a zatim dodaje 10 % Pd/C katalizator (20 % w/w u odnosu na količinu estera). U smešu se uvodi vodonik (2 atm H₂) i ostavi na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon završetka reakcije (4 h za estere sa lizinom, prolinom i glutaminom i 6 h za ester sa asparaginom) katalizator se ukloni filtriranjem a rastvarač upari do suva pod vakuumom. Ostatak se prečisti *dry flash* hromatografijom na koloni upotrebom (E), (F) i (C) mobilnih faza kako bi se izolovali α -tokoferil estri prolina, glutamina i asparagina, redosledom, u vidu slobodnih amina. α -Tokoferil lizin ester se izoluje kao so hidrohlorid dodavanjem rasvora hlorovodonične kiseline u suvom dietiletru u ostatak nakon uparavanja. Beli precipitat hidrohloridne soli se filtrira i suši 24 h u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi.

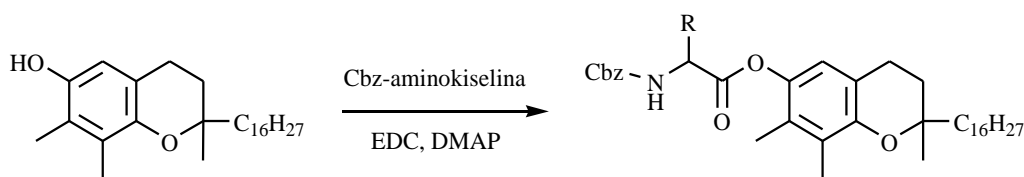
3.2.6. Sinteza estara γ -tokotrienola

U prvoj fazi sintetisani su estri γ -tokotrienola sa Cbz-zaštićenim aminokiselinama, zajedničkog naziva γ -tokotrienil - α -(N-benziloksidikarbonilamino) karboksilati.

U drugoj fazi, katalitičkom hidrogenacijom su uklonjene zaštitne Cbz-grupe da bi se dobili slobodni amini, odnosno γ -tokotrienil- α -aminokarboksilati.

3.2.6.1. Opšti postupak sinteze γ -tokotrienil- α -(N-benziloksikarbonilamino) karboksilata

Opšti postupak za sintezu γ -tokotrienil- α -(N-benziloksikarbonilamino) karboksilata je prikazan na Šemi 4.

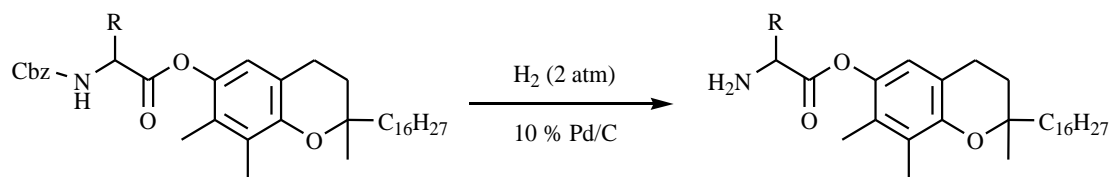


Šema 4. Sinteza γ -tokotrienil- α -(N-benziloksikarbonilamino) karboksilata.

U rastvor γ -tokotrienola (2,2 mmol) u 20 ml suvog DCM (estar sa lizinom i prolinom) ili u smeši 10 ml suvog DCM i 10 ml THF (estar sa glutaminom) dodaje se DMAP (0,5 mmol), EDC (1,3 mmol) i Cbz-zaštićena aminokiselina (1 mmol) uz mešanje. U reakcionu smešu se uvodi azot i štiti se od svetlosti. Reakciona smeša se ostavi na magnetnoj mešalici preko noći, na sobnoj temperaturi. Nakon toga se prenese u levak za odvajanje, ispira 3 puta sa vodom i organski sloj filtrira preko anhidrovanog natrijum sulfata. Rastvarač se ukloni na rotacionom vakuum uparivaču do suva, a ostatak prečišćava preparativnom TLC koristeći mobilne faze (A), (B) i (C) za dobijanje estara γ -tokotrienola sa Cbz-zaštićenim lizinom, prolinom i glutaminom, prema redosledu.

3.2.6.2. Opšti postupak sinteze γ -tokotrienil- α -aminokarboksilata

Opšti postupak za sintezu γ -tokotrienil- α -aminokarboksilata katalitičkom hidrogenacijom je prikazan na Šemi 5.



Šema 5. Sinteza γ -tokotrienil- α -aminokarboksilata.

Prečišćeni estar γ -tokotrienola sa Cbz-aminokiselinom (1 mmol) se rastvori u anhidrovanom etanolu (estar sa lizinom i prolinom) ili anhidrovanom metanolu (estar sa glutaminom) i postavi na magnetnu mešalicu. Kroz reakcionu smešu se propušta azot u trajanju od 10 minuta kako bi se postigla inertna atmosfera, a zatim dodaje 10 % Pd/C katalizator (20 % w/w u odnosu na količinu estara). U smešu se uvodi vodonik (2 atm H₂) i ostavi na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon završetka reakcije (prati se TLC-om) katalizator se ukloni filtriranjem a rastvarač upari do suva pod vakuumom. Ostatak se prečisti *dry flash* hromatografijom na koloni upotrebom mobilne faze (F) kako bi se izolovali γ -tokotrienil estri prolina i glutamina, redosledom, u vidu slobodnih amina. γ -Tokotrienil lizin estar se izoluje u vidu hidrohloridne soli dodavanjem rasvora hlorovodonične kiseline u suvom dietiletru u ostatak nakon uparavanja. Beli precipitat hidrohloridne soli se filtrira i suši 24 h u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi.

3.3. *IN VITRO* ISPITIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI I MEHANIZMA DEJSTVA SINTETISANIH ESTARA

3.3.1. Reagensi i rastvarači

- Dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Suplementarni Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medijum (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Suplementarni Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) medijum (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Serum fetusa govečeta, FCS (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Natrijum dodecil sulfat, SDS (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-terazolijum bromid, MTT (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- 4-(2-Hidroksietil)-piperazin-1-etansulfonska kiselina, HEPES (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Voda za injekcije (Velefarm, Beograd, Srbija)
- Propidijum jodid, PI (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Annexin V-FITC kit za detekciju apoptoze (BD Biosciences, Pharmingen, SAD)
- Koncentrovan rastvor fosfatnog pufera pH 7,4, SBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Pufer za vezivanje, PV (10 mM HEPES/NaOH; pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂)
- RNase, 1 mg/ml

- Tripsin

3.3.2. Oprema

- Protočni citometar, BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, SAD)
- Višekanalni čitač mikrotitar ploča, CHEMWELL (Awareness Technology, Inc., Palm City, SAD)
- Mikrotitar ploče sa 96 bunara, NUNC (Thermo Scientific, Roskilde, Danska)
- Vorteks mešalica
- Centrifuga
- CO₂ inkubator

3.3.3. Čelijske linije

In vitro ispitivanja su vršena na sledećim čelijskim linijama:

- MCF7, ćelije humanog estrogen zavisnog tumora dojke (The American Type Culture Collection, ATCC® N⁰: HTB-22)
- MDA-MB-231, ćelije humanog estrogen rezistentnog tumora dojke (The American Type Culture Collection, ATCC® N⁰: HTB-26)
- A549, ćelije humanog tumora pluća (The American Type Culture Collection, ATCC® N⁰: CCL-185)
- MRC-5, normalne ćelije humanih fetalnih fibroblasta pluća (The American Type Culture Collection, ATCC® N⁰: CCL-171)

3.3.4. Uslovi gajenja ćelijskih linija

Humane ćelije tumora pluća (A549) i normalne ćelije humanih fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) se održavaju kao jednoslojna kultura u hranljivom RPMI 1640 medijumu, dok se humane ćelije tumora dojke (MCF7 i MDA-MB-231) održavaju u DMEM hranljivom medijumu. Ćelije se uzgajaju na temperaturi od 37 °C, u atmosferi 5 % CO₂ i uslovima povećane vlažnosti. Presađivanje se vrši dva puta sedmično.

3.3.4.1. Priprema hranljivih medijuma

Prašasti RPMI 1640 medijum se rastvori u sterilnoj dejonizovanoj vodi u koju su dodani penicilin (192 U/mL), streptomycin (200 µg/ml), HEPES (25 mM), L-glutamin (3 mM) i 10% toplotom inaktivirani FCS (pH 7.2).

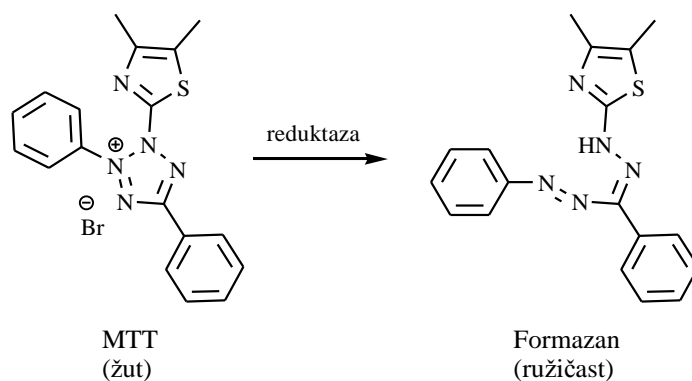
Prašasti DMEM medijum se rastvori u sterilnoj dejonizovanoj vodi u koju su dodati penicilin (192 U/mL), streptomycin (200 µg/ml) i 10% toplotom inaktivirani FCS (pH 7,2).

3.3.5. MTT-test

Preživljavanje ćelija nakon tretmana sintetisanim jedinjenjima se određuje MTT-testom.^{176,177} Metoda je zasnovana na redukciji tetrazolijumskih soli u metabolički aktivnim ćelijama do intenzivno obojenih formazana, koji se potom mogu odrediti kolorimetrijski (Šema 6). Količina nastalog formazana je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Sve ćelijske linije se zaseju u 100µl podloge u mikrotitar ploči sa 96 bunara, sa gustom 7000 ćelija po bunaru. Nakon 24 h, kada je završena adherencija ćelija za podlogu i ćelije ušle u eksponencijalnu fazu rasta, dodaju se serije razblaženja ispitivanih jedinjenja (0,6-50 µM). Osnovni rastvori (80 µM) ispitivanih jedinjenja se pripremaju u DMSO neposredno pre eksperimenta. Nakon 48 h sati inkubacije ćelija sa

testiranim jedinjenjima na 37 °C u uslovima povećane vlažnosti i 5 % CO₂, u bunariće se dodaje MTT (20 µL). Uzorci se inkubiraju još 4 h, nakon čega se dodaje 100 µL 10% SDS, da bi se prekinula redukcija MTT-a u formazan. Apsorbancija ružičasto obojenog formazana se meri narednog dana na 570 nm na višekanalnom čitaču mikrotiter ploča. Svaka testirana koncentracija se primenjuje u triplikatu.



Šema 6. Redukcija MTT do formazana.

Procenat ćelijskog preživljavanja (% S) se definiše kao odnos apsorbancija tretiranih i kontrolnih ćelija, pomnožen sa 100:

$$\% S = \frac{A_t - A_b}{A_c - A_b} \times 100 \quad (17)$$

A_t - srednja vrednost apsorbancije tretiranih ćelija

A_b - srednja vrednost apsorbancije blanka (ispitivana supstanca u podlozi)

A_c - srednja vrednost apsorbancije kontrolnih (netretiranih) ćelija

Vrednost IC_{50} se računa kao koncentracija ispitivanog jedinjenja koja u tretiranim ćelijama inhibira ćelijsko preživljavanje za 50 % u poređenju sa kontrolnim ćelijama.

3.3.6. Citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Uticaj ispitivanog jedinjenja na ćelijski ciklus tumorskih ćelija praćen je citometrijskom analizom DNK sadržaja, nakon bojenja sa PI.¹⁷⁸

Testirana ćelijska linija u eksponencijalnoj fazi rasta se zasadi u Petrijevu posudu (60 x 15 mm) u koncentraciji 2×10^5 ćelija/posuda. Ćelije se tretiraju IC_{50} koncentracijama ispitivanog jedinjenja, doksorubicina i njihovom kombinacijom. Nakon 48 h inkubacije, ćelije se prikupljaju tripsinizacijom, ispiraju dva puta hladnim rastvorom PBS-a i fiksiraju 30 min u 70 % etanolu. Na dan analize fiksirane ćelije se ispiraju sa PBS-om, inkubiraju sa RNase (1mg/ml) 30 min na 37 °C i boje propidijum-jodidom (400 µg/ml).

Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je analizirana na FACS Calibur protočnom citometru sa Cell Quest kompjuterskim softverom.

3.3.7. Citometrijska analiza apoptoze ćelija

Apoptoza tumorskih ćelija tretiranih ispitivanim jedinjenjem, doksorubicinom i njihovom kombinacijom je evaluirana upotrebom Annexin V-fluorescein izotiocijanat (FITC) kita za detekciju apoptoze.

Nakon 48 h sati inkubacije sa $1 \times IC_{50}$ dozom testiranih jedinjenja, ćelije (1×10^6 ćelija/ml) se isperu dva puta sa hladnim PBS-om i resuspenduju u 200 µL vezujućeg pufera (10 mM HEPES/NaOH; pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$). Odvoji se 100 µL (1×10^5 ćelija) rastvora u epruvetu (5 ml) i doda 5 µL Annexin V-FITC i 5 µL PI.

Ćelije se blago mućkaju i inkubiraju 15 minuta na 25°C, zaštićene od svetlosti, nakon čega se se doda 400 µL pufera za vezivanje.

Uzorak je analiziran na FACS Calibur protočnom citometru sa Cell Quest kompjuterskim softverom.

3.4. STUDIJE STABILNOSTI U HUMANOJ PLAZMI

3.4.1. Reagensi i rastvarači

- Metanol, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)
- Acetonitril HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)

3.4.2. Oprema

- HPLC uređaj HP 1100 (Hewlett-Packard, Beaverton, SAD)
- Kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 100 mm x 4,6 mm; dijametar čestica 3,5 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD)
- Analitička vaga, Adventurer-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Vortex mešalica
- Centrifuga, Eppendorf 5417R (Eppendorf, Hamburg, Nemačka)

3.4.3. Priprema osnovnog rastvora ispitivanog jedinjenja (1 mg/ml)

Odmeri se 10 mg ispitivanog jedinjenja, prenese u odmerni sud od 10 ml i rastvori u 5 ml metanola. Odmerni sud se dopuni do oznake istim rastvaračem.

3.4.4. Postupak ispitivanja stabilnosti u plazmi

Plazma je pripremljena centrifugiranjem pune humane krvi, sakupljene od zdravog odraslog dobrovoljca. Studije stabilnosti ispitivanog jedinjenja u plazmi su sprovedene prema proceduri opisanoj ranije.^{97,179}

Sveže pripremljena humana plazma (1.5 ml) je termostatirana na 37 °C u vodenom kupatilu. Reakcija je započeta dodavanjem ispitivanog jedinjenja u plazmu tako da se postigne koncentracija 200 µg/ml. Uzorkovanje je vršeno u vremenskim intervalima 0 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h i 24 h, pri čemu se 75 µL uzorka prenese u 300 µL acetonitrila, kako bi se izvršila deproteinizacija plazme. Uzorci su mučkani na vorteks mešalici 1 min, a zatim centrifugirani 15 min na 4 °C, brzinom 14 000 obrtaja u minuti. Inkubacije su sprovedene u duplikatu.

Bistri supernatant je analiziran HPLC metodom na Zorbax Eclipse XDB-C18 koloni, uz mobilnu fazu acetonitril/voda (95:5 v/v). Protok mobilne faze je podešen na 2 ml/min, temperatura na 30 °C, a detekcija je vršena putem UV detektora na talasnoj dužini 215 nm. Ova HPLC metoda je razvijena ranije za analizu estara α -tokoferola.¹⁸⁰ Kalibracona kriva je konstruisana koristeći razblaženja ispitivanog jedinjenja u plazmi u opsegu koncentracija 1-500 µg/ml.

3.5. VIRTUELNI SKRINING

3.5.1. Kompjuterski programi

- FLAP 2.1.0 (Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italija 2015)

3.5.2. Priprema baze podataka

Baza podataka za virtuelni skrining (VS) je generisana koristeći ChEMBL databazu (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) koja je u momentu pristupa sadržavala 1 463 270 različitih bioaktivnih jedinjenja.¹⁸¹ Kao model ligandi za filtriranje baze podataka korišćeni su α -tokoferil lizin estar i α -tokoferil asparagin estar, pri čemu su formirana 2 VS modela za identifikaciju jedinjenja sa potencijalnom aktivnošću na MCF7 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama tumora dojke.

Pre same procedure virtuelnog skrininga izvršena je prefiltracija generisane baze podataka, kako bi se izdvojio manji broj jedinjenja koji pokazuju strukturnu sličnost sa model ligandima. Zbog ogromnog broja jedinjenja databaza je podeljena na više podbaza, pri čemu je u svakoj podbazi vršeno poređenje filtriranih jedinjenja sa model ligandima i računati su skorovi koji definišu njihovu sličnost. Na osnovu skorova sličnosti, iz svake podbaze je odabrano 200 top rangiranih jedinjenja od kojih je formirana baza podataka za virtuelni skrining.

Cilj prefiltracije je da se redukuje početni dataset koji sadrži ogroman broj jedinjenja i zadrže samo ona jedinjenja koja imaju određenu farmakofornu sličnost sa model ligandima. Ovaj korak je dizajniran tako da bude brz budući da se u njemu se ne vrši poravnanje filtriranih molekula sa model ligandima i ne računaju se GRID molekulska polja interakcija.

U cilju kasnije validacije modela, u dataset su uključeni i sintetisani estri α -tokoferola i γ -tokotrienola koji su pokazali aktivnost na MCF7 i MDA-MB-231

ćelijama kao i derivati vitamina E za koje je u ranijim ispitivanjima antitumorski efekat na ovim ćelijskim linijama.^{99,154,161,163}

Na ovaj način formirane su dve databaze za virtuelni skrining jedinjenja sa potencijalnom aktivnošću na MCF7 i MDA-MB-231 ćelijama, od kojih je svaka sadržala 4599 jedinjenja.

3.5.3. Procedura za virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda

Na dve formirane databaze sproveden je virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda (LBVS) upotrebom FLAP kompjuterskog softvera.

FLAP računa GRID molekulska polja interakcija koristeći 4 različite probe (H, O, N1 i DRY) koje opisuju uobičajene interakcije liganda sa receptorom, kao što su sterne interakcije (H proba), interakcije sa akceptorima vodoničnih veza (O proba), interakcije sa donorima vodoničnih veza (N1 proba) i hidrofobne interakcije (DRY proba).¹⁸² FLAP algoritam se može podeliti na tri faze¹⁸³:

- U prvoj fazi se smanjuje kompleksnost molekulska polja interakcija, tako što se za svaki ispitivani molekul ekstrahuju samo najpovoljnije interakcije i predstavljaju u vidu kvadripleta tačaka.
- U drugoj fazi algoritam vrši superpoziciju jedinjenja iz baze podataka sa model ligandom i poredi njihove ekstrahovane kvadriplete tačaka.
- Treća faza na osnovu preklapanja kvadripleta računa tzv. skorove sličnosti prema kojima se vrši rangiranje jedinjenja u databazi: *Probe* skorovi, *Distance* skorovi i dva globalna skora *Glob-Prod* i *Glob-Sum*. *Probe* skorovi su definisani stepenom preklapanja molekulska polja za svaku probu pojedinačno (H, O, N1 i DRY) ili njihovu kombinaciju (H*N1, H*DRY, H*O, H*N1*H, N1*DRY, N1*O, H*DRY*H, H*DRY*N1, DRY*O, H*O*H, H*O*N1 i H*O*DRY). *Distance* skorovi su definisani razlikom između *Probe* skorova model jedinjenja i liganda.

Glob-Sum se dobija sabiranjem skorova svih individualnih proba zajedno, dok se *Glob-Prod* dobija njihovim množenjem.

3.5.4. Validacija LBVS modela

Da bi se procenilo koliko dobro formirani LBVS model rangira poznata aktivna jedinjenja u odnosu na poznata neaktivna jedinjenja, korišćen je *Enrichment* grafik odnosa stvarno pozitivnih liganada (y-osa) i stvarno negativnih liganada (x-osa) za seriju rangiranih liganada, pri čemu se dobija ROC (*Receiver Operating Characteristic*) kriva.

Površina ispod ROC krive (*Area Under the Curve*, AUC) predstavlja meru grupisanja stvarno pozitivnih liganada u vrhu liste rangiranih liganada. Što je ova vrednost bliža jedinici to je više stvarno pozitivnih liganada smešteno u vrh liste i model je efikasniji. Za efikasan LBVS model potrebno je da vrednost AUC bude viša od 0.5.¹⁸⁴

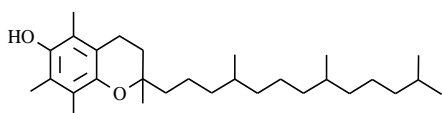
Budući da model rangira jedinjenja na osnovu više skorova sličnosti (*Probe*, *Distance*, *Glob-Prod* i *Glob-Sum*), za rangiranje liganada bira se onaj skor koji daje najvišu AUC vrednost.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. QSAR STUDIJE DERIVATA VITAMINA E

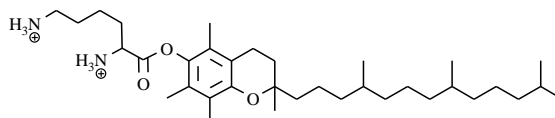
4.1.1. Dataset

Na datasetu sastavljenom od 30 derivata vitamina E i hromana (Slika 15) su sprovedene 2D- i 3D-QSAR studije u cilju identifikacije najvažnijih strukturnih karakteristika koje su odgovorne za antitumorsku aktivnost. Za sva jedinjenja su iz literature sakupljeni podaci o eksperimentalno određenoj antitumorskoj aktivnosti na MCF7 ćelijskoj liniji tumora dojke i izraženi u vidu pIC_{50} vrednosti, pri čemu je pokriven širok opseg aktivnosti od 2,690 do 5,471 logaritamskih jedinica. Početni dataset je podeljen na trening set, sačinjen od 20 jedinjenja od kojih su formirani QSAR modeli, i test set sačinjen od 10 jedinjenja, koji je služio za eksternu validaciju modela. Sve strukture su prethodno energetski minimizovane i odabrani su najrelevantniji deskriptori. Za formiranje QSAR modela korišćena je PLS regresiona analiza.



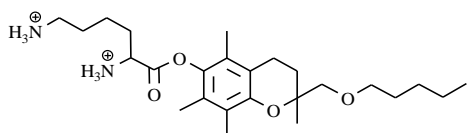
L1

2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-hroman-6-ol



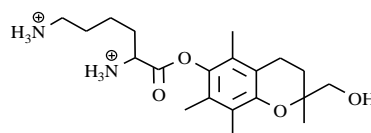
L2

2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-hroman-6-il estar 2,6-diamino-heksanske kiseline



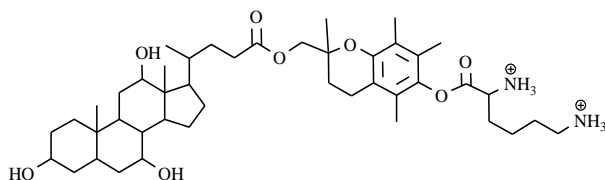
L3*

2,5,7,8-Tetrametil-2-pentiloksimetil-hroman-6-il estar 2,6-diamino-heksanske kiseline



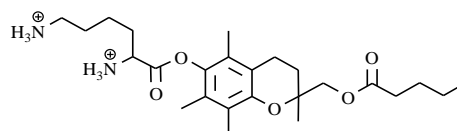
L4

2-Hidroksimetil-2,5,7,8-tetrametil-hroman-6-il estar 2,6-diamino-heksanske kiseline



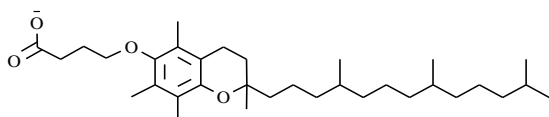
L5

2,5,7,8-Tetrametil-2-[4-(3,7,12-trihidroksi-10,13-dimetil-heksadekahidro-ciklopenta[a]fenantren-17-il)-pentanoiloksimetil]-hroman-6-il estar 2,6-diamino-heksanske kiseline



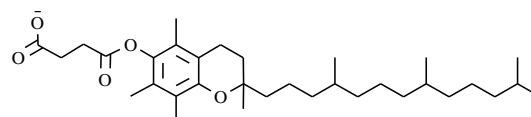
L6

2,5,7,8-Tetrametil-2-pentanoiloksimetil-hroman-6-il estar 2,6-diamino-heksanske kiseline



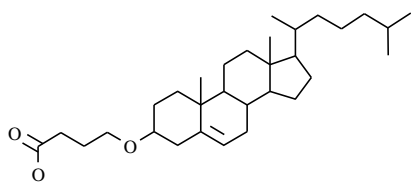
L7*

4-[2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-hroman-6-iloksi]-buterna kiselina



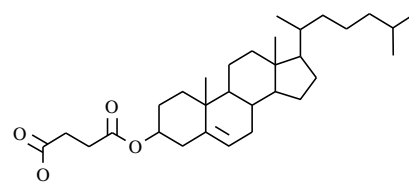
L8

Mono-[2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-hroman-6-il] estar sukcinjske kiseline



L9

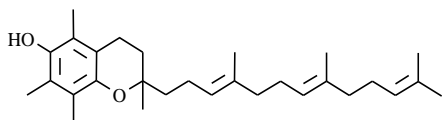
4-[17-(1,5-Dimetil-heksil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantren-3-iloksi]-buterna kiselina



L10*

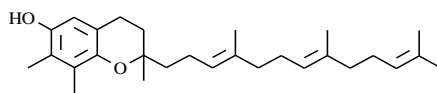
Mono-[17-(1,5-dimetil-heksil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantren-3-il] estar sukcinjske kiseline

Slika 15. Strukture jedinjenja **L1-10** iz trening i test (*) seta (I deo).



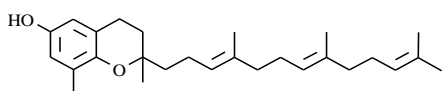
L11

2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-ol



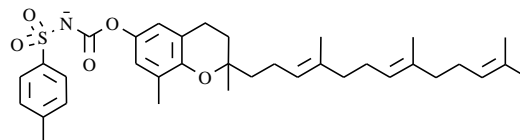
L12

2,7,8-Trimetil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-ol



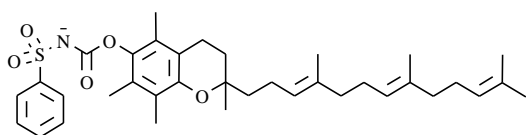
L13*

2,8-Dimetil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-ol



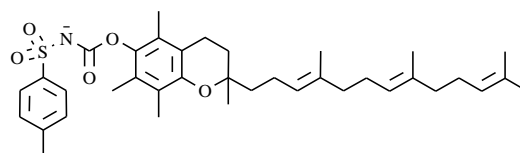
L14

2,8-Dimetil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-il N-(4-metilbenzenesulfonil) karbamat



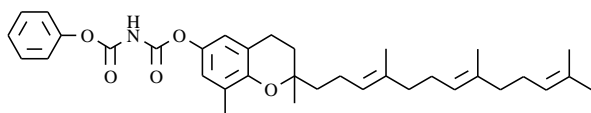
L15

2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-il N-(benzenesulfonil) karbamat



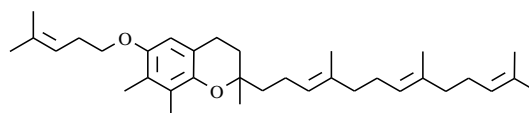
L16*

2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-il N-(4-metilbenzenesulfonil) karbamat



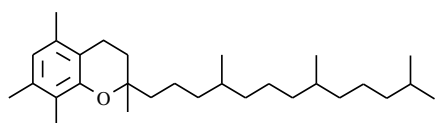
L17

2,8-Dimetil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-il N-(feniloksikarbonil) karbamat



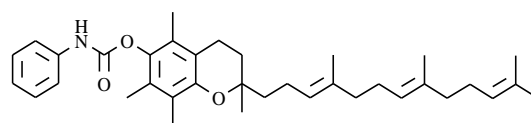
L18

2,7,8-Trimetil-6-(4-metil-pent-3-eniloksi)-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman



L19

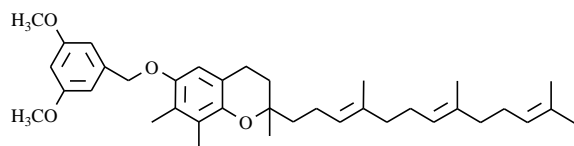
2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-tridecil)-hroman



L20*

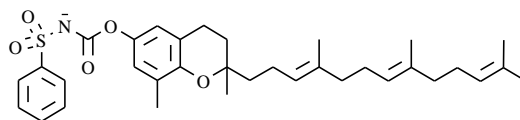
2,5,7,8-Tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-il estar fenil-karbaminske kiseline

Slika 15. Strukture jedinjenja **L11-20** iz trening i test (*) seta (II deo).



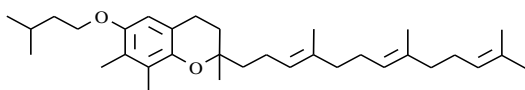
L21

6-(3,5-Dimetoksi-benziloksi)-2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman



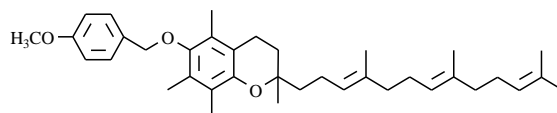
L22

2,8-Dimetil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-il N-(benzenesulfonyl) karbamat



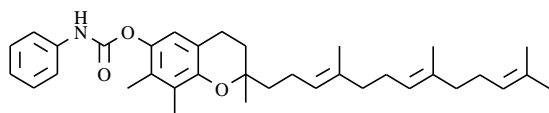
L23*

2,7,8-Trimetil-6-(3-metil-butoksi)-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman



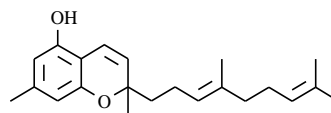
L24*

6-(4-Metoksi-benziloksi)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman



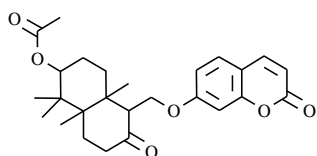
L25

2,7,8-Trimetil-2-(4,8,12-trimetil-trideka-3,7,11-trienil)-hroman-6-il estar fenil-karbaminske kiseline



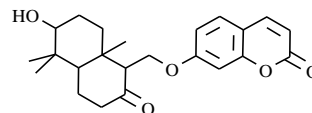
L26*

2-(4,8-Dimetil-nona-3,7-dienil)-2,7-dimetil-2H-hromen-5-ol



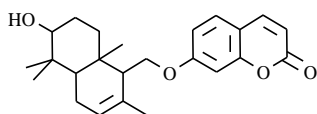
L27

1,1,4a,8a-tetrametil-6-okso-5-(2-okso-2H-hromen-7-iloksimetil)-dekahidro-naftalen-2-il estar sirčetne kiseline



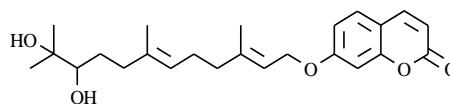
L28*

7-(6-Hidroksi-5,5,8a-trimetil-2-okso-dekahidro-naftalen-1-ilmetoksi)-hromen-2-on



L29

7-(6-Hidroksi-2,5,5,8a-tetrametil-1,4,4a,5,6,7,8,8a-oktahidro-naftalen-1-ilmetoksi)-hromen-2-on



L30

7-(10,11-Dihidroksi-3,7,11-trimetil-dodeka-2,6-dieniloksi)-hromen-2-on

Slika 15. Strukture jedinjenja **L21-30** iz trening i test (*) seta (III deo).

4.1.2. 2D-QSAR

Upotrebom programa SIMCA P+ formirano je nekoliko PLS modela sa različitim setovima varijabli. Selekcija varijabli je vršena na osnovu VIP vrednosti, pri čemu su varijable sa najmanjim VIP vrednostima uklanjane iz modela i računati su novi statistički parametri koji su poređeni sa parametrima prethodnog modela. Ovaj postupak je ponavljan do dobijanja najpovoljnijih vrednosti parametara R^2 i Q^2 . Na ovaj način odabran je optimalan model sa 5 varijabli i jednom latentnom varijablom, odnosno osnovnom komponentom. Statistički parametri 2D-QSAR i 3D-QSAR modela su radi lakšeg poređenja prikazani zajedno u Tabeli 3.

Tabela 3. Statistički parametri 2D-QSAR i 3D-QSAR modela

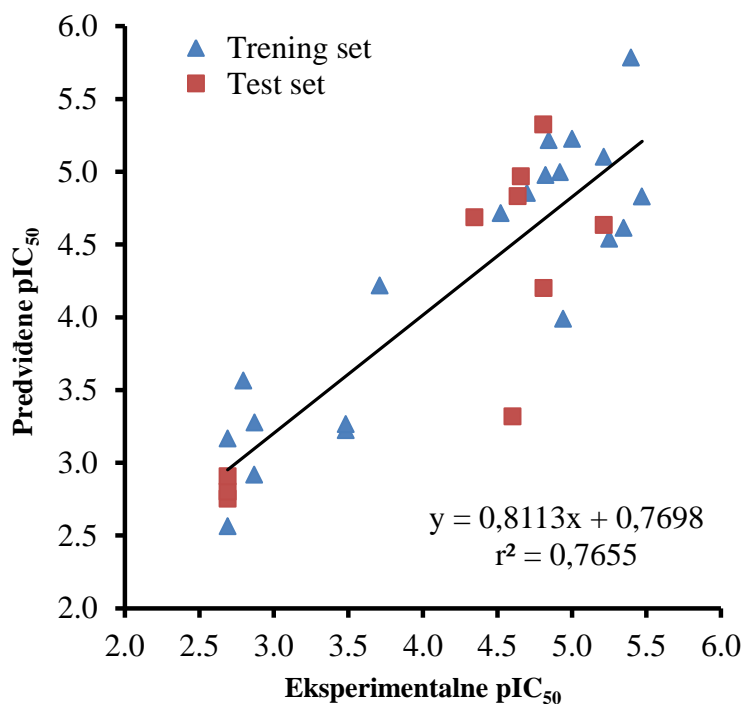
	2D-QSAR	3D-QSAR
parametri interne validacije		
R^2	0,798	0,960
Q^2	0,772	0,830
RMSEE	0,482	0,410
F	28,854	
p	$3,429e^{-006}$	
parametri eksterne validacije		
R^2_{pred}	0,685	0,649
RMSEP	0,542	0,572
r_m^2	0,591	0,611
$r_m'^2$	0,601	0,439
$\overline{r_m^2}$	0,596	0,525
Δr_m^2	0,010	0,172

Dobijene vrednosti parametara 2D-QSAR modela (Q^2 : 0,772; R^2_{pred} : 0,685; $\overline{r_m^2}$: 0,596 i Δr_m^2 : 0,010) pokazuju da je model robustan i da ima dobru moć predviđanja, dok vrednosti F-odnosa: 28,8538 i $p < 0,001$ pokazuju da je model statistički značajan. Eksperimentalne i modelom predviđene vrednosti za sva jedinjenja iz dataseta su prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Eksperimentalne i predviđene (2D- i 3D-QSAR) vrednosti jedinjenja iz dataseta.

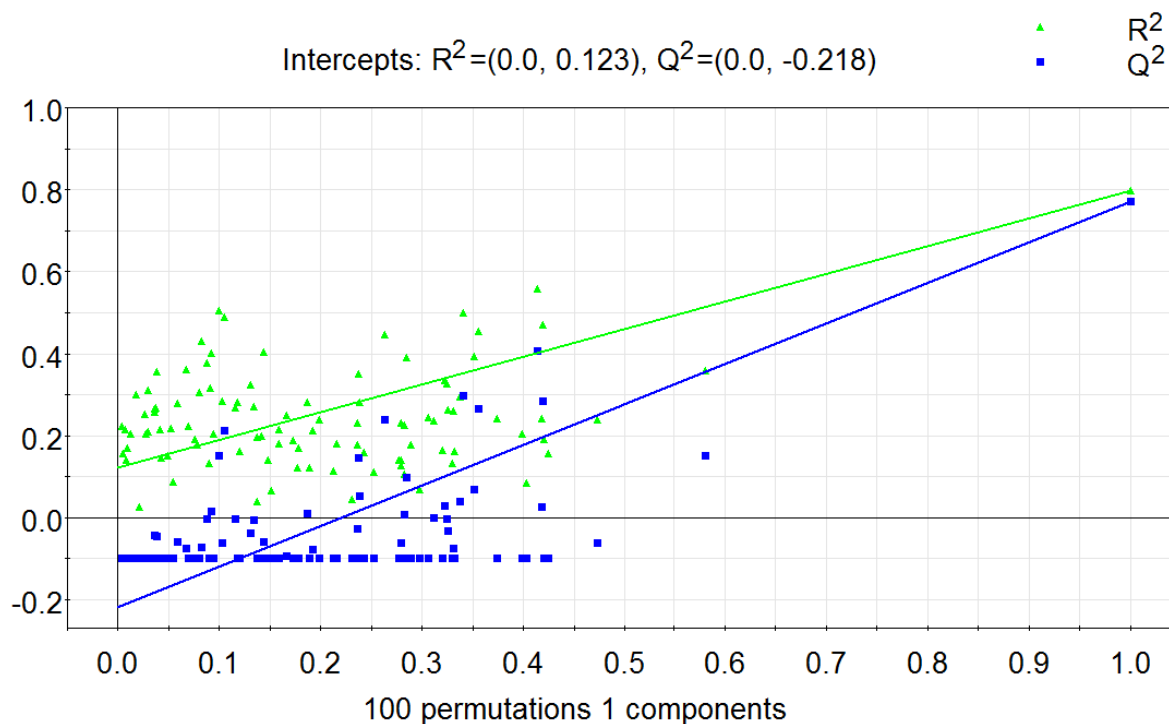
Jedinjenje	Eksperimentalne pIC ₅₀	Predviđene pIC ₅₀ (2D-QSAR)	Residuali	Predviđene pIC ₅₀ (3D-QSAR)	Residuali
Trening set					
L1	3,483	3,224	0,259	3,748	-0,265
L2	4,921	4,997	-0,076	4,629	0,292
L4	3,712	4,217	-0,505	3,556	0,156
L5	5,398	5,784	-0,386	5,462	-0,064
L6	4,824	4,976	-0,152	4,684	0,140
L8	4,523	4,714	-0,191	4,630	-0,107
L9	4,699	4,853	-0,154	4,838	-0,139
L11	2,795	3,565	-0,770	2,954	-0,159
L12	4,943	3,990	0,953	4,357	0,586
L14	2,870	2,917	-0,047	2,874	-0,004
L15	5,347	4,615	0,732	5,270	0,077
L17	5,252	4,540	0,712	5,401	-0,149
L18	2,872	3,276	-0,404	3,155	-0,283
L19	3,483	3,266	0,217	3,414	0,069
L21	2,690	3,166	-0,476	2,720	-0,030
L22	5,215	5,103	0,112	5,386	-0,171
L25	2,690	2,563	0,127	2,664	0,026
L27	5,003	5,225	-0,222	5,176	-0,173
L29	5,471	4,828	0,643	5,017	0,454
L30	4,846	5,218	-0,372	5,137	-0,291
Test set					
L3	4,658	4,969	-0,311	3,814	0,844
L7	4,602	3,318	1,284	3,896	0,706
L10	4,347	4,687	-0,340	4,957	-0,610
L13	4,810	4,201	0,609	4,132	0,678
L16	5,215	4,634	0,581	5,373	-0,158
L20	2,690	2,752	-0,062	3,244	-0,554
L23	2,690	2,801	-0,111	3,062	-0,372
L24	2,690	2,907	-0,217	3,221	-0,531
L26	4,638	4,832	-0,194	4,587	0,051
L28	4,808	5,324	-0,516	5,493	-0,685

Grafik eksperimentalnih u odnosu na 2D-QSAR modelom predviđene vrednosti je predstavljen na Slici 16.



Slika 16. Grafik eksperimentalnih u odnosu na predviđene pIC₅₀ vrednosti za 2D-QSAR model.

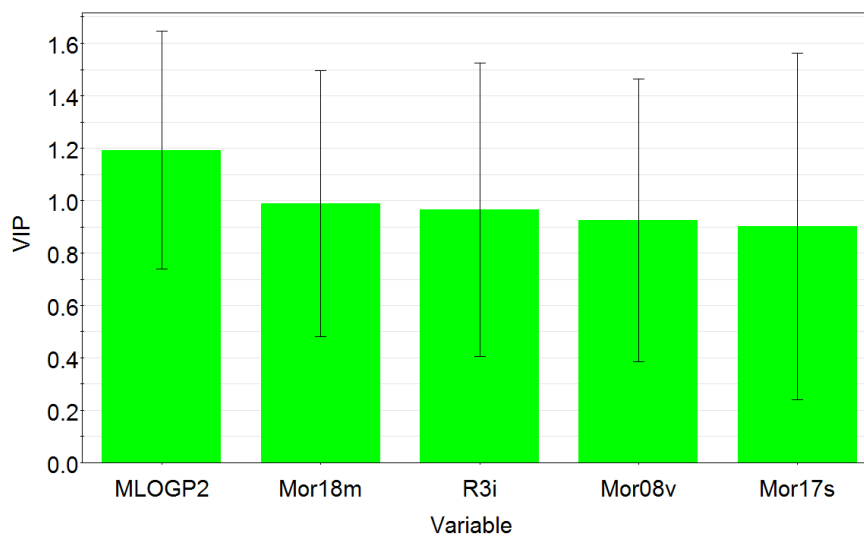
Da bismo potvrdili da su posmatrane vrednosti dovoljno nezavisne jedna od druge sproveden je test Y-randomizacije. Vrednosti odsečaka za R^2 i Q^2 regresione linije koje prolaze kroz centar koordinatnog sistema $R^2 = (0,0; 0,123)$ i $Q^2 = (0,0; -0,218)$ ukazuju da model nije rezultat slučajnih korelacija. Grafički prikaz testa Y-randomizacije je generisan u programu SIMCA P+ i predstavljen je na Slici 17.



Slika 17. Test Y-randomizacije.

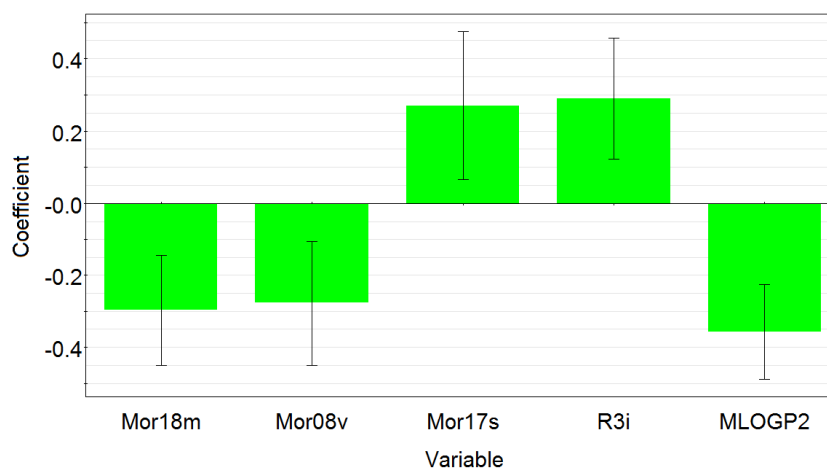
U cilju proveravanja domena primenjivosti 2D-QSAR modela korišćena je besplatno dostupna aplikacija (<http://dtclab.webs.com/software-tools>) koju su razvili Roy i saradnici, a koja kao pristup koristi osnovnu teoriju standardizacije.¹⁷⁵ Aplikacija za računanje domena primenjivosti koristi vrednosti deskriptora koji su odabrani za formiranje finalnog modela. Nakon izračunavanja, utvrđeno je da u trening setu nema autlajera i da se sva jedinjenja iz test seta nalaze u okviru domena primenjivosti modela, što ukazuje na sposobnost modela da pouzdano predviđa aktivnosti jedinjenja iz test seta.

Na osnovu VIP vrednosti odabrani su deskriptori sa najvećim uticajem na antitumorsku aktivnost derivata vitamina E i na osnovu kojih je formiran 2D-QSAR model: MLOGP2, Mor18m, R3i, Mor08v i Mor17s. VIP vrednosti ovih deskriptora su prikazane na Slici 18.



Slika 18. VIP vrednosti deskriptora koji su korišćeni za formiranje 2D-QSAR modela.

Na osnovu vrednosti koeficijenta može se zaključiti da Mor17s i R3i imaju pozitivan uticaj na aktivnost, dok Mor18m, Mor08v i MLOGP2 imaju negativan uticaj na aktivnost (Slika 19).



Slika 19. Koeficijenti deskriptora koji su korišćeni za formiranje 2D-QSAR modela.

MLOGP2, deskriptor sa najvećom VIP vrednošću, predstavlja kvadratni Moriguchi-jev oktanol-voda particioni koeficijent i opisuje lipofilnost jedinjenja.¹⁸⁵

Negativna vrednost koeficijenta ovog deskriptora ukazuje da povećanje lipofilnosti derivata vitamina E dovodi do smanjenja antitumorskog dejstva. Ovaj negativan efekat se može objasniti činjenicom da su tokoferoli i tokotrienoli lipofilna jedinjenja i da dalje povećanje lipofilnosti može dovesti do otežanog prolaska molekula kroz ćelijske barijere. Najaktivnija jedinjenja iz dataseta (**L29** i **L5**) imaju vrednosti MLOGP2 između 10 i 20, dok su kod neaktivnih jedinjenja ove vrednosti iznad 35 (Tabela 5). Jedinjenja **L15**, **L17** i **L22** imaju dobru aktivnost, ali relativno visoke vrednosti MLOGP2, između 26,5 i 30,5 (Tabela 5). Prema tome, na osnovu uticaja ovog deskriptora može se zaključiti da bi smanjenje lipofilnosti, na primer putem uvođenja polarne grupe u molekul ili skraćivanja bočnog lanca u položaju C2, moglo dovesti do povećanja antitumorske aktivnosti.

Deskriptor R3i (*R autocorrelation of lag 3/weighted by ionization potential*) je autokorelacioni deskriptor koji pripada GATEWAY (GEometry, Topology, and Atom-Weights Assembly) grupi Dragon deskriptora.^{186,187} Vrednost koeficijenta ovog deskriptora ukazuje da prisustvo jednog ili više jonizujućih centara u molekuli ima pozitivan uticaj na aktivnost. Visoko aktivno jedinjenje **L6**, koje predstavlja estar sa lizinom (dva jonizujuća centra) ima visoku vrednost ovog deskriptora, dok neaktivno jedinjenje **L27** koje ne poseduje jonizujući centar u strukturi, ima nisku vrednost ovog deskriptora (Tabela 5).

Mor18m, Mor08v i Mor17s su 3D-MoRSE (*Molecular Representation of Structures based on Electronic diffraction*) deskriptori koji su izvedeni iz simulacije IR spektra koristeći generalizovanu difrakcionu funkciju, nazvanu molekulska transformacija. 3D-MoRSE deskriptori su naročito pogodni za opisivanje molekula relativno velikih molekulskih masa, kao što su derivati vitamina E, budući da ne zavise od veličine molekule i mogu se primeniti na veliki broj strukturno različitih jedinjenja.^{188,189}

Mor17s je signal 17 korigovan I-stanjem i ima pozitivan uticaj na aktivnost. Pozitivne vrednosti ovog deskriptora su prisutne kod jedinjenja sa visokom antitumorskom aktivnošću (**L29**, **L30**, **L31**, **L33**), dok neaktivna jedinjenja (**L24**, **L27**) imaju niske (negativne) vrednosti (Tabela 5). Deskriptori Mor18m (signal 18 korigovan atomskom masom) i Mor08v (signal 8 korigovan atomskim van der Waals-ovim

volumenom) su negativno korelisani sa aktivnošću. Naime, većina derivata vitamina E ima relativnu molekulsku masu preko 500, i dalje povećanje mase i zapremine može imati za posledicu manju aktivnost. Jedno od najaktivnijih jedinjenja, **L18**, ima niske vrednosti Mor18m i Mor08v deskriptora, dok su vrednosti oba deskriptora visoke kod neaktivnog jedinjenja **L28** (Tabela 5).

Tabela 5. Vrednosti deskriptora korišćenih za 2D-QSAR studiju.

Jedinjenje	MLOGP2	R3i	Mor18m	Mor08v	Mor17s
L1	38,90	1,798	0,166	1,358	-0,598
L2	2,96	1,338	-0,108	0,779	0,174
L3	19,46	1,935	0,437	0,331	-1,075
L4	30,11	1,823	-0,246	-0,171	-3,767
L5	10,22	1,68	0,282	0,128	-0,907
L6	19,76	2,462	-0,394	0,535	-2,617
L7	36,86	1,857	-0,187	0,235	-1,823
L8	36,12	1,854	0,143	0,877	-2,961
L9	37,91	1,792	-0,531	0,021	-2,929
L10	36,78	2,218	-0,405	0,664	-0,99
L11	35,74	2,126	-0,663	0,582	-3,225
L12	33,44	1,462	0,006	0,572	-1,639
L13	31,19	1,508	-0,092	0,589	-0,577
L14	28,49	1,592	-0,068	0,438	-0,87
L15	30,43	1,482	-0,287	1,099	-0,486
L16	32,41	1,514	-0,079	1,062	-4,767
L17	29,25	1,573	-0,54	0,659	-0,387
L18	46,76	1,543	-0,608	0,254	-1,898
L19	46,92	1,584	-0,401	0,245	-2,042
L20	41,06	1,552	-0,02	0,709	-2,772
L21	37,39	1,553	-0,01	0,535	-2,118
L22	26,59	1,862	0,156	0,704	-2,325
L23	45,36	1,431	0,28	0,501	-3,561
L24	44,28	1,394	-0,097	0,939	-1,998
L25	38,79	1,636	-0,452	0,014	-1,175
L26	20,66	1,563	-0,153	0,698	-4,894
L27	22,07	1,339	-0,144	1,003	-1,867
L28	17,14	1,48	0,281	0,699	-4,318
L29	17,14	1,482	-0,052	0,274	0,676
L30	13,43	1,785	-0,314	0,687	1,48

Na osnovu rezultata 2D-QSAR studije derivata vitamina E se može zaključiti da bi povećanje lipofilnosti, molekulske mase i zapremine imalo negativan uticaj na aktivnost, dok uvođenje jednog ili više jonizujućih centara u molekul putem esterifikacije fenolne grupe sa odgovarajućim kiselinama (dikarboksilne kiseline, aminokiseline ili kiseline koje u lancu poseduju jonizujući centar) vodi ka povećanju antitumorske aktivnosti.

4.1.3. 3D-QSAR

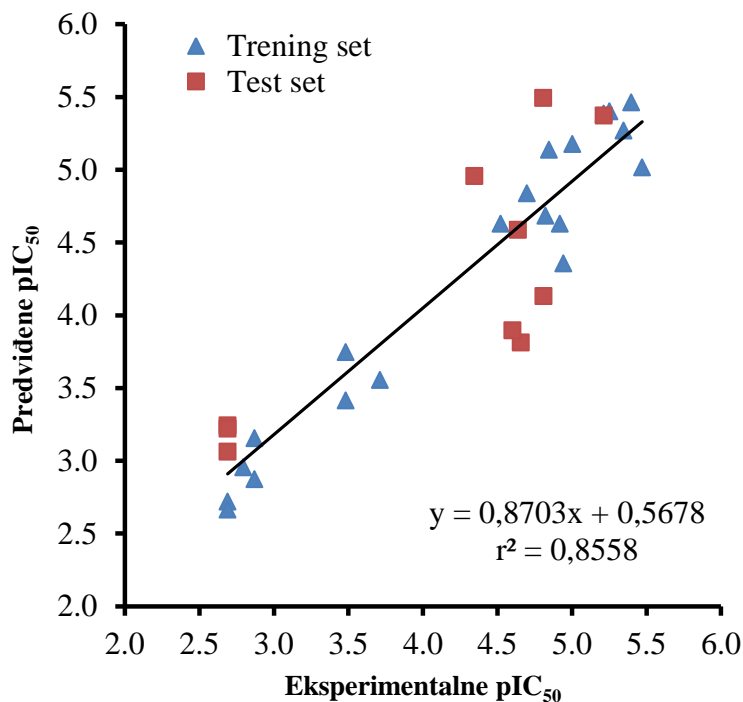
3D-QSAR modelovanje je započeto izračunavanjem GRIND deskriptora iz molekulskih polja interakcija. Inicijalni broj deskriptora je redukovan upotrebom FFD algoritma za selekciju varijabli. Treba naglasiti da je upotrebom ovog algoritma rizik od dobijanja overfitovanog modela kao posledice nepravilnog odabira varijabli mnogo manji nego kod drugih 3D-QSAR modela.¹³³ Kao rezultat, formiran je optimalan model sa dve značajne komponente ili latentne varijable. Statistički parametri modela su prikazani u Tabeli 3.

Vrednosti R^2 : 0,960; Q^2 : 0,830; RMSEE: 0,410; RMSEP: 0,572 i R^2_{pred} : 0,649 ukazuju da formirani 3D-QSAR model ima dobru moć previđanja i da se može koristiti za dizajniranje novih jedinjenja sa unapređenom aktivnošću. Dobijene vrednosti parametara r_m^2 , $r_m'^2$, $\overline{r_m^2}$ koje su veće od 0,5 i vrednosti Δr_m^2 manje od 0,2 dalje potvrđuju kvalitet modela, budući da ovi parametri predstavljaju najstrožije kriterijume eksterne validacije.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4, može se zaključiti da je 3D-QSAR sa visokim stepenom pouzdanosti predvideo aktivnosti jedinjenja iz trening i test seta, pri čemu predviđene pIC₅₀ vrednosti nisu odstupale od eksperimentalnih za više od jedne logaritamske jedinice. U Tabeli 4 se takođe može videti da su oba modela na sličan način i vrlo precizno predvidela aktivnosti jedinjenja **L6, L8, L9, L14, L22, L25 i L26**,

pri čemu predviđene pIC_{50} vrednosti nisu odstupale od eksperimentalnih za više od 0.2 logaritamske jedinice.

Grafički prikaz eksperimentalnih u odnosu na 3D-QSAR modelom predviđene aktivnosti jedinjenja iz trening i test seta je predstavljen na Slici 20.

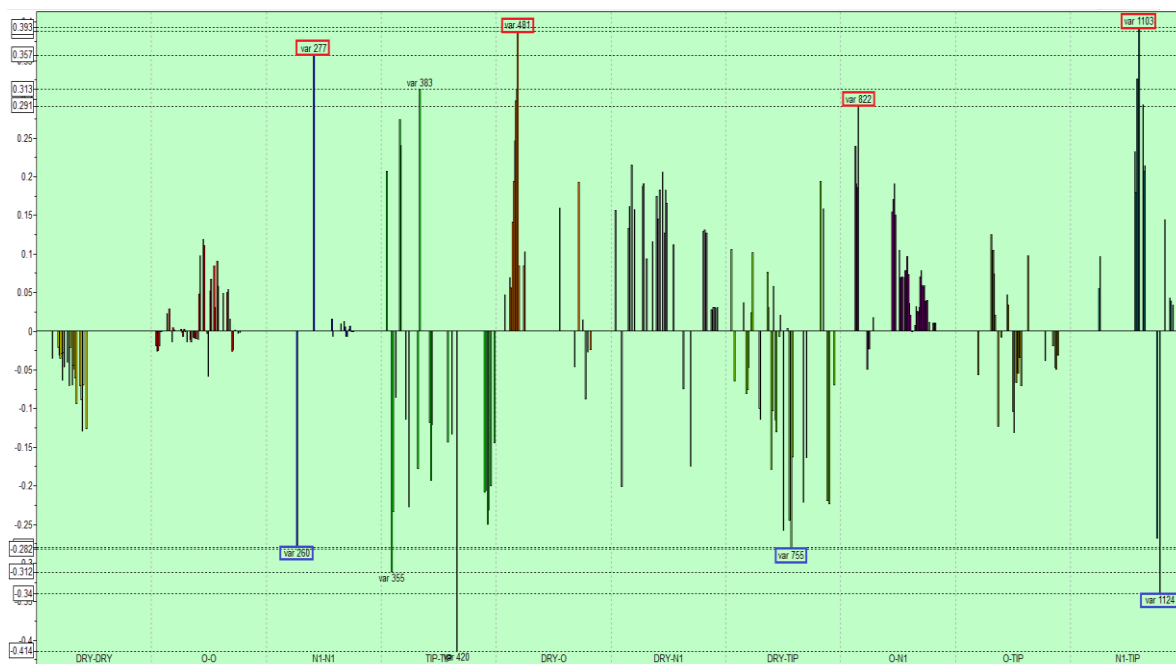


Slika 20. Grafik eksperimentalnih u odnosu na predviđene pIC_{50} vrednosti za 3D-QSAR model.

Bolja moć predviđanja 3D-QSAR modela ($Q^2 = 0,830$) u odnosu na 2D-QSAR model ($Q^2 = 0,772$) je ukazala na to da 3D-QSAR model predstavlja bolji izbor za previđanje aktivnosti dizajniranih jedinjenja. Takođe, 3D-QSAR studija je omogućila bolje razumevanje strukturnih karakteristika koje su bitne za antitumorsko dejstvo analoga vitamina E, što je primenjeno za dizajniranje novih jedinjenja.

Prema histogramu prikazanom na Slici 21, najznačajnije varijable koje imaju pozitivan uticaj na antitumorsku aktivnost derivata vitamina E su: v1103 (N1-TIP),

v481 (DRY-O), v277 (N1-N1), v383 (TIP-TIP) i v822 (O-N1). Najznačajnije varijable sa negativnim uticajem na aktivnost su: v1124 (N1-TIP), v755 (DRY-TIP), v420 (TIP-TIP), v260 (N1-N1) and v355 (TIP-TIP).



Slika 21. Grafik PLS koeficijenta GRIND varijabli. Direktan i inverzan uticaj na aktivnost je indikovano pozitivnim odnosno negativnim vrednostima koeficijenta, redosledom. Markirane su varijable sa najvećim uticajem na aktivnost.

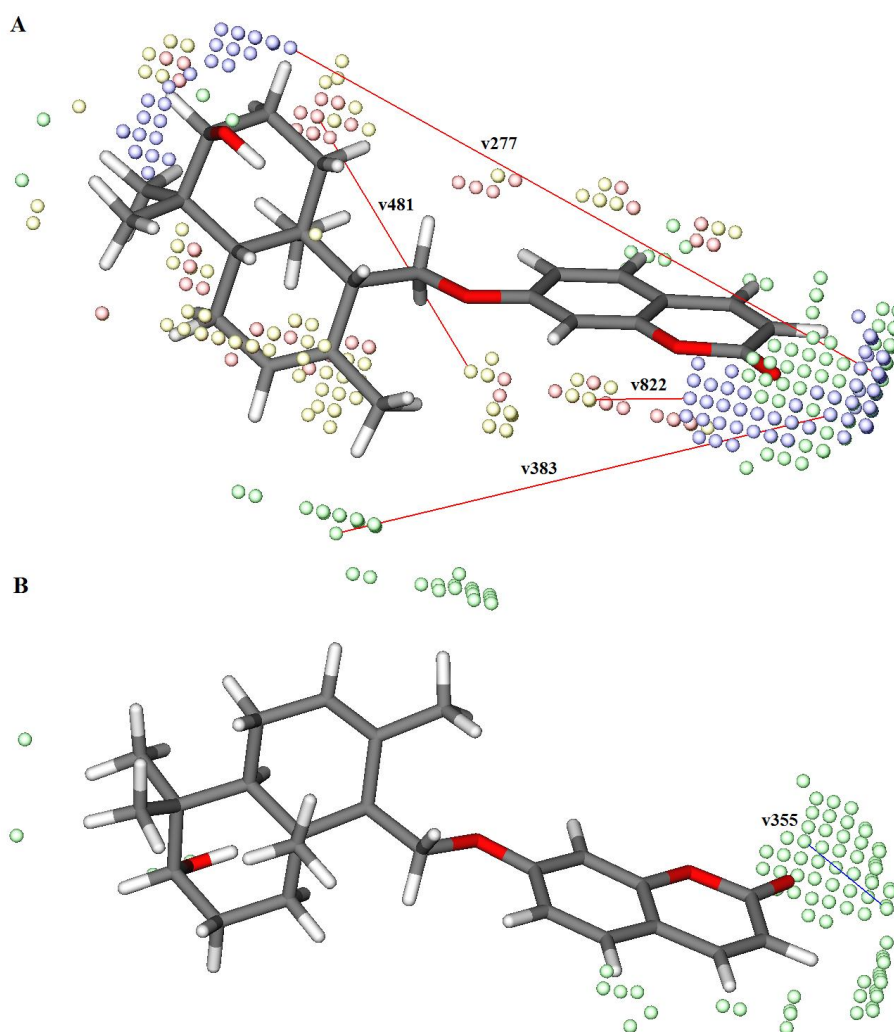
Detaljan opis GRIND varijabli sa najvećim uticajem na antitumorsku aktivnost je predstavljen u Tabeli 6.

Tabela 6. Sumarni prikaz najznačajnijih GRIND varijabli sa pozitivnim i negativnim uticajem na antitumorsku aktivnost.

Varijabla	Par nodova	Rastojanje [Å]	Utica j	Komentar
v260	N1-N1	12,0-12,4	-	Dva akceptora vodonične veze na rastojanju manjem od optimalnog, opisanog varijablom v277.
v277	N1-N1	18,8-19,2	+	Optimalna razdaljina između dva karbonilna kiseonika (L5,L6) ili između karbonilnog kiseonika i hidroksilne grupe (L29). Izražena kod većine aktivnih jedinjenja.
v355	TIP-TIP	4,0-4,4	-	Dva sterna mesta na manjoj razdaljini od optimalne opisane varijablom v383.
v383	TIP-TIP	15,2-15,6	+	Kod većine jedinjenja predstavlja optimalnu razdaljinu između dva sterna u mesta u hromanskom prstenu i estarskom lancu na C6.
v420	TIP-TIP	30,0-30,4	-	Dva sterna mesta na većoj razdaljini od optimalne, opisane varijablom v383.
v481	DRY-O	8,4-8,8	+	Kod većine jedinjenja je formirana između hidrofobnog domena oko hromanskog prstena i donora vodonične veze u estarskom lancu na C6. Izražena kod svih jedinjenja osim L11.
v755	DRY-TIP	26,0-26,4	-	Rastojanje između hidrofobnog domena oko hromanskog prstena i sternog mesta na kraju izoprenskog lanca. Dobro izražena kod jedinjenja sa niskom aktivnošću.
v822	O-N1	6,8-7,2	+	Donor i akceptor vodonične veze na malom rastojanju u estarskom lancu esterifikovanih derivata.
v1103	N1-TIP	27,2-27,6	+	Optimalna razdaljina između karbonilnog kiseonika u estarskom lancu i sternog mesta na kraju izoprenskog lanca. Izražena u skoro svim aktivnim jedinjenjima.
v1124	N1-TIP	35,6-36,0	-	Rastojanje između akceptora vodonične veze u estarskom lancu na C6 i sternog mesta na kraju izoprenskog lanca.

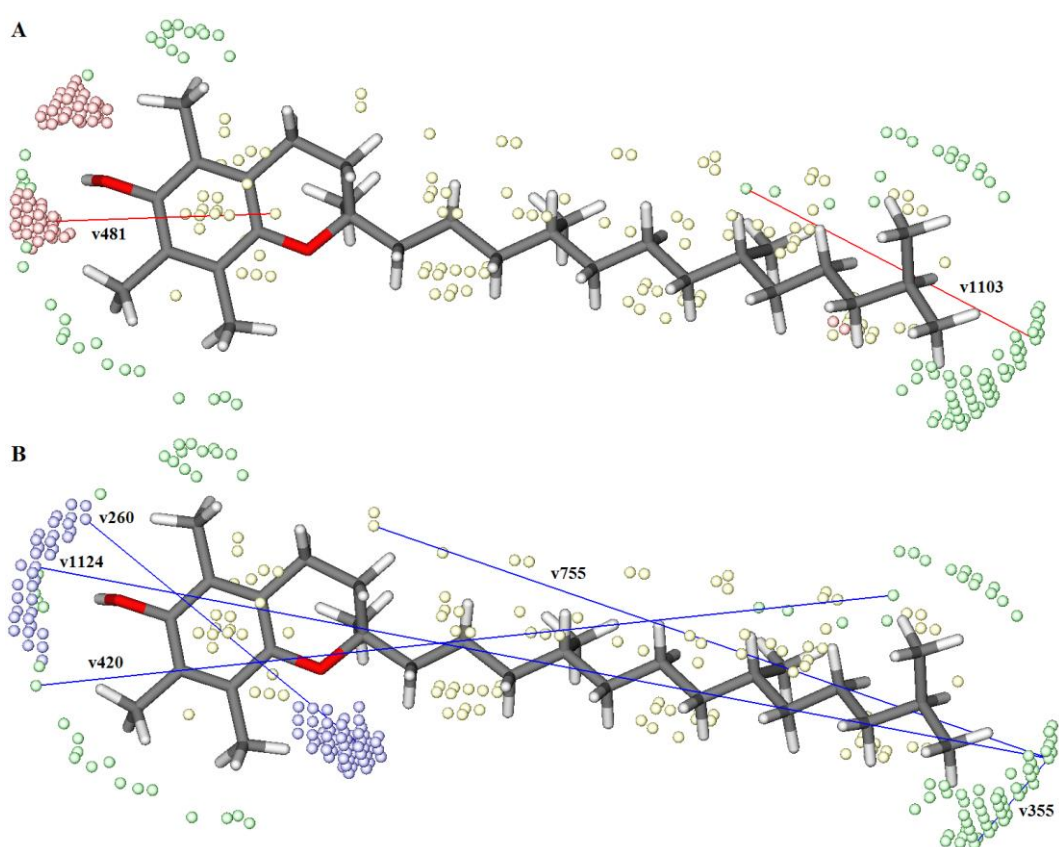
3D-QSAR studijom su dva akceptora vodoničnih veza na određenoj razdaljini u molekuli identifikovana kao grupe koje imaju značajan uticaj na biološku aktivnost

(v277: N1-N1). Ove grupe su prisutne kod najaktivnijih jedinjenja **L5**, **L6**, **L29** (Slika 22A) i predstavljene su sa karbonilnim kiseonikom i hidroksilnom grupom kod jedinjenja **L29**, odnosno sa dva karbonilna kiseonika kod jedinjenja **L5** i **L6**.



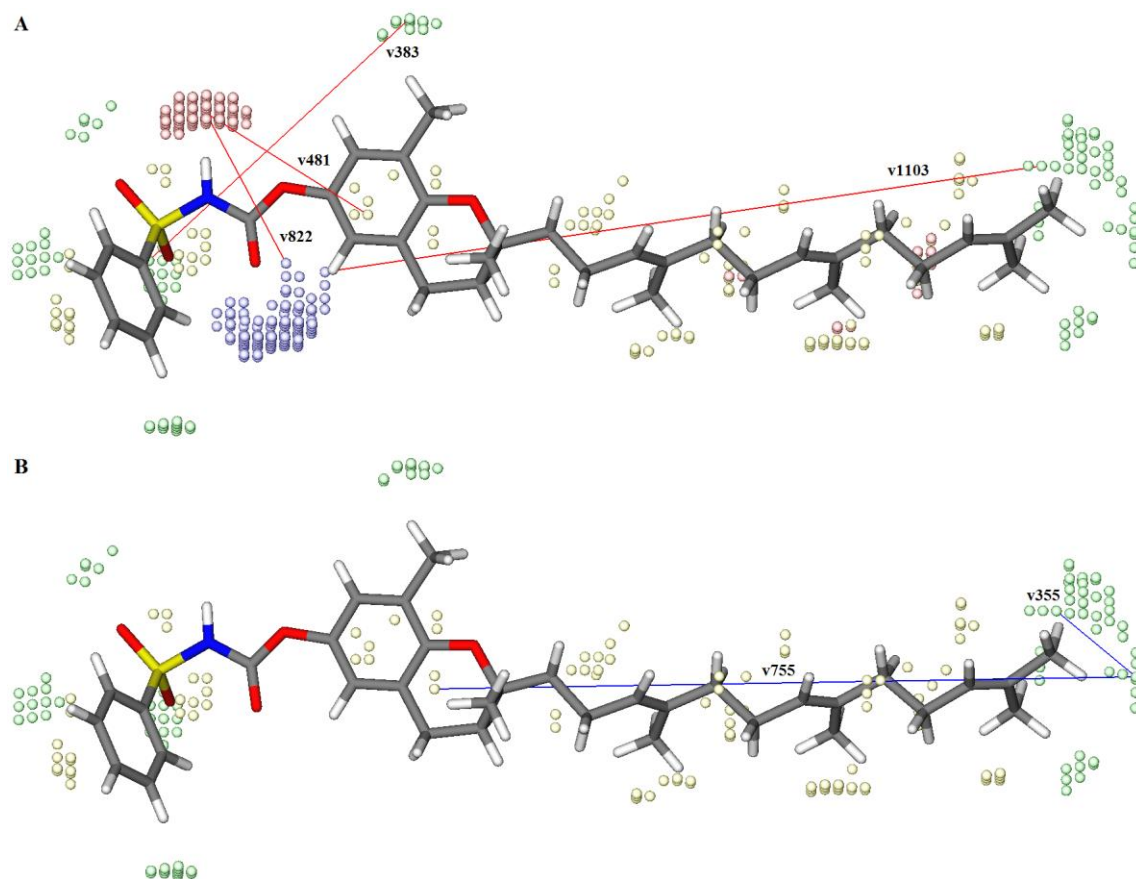
Slika 22. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja **L29** ($pIC_{50}=5,471$). Varijable sa pozitivnim uticajem na aktivnost su prikazane pod (A), a varijable sa negativnim uticajem na aktivnost pod (B). Hidrofobni regioni (DRY) su predstavljeni u žutom, sterna mesta (TIP) u zelenom, donori H-veze (O) u rozom i akceptori H-veze (N1) u plavom.

Prema modelu, optimalno rastojanje između akceptora vodoničnih veza opisanih varijablom v277 je 18,8-19,2 Å. Kraće rastojanje između ovih grupa vodi ka smanjenju aktivnosti, što je opisano varijablom v260: N1-N1. To je razlog smanjene aktivnosti nesupstituisanih tokoferola i tokotrienola (**L1**, **L11**), kod kojih je fenolna grupa na razdaljini 12,0-12,4 Å od hromanskog kiseonika (Slika 23B). Prema tome, esterifikacija fenolne grupe na C6 i uvođenje akceptora vodonične veze na C2 bi moglo dovesti do povećanja aktivnosti novih derivata vitamina E.



Slika 23. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja **L1** ($pIC_{50}=3,483$). Varijable sa pozitivnim uticajem na aktivnost su prikazane pod (A), a varijable sa negativnim uticajem na aktivnost pod (B). Hidrofobni regioni (DRY) su predstavljeni u žutom, sterna mesta (TIP) u zelenom, donori H-veze (O) u rozom i akceptori H-veze (N1) u plavom.

Kod skoro svih jedinjenja, prisustvo dva sterna centra na razdaljini 15,2-15,6 Å, što opisuje varijabla v383: TIP-TIP, je važno za visoku aktivnost (Slika 22A i Slika 24A). Smanjenje (**L1**, **L14**, **L19**) ili povećanje (**L11**, **L18**, **L25**) razdaljine između ovih sternih mesta ima negativan uticaj na aktivnost, što opisuju TIP-TIP varijable v355 i v420 (Slika 22B, Slika 23B i Slika 24B).



Slika 24. 3D-QSAR farmakoforni prikaz jedinjenja **L22** ($pIC_{50}=5,215$). Varijable sa pozitivnim uticajem na aktivnost su prikazane pod (A), a varijable sa negativnim uticajem na aktivnost pod (B). Hidrofobni regioni (DRY) su predstavljeni u žutom, sterna mesta (TIP) u zelenom, donori H-veze (O) u rozom i akceptori H-veze (N1) u plavom.

Kod aktivnih jedinjenja kao što su **L5**, **L6**, **L17** i **L22**, varijabla sa pozitivnim uticajem na aktivnost v481: DRY-O je formirana između hidrofobnog regiona oko hromanskog prstena i donora vodonične veze lociranog u estarskom lancu na C6 (Slika 24A). Kod jedinjenja **L15**, v481: DRY-O je formirana između hidrofobnog regiona oko benzenovog prstena i –NH grupe, oboje smeštenih u estarskom lancu na C6. To ukazuje da prisustvo hidrofobnog regiona i donora vodonične veze na razdaljini 8,4-8,8 Å u estarskom lancu, ima pozitivan uticaj na aktivnost.

Varijabla sa negativnim uticajem na aktivnost, v755: DRY-TIP, nije prisutna kod najaktivnijeg jedinjenja **L29**. Kod jedinjenja sa slabijom aktivnošću (**L1**, **L11**, **L18**, **L19**) ova varijabla predstavlja razdaljinu između hidrofobnog regiona oko hromanskog prstena i sternog mesta na kraju fitilnog bočnog lanca na C2 (Slika 23B). Prema tome, strukturna modifikacija bočnog lanca na položaju C2 bi mogla dovesti do povećanja aktivnosti derivata vitamina E.

Prisustvo donora vodonične veze i akceptora vodonične veze na maloj razdaljini od 6,8-7,2 Å u estarskom lancu na C6 (v822: O-N1) poboljšava antitumorsku aktivnost derivata tokoferola i tokotrienola (**L5**, **L15**, **L17**, **L22**). Kod ovih jedinjenja je varijabla v822 formirana između karbonilnog kiseonika i –NH grupe koje se nalaze u estarskom lancu na položaju C6 (Slika 24A).

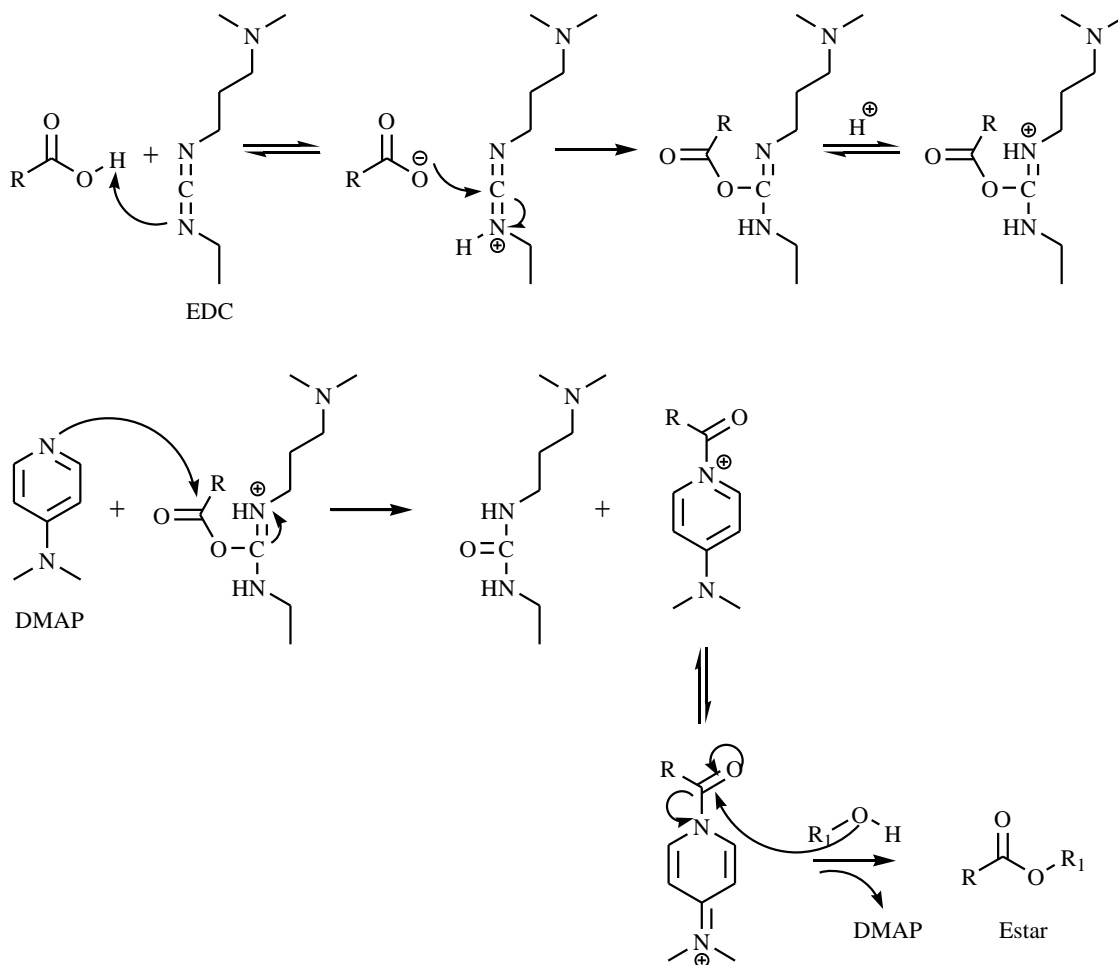
Optimalna razdaljina od 27,2-27,6 Å (predstavljena varijablom v1103: N1-TIP) između karbonilnog kiseonika u estarskom lancu na C6 i sternog mesta na kraju ugljovodoničnog lanca na C2 (Slika 24A) je prisutna kod jedinjenja sa visokom aktivnošću (**L2**, **L15**, **L17**, **L22**). Antitumorska aktivnost opada sa povećanjem optimalne razdaljine između akceptora vodonične veze u estarskom lancu na položaju C6 i sternog mesta na kraju bočnog lanca na položaju C2, što opisuje varijabla v1124: N1-TIP.

4.2. SINTEZA I FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ESTARA α -TOKOFEROLA I γ -TOKOTRIENOLA

4.2.1. Sinteza estara α -tokoferola i γ -tokotrienola upotrebom EDC/DMAP uslova reakcije

Šema sinteze estara α -tokoferola i γ -tokotrienola prikazana je u odeljku *Eksperimentalni deo* na Šemama 2-5. U dvostepenoj proceduri sintetisana su 4 estra α -tokoferola sa aminokiselinama lizinom, prolinom, glutaminom, asparaginom i 3 estra γ -tokotrienola sa aminokiselinama lizinom, prolinom i glutaminom.

Prvu fazu sinteze predstavlja reakcija kuplovanja α -tokoferola i γ -tokotrienola sa odgovarajućim Cbz-zaštićenim aminokiselinama, upotrebom Steglich-ovog metoda esterifikacije.¹⁹⁰ Ovaj metod se zasniva na upotrebi *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC) kao kuplujućeg agensa i *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) kao katalizatora. Karboksilna grupa reaguje sa DCC-om pri čemu nastaje *O*-acilizourea, međuproizvod koji ima sličnu reaktivnost kao i odgovarajući anhidrid karboksilne kiseline. *O*-acilizourea zatim reaguje sa alkoholom pri čemu nastaje dicikloheksilurea (DHU) i odgovarajući estar. Reakcija je spora i zbog toga se dodaje DMAP kao katalizator. DMAP, kao jači nukleofil od alkohola, reaguje sa *O*-acilizouream pri čemu nastaje reaktivni amid ili takozvani aktivni estar. Ovaj međuproizvod reaguje brzo sa alkoholom, dajući estar. Najveći nedostatak ovog metoda esterifikacije je teško prečišćavanje reakcione smeše, budući da je nastala DHU nedovoljno rastvorljiva i u polarnim i u nepolarnim rastvaračima i često se u tragovima javlja u finalnom proizvodu. U ovoj doktorskoj disertaciji, za sintezu estara vitamina E je korišćen EDC kao kuplujući agens koji je polarniji od DCC-a. Ono što je značajno, derivat uree koji nastaje u toku reakcije je polaran i lako može biti uklonjen ekstrakcijom sa vodom. Mehanizam kuplovanja sa EDC-om je isti kao i kod kuplovanja sa DCC-om i predstavljen je na Šemi 7.

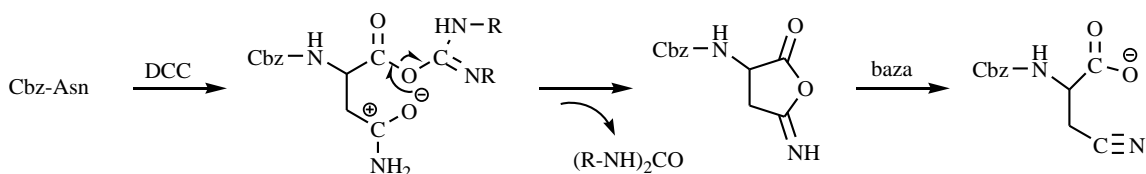


Šema 7. Mehanizam EDC/DMAP kuplovanja.

U ranijoj studiji praćen je uticaj koncentracije reaktanata (kiselina, alkohola i katalizatora) na reakciju esterifikacije i formiranje derivata uree kao sporednog proizvoda.¹⁹¹ Rezultati ove studije su pokazali da je optimalan molarni odnos reaktanata kiselina/alkohol/katalizator: 0,01/0,022/0,005, i taj odnos je primenjen za sintezu estara α -tokoferola i γ -tokotrienola sa aminokiselinama.

Poznato je da asparagin i glutamin podležu reakcijama formiranja nitrila putem dehidratacije karboksamidnog bočnog lanca, kada se koriste karbodiimidi kao kuplujući agensi.¹⁹² Kada je u pitanju asparagin ova reakcija je gotovo isključiva, pa je estar α -tokoferola sa asparaginom pripremljen u formi nitrila. Dehidratacija glutamina se dešava u manjem stepenu, pa su uspešno, iako u nižem prinosu, izolovani estri

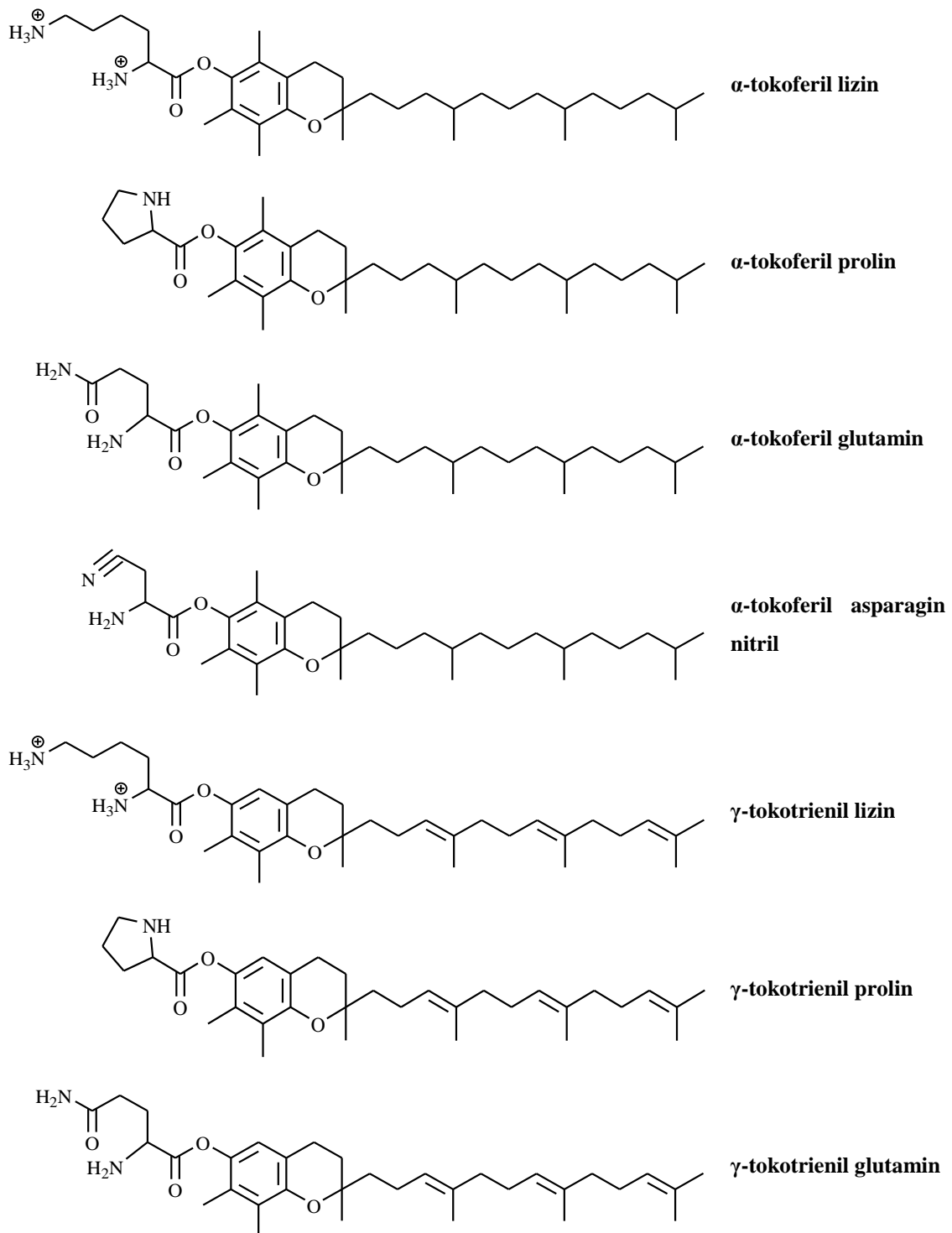
glutamina sa amidnim bočnim lancem. Mehanizam dehidratacije asparagina i formiranje nitrila u prisustvu karbodiimida (DCC) je prikazan na Šemi 8.



Šema 8. Dehidratacija asparagina u prisustvu DCC-a.

U drugoj fazi sinteze katalitičkom hidrogenacijom su uklonjene zaštitne Cbz-grupe kuplovanih proizvoda, uz upotrebu 10% Pd/C kao katalizatora. Hidrogenacija estara γ -tokotrienola je pažljivo praćena zbog postojanja rizika od redukcije dvostrukih veza. Uzorci reakcione smeše su sakupljeni u intervalima od 30 minuta i analizirani upotrebom TLC, HPLC i NMR metoda. Nađeno je da je optimalno vreme hidrogenacije 2 h, što predstavlja vreme u toku kojeg ne dolazi do redukcije dvostrukih veza, a u isto vreme obezbeđuje zadovoljavajući prinos finalnog proizvoda (estra sa eliminisanom Cbz-grupom).

Estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa lizinom su izolovani kao soli hidrohloridi nakon acidifikacije sa rastvorom hlorovodonične kiseline u suvom dietil etru i filtriranjem nastalog precipitata. Sa ostalim sintetisanim estrima nije došlo do izdvajanja precipitata, tako da su oni izolovani kao slobodni amini prečišćavanjem reakcione smeše, upotrebom TLC i kolonske hromatografije. Mobilne faze koje su korišćene za prečišćavanje pojedinačnih estara su navedene u odeljku *Eksperimentalni deo*. Strukture sintetisanih estara su prikazane na Slici 25.



Slika 25. Strukture sintetisanih estara α -tokoferola i γ -tokotrienola.

4.2.2. Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih estara i njihovih intermedijera

Strukture sintetisanih jedinjenja potvrđene su upotrebom ATR-FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS TOF i MS-MS spektroskopskih metoda:

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-yl 2,6-di([(benziloksi)karbonil]amino)heksanoat (α -tokoferil di-Cbz-lizin). Prinos: 86%; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0,84-0,88 (m, 12H), 1,08-2,17 (m, 29H), 1,23 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,56-2,58 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 4,65 (m, 1H), 5,08-5,12 (m, 4H), 7,30-7,34 (m, 10H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11,81; 12,11; 12,96; 19,68; 19,75; 20,59; 21,02; 22,62; 22,71; 24,44; 24,79; 27,98; 29,40; 29,69; 31,03; 31,92; 32,18; 32,69; 32,79; 37,28; 37,38; 37,46; 37,56; 39,38; 40,53; 53,83; 66,70; 67,10; 75,13; 117,52; 123,20; 124,78; 126,51; 128,10; 128,19; 128,50; 128,53; 136,19; 136,55; 140,14; 149,63; 156,14; 156,53; 171,12; MS m/z : 827,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 783,51; 430,11; 691,40; 164,78; 173,79; 719,44.

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2,6-diaminoheksanoat hidrohlorid (α -tokoferil lizin hidrohlorid). Prinos: 82%; IR (ATR) cm^{-1} : 1764,4; 3385,3; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0,83-0,88 (m, 12H), 1,08-2,16 (m, 29H), 1,18 (s, 3H), 1,90 (s, 3H), 1,93 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 2,52-2,60 (m, 2H), 3,02-3,15 (m, 2H), 3,87 (m, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11,74; 12,11; 12,95; 19,63; 20,52; 20,70; 21,01; 22,60; 22,67; 23,74; 24,42; 24,76; 27,58; 27,93; 29,64; 30,93; 32,74; 33,17; 37,25; 37,40; 39,33; 39,77; 53,68; 75,03; 117,44; 123,03; 124,79; 126,49; 140,21; 149,46; 173,77; MS m/z : 559,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 84,15; 542,51; 129,06; 56,16; HRMS: izračunato za $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 559,48332, nađeno 559,48060.

1-benzil-2-(2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il)-pirolidin-1,2-dikarboksilat (α -tokoferil Cbz-prolin). Prinos: 69%; ^1H

NMR (CDCl₃) δ : 0,83-0,87 (m, 12H), 1,08-1,61 (m, 21H), 1,23 (s, 3H), 1,73-1,92 (m, 4H), 2,05 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,29-2,41 (m, 2H), 2,54-2,60 (m, 2H), 3,56-3,70 (m, 2H), 4,67-4,74 (m, 1H), 5,02-5,30 (m, 2H), 7,29-7,38 (m, 5H); **¹³C NMR (CDCl₃)** δ : 11,79; 11,83; 12,69; 19,60; 19,70; 20,59; 21,05; 22,64; 22,73; 23,51; 24,46; 24,83; 27,99; 29,29; 30,16; 31,14; 32,72; 32,79; 37,31; 37,41; 37,43; 37,47; 39,40; 47,01; 59,30; 75,10; 117,42; 123,09; 124,85; 126,57; 127,81; 127,99; 128,10; 128,46; 136,76; 140,37; 149,52; 154,89; 171,29; **MS m/z**: 662,4 [M+H]⁺, 526,41; 164,92; 430,26; 305,92; 90,99; 618,49.

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il pirolidin-2-karboksilat (α -tokoferil prolin). **Prinos**: 78%; **IR (ATR) cm⁻¹**: 1763,5; 3360,2; **¹H NMR (MeOD)** δ : 0,87-0,90 (m, 12H), 1,12-2,13 (m, 23H), 1,24 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,16-2,25 (m, 2H), 2,37-2,42 (m, 1H), 2,60-2,63 (m, 2H), 2,65-2,70 (m, 1H), 3,47-3,52 (m, 2H), 4,84-4,88 (m, 1H); **¹³C NMR (MeOD)** δ : 10,70; 10,91; 11,78; 18,84; 18,90; 20,15; 20,68; 21,69; 21,78; 23,40; 24,06; 24,52; 27,76; 28,53; 32,39; 32,44; 32,53; 36,89; 36,97; 37,01; 37,09; 39,17; 45,68; 59,44; 75,00; 117,72; 122,84; 126,14; 140,04; 149,65; 168,22; **MS m/z**: 528,1 [M+H]⁺, 70,48; 165,45; 149,15; 527,30; 431,56; 136,99; **HRMS**: izračunato za C₃₄H₅₇NO₃ [M+H]⁺ 528,44112, nađeno 528,44130.

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2-((benziloksikarbonil)amino)-4-karbamoilbutanoat (α -tokoferil Cbz-glutamin). **Prinos**: 38%; **¹H NMR (CDCl₃)** δ : 0,84-0,87 (m, 12H), 1,07-1,71 (m, 21H), 1,23 (s, 3H), 1,72-1,82 (m, 2H), 1,95 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,16-2,19 (m, 1H), 2,41-2,49 (m, 3H), 2,56-2,59 (m, 2H), 4,67 (m, 1H), 5,09-5,17 (m, 2H), 7,32-7,36 (m, 5H); **¹³C NMR (CDCl₃)** δ : 11,83; 12,15; 12,99; 19,63; 19,77; 20,60; 21,05; 22,64; 22,73; 24,45; 24,83; 27,99; 28,44; 29,70; 31,20; 31,93; 32,72; 32,79; 37,31; 37,37; 37,40; 37,49; 37,58; 39,39; 53,82; 67,20; 75,18; 117,56; 123,24; 124,77; 126,44; 128,13; 128,26; 128,35; 128,57; 136,18; 140,14; 149,70; 156,51; 170,71; 174,26; **MS m/z**: 693,4 [M+H]⁺, 557,35; 649,43; 430,14; 164,84; 173,88; 275,86.

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2-amino-4-karbamoilbutanoat (α-tokoferil glutamin). **Prinos:** 68%; **IR (ATR) cm⁻¹:** 1644,1; 1734,4; 3321,8; **¹H NMR (MeOD) δ:** 0,87-0,90 (m, 12H), 1,11-1,56 (m, 21H), 1,26 (s, 3H), 1,80-1,83 (m, 2H), 1,99 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,17-2,20 (m, 2H), 2,49-2,53 (m, 2H), 2,62-2,65 (m, 2H), 3,86-3,90 (m, 1H); **¹³C NMR (MeOD) δ:** 10,67; 10,97; 11,85; 18,81; 18,86; 20,17; 20,71; 21,66; 21,75; 24,05; 24,51; 27,76; 28,17; 29,31; 29,70; 30,72; 31,24; 32,53; 37,00; 37,05; 37,09; 37,13; 39,16; 54,68; 74,84; 117,51; 122,55; 124,80; 126,34; 140,39; 149,25; 173,31; 176,39; **MS m/z:** 559,5 [M+H]⁺, 275,95; 84,03; 164,95; 541,47; 101,01; 263,87; **HRMS:** izračunato za C₃₄H₅₈N₂O₄ [M+H]⁺ 559,44693, nađeno 559,44685.

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2-((benziloksikarbonil)amino)-3-cijanopropanoat (α-tokoferil Cbz-asparagin nitril). **Prinos:** 31%; **¹H NMR (CDCl₃) δ:** 0,83-0,87 (m, 12H), 1,05-2,01 (m, 21H), 1,24 (s, 3H), 1,73-1,83 (m, 2H), 2,04 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,57-2,63 (m, 2H), 3,20-3,24 (m, 2H), 4,85-4,89 (m, 1H), 5,17 (m, 2H), 7,33-7,38 (m, 5H); **¹³C NMR (CDCl₃) δ:** 11,83; 12,20; 13,04; 19,69; 19,76; 20,61; 21,03; 21,81; 22,62; 22,71; 24,45; 24,80; 27,98; 30,88; 32,70; 32,80; 37,31; 37,36; 37,40; 37,43; 37,47; 37,57; 39,39; 50,8; 67,68; 75,31; 115,94; 117,74; 123,49; 126,25; 128,21; 128,46; 128,65; 135,65; 140,05; 150,05; 155,55; 167,39; **MS m/z:** 661,1 [M+H]⁺, 304,64; 164,90; 91,10; 569,08; 344,73; 136,93.

2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2-amino-3-cijanopropanoat (α-tokoferil asparagin nitril). **Prinos:** 28%; **IR (ATR) cm⁻¹:** 1753,1; 2159,3; 3292,1; **¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ:** 0,81-0,85 (m, 12H), 1,06-1,53 (m, 21H), 1,19 (s, 3H), 1,73-1,75 (m, 2H), 1,92 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,55-2,58 (m, 2H), 2,95-2,98 (m, 2H), 4,03-4,06 (m, 1H); **¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ:** 12,03; 12,30; 13,15; 20,04; 20,10; 20,39; 20,84; 22,93; 23,02; 23,40; 24,16; 24,60; 27,84; 31,08; 32,39; 32,47; 36,98; 37,07; 37,14; 37,18; 37,21; 37,35; 39,23; 51,62; 75,34; 117,92;

118,90; 122,37; 125,37; 126,75; 140,47; 149,24; 171,89; **MS m/z**: 527,1 [M+H]⁺, 261,40; 165,43; 430,84; 149,14; 136,93; 119,23; **HRMS**: izračunato za C₃₃H₅₄N₂O₃ [M+H]⁺ 527,42072, nađeno 527,41897.

2,7,8-trimetil-2-((3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il-2,6-di((benziloksikarbonil)amino)heksanoat (γ-tokotrienil di-Cbz-lizin). **Prinos**: 83%; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,26 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,63 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,53-2,13 (m, 20H), 1,99 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,69 (m, 2H), 3,21 (m, 2H), 4,59-4,60 (m, 1H), 5,08-5,15 (m, 7H), 6,54 (s, 3H), 7,33-7,34 (m, 10H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 11,95; 12,67; 15,92; 16,02; 17,69; 22,20; 22,44; 24,08; 25,70; 26,62; 26,78; 29,45; 31,03; 32,27; 39,70; 39,73; 40,05; 40,56; 53,85; 66,70; 67,12; 75,90; 118,54; 118,57; 124,19; 124,22; 124,43; 126,03; 126,87; 128,10; 128,13; 128,21; 128,52; 128,55; 131,25; 134,99; 135,25; 136,23; 136,60; 141,26; 149,74; 156,09; 156,54; 171,54; **MS m/z**: 807,3 [M+H]⁺, 763,48; 719,44; 84,17; 90,87.

2,7,8-trimetil-2-((3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2,6-diaminoheksanoat hidrohlorid (γ-tokotrienil lizin hidrohlorid). **Prinos**: 78%; **IR (ATR) cm⁻¹**: 1765,9; 3396,4; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1,23 (s, 3H), 1,54 (s, 3H), 1,54 (s, 3H), 1,56 (s, 3H), 1,63 (s, 3H), 1,07-2,04 (m, 20H), 1,98 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,69 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 4,29 (m, 1H), 5,06-5,13 (m, 3H), 6,71 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 12,18; 12,98; 16,08; 16,27; 18,01; 21,87; 22,17; 22,97; 24,21; 25,95; 26,41; 26,66; 28,92; 29,85; 30,87; 38,64; 40,44; 40,65; 40,76; 52,20; 76,27; 119,04; 119,31; 124,35; 124,59; 124,64; 125,44; 127,12; 131,07; 134,81; 134,87; 141,20; 149,68; 172,39; **MS m/z**: 539,4 [M+H]⁺, 129,06; 84,10; 521,51; 111,09; **HRMS**: izračunato za C₃₄H₅₄N₂O₃ [M+H]⁺ 539,42072, nađeno 539,41883.

1-benzil-2-((2,7,8-trimetil-2-((3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il)-pirolidin-1,2-dikarboksilat (γ-tokotrienil Cbz-prolin). **Prinos**: 72%; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,26 (s, 3H), 1,59 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,63-2,18 (m, 16H), 2,04 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,19-2,27 (m, 1H), 2,35-2,39 (m, 1H), 2,63-2,72 (m, 2H), 3,55-3,71 (m, 2H), 4,58-4,65 (m, 1H), 5,09-5,21

(m, 5H), 6,60 (s, 1H), 7,30-7,38 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$ δ : 11,91; 12,59; 15,92; 16,02; 17,69; 22,20; 23,59; 24,13; 24,47; 25,70; 26,62; 26,78; 29,29; 31,05; 39,73; 39,95; 47,04; 58,92; 67,22; 75,81; 118,51; 118,75; 124,18; 124,23; 124,42; 125,86; 126,88; 127,82; 127,99; 128,48; 131,25; 134,98; 135,24; 136,76; 141,27; 149,57; 154,91; 171,67; **MS m/z**: 642,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 98,42; 70,16; 91,04; 240,95; 150,93; 190,97.

*2,7,8-trimetil-2-((3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il piroolidin-2-karboksilat (γ -tokotrienil prolin). Prinos: 55%; IR (ATR) cm^{-1} : 1766,1; 3369,4; $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ δ : 1,27 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 1,59 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,69-2,13 (m, 14H), 2,01 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,18-2,31 (m, 4H), 2,63-2,73 (m, 2H), 2,96-3,0 (m, 1H), 3,14-3,17 (m, 1H), 4,01-4,04 (m, 1H), 5,09-5,15 (m, 3H), 6,56 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$ δ : 11,96; 12,63; 15,91; 16,02; 17,69; 22,20; 22,67; 24,12; 25,55; 25,70; 26,62; 26,78; 30,58; 31,06; 39,71; 39,73; 40,02; 47,03; 59,80; 75,85; 118,47; 118,65; 123,96; 124,22; 124,43; 125,94; 126,95; 131,25; 134,98; 135,23; 141,45; 149,60; 174,55; **MS m/z**: 508,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 70,21; 150,99; 247,98; 372,15; 304,07; 191,00; **HRMS**: izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 508,37852, nađeno 508,37874.*

*2,7,8-trimetil-2-((3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2-((benziloksikarbonil)amino)-4-karbamoilbutanoat (γ -tokotrienil Cbz-glutamin). Prinos: 29%; $^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ δ : 1,27 (s, 3H), 1,59 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,61-2,18 (m, 16H), 2,00 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,39-2,46 (m, 2H), 2,70-2,71 (m, 2H), 4,63 (m, 1H), 5,09-5,17 (m, 5H), 6,56 (s, 1H), 7,31-7,37 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$ δ : 11,96; 12,70; 15,92; 16,02; 17,69; 22,19; 22,21; 24,09; 25,70; 26,62; 26,78; 28,54; 31,01; 31,80; 39,70; 39,73; 40,06; 53,74; 67,22; 75,92; 118,53; 118,55; 124,18; 124,21; 124,42; 126,05; 126,84; 128,16; 128,27; 128,58; 131,26; 135,00; 135,27; 136,17; 141,22; 149,82; 171,07; 174,02; **MS m/z**: 673,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 629,39; 84,00; 100,85; 90,96; 351,95; 222,90.*

2,7,8-trimetil-2-((3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-il 2-amino-4-karbamoilbutanoat (γ -tokotrienil glutamin). Prinos: 68%; IR (ATR) cm^{-1} : 1667,2; 1739,3; 3357,5; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,27 (s, 3H), 1,59 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,66 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,61-2,18 (m, 14H), 2,01 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,32-2,43 (m, 2H), 2,47-2,55 (m, 2H), 2,69-2,71 (m, 2H), 3,72-3,77 (m, 1H), 5,10-5,14 (m, 3H), 6,55 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 11,96; 12,72; 15,90; 17,68; 22,19; 22,23; 24,10; 25,74; 26,61; 26,77; 29,91; 31,02; 32,15; 39,69; 39,73; 39,90; 53,96; 75,90; 118,53; 118,58; 124,17; 124,37; 124,42; 126,01; 126,84; 131,24; 134,96; 135,24; 141,37; 149,68; 170,96; 174,61; MS m/z: 539,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 84,02; 150,94; 101,00; 261,94; 81,09; 190,94; HRMS: izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539,38433, nađeno 539,38390.

4.3. IN VITRO ISPITIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI I MEHANIZMA DEJSTVA SINTETISANIH ESTARA

4.3.1. Uticaj sintetisanih estara α -tokoferola i γ -tokotrienola na preživljavanje tumorskih ćelija

In vitro antitumorska aktivnost sintetisanih jedinjenja ispitana je MTT-testom na tri maligne humane ćelijske linije: estrogen-osetljivoj MCF7 ćelijskoj liniji tumora dojke, estrogen-rezistentnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji tumora dojke i A549 ćelijskoj liniji tumora pluća. Rezultati ispitivanja su izraženi kao IC_{50} vrednost, koja je izračunata iz grafika preživljavanja ćelija kao koncentracija ispitivanog jedinjenja pri kojoj dolazi do smanjenja preživljavanja za 50%. U studiju su uključeni i komercijalno dostupni α -TOS i γ -tokotrienol, i njihova aktivnost na navedenim ćelijskim linijama je upoređena sa aktivnošću sintetisanih estara. Sve ćelijske linije tretirane su koncentracijama ispitivanih jedinjenja u opsegu 0,62-50 μ M u toku 48 sati. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 7.

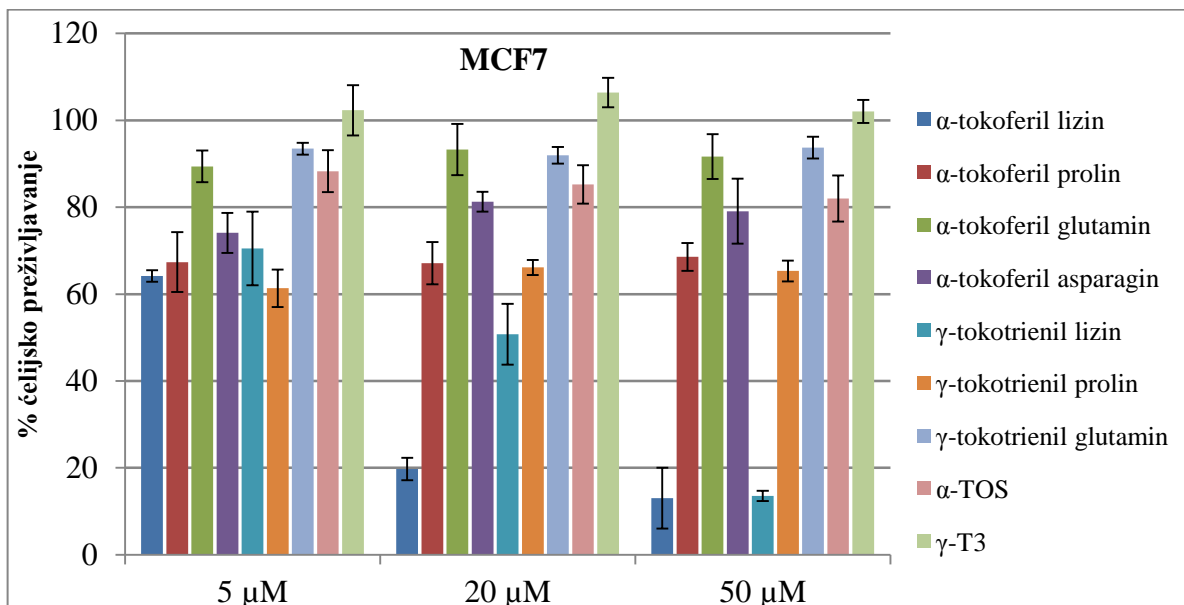
Od 7 sintetisanih estara, najveći uticaj na preživljavanje malignih ćelija su imali α -tokoferil lizin, α -tokoferil asparagin i γ -tokotrienil lizin, sa IC_{50} vrednostima nižim od 30 μ M na ćelijskim linijama na kojima su ispoljili aktivnost (Tabela 7). Kao što je navedeno ranije,⁹⁹ *in vitro* antitumorska aktivnost α -tokoferil lizina na MCF7 ćelijskoj liniji je ispitana u drugoj studiji, i dobijeni rezultat ($IC_{50}=8,6$ μ M) je bio u skladu sa rezultatom prethodne studije. Na osnovu IC_{50} vrednosti prikazanih u Tabeli 7 se može zaključiti da je α -tokoferil lizin takođe ispoljio snažnu antitumorsku aktivnost i na A549 ćelijama tumora pluća ($IC_{50}=10,6$ μ M). γ -Tokotrienil lizin je jedini od ispitivanih jedinjenja koji je ispoljio aktivnost na sve tri maligne ćelijske linije, sa IC_{50} vrednostima 20,6 μ M, 28,6 μ M i 19 μ M na MCF7, MDA-MB-231 i A549 ćelijama, redosledom, ali je α -tokoferil lizin bio aktivniji na MCF7 i A549 ćelijama. α -Tokoferil asparagin nitril je doveo do snažne inhibicije preživljavanja multirezistentnih MDA-MB-231 ćelija ($IC_{50}=9,2$ μ M).

Tabela 7. IC₅₀ vrednosti (μM) ispitivanih jedinjenja na MCF7, MDA-MB-231 i A549 malignim ćelijskim linijama nakon 48 h tretmana.

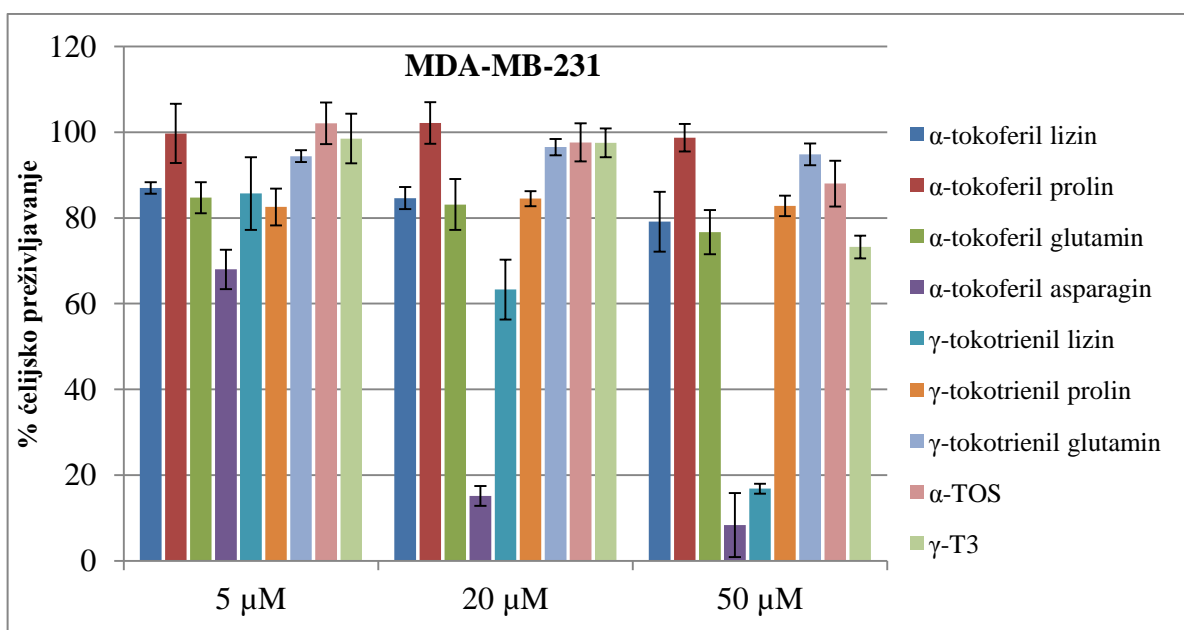
Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)		
	MCF-7	MDA-MB-231	A549
α-tokoferil lizin hidrohlorid	8,6	>50	10,6
α-tokoferil prolin	>50	>50	>50
α-tokoferil glutamin	>50	>50	>50
α-tokoferil asparagin nitril	>50	9,2	>50
γ-tokotrienil lizin hidrohlorid	20,6	28,6	19
γ-tokotrienil prolin	>50	>50	>50
γ-tokotrienil glutamin	>50	>50	>50
γ-tokotrienol	>50	>50	>50
α-TOS	>50	>50	>50

Za razliku od α-tokoferil lizina, α-tokoferili asparagina i γ-tokotrienil lizina koji su pokazali sposobnost da efektivno inhibiraju preživljavanje određenih malignih ćelija, α-TOS i γ-tokotrienol su ispoljili samo ograničenu antitumorsku aktivnost na sve tri ćelijske linije, sa IC₅₀ vrednostima većim od 50 μM, uprkos ranije dokazanoj antitumorskoj aktivnosti ovih jedinjenja na različitim ćelijskim linijama tumora.^{71,90,193-195}

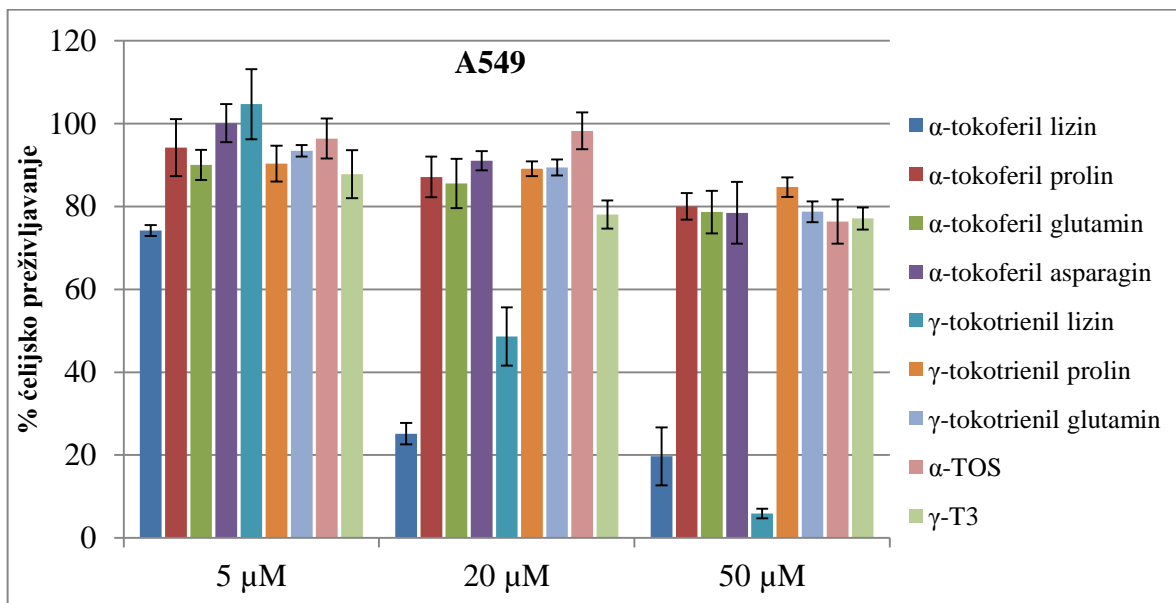
Na Slikama 26, 27 i 28 prikazan je uticaj različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja na preživljavanje MCF7, MDA-MB-231 i A549 ćelija, redosledom. Na osnovu grafika preživljavanja ćelija u zavisnosti od koncentracije ispitivanog jedinjenja, može se zaključiti da je pokazani antitumorski efekat α-tokoferil lizina, α-tokoferil asparagina i γ-tokotrienil lizina dozno zavisna na sve tri ispitivane ćelijske linije.



Slika 26. Efekat različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja na preživljavanje MCF7 ćelija.



Slika 27. Efekat različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja na preživljavanje MDA-MB-231 ćelija.



Slika 28. Efekat razlićitih koncentracija ispitivanih jedinjenja na preživljavanje A549 ćelija.

Estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa prolinom su pokazali umerenu antitumorsku aktivnost na MCF 7 ćelijskoj liniji, pri ćemu su nakon tretmana koncentracijom 20 μ M doveli do smanjenja postotka preživljavanja ćelija od 67,1% (α -tokoferol) i 66,1% (γ -tokotrienol) (Slika 26).

U cilju utvrđivanja toksićnosti ka zdravim ćelijama, ispitan je uticaj svih testiranih jedinjenja na preživljavanje MRC-5 normalnih ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća. Vijabilnost ćelija nakon tretmana koncentracijom ispitivanih jedinjenja od 20 μ M u toku 48 sati je iznosila 80-90%, što ukazuje na selektivnu toksićnost sintetisanih estara vitamina E.

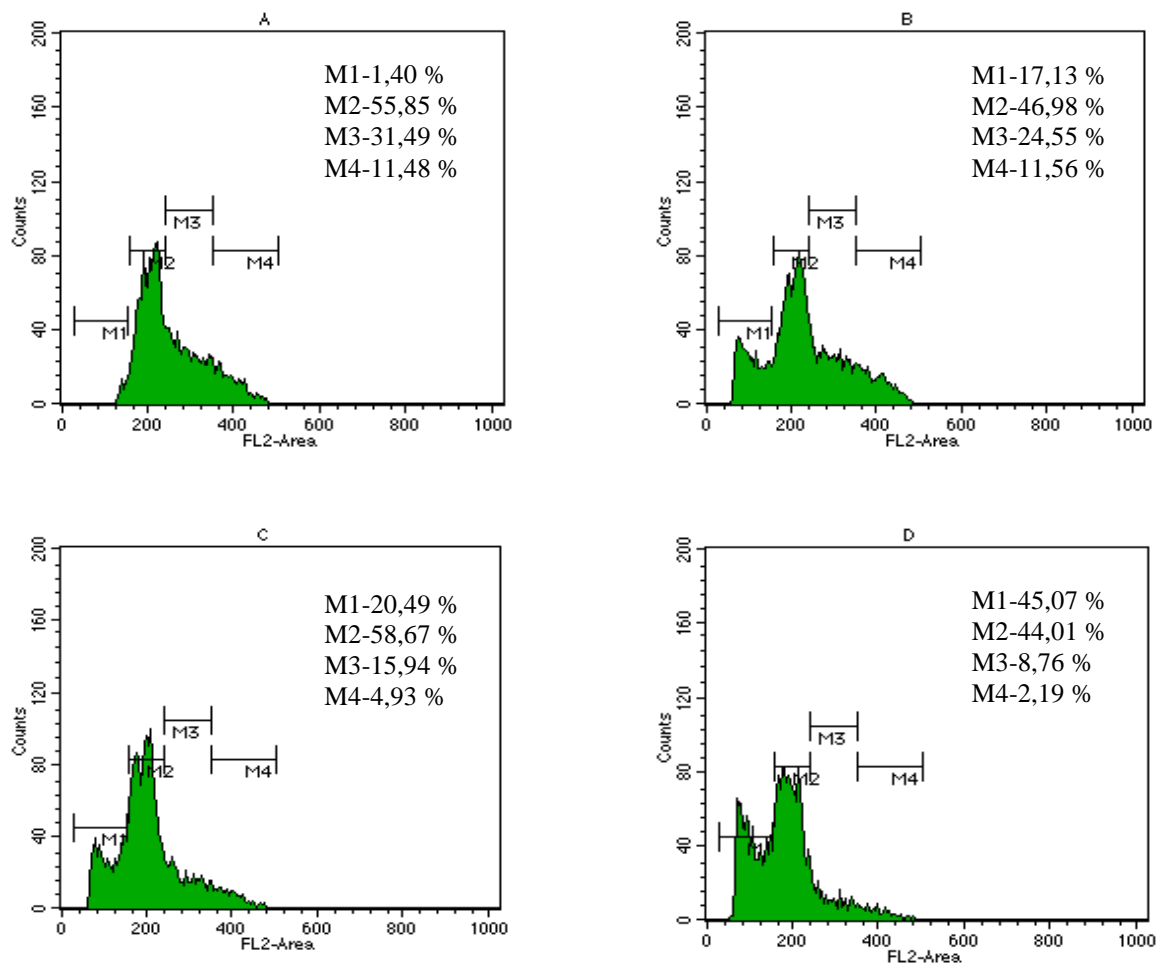
Dobijene IC_{50} vrednosti sintetisanih estara daju informaciju samo o procentu preživelih ćelija nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima. Da bi dobili uvid u mehanizam koji leži u osnovi antitumorske aktivnosti, potrebno je ispitati da li je smanjenje preživljavanja ćelija rezultat uticaja ispitivanih jedinjenja na ćelijski ciklus ili njihove sposobnosti da izazovu ćelijsku smrt, odnosno apoptozu.

4.3.2. Uticaj α -tokoferil asparagin estera na distribuciju MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Za ispitivanje uticaja sintetisanih estara vitamina E na ćelijski ciklus malignih ćelija odabrana je multirezistentna MDA-MB-231 ćelijska linija tumora dojke i α -tokoferil asparagin, kao estar koji je ispoljio najsnažniju aktivnost na ovoj ćelijskoj liniji. U ispitivanje je uključen i doksorubicin, kao antineoplastik koji se koristi u terapiji tumora dojke, da bismo dobili informacije o potencijalnom sinergističkom efektu. U tu svrhu, MDA-MB-231 ćelije su tokom 48 h tretirane IC_{50} koncentracijama doksorubicina ($IC_{50}=4 \mu M$, podatak nije prikazan u ovoj doktorskoj disertaciji) i α -tokoferil asparagina ($IC_{50}=9,2 \mu M$), a promene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su registrovane citometrijskom analizom.

Nakon 48 sati kontinuiranog tretmana MDA-MB-231 ćelija α -tokoferil asparaginom došlo je do povećanja procenta apoptotičnih ćelija sa 1,4% u kontrolnoj grupi (Slika 29A) na 17,13%, što se na dijagramu distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa uočava kao jasno izdvojen sub-G1 pik (Slika 29 B). Ovaj pik potiče od fragmentisanih DNK molekula koji su odlika apoptotičnih ćelija. Pored toga, α -tokoferil asparagin je doveo do smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na netretirane ćelije (Slika 29 B). Doksorubicin je takođe bio u stanju da uvede ćelije u apoptozu, sa izdvajanjem karakterističnog sub-G1 pika, a doveo je i do značajnog smanjenja udela ćelija u S i G2/M fazi na 15,94% i 4,93% u odnosu na kontrolne ćelije 31,49% i 11,48%, redosledom (Slika 29 C). Najveći procenat apoptotičnih ćelija od čak 45,07% je nađen nakon 48 sati tretmana MDA-MB-231 ćelija kombinacijom α -tokoferil asparagin-doksorubicin (Slika 29 D). Ovo povećanje je imalo za rezultat redukciju ćelija u S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa.

Na osnovu rezultata distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa može se zaključiti da su α -tokoferil asparagin, doksorubicin i naročito njihova kombinacija izazivali nakupljanje ćelija u sub-G1 fazi, ukazujući na apoptozu kao primarni mehanizam njihove antitumorske aktivnosti.



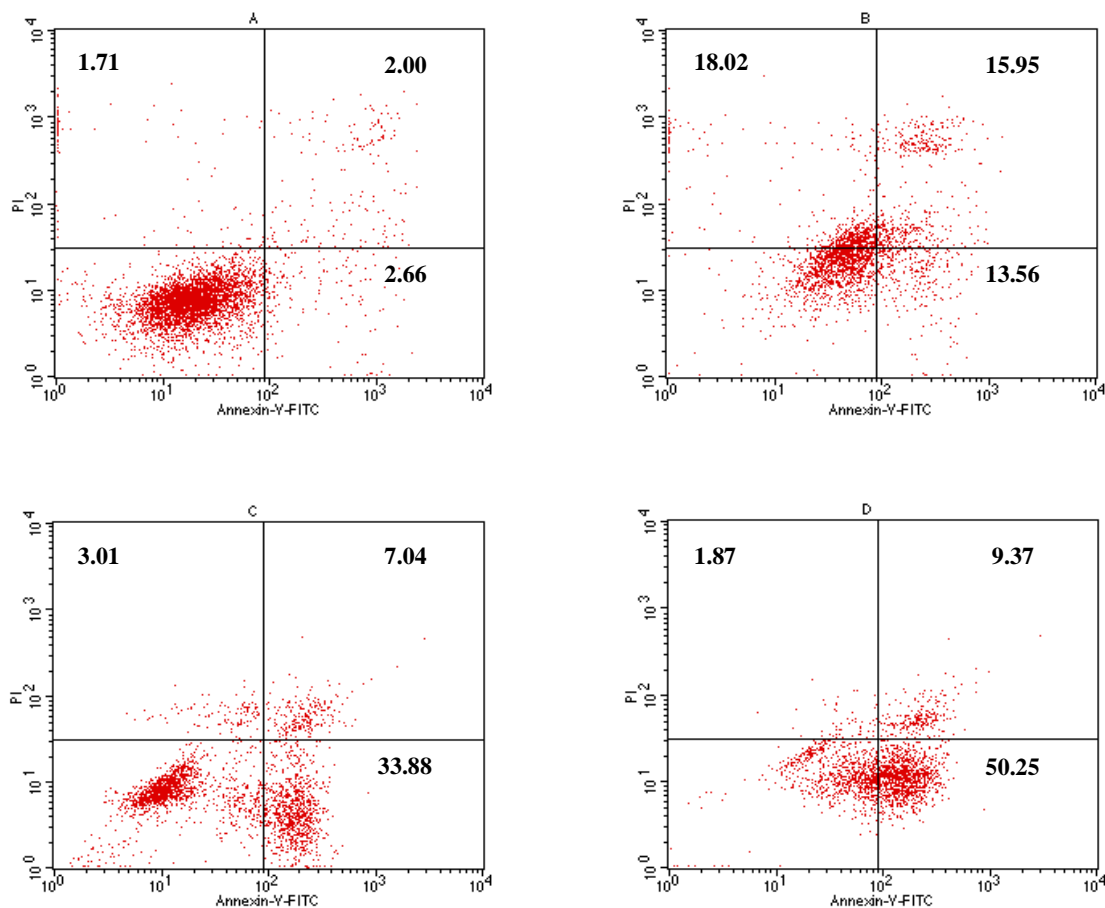
Slika 29. Grafik distribucije MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa: (A) netretirane ćelije, (B) ćelije tretirane α -tokoferil asparaginom, (C) ćelije tretirane doksorubicinom, (D) ćelije tretirane kombinacijom α -tokoferil asparagin-doksorubicin. Ćelije su tretirane IC_{50} koncentracijama α -tokoferil asparagina i doksorubicina tokom 48 h. Na y-osi predstavljen je broj ćelija (*counts*), a na x-osi je predstavljen intenzitet propidijum-jodida (*FL2-Area*). Markeri M1, M2, M3 i M4 se odnose na sub-G1, G1, S i G2/M faze ćelijskog ciklusa, redosledom. Povećana populacija ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa ukazuje na apoptozu.

4.3.3. Uticaj α -tokoferil asparagin estra na apoptozu MDA-MB-231 ćelija

Budući da je ispitivanje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ukazalo na apoptozu ćelija, citometrijskom analizom je izvršeno ispitivanje sposobnosti α -tokoferil asparagin estra da izazove programiranu ćelijsku smrt MDA-MB-231 ćelija, upotrebom metode dvokolornog bojenja sa Annexin V-FITC i propidijum jodidom. Na ovaj način se mogu detektovati ćelije koje se nalaze u ranom stadijumu apoptoze, budući da kod ovih ćelija dolazi do premeštanja fosfatidil serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, što omogućava vezivanje Annexina V (Annexin V⁺ ćelije). Detekcija ovog vezivanja je moguća zahvaljujući obeležavanju Annexina V fluorescentnom bojom, fluorescein izotiocijanatom (FITC). Zahvaljujući sposobnosti propidijum jodida da se vezuje za DNK, moguća je i detekcija ćelija u kasnom stadijumu apoptoze, kod kojih je nakon rupture ćelijske membrane došlo do oslobađanja DNK sadržaja (PI⁺ ćelije).

MDA-MB-231 ćelije su tretirane α -tokoferil asparaginom, doksorubicinom i njihovom kombinacijom tokom 48 sati, nakon čega je protočnom citometrijom određen postotak apoptotičnih ćelija. Rezultati su pokazali da je α -tokoferil asparagin indukovao apoptozu pri čemu je 13,56% ćelija bilo u stadijumu rane apoptoze (Annexin V pozitivne/PI negativne ćelije), 15,95% ćelija u stadijumu kasne apoptoze ili nekroze (Annexin V pozitivne/PI pozitivne ćelije), a 18,02% ćelija se odnosi na ćelijski debri (Annexin V negativne/PI pozitivne ćelije) (Slika 30 B). Doksorubicin je primarno doveo do povećanja procenta kasnoapoptotičnih/nekrotičnih ćelija, i to 33,88% u odnosu na netretirane ćelije (Slika 30 C). Tretman MDA-MB-231 ćelija kombinacijom α -tokoferil asparagin-doksorubicin je doveo do masovne apoptoze sa procentom ćelija u ranom stadijumu apoptoze od 50,25% (Slika 30 D). Zanimljivo je da, iako je došlo do značajnog povećanja populacije ranoapoptotičnih ćelija nakon tretmana kombinacijom α -tokoferil asparagin-doksorubicin, populacije kasnoapoptotičnih i nekrotičnih ćelija, kao i ćelijskog debrija su skoro u potpunosti izgubljene (9,37% i 1,87%, redosledom). Ova pojava ukazuje na zakašnjenje u aktivaciji apoptotskog izvršnog mehanizma. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da bi terapija visoko metastatskog tumora

dojke kombinacijom doksorubicina i α -tokoferil asparagina mogla dovesti do poboljšanog terapijskog odgovora i smanjiti toksičnost povezanu sa visokim dozama monoterapije doksorubicinom.



Slika 30. Dijagram citometrijske analize apoptoze MDA-MB-231 ćelija: (A) netretirane ćelije, (B) ćelije tretirane α -tokoferil asparaginom, (C) ćelije tretirane doksorubicinom, (D) ćelije tretirane kombinacijom α -tokoferil asparagin-doksorubicin. Ćelije su tretirane IC₅₀ koncentracijama α -tokoferil asparagina i doksorubicina tokom 48 h. Na svakom panelu donji levi kvadrant predstavlja žive ćelije (Annexin V⁻/PI⁻), gornji levi kvadrant predstavlja ćelijski debri (Annexin V⁻/PI⁺), donji desni kvadrant predstavlja ćelije u fazi rane apoptoze (Annexin V⁺/PI⁻), gornji desni kvadrant predstavlja ćelije u fazi kasne apoptoze/nekroze (Annexin V⁺/PI⁺).

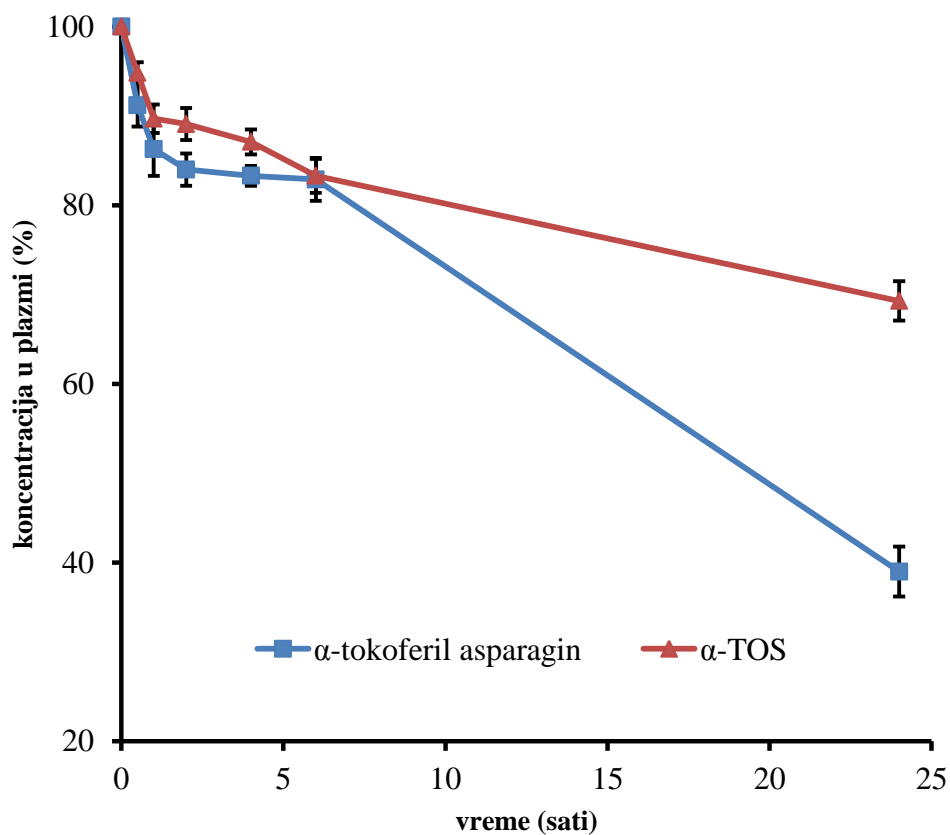
4.3.4. Stabilnost α -tokoferil asparagina u humanoj plazmi

S obzirom na prisustvo velikog broja nespecifičnih esteraza, estri vitamina E mogu lako biti hidrolizovani u jetri. Osetljivost α -tokoferil acetata i α -tokoferil asparagina na hepatičku hidrolizu je ispitana u ranijoj studiji koristeći svinjske esteraze jetre.¹⁸⁰ Utvrđeno je da je poluvreme komercijalnog α -tokoferil acetata oko 1 h, dok se α -tokoferil asparagin pokazao znatno stabilnijim prema hepatičkim enzimima, sa poluvremenom od 6 h.

U cilju izbegavanja ekstenzivnog metabolizma estara vitamina E u jetri i postizanja visoke koncentracije u plazmi, predložene su parenteralne formulacije estara vitamina E.^{196,197} U novije vreme razvijene su lipozomalne formulacije derivata vitamina E da bi se povećalo njihovo poluvreme života u plazmi i osigurala sigurna isporuka do tumorskih ćelija. Antitumorski efekat ovih formulacija je uspešno demonstriran na pre-kliničkim modelima *in vivo*.^{101,198,199}

Budući da enzimi prisutni u krvi mogu dovesti do hidrolize estara vitamina E, testirana je stabilnost α -tokoferil asparagina, kao najaktivnijeg sintetisanog estara na multirezistentnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, i komercijalnog α -TOS u sveže pripremljenoj humanoj plazmi. Plazma je opterećena sa ispitivanim jedinjenjima da bi se postigla finalna koncentracija od 200 $\mu\text{g/mL}$ a merenja su vršena upotrebom HPLC metode u vremenskim intervalima 0 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h i 24 h. Rezultati merenja su prikazani na Slici 31, gde se sa grafika koncentracije ispitivane supstance (izražene u procentima od početne koncentracije koja je 100%) u zavisnosti od vremena može uočiti spora dekompozicija oba jedinjenja tokom 24 h inkubacije. Nakon 6 h, koncentracija oba estara u plazmi se smanjila na oko 83% od početne koncentracije. Nakon 24 h, 39% od početne koncentracije α -tokoferil asparagina i 69% od početne koncentracije α -TOS je izmereno u plazmi.

Rezultati ispitivanja stabilnosti u plazmi ukazuju na prihvatljivu metaboličku stabilnost α -tokoferil asparagina i srodnih estara vitamina E. Na osnovu navedenih činjenica može se izvesti zaključak da bi parenteralna aplikacija sintetisanih estara vitamina E trebala obezbediti postojane koncentracije u plazmi, koje će garantovati efektivnu distribuciju i dovoljne terapijske koncentracije jedinjenja u tumorskom tkivu.

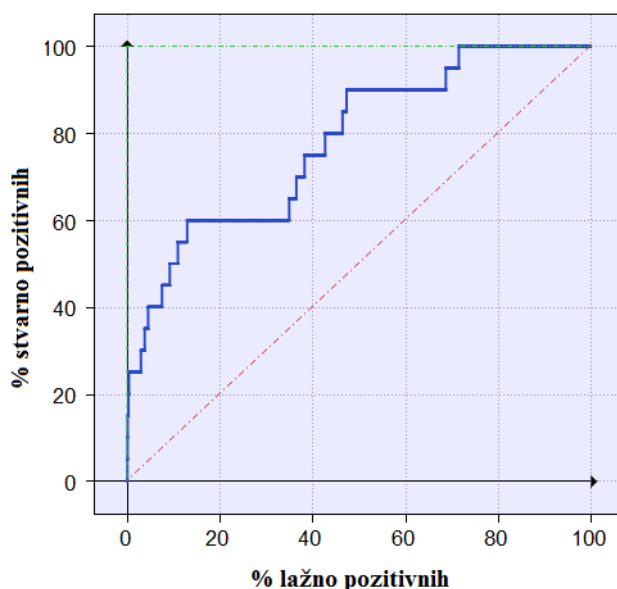


Slika 31. Profil stabilnosti α -tokoferil asparagina i komercijalnog α -TOS u humanoј plazmi. Uzorkovanje je vršeno u vremenskim intervalima 0 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h i 24 h, na 37 °C, u duplikatu. Uzorci su analizirani upotrebom HPLC metode.

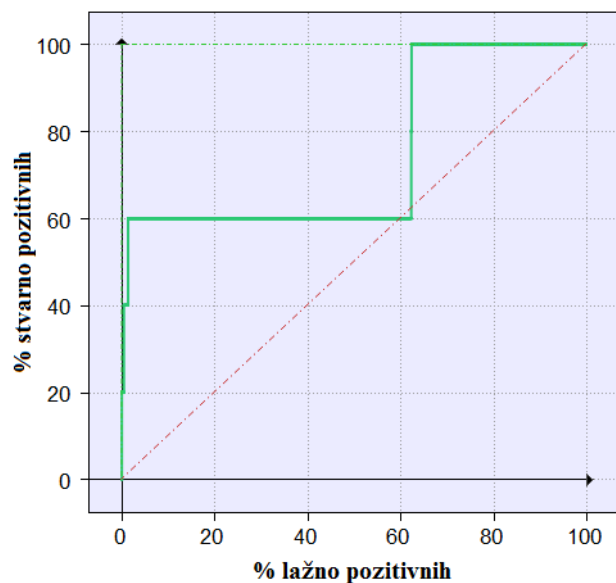
4.4. VIRTUELNI SKRINING ZASNOVAN NA STRUKTURI LIGANDA

Virtuelni skrining predstavlja korisnu i pouzdanu metodu za identifikaciju potencijalno aktivnih jedinjenja iz molekularskih baza podataka. Da bi identifikovali nova vodeća jedinjenja sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću, razvijena su dva modela, i to na MCF7 (model 1) i MDA-MB-231 (model 2) ćelijskim linijama. Kao ligandi na osnovu kojih je vršeno pretraživanje su uzeta najaktivnija jedinjenja na ovim ćelijskim linijama, α -tokoferil lizin na MCF 7 ćelijskoj liniji i α -tokoferil asparagin nitril na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji. Za skrining je korišćena ChEMBL baza podataka u koju su, nakon prethodne prefiltracije, dodata i jedinjenja iz ranije QSAR studije.²⁰⁰

Za modelovanje je korišćen FLAP program, koji za izračunavanje skorova sličnosti između liganda i filtriranih jedinjenja koristi H, DRY, O i N1 probe. Za svaki model su generisane ROC krive na kojima su grafički predstavljene lažno pozitivni u odnosu na stvarno pozitivne rezultate (Slika 32 i 33).



Slika 32. ROC kriva za LBVS model 1 (MCF7 ćelijska linija) i DRY skor



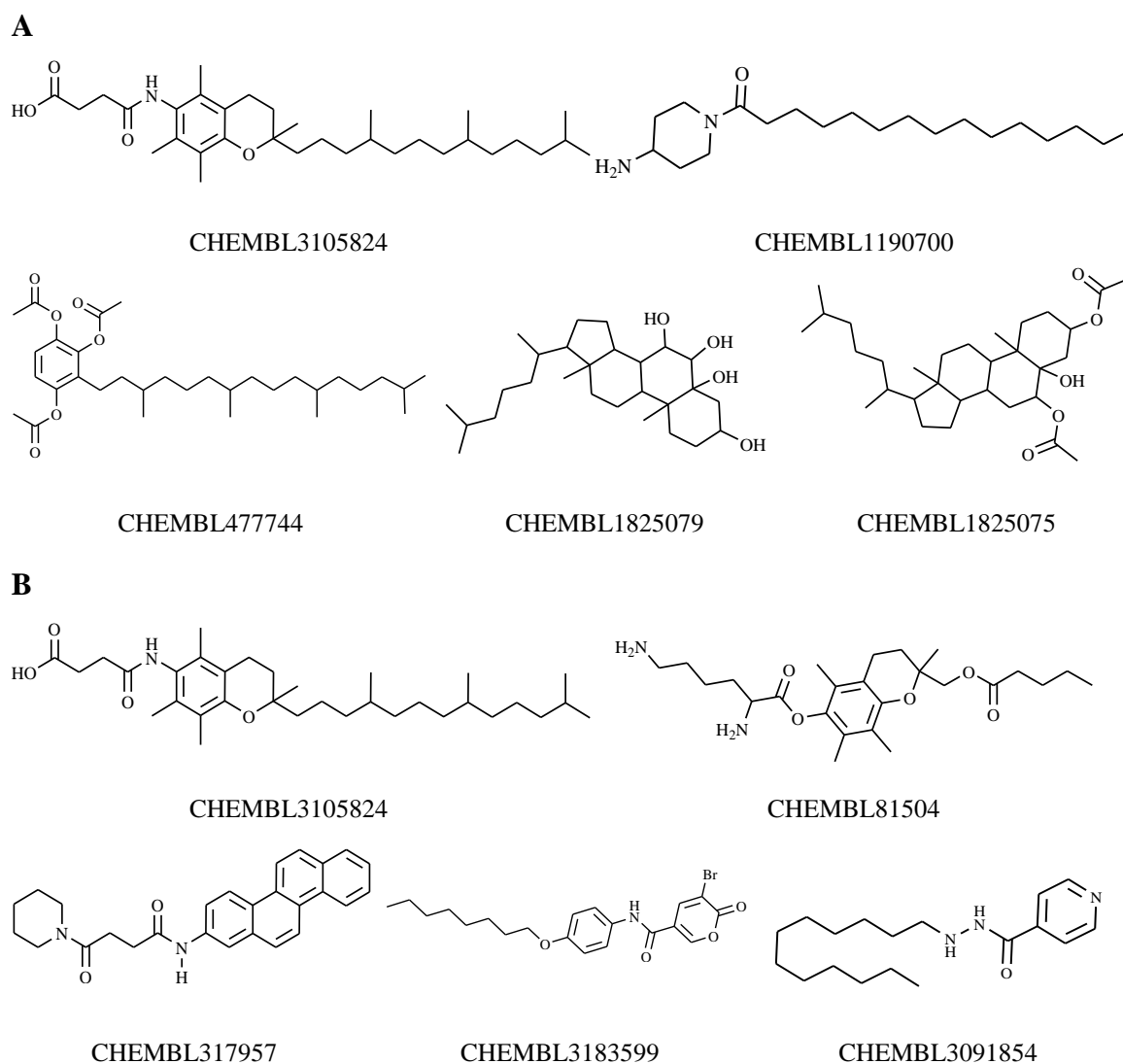
Slika 33. ROC kriva za LBVS model 2 (MDA-MB-231 ćelijska linija) i N*DRY skor

Na osnovu vrednosti površine ispod ROC krive (AUC) vrednosti, za rangiranje jedinjenja odabrani su skorovi koji imaju najbolju sposobnost diskriminacije između poznatih aktivnih i neaktivnih jedinjenja. Za model 1 (MCF7), najviša AUC vrednost (0,78) je postignuta sa DRY skorom (Slika 32), dok je za model 2 (MDA-MB-231), najviša AUC vrednost (0,75) postignuta sa N*DRY skorom (Slika 33). Prema tome, može se zaključiti da su hidrofobnost molekule i prisustvo akceptora vodoničnih veza važni faktori za rangiranje ispitivanih jedinjenja sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću.

Pet top rangiranih jedinjenja iz modela 1 (CHEMBL3105824, CHEMBL477744, CHEMBL1825075, CHEMBL1190700 i CHEMBL1825079) i pet top rangiranih jedinjenja iz modela 2 (CHEMBL81504, CHEMBL317957, CHEMBL3105824, CHEMBL3183599 i CHEMBL3091854) su selektovani kao vodeća jedinjenja sa najvećim potencijalom da ispolje antitumorsku aktivnost na MCF7 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama, redosledom (Slika 34).

Pretraživanjem literature nađeno je da je za jedinjenje CHEMBL1825079, koje je model predvideo kao potencijalno aktivno na MCF7 ćelijskoj liniji, ranijom studijom

prijavljena antitumorska aktivnost na ovoj ćelijskoj liniji²⁰¹, potvrđujući na taj način validnost modela. Pored toga, CHEMBL3105824, CHEMBL477744, CHEMBL1825075, CHEMBL81504 and CHEMBL317957 su takođe pokazali aktivnost na različitim malignim ćelijskim linijama. Oba modela su identifikovala CHEMBL3105824 kao potencijalno aktivno jedinjenje na MCF7 i MDA-MB-231 ćelijskoj liniji.



Slika 34. Vodeća jedinjenja identifikovana skriningom ChEMBL databaze sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću na (A) MCF7 ćelijama i (B) MDA-MB-231 ćelijama.

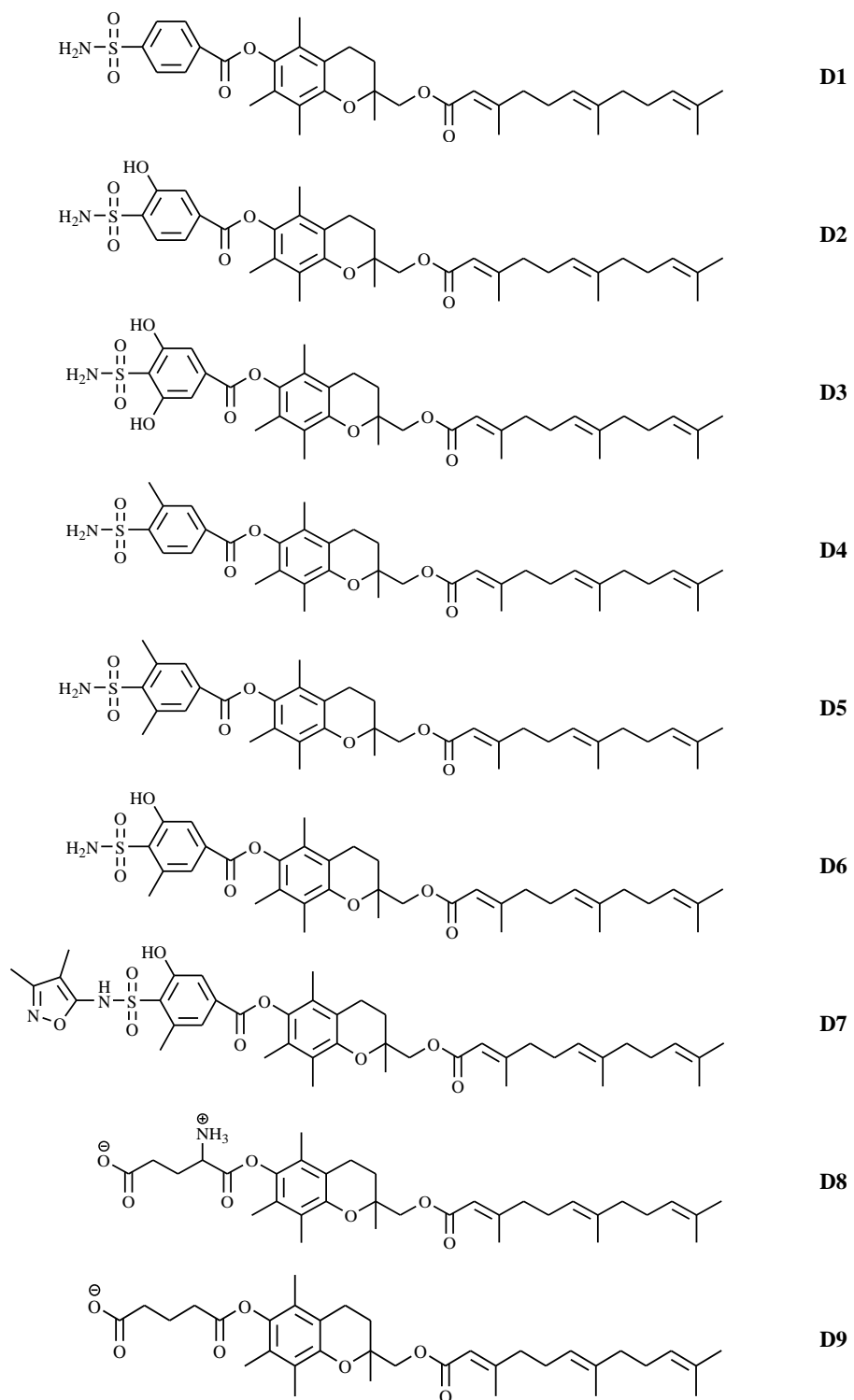
4.5. DIZAJNIRANJE NOVIH JEDINJENJA

Na osnovu rezultata 2D- i 3D-QSAR studija derivata vitamina E može se zaključiti da sledeće strukturne modifikacije dovode do poboljšanja antitumorske aktivnosti:

- esterifikacija fenolne grupe na položaju C6;
- najmanje jedan donor i/ili akceptor vodonične veze u estarskom lancu na C6;
- najmanje jedan jonizujući centar u estarskom lancu na C6;
- hidrofobni region u estarskom lancu na C6;
- dva karbonilna kiseonika na optimalnoj razdaljini od 18,8-19,2 Å ili kraćoj;
- kraći ili sterno drugačiji ugljovodonični lanac na položaju C2;
- smanjenje lipofilnosti.

Informacije dobijene iz QSAR studija su upotrebljene za dizajniranje novih jedinjenja. Dizajnirano je 9 novih jedinjenja, označenih **D1-9**, čije su strukture predstavljene na Slici 35. 3D-QSAR modelom su predviđene antitumorske aktivnosti dizajniranih jedinjenja na MCF7 ćelijskoj liniji (Tabela 8). Od 9 dizajniranih jedinjenja, za 4 je predviđena bolja aktivnost od najaktivnijeg jedinjenja iz dataseta (**L29**). Međutim, i za ostalih 5 jedinjenja je predviđena visoka aktivnost, sa pIC₅₀ vrednostima iznad 5.

Najaktivnija jedinjenja (**D3**, **D6**, **D2**) poseduju jedan ili više jonizujućih centara u estarskom lancu na C6 i MLOGP2 vrednosti između 15 i 17, što prema 2D-QSAR studijama ima pozitivan uticaj na aktivnost. Takođe, visoka aktivnost **D3**, **D6** i **D2** je povezana sa 3D-strukturom farmakofore koja uključuje prisustvo dva karbonilna kiseonika na optimalnoj razdaljini, prisustvo hidrofobnog regiona i prisustvo donora i akceptora vodoničnih veza u estarskom lancu na položaju C6, što je u skladu sa rezultatima 3D-QSAR studije (v277: N1-N1, v481: DRY-O i v822: O-N1 varijable).



Slika 35. Strukture dizajniranih jedinjenja.

Tabela 8. 3D-QSAR predviđene aktivnosti dizajniranih jedinjenja i odabrane ADMET karakteristike dizajniranih i jedinjenja iz trening i test seta.

Dizajnirana jedinjenja											
Jedinjenje	Predviđene pIC ₅₀	MWt	MLOGP2	PrUnbnd	HBD	HBA	RuleOf5	CYP_Risk	TOX_hERG	TOX_Risk	
D1	5,193	637,84	17,72	3,09	1	8	2	4	6,01	Netoksično	3
D2	5,799	653,84	15,84	4,14	2	9	1	2	5,68	Netoksično	1
D3	5,972	669,84	10,56	1,69	3	10	1	1	5,85	Netoksično	0
D4	5,383	651,87	19,18	3,29	1	8	2	4	6,03	Netoksično	3
D5	5,522	665,89	20,79	3,53	1	8	2	4	6,09	Netoksično	3
D6	5,948	667,87	17,31	4,82	2	9	2	3	5,72	Netoksično	1
D7	5,199	732,94	21,90	0,62	1	10	2	2	6,04	Netoksično	3
D8	5,365	583,77	10,18	15,72	2	8	1	2	4,73	Netoksično	0
D9	5,076	568,76	15,52	1,44	1	7	1	1	5,67	Netoksično	1
Jedinjenja iz trening i test seta											
Jedinjenje	MWt	MLOGP2	PrUnbnd	HBD	HBA	RuleOf5	CYP_Risk	TOX_hERG	TOX_Risk		
L1	430,72	38,90	9,66	1	2	1	0	5,93	Netoksično	0	
L2	558,89	2,96	26,02	2	5	2	2	6,63	Toksično	2	
L3	434,62	19,46	29,35	2	6	0	3	5,49	Toksično	1	
L4	364,49	30,11	35,51	3	6	0	2	4,89	Netoksično	1	
L5	755,05	10,22	36,91	5	10	2	1	5,66	Netoksično	1	
L6	448,61	19,76	34,46	2	7	0	2	5,42	Netoksično	1	
L7	516,81	36,86	1,83	1	4	2	0	6,39	Netoksično	2	
L8	530,79	36,12	2,36	1	5	2	0	6,22	Netoksično	1	
L9	472,76	37,91	3,21	1	3	1	0	5,67	Netoksično	0	
L10	486,74	36,78	4,12	1	4	1	1	5,71	Netoksično	0	

L11	424,67	35,74	4,85	1	2	1	2	5,73	Netoksično	0
L12	410,64	33,44	5,23	1	2	1	2	5,76	Netoksično	0
L13	396,62	31,19	5,72	1	2	1	2	5,84	Netoksično	0
L14	593,83	28,49	0,73	1	6	2	3	6,44	Netoksično	1
L15	607,86	30,43	0,65	1	6	2	3	6,1	Netoksično	1
L16	621,88	32,41	0,66	1	6	2	3	6,17	Netoksično	2
L17	559,75	29,25	1,00	1	6	2	3	6,66	Toksično	2
L18	492,79	46,76	3,18	0	2	1	2	5,97	Netoksično	0
L19	414,72	46,92	9,28	0	1	1	1	5,92	Toksično	1
L20	543,8	41,06	3,02	1	4	2	2	6,32	Toksično	3
L21	560,82	37,39	1,87	0	4	2	2	6,19	Netoksično	1
L22	579,8	26,59	0,72	1	6	2	3	6,38	Netoksično	1
L23	480,78	45,36	4,18	0	2	1	2	6,02	Toksično	2
L24	544,82	44,28	1,63	0	3	2	3	6,26	Toksično	1
L25	529,77	38,79	3,19	1	4	2	2	6,39	Toksično	3
L26	326,48	20,66	7,70	1	2	1	4	5,45	Netoksično	0
L27	438,57	22,07	8,42	0	5	0	2	5,38	Netoksično	1
L28	382,5	17,14	7,96	1	4	0	2	5,39	Netoksično	1
L29	382,5	17,14	7,98	1	4	0	1	5,35	Netoksično	1
L30	400,52	13,43	6,52	2	5	0	2	5,42	Netoksično	1

MWt: molekulska masa; MLOGP2: kvadratni Moriguchi-jev oktanol-voda particioni koeficijent; PrUnbnd: procenat nevezan za protein plazme; HBD: broj donora vodoničnih veza; HBA: broj akceptora vodoničnih veza; RuleOf5: Lipinski pravilo od 5; CYP_Risk: rizik povezan sa P450 oksidacijom; TOX_hERG: afinitet za hERG kalijumov kanal izražen kao pIC₅₀; TOX_Risk: rizik povezan sa predviđenom toksičnošću (skor u opsegu 0-7 ukazuje na broj potencijalnih problema povezanih sa toksičnošću).

Za finalni odabir najboljih kandidata, izračunate su ADMET osobine dizajniranih jedinjenja (MWt, MlogP, PrUnbnd, HBD, HBA, RuleOf5, CYP_Risk, TOX_hERG, TOX_Risk) korišćenjem programa ADMET Predictor i upoređene sa ADMET osobinama jedinjenja iz dataseta (Tabela 8). Provereno je da li dizajnirana i jedinjenja iz dataseta zadovoljavaju pravilo Lipinskog, da li postoji rizik od oksidacije enzimima iz grupe citohroma P450 i da li postoji rizik od ispoljavanja toksičnih efekata.

Od jedinjenja iz trening i test seta, samo 4 jedinjenja sa visokom aktivnošću (**L12, L13, L27, L29**) nisu prekršila više od jednog pravila Lipinskog, dok su ostala jedinjenja sa visokom aktivnošću (**L2, L5, L15, L16, L17, L22**) nisu zadovoljila 2 ili više pravila. Generalno, sva jedinjenja iz trening i test seta su imala malu predviđenu toksičnost, sa izuzetkom jedinjenja **L17**, za koje je predviđeno da ispoljava kardiotoksičnost putem vezivanja za hERG kanale.

Od dizajniranih jedinjenja, **D1, D4, D5, D6** i **D7** ne zadovoljavaju 2 pravila Lipinskog, dok **D2, D3, D8** i **D9** ne zadovoljavaju samo jedno pravilo. Takođe za jedinjenja **D2, D3, D8** i **D9** je procenjen manji rizik od metaboličke oksidacije P450 enzimima. Nijedno dizajnirano jedinjenje nema afinitet za hERG kalijumove kanale. Za jedinjenja **D2, D6** i **D9** je procenjen mali rizik za ispoljavanje toksičnih efekata, dok jedinjenja **D3** i **D8** nisu povezana sa rizikom od toksičnosti.

Na osnovu predviđenih pIC₅₀ vrednosti na MCF-7 ćelijskoj liniji tumora dojke i predviđenih ADMET osobina, dizajnirana jedinjenja **D3** i **D2** su odabrana kao najbolji kandidati za buduću sintezu i biološka istraživanja.

5. ZAKLJUČAK

- QSAR studije i određivanje strukture farmakofore derivata vitamina E sa antitumorskom aktivnošću na MCF7 ćelijskoj liniji tumora dojke.
 - U cilju određivanja strukture farmakofore sprovedene su 2D-QSAR i 3D-QSAR studije derivata vitamina E primenom PLS regresione analize. Oba QSAR modela daju dobre statističke parametre, pri čemu 3D-QSAR model ima bolju moć predviđanja ($Q^2=0,830$) u odnosu na 2D-QSAR model ($Q^2=0,772$).
 - Rezultati 2D-QSAR studije derivata vitamina E ukazuju da povećanje lipofilnosti, molekulske mase i zapremine ima negativan uticaj na aktivnost, dok uvođenje jednog ili više jonizujućih centara u molekul putem esterifikacije fenolne grupe vodi ka povećanju antitumorske aktivnosti.
 - Rezultati 3D-QSAR studije derivata vitamina E ukazuju da sledeće strukturne modifikacije dovode povećanja antitumorske aktivnosti derivata vitamina E: esterifikacija fenolne grupe na položaju C6; najmanje jedan donor i/ili akceptor vodonične veze u estarskom lancu na C6; hidrofobni region u estarskom lancu na C6; dva karbonilna kiseonika na optimalnoj razdaljini od 18,8-19,2 Å ili kraćoj; kraći ili sterno drugačiji ugljovodonični lanac na položaju C2.

- Sinteza aminokiselinskih estara α -tokoferola i γ -tokotrienola.
 - Upotrebom modifikovanog Steglich-ovog metoda esterifikacije, uz primenu EDC kao kuplujućeg agensa i DMAP kao katalizatora, sintetisani su estri α -tokoferola sa lizinom, prolinom, glutaminom, asparaginom i estri γ -tokotrienola sa lizinom, prolinom i glutaminom.
 - U prvoj fazi sinteze sintetisani su estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa Cbz-zaštićenim aminokiselinama, a u drugoj fazi su zaštitne Cbz-grupe uklonjene katalitičkom hidrogenacijom uz primenu Pd/C kao katalizatora.

- Strukture sintetisanih jedinjenja su potvrđene upotrebom ^1H NMR, ^{13}C NMR, ATR-FTIR, MS TOF i MS-MS spektroskopskih metoda.

- *In vitro* ispitivanje aktivnosti sintetisanih jedinjenja na malignim ćelijskim linijama.
 - MTT-testom ispitan je uticaj sintetisanih jedinjenja na preživljavanje MCF7 i MDA-MB 231 ćelija tumora dojke i A549 ćelija tumora pluća. Aktivnost je izražena u vidu minimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}).
 - Estar α -tokoferola sa lizinom dovodi do efektivne inhibicije preživljavanja MCF7 i MDA-MB-231 ćelija, dok je estar γ -tokotrienola aktivan na sve tri ćelijske linije. Na multirezistentnoj MDA-MB-231 ćelijskoj liniji najveću aktivnost ispoljava α -tokoferil asparagin nitril. ($\text{IC}_{50}=9,2 \mu\text{M}$). Estri α -tokoferola i γ -tokotrienola sa prolinom dovode do umerene inhibicije preživljavanja MCF7 ćelija. Komercijalni α -TOS i prirodni γ -tokotrienol ispoljavaju ograničenu aktivnost na sve tri ćelijske linije.
 - Sva sintetisana jedinjenja ispoljavaju slabu aktivnost na MRC-5 zdravim ćelijama fetalnih fibroblasta pluća, iz čega se izvodi zaključak da su selektivni za maligne ćelije.

- Ispitivanje mehanizama koji dovode do inhibicije preživljavanja malignih ćelija i sinergizma sa doksorubicinom.
 - Citometrijskom analizom ispitan je uticaj α -tokoferil asparagin nitrila na distribuciju MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. α -Tokoferil asparagin dovodi do smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa i izaziva apoptozu ćelija sa jasnim izdvajanjem sub-G1 pika. Kombinacija α -tokoferil asparagina sa doksorubicinom dovodi do

izraženog nakupljanja ćelija u sub-G1 fazi, što ukazuje na apoptozu kao primarni mehanizam antitumorske aktivnosti.

- Upotrebom Annexin V-FITC kita ispitana je sposobnost α -tokoferil asparagina da izazove apoptozu MDA-MB 231 ćelija. α -Tokoferil asparagin dovodi do rane i kasne apoptoze MDA-MB 231 ćelija. Visok stepen rane apoptoze (50,25%) izaziva kombinacija α -tokoferil asparagina sa doksorubicinom, što ukazuje na sinergizam u dejstvu i mogućnost kombinovane terapije.

- Ispitivanje stabilnosti u humanoj plazmi.
 - HPLC analizom ispitana je stabilnost α -tokoferil asparagina u humanoj plazmi.
 - Nakon 6 h, približno 83% od početne koncentracije α -tokoferil asparagina se detektuje u plazmi, odnosno 39% nakon 24 h.
 - Na osnovu prihvatljive metaboličke stabilnosti α -tokoferil asparagina i srodnih estara vitamina E u humanoj plazmi, može se zaključiti da će nakon parenteralne aplikacije estri vitamina E biti stabilni dovoljno dugo da bezbedno stignu do tumorskih tkiva i ispolje dejstvo.

- Virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda.
 - Pretraživanjem ChEMBL baze bioaktivnih jedinjenja metodom virtuelnog skrininga zasnovanog na strukturi najaktivnijih liganada na MCF7 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama tumora dojke, identifikovano je po 5 jedinjenja sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću na navedenim ćelijskim linijama.

- Racionalni dizajn analoga vitamina E.
 - Primenom moćnog pristupa integrisanja informacija dobijenih iz 2D- i 3D-QSAR studija dizajnirano je 9 novih jedinjenja (**D1-9**) sa potencijalno snažnijom antitumorskom aktivnošću na MCF7 ćelijskoj liniji tumora dojke. Za sva dizajnirana jedinjenja predviđene su ADMET osobine.
 - Dizajnirana jedinjenja **D3** i **D2** imaju najvišu predviđenu antitumorsku aktivnost, dobru metaboličku stabilnost i nisku toksičnost, te se predlažu za sintezu i buduća istraživanja.

6. LITERATURA

1. Evans H.M., Bishop K.S. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science*. **1922**, *56*, 650-651.
2. Evans H.M., Emerson O.H., Emerson G.A. The isolation from wheat-germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *J Biol Chem*. **1936**, *113*, 19-32.
3. Preedy V.R., Watson R.R., (Eds). The Encyclopedia of Vitamin E. CABI International, Wallingford, Oxfordshire, UK, **2007**.
4. Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. **1996**, *31*, 671-701.
5. Acuff R.V., Thedford S.S., Hidioglou N.N., Papas A.M., Odom T.A. Relative bioavailability of RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetate in humans: studies using deuterated compounds. *Am J Clin Nutr*. **1994**, *60*, 397-402.
6. Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radic Biol Med*. **2014**, *66*, 3-12.
7. Serbinova E., Kagan V., Han D., Packer L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic Biol Med*. **1991**, *10*, 263-275.
8. Burton G.W. Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc*. **1994**, *53*, 251-262.
9. Suzuki Y.J., Tsuchiya M., Wassall S.R. et al. Structural and dynamic membrane properties of .alpha.-tocopherol and .alpha.-tocotrienol: Implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*. **1993**, *32*, 10692-10699.
10. Qureshi A.A., Mo H., Packer L., Peterson D.M. Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *J Agric Food Chem*. **2000**, *48*, 3130-3140.

11. Hosomi A., Arita M., Sato Y. et al. Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 105-108.
12. Radosavac D., Graf P., Polidori M.C., Sies H., Stahl W. Tocopherol metabolites 2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (alpha-CEHC) and 2, 7, 8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (gamma-CEHC) in human serum after a single dose of natural vitamin E. *Eur J Nutr.* **2002**, *41*, 119-124.
13. Schmolz L., Birringer M., Lorkowski S., Wallert M. Complexity of vitamin E metabolism. *World J Biol Chem.* **2016**, *7*, 14-43.
14. Wilson C.O., Gisvold O., Block J.H., Beale J.M. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. 12th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2011**.
15. Negis Y., Zingg J.M., Ogru E., Gianello R., Libinaki R., Azzi A. On the existence of cellular tocopheryl phosphate, its synthesis, degradation and cellular roles: a hypothesis. *IUBMB Life.* **2005**, *57*, 23-25.
16. Negis Y., Aytan N., Ozer N. et al. The effect of tocopheryl phosphates on atherosclerosis progression in rabbits fed with a high cholesterol diet. *Arch Biochem Biophys.* **2006**, *450*, 63-66.
17. IOM. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academies Press, Washington (DC), US, **2000**, pp. 186-283.
18. Kowdley K.V., Mason J.B., Meydani S.N., Cornwall S., Grand R.J. Vitamin E deficiency and impaired cellular immunity related to intestinal fat malabsorption. *Gastroenterol.* **1992**, *102*, 2139-2142.
19. Nikolić J. Medicinska biohemija. Medicinski fakultet, Banja Luka, BIH, **2012**.
20. Freedman J.E., Farhat J.H., Loscalzo J., Keaney J.F. α -Tocopherol Inhibits Aggregation of Human Platelets by a Protein Kinase C Dependent Mechanism. *Circulation.* **1996**, *94*, 2434-2440.

21. Liu M., Wallmon A., Olsson-Mortlock C., Wallin R., Saldeen T. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* **2003**, *77*, 700-706.
22. Singh I., Turner A.H., Sinclair A.J., Li D., Hawley J.A. Effects of gamma-tocopherol supplementation on thrombotic risk factors. *Asia Pac J Clin Nutr.* **2007**, *16*, 422-428.
23. Parker R.A., Pearce B.C., Clark R.W., Gordon D.A., Wright J.J. Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem.* **1993**, *268*, 11230-11238.
24. Meydani M., Kwan P., Band M. et al. Long-term vitamin E supplementation reduces atherosclerosis and mortality in Ldlr^{-/-} mice, but not when fed Western style diet. *Atherosclerosis.* **2014**, *233*, 196-205.
25. Sesso H.D., Buring J.E., Christen W.G. et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA.* **2008**, *300*, 2123-2133.
26. Jiang Z., Yin X., Jiang Q. Natural forms of vitamin E and 13'-carboxychromanol, a long-chain vitamin E metabolite, inhibit leukotriene generation from stimulated neutrophils by blocking calcium influx and suppressing 5-lipoxygenase activity, respectively. *J Immunol.* **2011**, *186*, 1173-1179.
27. Wang Y., Jiang Q. gamma-Tocotrienol inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor by suppressing C/EBPbeta and NF-kappaB in macrophages. *J Nutr Biochem.* **2013**, *24*, 1146-1152.
28. Kim J.C., Mullan B.P., Black J.L., Hewitt R.J., van Barneveld R.J., Pluske J.R. Acetylsalicylic acid supplementation improves protein utilization efficiency while vitamin E supplementation reduces markers of the inflammatory response in weaned pigs challenged with enterotoxigenic E. coli. *J Anim Sci Biotechnol.* **2016**, *7*, 58.

29. Abdala-Valencia H., Berdnikovs S., Cook-Mills J.M. Vitamin E isoforms as modulators of lung inflammation. *Nutrients*. **2013**, *5*, 4347-4363.
30. Cook-Mills J.M. Isoforms of Vitamin E Differentially Regulate PKC alpha and Inflammation: A Review. *J Clin Cell Immunol*. **2013**, *4*.
31. Traber M.G., Podda M., Weber C., Thiele J., Rallis M., Packer L. Diet-derived and topically applied tocotrienols accumulate in skin and protect the tissue against ultraviolet light-induced oxidative stress. *Asia Pac J Clin Nutr*. **1997**, *6*, 63-67.
32. Weber C., Podda M., Rallis M., Thiele J.J., Traber M.G., Packer L. Efficacy of topically applied tocopherols and tocotrienols in protection of murine skin from oxidative damage induced by UV-irradiation. *Free Radic Biol Med*. **1997**, *22*, 761-769.
33. Pegoraro N.S., Barbieri A.V., Camponogara C. et al. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2017**, *150*, 32-40.
34. Berdnikovs S., Abdala-Valencia H., McCary C. et al. Isoforms of vitamin E have opposing immunoregulatory functions during inflammation by regulating leukocyte recruitment. *J Immunol*. **2009**, *182*, 4395-4405.
35. Wu D., Meydani S.N. Age-associated changes in immune function: impact of vitamin E intervention and the underlying mechanisms. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. **2014**, *14*, 283-289.
36. Abdala-Valencia H., Soveg F., Cook-Mills J.M. gamma-Tocopherol supplementation of allergic female mice augments development of CD11c+CD11b+ dendritic cells in utero and allergic inflammation in neonates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2016**, *310*, L759-771.
37. Kang J.H., Cook N., Manson J., Buring J.E., Grodstein F. A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women. *Arch Intern Med*. **2006**, *166*, 2462-2468.

38. Dysken M.W., Sano M., Asthana S. et al. Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. *JAMA*. **2014**, *311*, 33-44.
39. Ulatowski L., Parker R., Warriar G., Sultana R., Butterfield D.A., Manor D. Vitamin E is essential for Purkinje neuron integrity. *Neuroscience*. **2014**, *260*, 120-129.
40. Mangialasche F., Solomon A., Kareholt I. et al. Serum levels of vitamin E forms and risk of cognitive impairment in a Finnish cohort of older adults. *Exp Gerontol*. **2013**, *48*, 1428-1435.
41. Constantinou C., Papas A., Constantinou A.I. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. *Int J Cancer*. **2008**, *123*, 739-752.
42. Negis Y., Zingg J.M., Libinaki R., Meydani M., Azzi A. Vitamin E and cancer. *Nutr Cancer*. **2009**, *61*, 875-878.
43. Berrino F., Muti P. Mediterranean diet and cancer. *Eur J Clin Nutr*. **1989**, *43*, 49-55.
44. Eichholzer M., Stähelin H.B., Gey K.F., Lüdin E., Bernasconi F. Prediction of male cancer mortality by plasma levels of interacting vitamins: 17-year follow-up of the prospective Basel study. *Int J Cancer*. **1996**, *66*, 145-150.
45. Burton G.W., Traber M.G., Acuff R.V. et al. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr*. **1998**, *67*, 669-684.
46. Azzi A., Aratri E., Boscoboinik D. et al. Molecular basis of α -tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *BioFactors*. **1998**, *7*, 3-14.
47. Campbell S.E., Stone W.L., Lee S. et al. Comparative effects of RRR- α - and RRR- γ -tocopherol on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *BMC Cancer*. **2006**, *6*, 13.

48. Longnecker M.P., Martin-Moreno J.M., Knekt P. et al. Serum alpha-tocopherol concentration in relation to subsequent colorectal cancer: pooled data from five cohorts. *J Natl Cancer Inst.* **1992**, *84*, 430-435.
49. Jiang Q., Wong J., Fyrst H., Saba J.D., Ames B.N. gamma-Tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, *101*, 17825-17830.
50. Campbell S.E., Musich P.R., Whaley S.G. et al. Gamma tocopherol upregulates the expression of 15-S-HETE and induces growth arrest through a PPAR gamma-dependent mechanism in PC-3 human prostate cancer cells. *Nutr Cancer.* **2009**, *61*, 649-662.
51. Jiang Q., Wong J., Ames B.N. Gamma-tocopherol induces apoptosis in androgen-responsive LNCaP prostate cancer cells via caspase-dependent and independent mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* **2004**, *1031*, 399-400.
52. Yu W., Simmons-Menchaca M., Gapor A., Sanders B.G., Kline K. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer.* **1999**, *33*, 26-32.
53. Yu W., Jia L., Wang P. et al. In vitro and in vivo evaluation of anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms. *Mol Nutr Food Res.* **2008**, *52*, 447-456.
54. Yu W., Jia L., Park S.K. et al. Anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms: RRR-alpha-tocopherol blocks the anticancer actions of gamma-tocopherol. *Mol Nutr Food Res.* **2009**, *53*, 1573-1581.
55. Das Gupta S., Sae-tan S., Wahler J. et al. Dietary gamma-Tocopherol-Rich Mixture Inhibits Estrogen-Induced Mammary Tumorigenesis by Modulating Estrogen Metabolism, Antioxidant Response, and PPARgamma. *Cancer Prev Res (Phila).* **2015**, *8*, 807-816.

56. Lee H.J., Ju J., Paul S. et al. Mixed tocopherols prevent mammary tumorigenesis by inhibiting estrogen action and activating PPAR-gamma. *Clin Cancer Res.* **2009**, *15*, 4242-4249.
57. Smolarek A.K., So J.Y., Thomas P.E. et al. Dietary tocopherols inhibit cell proliferation, regulate expression of ERalpha, PPARgamma, and Nrf2, and decrease serum inflammatory markers during the development of mammary hyperplasia. *Mol Carcinog.* **2013**, *52*, 514-525.
58. Lu G., Xiao H., Li G.X. et al. A gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols inhibits chemically induced lung tumorigenesis in A/J mice and xenograft tumor growth. *Carcinogenesis.* **2010**, *31*, 687-694.
59. Li G.X., Lee M.J., Liu A.B. et al. delta-tocopherol is more active than alpha - or gamma -tocopherol in inhibiting lung tumorigenesis in vivo. *Cancer Prev Res (Phila).* **2011**, *4*, 404-413.
60. Michels K.B., Holmberg L., Bergkvist L., Ljung H., Bruce A., Wolk A. Dietary antioxidant vitamins, retinol, and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. *Int J Cancer.* **2001**, *91*, 563-567.
61. Verhoeven D.T., Assen N., Goldbohm R.A. et al. Vitamins C and E, retinol, beta-carotene and dietary fibre in relation to breast cancer risk: a prospective cohort study. *Br J Cancer.* **1997**, *75*, 149-155.
62. Lee I.M., Cook N.R., Gaziano J.M. et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA.* **2005**, *294*, 56-65.
63. Hu F., Wu Z., Li G. et al. The plasma level of retinol, vitamins A, C and alpha-tocopherol could reduce breast cancer risk? A meta-analysis and meta-regression. *J Cancer Res Clin Oncol.* **2015**, *141*, 601-614.
64. Wu Q.J., Xiang Y.B., Yang G. et al. Vitamin E intake and the lung cancer risk among female nonsmokers: a report from the Shanghai Women's Health Study. *Int J Cancer.* **2015**, *136*, 610-617.

65. Wright M.E., Weinstein S.J., Lawson K.A. et al. Supplemental and dietary vitamin E intakes and risk of prostate cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2007**, *16*, 1128-1135.
66. Lonn E., Bosch J., Yusuf S. et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.* **2005**, *293*, 1338-1347.
67. Heinonen O.P., Albanes D., Virtamo J. et al. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst.* **1998**, *90*, 440-446.
68. Lippman S.M., Goodman P.J., Klein E.A. et al. Designing the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *J Natl Cancer Inst.* **2005**, *97*, 94-102.
69. Lippman S.M., Klein E.A., Goodman P.J. et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* **2009**, *301*, 39-51.
70. Klein E.A., Thompson I.M., Jr., Tangen C.M. et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* **2011**, *306*, 1549-1556.
71. McIntyre B.S., Briski K.P., Tirmenstein M.A., Fariss M.W., Gapor A., Sylvester P.W. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids.* **2000**, *35*, 171-180.
72. Nesaretnam K., Guthrie N., Chambers A.F., Carroll K.K. Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids.* **1995**, *30*, 1139-1143.
73. Guthrie N., Gapor A., Chambers A.F., Carroll K.K. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J Nutr.* **1997**, *127*, 544S-548S.

74. Nesaretnam K., Stephen R., Dils R., Darbre P. Tocotrienols inhibit the growth of human breast cancer cells irrespective of estrogen receptor status. *Lipids*. **1998**, *33*, 461-469.
75. Pierpaoli E., Viola V., Pilolli F., Piroddi M., Galli F., Provinciali M. Gamma- and delta-tocotrienols exert a more potent anticancer effect than alpha-tocopheryl succinate on breast cancer cell lines irrespective of HER-2/neu expression. *Life Sci*. **2010**, *86*, 668-675.
76. Shun M.C., Yu W., Gapor A. et al. Pro-apoptotic mechanisms of action of a novel vitamin E analog (alpha-TEA) and a naturally occurring form of vitamin E (delta-tocotrienol) in MDA-MB-435 human breast cancer cells. *Nutr Cancer*. **2004**, *48*, 95-105.
77. Srivastava J.K., Gupta S. Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2006**, *346*, 447-453.
78. Huang Y., Wu R., Su Z.Y. et al. A naturally occurring mixture of tocotrienols inhibits the growth of human prostate tumor, associated with epigenetic modifications of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. *J Nutr Biochem*. **2017**, *40*, 155-163.
79. Barve A., Khor T.O., Reuhl K., Reddy B., Newmark H., Kong A.N. Mixed tocotrienols inhibit prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Nutr Cancer*. **2010**, *62*, 789-794.
80. Sakai M., Okabe M., Tachibana H., Yamada K. Apoptosis induction by gamma-tocotrienol in human hepatoma Hep3B cells. *J Nutr Biochem*. **2006**, *17*, 672-676.
81. Wada S., Satomi Y., Murakoshi M., Noguchi N., Yoshikawa T., Nishino H. Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro. *Cancer Lett*. **2005**, *229*, 181-191.

82. Agarwal M.K., Agarwal M.L., Athar M., Gupta S. Tocotrienol-rich fraction of palm oil activates p53, modulates Bax/Bcl2 ratio and induces apoptosis independent of cell cycle association. *Cell Cycle*. **2004**, 3, 205-211.
83. Zhang J.S., Li D.M., He N. et al. A paraptosis-like cell death induced by delta-tocotrienol in human colon carcinoma SW620 cells is associated with the suppression of the Wnt signaling pathway. *Toxicology*. **2011**, 285, 8-17.
84. Zhang J.S., Li D.M., Ma Y. et al. gamma-Tocotrienol induces paraptosis-like cell death in human colon carcinoma SW620 cells. *PLoS One*. **2013**, 8, e57779.
85. Nesaretnam K., Gomez P.A., Selvaduray K.R., Razak G.A. Tocotrienol levels in adipose tissue of benign and malignant breast lumps in patients in Malaysia. *Asia Pac J Clin Nutr*. **2007**, 16, 498-504.
86. Nesaretnam K., Selvaduray K.R., Abdul Razak G., Veerasenan S.D., Gomez P.A. Effectiveness of tocotrienol-rich fraction combined with tamoxifen in the management of women with early breast cancer: a pilot clinical trial. *Breast Cancer Res*. **2010**, 12, R81.
87. Neuzil J. Vitamin E succinate and cancer treatment: a vitamin E prototype for selective antitumour activity. *Br J Cancer*. **2003**, 89, 1822-1826.
88. Alleva R., Benassi M.S., Pazzaglia L. et al. Alpha-tocopheryl succinate alters cell cycle distribution sensitising human osteosarcoma cells to methotrexate-induced apoptosis. *Cancer Lett*. **2006**, 232, 226-235.
89. Basu A., Grossie B., Bennett M., Mills N., Imrhan V. Alpha-tocopheryl succinate (alpha-TOS) modulates human prostate LNCaP xenograft growth and gene expression in BALB/c nude mice fed two levels of dietary soybean oil. *Eur J Nutr*. **2007**, 46, 34-43.
90. Sun Y., Zhao Y., Hou L., Zhang X., Zhang Z., Wu K. RRR-alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis in human gastric cancer cells via the NF-kappaB signaling pathway. *Oncol Rep*. **2014**, 32, 1243-1248.

91. Yu W., Sanders B.G., Kline K. RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2483-2491.
92. Lee E., Choi M.K., Lee Y.J. et al. Alpha-tocopheryl succinate, in contrast to alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E2 production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis.* **2006**, *27*, 2308-2315.
93. Birringer M., EyTina J.H., Salvatore B.A., Neuzil J. Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: structure-function relation. *Br J Cancer.* **2003**, *88*, 1948-1955.
94. Tomasetti M., Rippo M.R., Alleva R. et al. Alpha-tocopheryl succinate and TRAIL selectively synergise in induction of apoptosis in human malignant mesothelioma cells. *Br J Cancer.* **2004**, *90*, 1644-1653.
95. Kogure K., Manabe S., Suzuki I., Tokumura A., Fukuzawa K. Cytotoxicity of alpha-tocopheryl succinate, malonate and oxalate in normal and cancer cells in vitro and their anti-cancer effects on mouse melanoma in vivo. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* **2002**, *51*, 392-397.
96. Malafa M.P., Fokum F.D., Mowlavi A., Abusief M., King M. Vitamin E inhibits melanoma growth in mice. *Surgery.* **2002**, *131*, 85-91.
97. Behery F.A., Elnagar A.Y., Akl M.R. et al. Redox-silent tocotrienol esters as breast cancer proliferation and migration inhibitors. *Bioorg Med Chem.* **2010**, *18*, 8066-8075.
98. Vraka P.S., Drouza C., Rikkou M.P., Odysseos A.D., Keramidas A.D. Synthesis and study of the cancer cell growth inhibitory properties of alpha-, gamma-tocopheryl and gamma-tocotrienyl 2-phenylselenyl succinates. *Bioorg Med Chem.* **2006**, *14*, 2684-2696.
99. Arya P., Alibhai N., Qin H. et al. Design and synthesis of analogs of vitamin E: antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**, *8*, 2433-2438.

100. Tomic-Vatic A., Eytina J., Chapman J., Mahdavian E., Neuzil J., Salvatore B.A. Vitamin E amides, a new class of vitamin E analogues with enhanced proapoptotic activity. *Int J Cancer*. **2005**, *117*, 188-193.
101. Turanek J., Wang X.F., Knotigova P. et al. Liposomal formulation of alpha-tocopheryl maleamide: in vitro and in vivo toxicological profile and anticancer effect against spontaneous breast carcinomas in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2009**, *237*, 249-257.
102. Lawson K.A., Anderson K., Menchaca M. et al. Novel vitamin E analogue decreases syngeneic mouse mammary tumor burden and reduces lung metastasis. *Mol Cancer Ther*. **2003**, *2*, 437-444.
103. Anderson K., Lawson K.A., Simmons-Menchaca M., Sun L., Sanders B.G., Kline K. Alpha-TEA plus cisplatin reduces human cisplatin-resistant ovarian cancer cell tumor burden and metastasis. *Exp Biol Med (Maywood)*. **2004**, *229*, 1169-1176.
104. Riedel S.B., Fischer S.M., Sanders B.G., Kline K. Vitamin E analog, alpha-tocopherol ether-linked acetic acid analog, alone and in combination with celecoxib, reduces multiplicity of ultraviolet-induced skin cancers in mice. *Anti Cancer Drug*. **2008**, *19*, 175-181.
105. Yao J., Gao P., Xu Y., Li Z. alpha-TEA inhibits the growth and motility of human colon cancer cells via targeting RhoA/ROCK signaling. *Mol Med Rep*. **2016**, *14*, 2534-2540.
106. Jia L., Yu W., Wang P., Sanders B.G., Kline K. In vivo and in vitro studies of anticancer actions of alpha-TEA for human prostate cancer cells. *Prostate*. **2008**, *68*, 849-860.
107. Nishikawa K., Satoh H., Hirai A. et al. alpha-Tocopheryloxybutyric acid enhances necrotic cell death in breast cancer cells treated with chemotherapy agent. *Cancer Lett*. **2003**, *201*, 51-56.

108. Chang E., Ni J., Yin Y. et al. Alpha-vitamin E derivative, RRR-alpha-tocopheryloxybutyric acid inhibits the proliferation of prostate cancer cells. *Asian J Androl.* **2007**, *9*, 31-39.
109. Ni J., Mai T., Pang S.T. et al. In vitro and in vivo anticancer effects of the novel vitamin E ether analogue RRR-alpha-tocopheryloxybutyl sulfonic acid in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **2009**, *15*, 898-906.
110. He L., Mo H., Hadisusilo S., Qureshi A.A., Elson C.E. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *J Nutr.* **1997**, *127*, 668-674.
111. Weber T., Dalen H., Andera L. et al. Mitochondria play a central role in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate, an agent with antineoplastic activity: comparison with receptor-mediated pro-apoptotic signaling. *Biochemistry.* **2003**, *42*, 4277-4291.
112. Wada S. Chemoprevention of tocotrienols: the mechanism of antiproliferative effects. *Forum Nutr.* **2009**, *61*, 204-216.
113. Shah S., Gapor A., Sylvester P.W. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-induced apoptosis in murine mammary cancer cells. *Nutr Cancer.* **2003**, *45*, 236-246.
114. Sylvester P.W., Shah S. Intracellular mechanisms mediating tocotrienol-induced apoptosis in neoplastic mammary epithelial cells. *Asia Pac J Clin Nutr.* **2005**, *14*, 366-373.
115. Ahn K.S., Sethi G., Krishnan K., Aggarwal B.B. Gamma-tocotrienol inhibits nuclear factor-kappaB signaling pathway through inhibition of receptor-interacting protein and TAK1 leading to suppression of antiapoptotic gene products and potentiation of apoptosis. *J Biol Chem.* **2007**, *282*, 809-820.
116. Yap W.N., Zaiden N., Tan Y.L. et al. Id1, inhibitor of differentiation, is a key protein mediating anti-tumor responses of gamma-tocotrienol in breast cancer cells. *Cancer Lett.* **2010**, *291*, 187-199.

117. Gysin R., Azzi A., Visarius T. Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J.* **2002**, *16*, 1952-1954.
118. Fernandes N.V., Guntipalli P.K., Mo H. d-delta-Tocotrienol-mediated cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 4937-4944.
119. Sylvester P.W. Synergistic anticancer effects of combined gamma-tocotrienol with statin or receptor tyrosine kinase inhibitor treatment. *Genes Nutr.* **2012**, *7*, 63-74.
120. Wali V.B., Sylvester P.W. Synergistic antiproliferative effects of gamma-tocotrienol and statin treatment on mammary tumor cells. *Lipids.* **2007**, *42*, 1113-1123.
121. Yang Z., Xiao H., Jin H., Koo P.T., Tsang D.J., Yang C.S. Synergistic actions of atorvastatin with gamma-tocotrienol and celecoxib against human colon cancer HT29 and HCT116 cells. *Int J Cancer.* **2010**, *126*, 852-863.
122. Siveen K.S., Ahn K.S., Ong T.H. et al. Y-tocotrienol inhibits angiogenesis-dependent growth of human hepatocellular carcinoma through abrogation of AKT/mTOR pathway in an orthotopic mouse model. *Oncotarget.* **2014**, *5*, 1897-1911.
123. Nakagawa K., Shibata A., Yamashita S. et al. In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol. *J Nutr.* **2007**, *137*, 1938-1943.
124. Selvaduray K.R., Radhakrishnan A.K., Kutty M.K., Nesaretnam K. Palm tocotrienols decrease levels of pro-angiogenic markers in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and murine mammary cancer cells. *Genes Nutr.* **2012**, *7*, 53-61.
125. Leelananda S.P., Lindert S. Computational methods in drug discovery. *Beilstein J Org Chem.* **2016**, *12*, 2694-2718.

126. Davis A., Ward S.E. The Handbook of Medicinal Chemistry: Principles and Practice. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2014**, pp. 67-72, 158.
127. Lewars E.G. Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics. Springer Science & Business Media, Dordrecht Heidelberg London New York, **2010**, pp. 1-7.
128. Geerlings P., De Proft F., Langenaeker W. Conceptual density functional theory. *Chem Rev.* **2003**, *103*, 1793-1873.
129. Crum-Brown A., Fraser T. On the connection between chemical constitution and physiological action. Part 1. On the physiological action of the ammonium bases, derived from Strychia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia and Nicotia. *Trans R Soc Edinburgh.* **1868**, *25*, 151-203.
130. Nantasenamat C., Isarankura-Na-Ayudhya C., Prachayasittikul V. Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert Opin Drug Discov.* **2010**, *5*, 633-654.
131. Verma J., Khedkar V., Coutinho E. 3D-QSAR in Drug Design - A Review. *Curr Top Med Chem.* **2010**, *10*, 95-115.
132. Klebe G., Abraham U. Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *J Comput Aided Mol Des.* **1999**, *13*, 1-10.
133. Pastor M., Cruciani G., McLay I., Pickett S., Clementi S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *J Med Chem.* **2000**, *43*, 3233-3243.
134. Todeschini R., Consonni V., Mannhold R., Kubinyi H., Timmerman H. Handbook of Molecular Descriptors. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2008**.
135. Roy K., Kar S., Das R.N. Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment. Academic Press, **2015**, pp. 53.

136. Martin T.M., Harten P., Young D.M. et al. Does rational selection of training and test sets improve the outcome of QSAR modeling? *J Chem Inf Model.* **2012**, *52*, 2570-2578.
137. OECD. Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models. OECD Publishing, Paris, France, **2014**.
138. Bodzioch K., Durand A., Kaliszan R., Baczek T., Vander Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta.* **2010**, *81*, 1711-1718.
139. Roy K., Pratim Roy P. Comparative chemometric modeling of cytochrome 3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds using stepwise MLR, FA-MLR, PLS, GFA, G/PLS and ANN techniques. *Eur J Med Chem.* **2009**, *44*, 2913-2922.
140. Wold S., Sjöström M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr Intell Lab.* **2001**, *58*, 109-130.
141. Eriksson L., Johansson E., AB U., Academy U., Kettaneh-Wold N., Wold S. Multi- and Megavariate Data Analysis: Principles and Applications. Umetrics Academy, Umea, Sweden, **2001**, pp. 39-103.
142. Agatonovic-Kustrin S., Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal.* **2000**, *22*, 717-727.
143. Braspenning P.J., Thuijsman F., Weijters A.J.M.M. Artificial Neural Networks: An Introduction to ANN Theory and Practice. Springer, Berlin, Germany, **1995**, pp. 2.
144. Tropsha A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol Inform.* **2010**, *29*, 476-488.
145. Tropsha A., Gramatica P., Gombar V.K. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. *QSAR Comb Sci.* **2003**, *22*, 69-77.

146. Golbraikh A., Tropsha A. Beware of q^2 ! *J Mol Graph Model.* **2002**, *20*, 269-276.
147. Pratim Roy P., Paul S., Mitra I., Roy K. On two novel parameters for validation of predictive QSAR models. *Molecules.* **2009**, *14*, 1660-1701.
148. Roy K., Mitra I., Kar S., Ojha P.K., Das R.N., Kabir H. Comparative studies on some metrics for external validation of QSPR models. *J Chem Inf Model.* **2012**, *52*, 396-408.
149. Veerasamy R., Rajak H., Jain A., Sivadasan S., Varghese C.P., Agrawal R. Validation of QSAR Models - Strategies and Importance. *Int J Drug Des Disc.* **2011**, *2*, 511-519.
150. Netzeva T.I., Worth A., Aldenberg T. et al. Current status of methods for defining the applicability domain of (quantitative) structure-activity relationships. The report and recommendations of ECVAM Workshop 52. *Altern Lab Anim.* **2005**, *33*, 155-173.
151. Roy K., Kar S., Das R.N. A Primer on QSAR/QSPR Modeling. Springer International Publishing, Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, **2015**, pp. 47-48.
152. Nikolic K., Agababa D. Design and QSAR study of analogs of gamma-tocotrienol with enhanced antiproliferative activity against human breast cancer cells. *J Mol Graph Model.* **2009**, *27*, 777-783.
153. Nikolic K.M. Design and QSAR study of analogs of alpha-tocopherol with enhanced antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *J Mol Graph Model.* **2008**, *26*, 868-873.
154. Elnagar A.Y., Wali V.B., Sylvester P.W., El Sayed K.A. Design and preliminary structure-activity relationship of redox-silent semisynthetic tocotrienol analogues as inhibitors for breast cancer proliferation and invasion. *Bioorg Med Chem.* **2010**, *18*, 755-768.
155. Shoichet B.K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature.* **2004**, *432*, 862-865.

156. Walters W.P., Stahl M.T., Murcko M.A. Virtual screening—an overview. *Drug Discov Today*. **1998**, *3*, 160-178.
157. Li Q., Shah S. Structure-Based Virtual Screening. *Methods Mol Biol*. **2017**, *1558*, 111-124.
158. Cai C., Gong J., Liu X., Gao D., Li H. Molecular Similarity: Methods and Performance. *Chinese J Chem*. **2013**, *31*, 1123-1132.
159. Fechner U., Schneider G. Evaluation of distance metrics for ligand-based similarity searching. *Chembiochem*. **2004**, *5*, 538-540.
160. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. **2001**, *46*, 3-26.
161. Djuric Z., Heilbrun L.K., Lababidi S., Everett-Bauer C.K., Fariss M.W. Growth inhibition of MCF-7 and MCF-10A human breast cells by α -tocopheryl hemisuccinate, cholesteryl hemisuccinate and their ether analogs. *Cancer Lett*. **1997**, *111*, 133-139.
162. Lee C.L., Chiang L.C., Cheng L.H. et al. Influenza A (H(1)N(1)) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula assa-foetida*. *J Nat Prod*. **2009**, *72*, 1568-1572.
163. Liu L.Y., Li Z.H., Ding Z.H. et al. Meroterpenoid pigments from the basidiomycete *Albatrellus ovinus*. *J Nat Prod*. **2013**, *76*, 79-84.
164. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J Comput Chem*. **1989**, *10*, 209-220.
165. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J Comput Chem*. **1989**, *10*, 221-264.
166. Roothaan C.C.J. New developments in molecular orbital theory. *Rev Mod Phys*. **1951**, *23*, 69.

167. Santos C.B., Lobato C.C., Braga F.S. et al. Application of Hartree-Fock method for modeling of bioactive molecules using SAR and QSPR. *Comput Mol Biosci.* **2014**, 2014.
168. Todeschini R., Consonni V. Molecular descriptors for chemoinformatics, volume 41 (2 volume set). Vol 41. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2009**.
169. Eriksson L., Jaworska J., Worth A.P., Cronin M.T., McDowell R.M., Gramatica P. Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification-and regression-based QSARs. *Environ Health Perspect.* **2003**, *111*, 1361.
170. Wold S., Trygg J. The PLS method--partial least squares projections to latent structures--and its applications in industrial RDP (research, development, and production). *UMETRICS AB*; 2004; (2011):1-44.
171. Mehmood T., Martens H., Saebo S., Warringer J., Snipen L. A Partial Least Squares based algorithm for parsimonious variable selection. *Algorithms Mol Biol.* **2011**, *6*, 27.
172. da Silva C.H.T.d.P., Taft C.A. 3D descriptors calculation and conformational search to investigate potential bioactive conformations, with application in 3D-QSAR and virtual screening in drug design. *J Biomol Struct Dyn.* **2016**, 1-9.
173. Baroni M., Costantino G., Cruciani G., Riganelli D., Valigi R., Clementi S. Generating Optimal Linear PLS Estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR Problems. *Quant Struct-Act Rel.* **1993**, *12*, 9-20.
174. Ojha P.K., Roy K. Comparative QSARs for antimalarial endochins: Importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemometr Intell Lab.* **2011**, *109*, 146-161.
175. Roy K., Kar S., Ambure P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemometr Intell Lab.* **2015**, *145*, 22-29.

176. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **1983**, *65*, 55-63.
177. Ohno M., Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods*. **1991**, *145*, 199-203.
178. Ormerod M.G. Flow Cytometry: A Practical Approach. In: Ormerod, M.G. (Ed.), Analysis of DNA-General Methods. Oxford University Press, New York, **2000**, pp. 119-125.
179. Konsoula R., Jung M. In vitro plasma stability, permeability and solubility of mercaptoacetamide histone deacetylase inhibitors. *Int J Pharm*. **2008**, *361*, 19-25.
180. Marra F., Ostacolo C., Laneri S. et al. Synthesis, hydrolysis, and skin retention of amino acid esters of α -tocopherol. *J Pharm Sci*. **2009**, *98*, 2364-2376.
181. Gaulton A., Bellis L.J., Bento A.P. et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res*. **2012**, *40*, D1100-D1107.
182. Cross S., Baroni M., Carosati E., Benedetti P., Clementi S. FLAP: GRID molecular interaction fields in virtual screening. validation using the DUD data set. *J Chem Inf Model*. **2010**, *50*, 1442-1450.
183. Sirci F., Goracci L., Rodriguez D., van Muijlwijk-Koezen J., Gutierrez-de-Teran H., Mannhold R. Ligand-, structure- and pharmacophore-based molecular fingerprints: a case study on adenosine A(1), A (2A), A (2B), and A (3) receptor antagonists. *J Comput Aided Mol Des*. **2012**, *26*, 1247-1266.
184. Vasanthanathan P., Kongsted J. Virtual screening models for prediction of HIV-1 RT associated RNase H inhibition. *PloS one*. **2013**, *8*, 1-15.
185. Moriguchi I., Hirono S., Liu Q., Nakagome I., Matsushita Y. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem Pharm Bull*. **1992**, *40*, 127-130.

186. Consonni V., Todeschini R., Pavan M. Structure/Response Correlations and Similarity/Diversity Analysis by GETAWAY Descriptors. 1. Theory of the Novel 3D Molecular Descriptors. *J Chem Inf Comput Sci.* **2002**, *42*, 682-692.
187. Consonni V., Todeschini R., Pavan M., Gramatica P. Structure/Response Correlations and Similarity/Diversity Analysis by GETAWAY Descriptors. 2. Application of the Novel 3D Molecular Descriptors to QSAR/QSPR Studies. *J Chem Inf Comput Sci.* **2002**, *42*, 693-705.
188. Schuur J.H., Selzer P., Gasteiger J. The Coding of the Three-Dimensional Structure of Molecules by Molecular Transforms and Its Application to Structure-Spectra Correlations and Studies of Biological Activity. *J Chem Inf Comput Sci.* **1996**, *36*, 334-344.
189. Duchowicz P.R., Fernandez M., Caballero J., Castro E.A., Fernandez F.M. QSAR for non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg Med Chem.* **2006**, *14*, 5876-5889.
190. Neises B., Steglich W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew Chem Int Ed.* **1978**, *17*, 522-524.
191. Tsvetkova B., Tencheva J., Peikov P. Esterification of 7-theophyllineacetic acid with diethylene glycol monomethyl ether. *Acta Pharm.* **2006**, *56*, 251-257.
192. Katsoyannis P.G., Gish D.T., Hess G.P., Du Vigneaud V. Synthesis of Two Protected Hexapeptides Containing the N-Terminal and C-Terminal Sequences of Arginine-Vasopressin1. *J Am Chem Soc.* **1958**, *80*, 2558-2562.
193. Ling M.T., Luk S.U., Al-Ejeh F., Khanna K.K. Tocotrienol as a potential anticancer agent. *Carcinogenesis.* **2012**, *33*, 233-239.
194. Guan F., Li G., Liu A.B. et al. δ - and γ -tocopherols, but not α -tocopherol, inhibit colon carcinogenesis in azoxymethane-treated F344 rats. *Cancer Prev Res.* **2012**, *5*, 644-654.

195. Patacsil D., Tran A.T., Cho Y.S. et al. Gamma-tocotrienol induced apoptosis is associated with unfolded protein response in human breast cancer cells. *J Nutr Biochem.* **2012**, *23*, 93-100.
196. Dos Santos G., e Lima R.A., Pestana C. et al. (+) α -Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. *Leukemia.* **2012**, *26*, 451-460.
197. Weber T., Lu M., Andera L. et al. Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clin Cancer Res.* **2002**, *8*, 863-869.
198. Koudelka S., Knotigova P.T., Masek J. et al. Liposomal delivery systems for anti-cancer analogues of vitamin E. *J Control Release.* **2015**, *207*, 59-69.
199. Neophytou C.M., Constantinou A.I. Drug delivery innovations for enhancing the anticancer potential of Vitamin E isoforms and their derivatives. *Biomed Res Int.* **2015**, 584862.
200. Gagic Z., Ivkovic B., Srdic-Rajic T., Vucicevic J., Nikolic K., Agbaba D. Synthesis of the vitamin E amino acid esters with an enhanced anticancer activity and in silico screening for new antineoplastic drugs. *Eur J Pharm Sci.* **2016**, *88*, 59-69.
201. Carvalho J.F., Silva M.M., Moreira J.N., Simoes S., Sa E.M.M.L. Selective cytotoxicity of oxysterols through structural modulation on rings A and B. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR. *J Med Chem.* **2011**, *54*, 6375-6393.

7. PRILOZI

PRILOG 1. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. **Gagic Z**, Nikolic K, Ivkovic B, Filipic S, Agbaba D. QSAR studies and design of new analogs of vitamin E with enhanced antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cells. *JTICE*. **2016**, 59, 33-44.
2. **Gagic Z**, Ivkovic B, Srdic-Rajic T, Vucicevic J, Nikolic K, Agbaba D. Synthesis of the vitamin E amino acid esters with an enhanced anticancer activity and *in silico* screening for new antineoplastic drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, 88, 59-69.

Spisak radova objavljenih u nacionalnim časopisima:

1. **Gagić Ž**, Ivković B, Nikolić K, Agbaba D. Primena metoda tankoslojne hromatografije i hromatografije na koloni u praćenju sinteze α -tokoferil-lizin estera. *Arh. Farm.* **2014**, 64, 261–270.

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu:

1. **Gagic Z**, Ivkovic B, Vucicevic J, Agbaba D, Nikolic K. The synthesis of amino acid analog of vitamin E. *12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, 2014. Proceedings, pp. 1149-1152.
2. **Gagić Ž**, Nikolić K, Agbaba D, Ivković B. QSAR studies and design of new analogs of vitamin E with antiproliferative effect on MCF-7 breast cancer cells. *VI Serbian Congress of Pharmacy with international participations*, Belgrade, 2014. Abstract book, pp. 166.

3. **Gagić Ž**, Nikolić K, Ivković B, Filipić S, Agbaba D. Primena hromatografskih metoda u sintezi α -tokoferil-lizin estera. *III Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem*, Sarajevo, 2015. Pharmacia, Vol.18(1): pp. 165.
4. **Gagić Ž**, Nikolić K, Ivković B, Filipić S, Agbaba D. Monitoring the synthesis and purification of amino acid ester of α -tocopherol. 21st International Symposium on Separation Sciences, Ljubljana, 2015. Book of Abstracts, pp. 78.
5. **Gagić Ž**, Nikolić K, Ivković B, Filipić S, Agbaba D. Design of new vitamin E derivatives as potential anticancer agents. *II Congress of pharmacists of Montenegro with the international participation*, Budva, 2015. Abstract book, pp. 123-124.

PRILOG 2. Biografija

Žarko Gagić rođen je 25.08.1985. u Bihaću. Osnovnu školu i Gimnaziju završio je u Banjaluci. Studijski program farmacija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjaluci upisao je 2003. godine i diplomirao je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.43. Tokom studiranja više puta je nagrađivan od strane Medicinskog fakulteta za postignute rezultate. Bio je stipendista fondacije „dr Milan Jelić“ „Petar Kočić“ te Vlade Republike Srpske. Nakon završenog studija obavio je pripravnički staž i položio stručni ispit za farmaceute.

Doktorske akademske studije-modul Farmaceutska hemija upisao je 2010. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2012. učestvuje kao istraživač doktorand na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj 172033, čiji je rukovodilac prof.dr Danica Agbaba.

Od 2010. je zaposlen u zvanju asistenta na Katedri za farmaceutsku hemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci, a 2014. godine u zvanju višeg asistenta. Bio je član komisije za odbranu 16 završnih radova na Medicinskom fakultetu – studijski program Farmacija, Univerziteta u Banjoj Luci.

Autor je i koautor 4 naučna rada štampana u časopisima međunarodnog značaja, 2 naučna rada štampana u časopisima nacionalnog značaja i 10 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u izvodu.

Doktorsku disertaciju pod nazivom „Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i ispitivanje antiproliferativne aktivnosti derivata α -tokoferola i γ -tokotrienola“ uradio je pod rukovodstvom dr sc. Katarine Nikolić.

PRILOG 3.

Изјава о ауторству

Потписани-а Жарко Гагић

број индекса 2/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Одређивање структуре фармакофоре, дизајн, синтеза и испитивање
антипролиферативне активности деривата α -токоферола и γ -
токотриенола“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 04.12.2017.

Потпис докторанда

PRILOG 4.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Жарко Гагић
Број индекса 2/10
Студијски програм Фармацеутска хемија
Наслов рада „Одређивање структуре фармакофоре, дизајн, синтеза и
 испитивање антипролиферативне активности
деривата α -токоферола и γ -токотриенола“
Ментор др. сц. Катарина Николић
Потписани/а Жарко Гагић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 04.12.2017.

Изјава о коришћењу

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

„Одређивање структуре фармакофоре, дизајн, синтеза и испитивање антипролиферативне активности деривата α -токоферола и γ -токотриенола“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 04.12.2017.

Потпис докторанда

