

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena D. Bošković

**DIZAJNIRANJE, SINTEZA I ISPITIVANJE  
BIOLOŠKIH OSOBINA DUALNIH INHIBITORA  
CIKLOOKSIGENAZE-2 (COX-2) I  
5-LIPOKSIGENAZE (5-LOX)**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Jelena D. Bošković

**DESIGN, SYNTHESIS AND TESTING OF  
BIOLOGICAL PROPERTIES OF DUAL INHIBITORS  
OF CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) AND  
5-LIPOXYGENASE (5-LOX)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

## **Mentori doktorske disertacije:**

---

Dr sc. Olivera Čudina, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Vladimir Dobričić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## **Članovi komisije:**

---

Dr sc. Milkica Crevar, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Nemanja Đoković, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Otilija Keta, naučni saradnik  
Institut za nuklearne nauke „Vinča”,  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

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

*Želim da izrazim duboku zahvalnost mentorima doktorske disertacije, prof. dr Oliveri Čudini i prof. dr Vladimiru Dobričiću, za pruženo znanje, podršku, strpljenje i vreme koje su posvetili izradi ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem članovima komisije na pomoći tokom izrade disertacije, kao i na temeljnom čitanju i konstruktivnim sugestijama.*

*Posebno se zahvaljujem svim svojim dragim kolegamicama i kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju koji su uvek bili spremni da pruže pomoć, koristan savet i podršku.*

*Zahvaljujem se kolegama sa drugih katedri koji su uvek bili tu da izađu u susret i pruže korisne savete i pomoć.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svojim voljenim osobama koje su sve vreme bile uz mene, pružajući mi podršku i doprinoseći da sve bude lakše.*

***Ovu disertaciju posvećujem svojim najvoljenijim roditeljima, bez čije безусловne podrške i ljubavi ništa ne bi bilo izvodljivo.***

# Dizajniranje, sinteza i ispitivanje bioloških osobina dualnih inhibitora ciklooksigenaze-2 (COX-2) i 5-lipoksigenaze (5-LOX)

## SAŽETAK

Dualna inhibicija COX-2 i 5-LOX enzima predstavlja racionalnu strategiju razvoja potentnijih i bezbednijih antiinflamatornih lekova. Zapažena je prekomerna ekspresija COX-2 i 5-LOX enzima u tumorskim ćelijama, te se smatra da bi dualni inhibitori imali primenu u terapiji kancera. Prva faza istraživanja je dizajniranje novih, potencijalnih dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora primenom SAR analize i kompjuterskih metoda (3D-QSAR studija i molekulski doking). Sintetisano je i strukturno okarakterisano devetnaest jedinjenja, čija je aktivnost ispitana upotrebom komercijalno dostupnih COX-1, COX-2 i 5-LOX inhibitornih enzimskih eseja. Jedinjenja **1, 2, 3, 5, 6, 11 i 12** su se izdvojila kao dualni inhibitori COX-2 i 5-LOX enzima (COX-2: IC<sub>50</sub> u opsegu od 5,26 μM do 83,42 μM; 5-LOX: IC<sub>50</sub> u opsegu od 1,04 μM do 53,84 μM). Jedinjenja **4, 7, 8, 10 i 13** su se izdvojila kao 5-LOX inhibitori sa IC<sub>50</sub> vrednostima u opsegu od 8,10 μM do 14,52 μM. Rezultati inhibicije COX-1 enzima ukazuju na to da su testirani dualni inhibitori slabi COX-1 inhibitori i da ispoljavaju zadovoljavajuću selektivnost prema COX-2 enzimu. Ispitana je antioksidativna aktivnost novosintetisanih jedinjenja. Dualni inhibitori **1, 2, 3 i 5** se ističu kao dobri potencijalni antioksidansi. U narednoj fazi istraživanja, razvijena je alternativna RP-HPLC metoda za procenu lipofilnosti jedinjenja. Najpogodniji RP-HPLC sistem se sastojao od C18 kolone (stacionarna faza), acetonitrila i fosfatnog pufera pH 7,4 i pH 5,5 u različitim odnosima (mobilna faza). Pasivna gastrointestinalna apsorpcija je procenjena primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i PAMPA testa. Na osnovu rezultata BMC testa, tj. dobijenih viših vrednosti retencionih faktora (**k**), izdvojena su jedinjenja sa potencijalno dobrom pasivnom gastrointestinalnom apsorpcijom (**1, 2, 3, 5, 6, 7, 10 i 13**). Rezultati PAMPA testa su bili poprilično usaglašeni sa rezultatima BMC testa i na osnovu dobijenih **-logP<sub>e</sub>** vrednosti očekuje se dobra pasivna gastrointestinalna apsorpcija u slučaju dualnih inhibitora **1, 2, 3, 5 i 6**. Citotoksični efekti testiranih jedinjenja ispitani su primenom MTT testa na različitim kancerskim ćelijskim linijama (HCT 116, HT-29, BxPC-3). Dualni inhibitori **3, 5 i 6**, kao i 5-LOX inhibitor **7**, odabrani su za dalje eksperimente radiosenzitizacije (SRB test). Statistički značajni rezultati za kombinovani tretman u odnosu na samo zračenje zapaženi su na HCT 116 i BxPC-3 (**3**), BxPC-3 i HT-29 (**6**) i HT-29 (**5 i 7**). Inhibicija migracije SW620 ćelija je ispitana u testu zarastanja rana, a dualni inhibitori **1 i 3** su se istakli kao jedinjenja sa najboljim antimigratornim potencijalom. Jedinjenje **3** se izdvaja kao dualni inhibitor sa najboljim biološkim karakteristikama.

**Ključne reči:** COX-2 i 5-LOX dualna inhibicija, antioksidansi, citostatici, antimigratorni agensi.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutsko-medicinska hemija

# Design, synthesis and testing of biological properties of dual inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX)

## ABSTRACT

Dual inhibition of COX-2 and 5-LOX enzymes represents a rational strategy for the development of more potent and safer anti-inflammatory drugs. It has been suggested that dual inhibitors could be useful in cancer therapy, as overexpression of COX-2 and 5-LOX enzymes in tumor cells has been observed. The first goal of research was the design of new, potential dual COX-2 and 5-LOX inhibitors using SAR analysis and computational methods (3D-QSAR study and molecular docking). COX-2 and 5-LOX inhibitory activity of newly synthesized and structurally characterized compounds was tested using commercially available COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitor screening assays. Compounds **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **11** and **12** proved to be dual COX-2 and 5-LOX inhibitors. Obtained IC<sub>50</sub> values were in the range of 5.26 - 83.42 μM (COX-2), and 1.04 - 53.84 μM (5-LOX). Compounds **4**, **7**, **8**, **10** and **13** proved to be 5-LOX inhibitors (IC<sub>50</sub> values were in the range of 8.10 - 14.52 μM). The tested dual inhibitors were weak COX-1 inhibitors (they showed selectivity towards COX-2 enzyme). The antioxidant activity of the newly synthesized compounds was tested and dual inhibitors **1**, **2**, **3** and **5** singled out as good potential antioxidants. In the next phase of research, an alternative RP-HPLC method was developed in order to assess the lipophilicity of compounds. The most suitable RP-HPLC system consisted of a C18 column (stationary phase), acetonitrile and phosphate buffer pH 7.4 and pH 5.5 in different ratios (mobile phase). Passive gastrointestinal absorption was assessed using biopartitioning micellar chromatography (BMC) and the PAMPA. Based on the obtained values of retention factors (**k**), it was concluded that the compounds **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7**, **10** and **13** would have good passive gastrointestinal absorption. The results of the PAMPA test were quite consistent with the results of the BMC test. Based on the obtained **-logP<sub>e</sub>** values, good passive gastrointestinal absorption is expected in the case of dual inhibitors **1**, **2**, **3**, **5** and **6**. Cytotoxic effects of the tested compounds on cancer cell lines (HCT 116, HT -29, BxPC-3) were examined using the MTT assay. Dual inhibitors **3**, **5** and **6**, as well as 5-LOX inhibitor **7**, were selected for further radiosensitization experiments (SRB test). Statistically significant results for combined treatment versus radiation alone were observed in the case of HCT 116 and BxPC-3 (**3**), BxPC-3 and HT-29 (**6**) and HT-29 (**5** and **7**) cancer cell lines. Inhibition of SW620 cell migration was examined in the wound healing assay. Dual inhibitors **1** and **3** showed good antimigratory potential. Compound **3** singled out as a dual inhibitor with the best biological characteristics.

**Key words:** dual COX-2 and 5-LOX inhibition, antioxidants, cytostatics, antimigratory effect.

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific subfield:** Pharmaceutical-medicinal chemistry

## LISTA SKRAĆENICA

<b>COX</b>	Ciklooksigenaza
<b>LOX</b>	Lipoksigenaza
<b>QSAR</b>	Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti
<b>GRIND</b>	<i>GRid-INdependent Descriptors</i> (GRID deskriptori koji ne zavise od poravnanja molekula)
<b>RMSEE</b>	Greška predviđanja trening set modela
<b>RMSEP</b>	Greška predviđanja test set modela
<b>HPLC</b>	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (tečna hromatografija visokih performansi)
<b>TLC</b>	<i>Thin Layer Chromatography</i> (hromatografija na tankom sloju)
<b>TEA</b>	Trietilamin
<b>DPPA</b>	Difenilfosforilazid
<b>EDC</b>	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
<b>HOBt</b>	Hidroksibenzotriazol
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamid
<b>DCM</b>	Dihlormetan
<b>THF</b>	Tetrahidrofuran
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoksid
<b>BMC</b>	<i>Biopartitioning Micellar Chromatography</i> (bioparticiona micelarna hromatografija)
<b>PAMPA</b>	<i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i> (test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama)
<b>EMEM</b>	Eagle's Minimum Essential Medium
<b>FBS</b>	Fetalni goveđi serum
<b>PBS</b>	Sulforodaminski B test
<b>SRB test</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (fosfatni pufer pH 7,4)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Inflamacija</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Uloga inflamacije u organizmu čoveka .....	2
1.1.2. Metabolizam arahidonske kiseline .....	4
1.1.3. Enzimi koji učestvuju u metabolizmu arahidonske kiseline.....	8
<b>1.2. Antiinflamatorni lekovi</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Pregled terapije za inflamatorna stanja .....	10
1.2.2. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), inhibitori COX enzima.....	11
1.2.3. Selektivni inhibitori COX-2 enzima.....	13
1.2.4. Inhibitori 5-LOX enzima.....	14
1.2.5. Dualni inhibitori COX-2 i 5-LOX enzima .....	15
<b>1.3. Antiinflamatorni lekovi kao potencijalni citostatici – veza između inflamacije, kancera i oksidativnog stresa</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4. Kompjuterske metode u dizajniranju lekova</b> .....	<b>23</b>
1.4.1. Metode koje se zasnivaju na poznavanju strukture liganda .....	26
1.4.2. Metode koje se zasnivaju na strukturi ciljnog mesta .....	31
<b>1.5. Metode za procenu lipofilnosti jedinjenja</b> .....	<b>33</b>
<b>1.6. Procena gastrointestinalne apsorpcije jedinjenja primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i PAMPA testa</b> .....	<b>34</b>
1.6.1. Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC) .....	34
1.6.2. PAMPA test.....	36
<b>1.7. Biološka ispitivanja novih jedinjenja, dualnih inhibitora COX-2 i 5-LOX enzima</b> .....	<b>38</b>
1.7.1. In vitro enzimski testovi za procenu inhibicije COX-1, COX-2 i 5-LOX enzima.....	38
1.7.2. Testovi za ispitivanje ćelijske vijabilnosti (MTT i SRB test) .....	38
1.7.3. Ispitivanje inhibicije migracije ćelija.....	40
<b>2. CILJ RADA</b> .....	<b>41</b>

<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Opšti podaci.....</b>	<b>44</b>
3.1.1. Softver .....	44
3.1.2. Prekursori u sintezi, reagensi i rastvarači.....	44
3.1.3. Biološki testovi .....	46
3.1.4. Oprema .....	46
<b>3.2. 3D-QSAR studija.....</b>	<b>48</b>
3.2.1. Priprema seta jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje .....	48
3.2.2. Razvoj 3D-QSAR modela .....	48
3.2.3. Validacija kreiranih 3D-QSAR modela .....	49
3.2.4. Domen primenljivosti 3D-QSAR modela.....	50
<b>3.3. Molekulski doking.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4. ADMET predviđanja.....</b>	<b>51</b>
<b>3.5. Sintaza jedinjenja 1-19 .....</b>	<b>52</b>
3.5.1. Sintaza jedinjenja 1-3 .....	52
3.5.2. Sintaza jedinjenja 4-7 .....	52
3.5.3. Sintaza jedinjenja 8 i 9 .....	52
3.5.4. Sintaza jedinjenja 10.....	52
3.5.5. Sintaza jedinjenja 11-12 .....	53
3.5.6. Sintaza jedinjenja 13.....	53
3.5.7. Sintaza jedinjenja 14.....	53
3.5.8. Sintaza jedinjenja 15-16.....	54
3.5.9. Sintaza jedinjenja 17.....	54
3.5.10. Sintaza jedinjenja 18.....	55
3.5.11. Sintaza jedinjenja 19 .....	55
<b>3.6. In vitro testiranje COX-1, COX-2 i 5-LOX inhibitornog efekta novosintetisanih jedinjenja.....</b>	<b>56</b>
3.6.1. Inhibicija COX-1 i COX-2 enzima .....	56
3.6.2. Inhibicija 5-LOX enzima .....	57
<b>3.7. Procena antioksidativne aktivnosti novosintetisanih jedinjenja .....</b>	<b>58</b>
3.7.1. Priprema uzoraka .....	58

3.7.2. Biohemijski parametri .....	58
3.7.3. Statistika.....	59
<b>3.8. Ispitivanje lipofilnosti novosintetisanih jedinjenja .....</b>	<b>60</b>
<b>3.9. Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC) i PAMPA test.....</b>	<b>61</b>
3.9.1. Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC) .....	61
3.9.2. PAMPA test.....	61
<b>3.10. Ispitivanje citotoksičnosti novosintetisanih jedinjenja i njihove sposobnosti da povećaju osetljivost ćelija na zračenje.....</b>	<b>63</b>
3.10.1. Ćelijske linije .....	63
3.10.2. 2,5-difenil-2 <i>H</i> -tetrazolijum-bromid (MTT) test.....	63
3.10.3. Sulforodaminski B (SRB) test.....	63
3.10.4. Statistička analiza.....	64
<b>3.11. Ispitivanje antimigratornog potencijala testiranih jedinjenja i vitalnosti ćelija .....</b>	<b>65</b>
3.11.1. Test zarastanja rana .....	65
3.11.2. Kalcein-AM test vijabilnosti ćelija ( <i>viability assay</i> ).....	65
3.11.3. Statistička analiza.....	65
<b>4.1. 3D-QSAR studija .....</b>	<b>67</b>
4.1.1. Interpretacija kreiranih 3D-QSAR modela.....	67
4.1.2. Dizajn novih dualnih inhibitora COX-2 i 5-LOX enzima.....	73
<b>4.2. Molekulski doking.....</b>	<b>75</b>
4.2.1. Enzimi COX-1 i COX-2.....	75
4.2.2. Enzim 5-LOX .....	78
<b>4.3. ADMET predviđanja.....</b>	<b>81</b>
<b>4.4. Sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija jedinjenja 1 - 19 .....</b>	<b>82</b>
4.4.1. Sinteza jedinjenja 1 - 19 .....	82
4.4.2. Strukturna karakterizacija novosintetisanih jedinjenja 1 - 19.....	88
<b>4.5. <i>In vitro</i> COX-1, COX-2 i 5-LOX inhibitorski testovi .....</b>	<b>92</b>
<b>4.6. Procena redoks aktivnosti novosintetisanih jedinjenja.....</b>	<b>94</b>
<b>4.7. Ispitivanje lipofilnosti.....</b>	<b>98</b>

<b>4.8. Procena pasivne gastrointestinalne apsorpcije primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i PAMPA testa .....</b>	<b>102</b>
<b>4.9. Citotoksični efekti ispitivanih jedinjenja na kancerskim ćelijama i njihov efekat u kombinaciji sa zračenjem .....</b>	<b>107</b>
<b>4.10. Antimigratorni potencijal odabranih jedinjenja i vijabilnost SW620 ćelija nakon tretmana.....</b>	<b>110</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>113</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>117</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>132</b>
<b>Biografija kandidata.....</b>	<b>170</b>
<b>Spisak naučnih radova i saopštenja koji čine deo disertacije .....</b>	<b>171</b>
<b>Izjava o autorstvu .....</b>	<b>173</b>
<b>Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada .....</b>	<b>174</b>
<b>Izjava o korišćenju .....</b>	<b>175</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Inflamacija

### 1.1.1. Uloga inflamacije u organizmu čoveka

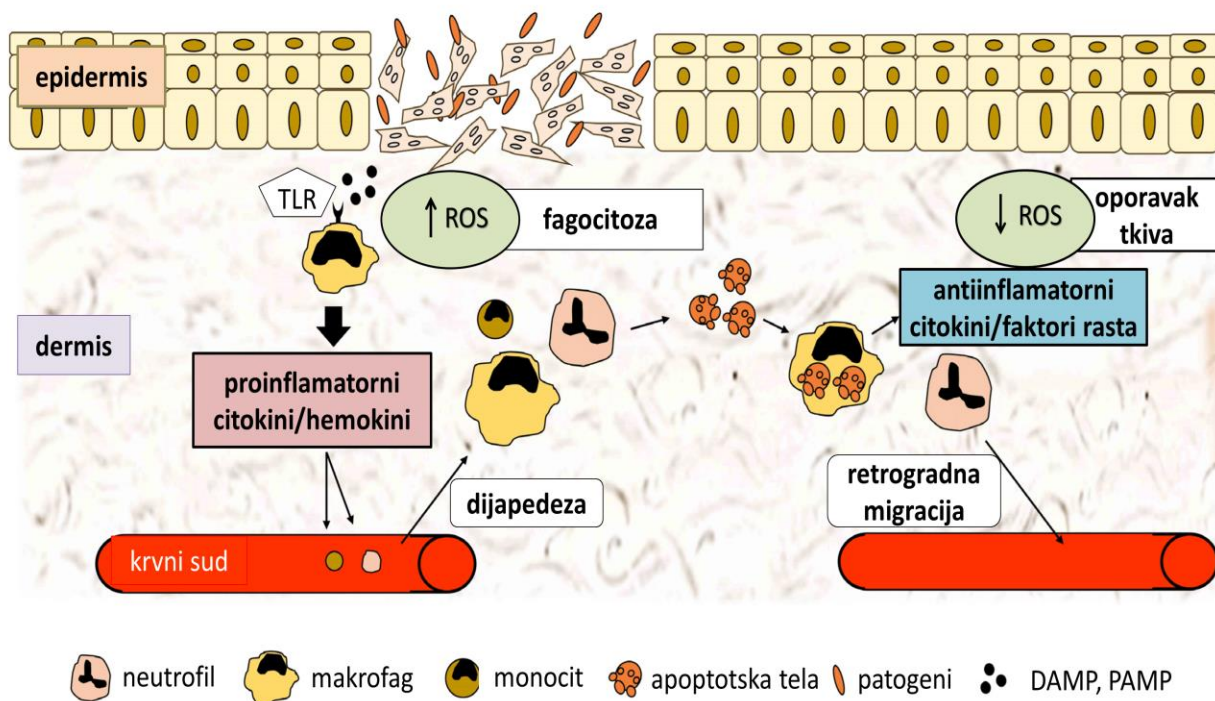
Živa bića se konstantno suočavaju sa izazovima u smislu opstanka u svetu koji ih okružuje i imaju homeostatske sisteme za održavanje unutrašnjeg ravnotežnog stanja. Ovi sistemi imaju ulogu u održavanju homeostaze uprkos brojnim promenama kojima organizam biva izložen (promena temperature, nedostatak hrane, vode i sl.), a vremenom su se razvili i mehanizmi koji služe za odbranu od infekcija i oporavak nakon povreda.

Imunski odgovor organizma podrazumeva kombinaciju urođenog i stečenog imunskog sistema, kao i brojne inflamatorne medijatore koji se stvaraju. Urođeni imunski odgovor prisutan je u gotovo svim organizmima, predstavlja prvu liniju odbrane, javlja se odmah nakon nastanka povrede ili infekcije, a razvijen je rano u evolutivnom smislu. Čine ga ćelijske i vaskularne komponente, a medijatori koji se produkuju od strane ćelija vrše regulaciju daljeg imunskog odgovora. Anatomske i fiziološke barijere predstavljaju bitnu komponentu urođenog imunskog odgovora (koža, sluzokoža). Najznačajnije ćelije koje učestvuju u urođenom imunskom odgovoru su neutrofili, eozinofili, bazofili, mastociti, makrofage, monociti, dendritske ćelije i prirodne ćelije ubice. Neutrofili imaju izuzetno važnu ulogu u urođenom imunskom sistemu i predstavljaju prvu liniju odbrane organizma. Nakon dospevanja do mesta infekcije, aktivirani neutrofili vrše fagocitozu patogena. Aktivacija ćelija urođenog imunskog sistema dovodi do oslobađanja brojnih citokina (najznačajniji IL-1 i TNF- $\alpha$ ) i hemokina, koji imaju ulogu u migraciji leukocita. Citokini utiču i na dalje oslobađanje prostaglandina (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) koji ispoljavaju vazodilatatorni efekat i leukotriena LTB<sub>4</sub>, koji ispoljava hemotaksični efekat, a ovi medijatori imaju bitnu ulogu u inflamatornim procesima. Stečeni ili specifični imunski odgovor razvijen je kasnije tokom evolucije, javlja se samo kod kičmenjaka i predstavlja drugu liniju odbrane. Ključne ćelije stečenog imunskog odgovora su limfociti i to: B ćelije, poreklom iz koštane srži koje su odgovorne za stvaranje antitela i deo su humoralnog imunskog odgovora i T ćelije, poreklom iz timusa koje imaju važnu ulogu u indukcionoj fazi imunskog odgovora. Osnovna razlika u odnosu na urođeni imunski odgovor je prisustvo antigen-specifičnih receptora na T i B ćelijama, pri čemu dolazi do specifičnog odgovora organizma <sup>1, 2</sup>.

Inflamatorni proces ima zaštitnu ulogu, odgovor je imunskog sistema na infekciju ili povredu, a glavni ishod je uglavnom oporavak, sa ili bez propratnih ožiljaka. Deli se na akutni i hronični inflamatorni proces, pri čemu je sistemski hronični inflamatorni proces slabije razjašnjen i u osnovi je brojnih oboljenja, a smatra se da ovaj proces nije prouzrokovan klasičnim okidačima kao što su infekcija i povreda tkiva. Inflamacija ima ulogu u patogenezi brojnih bolesti među kojima su kancer, artritis, neurodegenerativna i kardiovaskularna oboljenja <sup>1, 3</sup>. Iako inflamacija predstavlja osnovnu komponentu velikog broja kako patoloških, tako i fizioloških procesa, uloga inflamacije u fiziološkim procesima je daleko manje razjašnjena. Kontrolisan inflamatorni proces je neosporno koristan za organizam (zaštita od infekcije), ali može postati štetan ukoliko se adekvatno ne reguliše. Akutni inflamatorni odgovor je najbolje objašnjen u slučaju infekcija izazvanih mikroorganizmima, gde je pokrenut od strane receptora koji imaju

ključnu ulogu u urođenom imunskom sistemu, kao što su tolični receptori - TLR (*toll-like* receptori) i nukleotidnovezujući oligomerizacijski receptori - NLR (NOD - *like* receptori). Nakon prodora mikroba u organizam, ovi receptori aktiviraju ćelijski imunski odgovor. Inicijalni odgovor organizma podrazumeva produkciju brojnih inflamatornih medijatora (hemokini, citokini, eikozanoidi, vazoaktivni amini i dr.). Najvažnija uloga ovih medijatora je dopremanje leukocita (uglavnom neutrofila) na mesto povrede. Aktivirani neutrofilu pokušavaju da eliminišu štetni agens oslobađanjem toksičnih komponenti iz svojih granula (reaktivnih kiseoničnih vrsta, proteinaza 3, katepsina G i dr.) pri čemu dolazi do uništavanja patogena, ali i kolateralne štete na tkivu. Zadovoljavajući inflamatorni odgovor se sastoji u eliminaciji patogena i naknadnoj reparaciji tkiva (**Slika 1**). Ključni korak u reparaciji je produkcija antiinflamatornih lipoksina umesto proinflamatornih prostaglandina, čija je uloga u zaustavljanju mobilizacije neutrofila i mobilizaciji monocita koji uklanjaju mrtve ćelije.

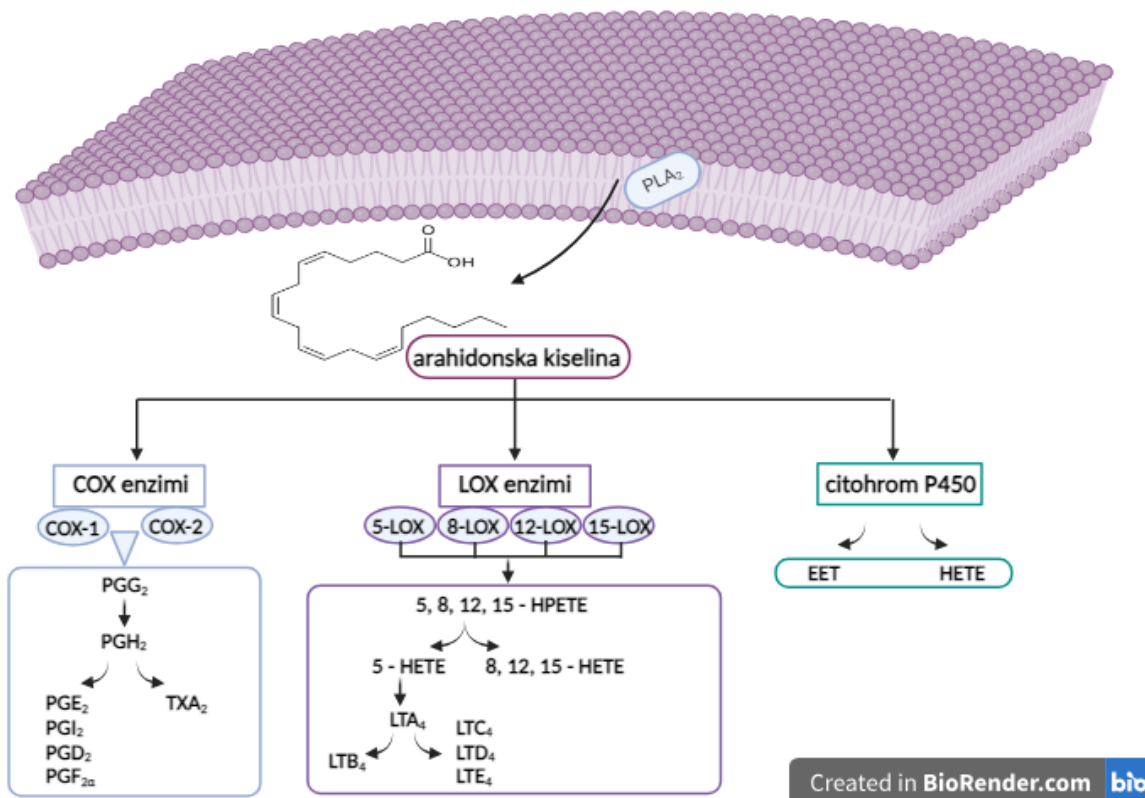
Induktori inflamacije mogu biti egzogeni i endogeni. Egzogeni induktori inflamacije se dele na mikrobiološke (patogeni, faktori virulencije) i nemikrobiološke (alergeni, iritansi, strana tela, toksične komponente), dok endogeni induktori mogu biti poreklom od ćelija, tkiva, plazme i ekstracelularnog matriksa <sup>4</sup>. Akutna faza inflamatornog procesa se odlikuje brzim influsom brojnih ćelija među kojima su najznačajniji granulociti (neutrofilu) i monociti koji sazrevaju u makrofage (identifikuju dve klase molekula: DAMP – molekulske obrasce povezane sa oštećenjem i PAMP – molekulske obrasce povezane sa patogenom). Nakon otklanjanja štetnog agensa fagocitozom, dolazi do smanjenja inflamatornog odgovora i reparacije tkiva <sup>5</sup>. Ukoliko ne dođe do smanjenja inflamatornog odgovora nakon akutne faze, inflamatorni proces prelazi u hroničnu formu koja može da bude predispozicija za nastanak brojnih oboljenja <sup>3</sup>.



**Slika 1.** Inflamatorni proces <sup>5</sup>

### 1.1.2. Metabolizam arahidonske kiseline

Među masnim kiselinama (supstratima enzima) kao što su *cis* - 5, 8, 11, 14 - eikozatetraenska (arahidonska kiselina), *cis* - 8, 11, 14 - eikozatrienska i *cis* - 5, 8, 11, 14, 17 - eikozapentaenska kiselina, izdvaja se arahidonska kiselina kao najvažnija za produkciju prostanoida i leukotriena <sup>6</sup>. Metabolizam arahidonske kiseline predstavlja značajnu komponentu u funkcionisanju imunskog sistema i inflamatornih procesa. Arahidonska kiselina predstavlja polinezasićenu masnu kiselinu sa 20 ugljenikovih atoma, četiri nezasićene dvostruke veze u *cis* položajima (5, 8, 11, 14 – eikozatetraenska kiselina). Ova kiselina je uglavnom inkorporirana u fosfolipidnom sloju ćelijske membrane, iz koga se oslobađa delovanjem enzima fosfolipaze. Fosfolipaza A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) dovodi do oslobađanja arahidonske kiseline u jednom koraku, dok fosfolipaze C i D dovode do oslobađanja arahidonske kiseline iz više reakcija (najpre nastaje diacilglicerol). Aktivacija enzima fosfolipaze A<sub>2</sub> može biti posledica brojnih faktora kao što su ćelijski aktivacioni signal i inflamatorni stimuli. Oslobođena arahidonska kiselina podleže dalje metabolizmu pod dejstvom enzima ciklooksigenaze (COX), lipoksigenaze (LOX) i enzimskog sistema citohrom P450 <sup>7</sup>, pri čemu se stvaraju prostaglandini (PG), tromboksani (TX), hidroperoksieikozatetraenske kiseline (HPETE), hidroksieikozatetraenske kiseline (HETE), leukotrieni (LT), lipoksini (LX) i epoksieikozatrienske kiseline (EET) <sup>8</sup> (**Slika 2**).



**Slika 2.** Metabolizam arahidonske kiseline

### 1.1.2.1. Prostanoidi kao medijatori inflamacije

Enzim COX-1 je prisutan u većini ćelija kao konstitutivni enzim i ima ulogu u produkciji prostanoida koji predstavljaju regulatore homeostaze (vrše regulaciju lučenja želudačne kiseline, modulaciju vaskularnih odgovora i imaju brojne druge uloge). Terminom prostanoidi obuhvaćeni su i prostaglandini i tromboksani. Za razliku od COX-1, COX-2 enzim predstavlja inducibilnu, inflamatornu formu enzima, koja se aktivira pod dejstvom inflamatornih stimulusa, hormona i faktora rasta. Oba enzima katalizuju inkorporaciju dva molekula kiseonika u strukturu oslobođene arahidonske kiseline, pri čemu se formiraju visoko nestabilni endoperoksidi, prostaglandini PGG<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub>. Sufiks "2" označava da novonastali produkti sadrže dve dvostruke veze, za razliku od supstrata - arahidonske kiseline, koja sadrži četiri dvostruke veze <sup>1</sup>. Posredstvom enzima hidroperoksidaze iz PGG<sub>2</sub> (hidroperoksi kiselina) nastaje PGH<sub>2</sub> (hidroksi kiselina). Prostaglandin PGH<sub>2</sub> se proizvodi pod dejstvom obe izoforme COX enzima i predstavlja supstrat za seriju specifičnih enzima izomeraza i sintaza (tromboksan sintaze, PGI<sub>2</sub> sintaze, PGD<sub>2</sub> izomeraze i PGE<sub>2</sub> izomeraze). Nastali endoperoksidi se velikom brzinom transformišu do bioaktivnih krajnjih produkata, prostaglandina PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> i tromboksana TXA<sub>2</sub>.

Nakon otkrića veze prostaglandina i inflamacije, smatralo se da samo PGE i PGF prostaglandini ispoljavaju biološku aktivnost i kao takvi su nazvani primarnim prostaglandinima. Prostaglandini PGG i PGH su izolovani 1973. godine i uprkos činjenici da su smatrani prelaznom formom prostaglandina i imali poluživot od svega nekoliko minuta, ova jedinjenja su se pokazala aktivnijim od tzv. primarnih prostaglandina <sup>6</sup>. Švedski biohemičar i lekar *Sune K. Bergstrom* dobio je Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 1982. godine za istraživanje vezano za prostaglandine. *Bergstrom* je prvi otkrio postojanje više od jednog prostaglandina i identifikovao strukturu dva nova prostaglandina. On je delio nagradu sa sunarodnikom *Bengtom Samuelssonom* i engleskim istraživačem *Johnom Vaneom*. *Samuelsson* je doprineo razumevanju sinteze i eliminacije prostaglandina, dok je *Vane* opisao prostacikline, ključnu komponentu sistema prostaglandina sa efektima na agregaciju trombocita i vazodilataciju <sup>9</sup>. Zapaženo je da produkti nastali iz PGH<sub>2</sub>, tromboksan TXA<sub>2</sub> i prostaciklin (PGI<sub>2</sub>) ispoljavaju suprotne biološke efekte. Tromboksan TXA<sub>2</sub> dovodi do jake konstrikcije krvnih sudova, a ispoljava i najpotentniji proagregacioni efekat. Za razliku od njega, PGI<sub>2</sub> dovodi do prevencije agregacije trombocita. Prisustvo endoperoksida u različitim tkivima, kao prekursora u daljoj sintezi eikozanoida, prouzrokuje odgovor karakterističan za enzimski sastav tog tkiva, te se sinteza TXA<sub>2</sub> vrši u trombocitima, a sinteza PGI<sub>2</sub> u aorti <sup>6</sup>.

Sinteza krajnjih prostanoida zavisi od tipa ćelija u kojima nastaju tj. određena je različitom ekspresijom enzima unutar ćelija na mestu inflamacije. Prostanoidni receptori se mogu podeliti u pet glavnih klasa (DP, FP, IP, EP i TP receptori), a svi ovi receptori spadaju u grupu receptora vezanih za G proteine. Prostanoidi mogu ispoljiti širok spektar efekata:

1. PGE<sub>2</sub>, koji je prevashodno proinflamatorni medijator, izaziva suprotne efekte u zavisnosti od receptora putem kojih ispoljava efekat, te dovodi do kontrakcije bronhijalnih i

gastrointestinalnih glatkih mišića (preko EP<sub>1</sub> receptora), bronhodilatacije, vazodilatacije, relaksacije gastrointestinalnih glatkih mišića (preko EP<sub>2</sub> receptora), kontrakcije intestinalnih glatkih mišića, kontrakcije uterusa kod trudnica, inhibicije lučenja želudačne kiseline (preko EP<sub>3</sub> receptora). Može se zaključiti da ovaj prostaglandin u fiziološkim uslovima predstavlja važan medijator u brojnim biološkim funkcijama, među kojima su regulacija krvnog pritiska, imunskog odgovora, stanja gastrointestinalnog sistema, dok u procesu inflamacije ima bitnu ulogu u nastanku klasičnih simptoma inflamacije (crvenilo, bol, oticanje);

2. PGD<sub>2</sub> ima pretežno vazodilatatorni efekat, izaziva inhibiciju agregacije trombocita, relaksaciju gastrointestinalnih mišića (preko DP receptora), a sintetiše se u centralnom nervnom sistemu (utiče na regulaciju sna, percepciju bola) i perifernim tkivima (formira se pretežno u mastocitima);
3. PGF<sub>2α</sub> izaziva kontrakciju uterusa i luteolizu (preko FP receptora), a sintetiše se iz PGH<sub>2</sub> posredstvom enzima PGF sintaze;
4. PGI<sub>2</sub> (prostaciklin) izaziva vazodilataciju i inhibiciju agregacije trombocita (preko IP receptora), te predstavlja jedan od najvažnijih prostanoida koji učestvuju u regulaciji homeostaze kardiovaskularnog sistema. Vaskularni endotel predstavlja glavni izvor ovog prostaglandina;
5. TXA<sub>2</sub> izaziva vazokonstrikciju i agregaciju trombocita (preko TP receptora), predstavlja nestabilni metabolit sa poluživotom od 30 sekundi, sintetiše se posredstvom enzima tromboksan sintaze, a neenzimski se degradira do biološki neaktivnog TXB<sub>2</sub>.

Kako je inflamatorni odgovor praćen oslobađanjem prostanoida, ispoljavaju se svi navedeni efekti u zavisnosti od prostanoida koji je zastupljeniji. U inflamatornim procesima preovlađuje stvaranje prostaglandina PGE<sub>2</sub>, iako je važna i produkcija prostaciklina PGI<sub>2</sub>. Generalno gledano, prostanoidi učestvuju kako u nastanku, tako i u povlačenju akutnog inflamatornog odgovora <sup>1, 3</sup>.

### 1.1.2.2. Leukotrieni kao medijatori inflamacije

U studiji iz 1974. godine, kao proizvod inkubacije arahidonske kiseline sa humanim trombocitima, formirana su jedinjenja 12-hidroksi-5,8,10,14-eikozatetraenska kiselina, 12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienska kiselina i 8-(1-hidroksi-3-oksopropil)-9,12-dihidroksi-5,10-heptadekadienska kiselina. Jedinjenje 12-hidroksi-5,8,10,14-eikozatetraenska kiselina nastaje iz 12-hidroperoksi-5,8,10,14-eikozatetraenske kiseline pod dejstvom novootkrivenog LOX enzima. Druga dva jedinjenja se formiraju pod dejstvom COX enzima <sup>10</sup>. Oksidacija arahidonske kiseline delovanjem enzima lipoksigenaze (LOX) predstavlja kompetitivni put oksidaciji arahidonske kiseline pomoću COX enzima. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi, inhibitori ciklooksigenaznog puta, ne ispoljavaju ovaj efekat na enzim lipoksigenazu. Primarni proizvod oksidacije arahidonske kiseline posredstvom LOX enzima su hidroperoksieikozatetraenske kiseline (HPETE - *hydroperoxyeicosatetraenoic acid*), koje se međusobno razlikuju prema položaju supstituenta, hidroperoksi grupe (5, 8, 9, 11, 12 ili 15 HPETE). Formirane hidroperoksi kiseline se dalje mogu metabolisati do hidroksi masne kiseline (HETE - *hydroxyeicosatetraenoic acid*) ili leukotriena. Redukcija HPETE do HETE se vrši pomoću enzima glutation peroksidaze. Dokazano je da se u trombocitima selektivno stvaraju 12-HPETE <sup>6</sup>. Enzimi lipoksigenaze predstavljaju rastvorljive citozolne enzime koji su uglavnom rasprostranjeni u plućima, leukocitima, mastocitima i trombocitima, a najznačajniji enzim iz ove grupe je 5-lipoksigenaza (5-LOX). Nakon aktivacije ćelije, enzim se translocira do jedarne membrane gde se povezuje sa FLAP (*Five-Lipoxygenase Activating Protein*) proteinom. Putem enzima 5-LOX vrši se inkorporacija hidroperoksi grupe na C5 položaju arahidonske kiseline, pri čemu se formira 5-HPETE. Ova kiselina se dalje transformiše do nestabilnog proizvoda, leukotriena LTA<sub>4</sub>, koji se enzimskim putem prevodi u leukotrien LTB<sub>4</sub> ili u cisteinil leukotriene (LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>, F<sub>4</sub>). To je put koji uključuje konjugaciju sa glutationom. Leukotrieni poseduju konjugovani trienski sistem, a dele se u dve kategorije: hemoatraktanti (LTB<sub>4</sub>) i cisteinil leukotrieni (LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>, F<sub>4</sub>). Leukotrienski receptori spadaju u grupu G protein spregnutih receptora, a dele se na BLT (za LTB<sub>4</sub>) i CysLT (za cisteinil leukotriene) receptore. Leukotrieni imaju brojne uloge u organizmu. Na nivou respiratornog sistema cisteinil leukotrieni izazivaju bronhokonstrikciju i povećavaju lučenje sluzi, na nivou kardiovaskularnog sistema leukotrieni LTC<sub>4</sub> ili LTD<sub>4</sub> izazivaju prolazni pad krvnog pritiska i suženje koronarnih sudova, dok u inflamatornim procesima leukotrien LTB<sub>4</sub> predstavlja snažan hemoatraktant, a cisteinil leukotrieni doprinose bronhijalnoj hiperreaktivnosti <sup>1</sup>.

### 1.1.3. Enzimi koji učestvuju u metabolizmu arahidonske kiseline

#### 1.1.3.1. Enzimi COX-1 i COX-2

COX enzimi, odnosno prostaglandin H sintaze (PGHS), učestvuju u stvaranju prostanoida iz arahidonske kiseline. Postoje dve izoforme enzima: COX-1, tj. konstitutivna forma COX enzima i COX-2, tj. inducibilna forma COX enzima. Smatra se da COX-1 ima bitnu ulogu u homeostazi organizma, dok COX-2 ima bitnu ulogu u inflamatornim stanjima organizma <sup>11</sup>. Oba enzima spadaju u grupu integralnih membranskih proteina lociranih pretežno u endoplazmatskom retikulumu, homodimeri su, pri čemu svaki monomer ima molekulsku masu oko 70 kDa. Dimerizacija je neophodna za katalitičku aktivnost enzima i strukturni integritet. Predstavljaju bifunkcionalne enzime, odnosno sadrže ciklooksigenazno i peroksidazno aktivno mesto. Inhibitori enzima (nesteroidni antiinflamatorni lekovi) se vezuju za ciklooksigenazno mesto, koje predstavlja dug hidrofobni kanal, gde se vrši inhibicija prve reakcije - oksidacije arahidonske kiseline do endoperoksida PGG<sub>2</sub> (ciklooksigenazna funkcija COX enzima). Endoperoksid PGG<sub>2</sub> se dalje transformiše do prostaglandina PGH<sub>2</sub> (peroksidazna funkcija COX enzima) <sup>12, 13</sup>. Svaki monomer se sastoji iz sledećih delova: N terminalni deo, domen epidermalnog faktora rasta (EGF – *epidermal growth factor*) koji je kratak i sastoji se iz 50 aminokiselina, membranski vezivni domen (oko 50 aminokiselina) i globularni C terminalni katalitički domen, koji je ujedno i najveći (približno 460 aminokiselina). Katalitički domen predstavlja mesto vezivanja supstrata i inhibitora – nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL). COX-1 enzim se sastoji iz 576 aminokiselina, dok se COX-2 enzim sastoji iz 587 aminokiselina, a homologija aminokiselinskih sekvenci iznosi od 60 % do 65 % u okviru istih vrsta. Najveća razlika sekvenci između izoformi COX enzima se zapaža u membranskom vezivnom domenu. Aktivna mesta COX enzima (COX-1 i COX-2) su veoma slična, predstavljaju hidrofobni kanal koji počinje od membranskog vezivnog domena i proteže se unutar katalitičkog domena. Glavna razlika predstavlja prisustvo aminokiseline Val523 u slučaju COX-2 izoforme, za razliku od COX-1 izoforme koja sadrži aminokiselinu Ile523. Pored toga, COX-2 enzim sadrži aminokiseline Arg513 i Val434, dok COX-1 enzim sadrži aminokiseline His513 i Ile434. Sve ove razlike čine aktivno mesto COX-2 enzima većim od aktivnog mesta COX-1 enzima (za oko 20 %). Vezivno mesto inhibitora se proteže od aminokiseline Arg120 do aminokiseline Tyr385. Skoro sve aminokiseline su hidrofobne, osim tri polarne (Arg120, Ser353 i Ser530) koje stupaju u važne interakcije sa supstratom/inhibitorom. Na osnovu kristalnih struktura COX-1 i COX-2 enzima u kompleksu sa arahidonskom kiselinom (supstratom), došlo se do zaključka da karboksilna kiselina supstrata stupa u interakciju (jonski par) sa gvanidino grupom aminokiseline Arg120, ostvaruje se i interakcija sa aminokiselinom Tyr355 (vodonična veza), a aminokiselina Ser530 je bitna za deacetilaciju aspirina <sup>13, 14</sup>.

### 1.1.3.2. Enzim 5-LOX

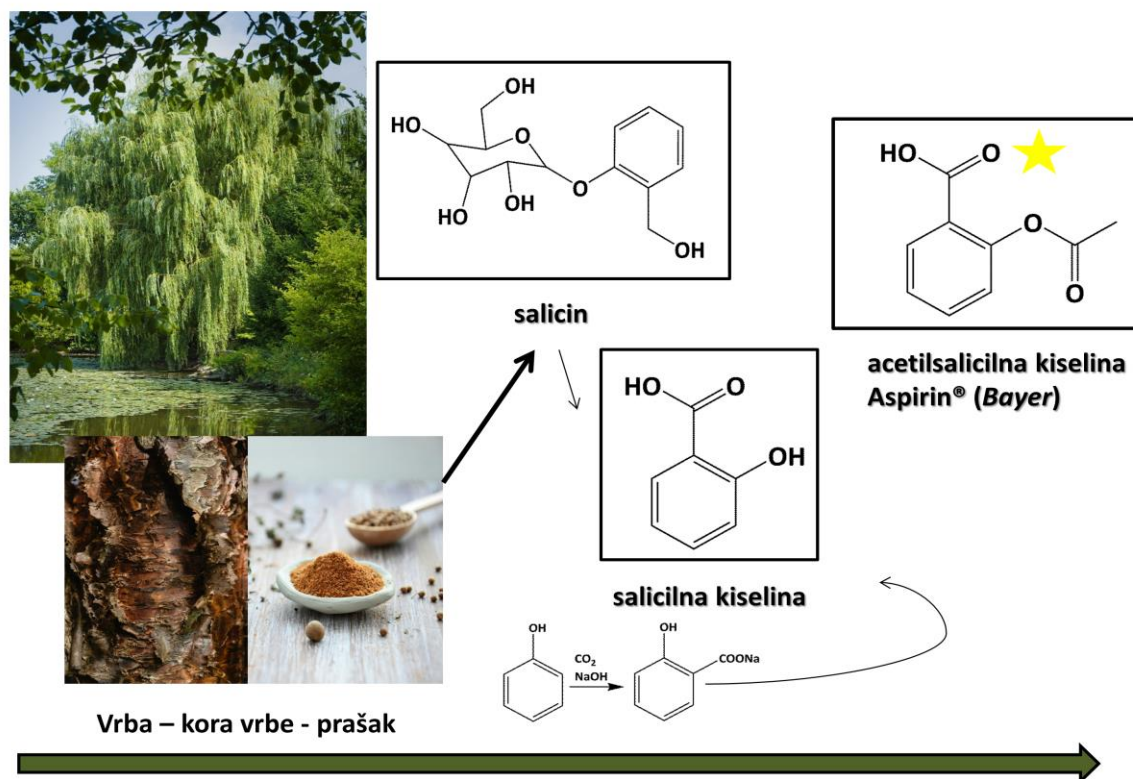
LOX enzimi obuhvataju 5-LOX, 12-LOX i 15-LOX enzime, a podela je izvršena na osnovu položaja oksidacije supstrata. 5-LOX enzim predstavlja najznačajniji enzim iz ove grupe. Rastvorljiv je, monomer, molekulske mase oko 72-82 kDa, a sastoji se iz 673 aminokiseline. Čine ga dva domena, manji N terminalni i veći katalitički C terminalni domen koji sadrži atom gvožđa. Gvožđe je povezano sa aminokiselinama His367, His372, His550, Asn554 i Ile673 C terminalnog kraja <sup>15</sup>. Gvožđe se javlja u dva oblika: u obliku Fe<sup>2+</sup> jona koji predstavlja neaktivnu formu i u obliku Fe<sup>3+</sup> jona koji predstavlja aktivnu formu, a nastaje oksidacijom Fe<sup>2+</sup> jona lipidnim hidroperoksidima <sup>16, 17</sup>. Katalitički domen je  $\alpha$  heliks i sadrži aminokiseline sa hidrofobnim svojstvima, kao što su Leu368, Ile406, Ala410, Leu414, Ile415, Leu691, Val604 i Leu607 <sup>18</sup>.

Na osnovu mehanizma dejstva, inhibitori 5-LOX enzima se mogu podeliti na: redoks inhibitore, ne-redoks ili kompetitivne inhibitore, helatore gvožđa i alosterne inhibitore <sup>19</sup>. Obzirom da 5-LOX enzim sadrži nehemsko gvožđe u aktivnom centru, redoks inhibitori ispoljavaju efekat redukovanjem aktivnog oblika Fe<sup>3+</sup> u neaktivni oblik Fe<sup>2+</sup>. Primeri redoks inhibitora su zileuton, atreleuton, NDGA i kumarini. Kompetitivni inhibitori ispoljavaju efekat blokiranjem aktivnog mesta ili vezivnog mesta supstrata. Helatori gvožđa sadrže funkcionalne grupe kao što su hidroksamska kiselina i *N*-hidroksiurea koje ostvaruju koordinativne veze sa atomom gvožđa i formiraju kompleks. Zileuton i atreleuton predstavljaju i helatore gvožđa. Alosterne inhibitori se ne vezuju za vezivno mesto supstrata već za ATP ili fosfatidil holin vezivno mesto <sup>15</sup>.

## 1.2. Antiinflamatorni lekovi

### 1.2.1. Pregled terapije za inflamatorna stanja

Drevne egipatske i grčke civilizacije koristile su lekovite supstance u terapiji groznice i bola. *Hippocrates* je još 400. p.n.e., preporučivao koru i lišće vrbe kao terapiju za groznicu i kod porođajnog bola <sup>13</sup>. *Edward Stone* je 1763. godine uputio dopis Kraljevskom Društvu koje je sadržalo informacije o lekovitim svojstvima kore vrbe koje je zapazio. Ovaj dopis se smatra prvim objavljenim izveštajem o antipiretičkim i analgetičkim svojstvima kore vrbe. *Stone* se vodio pretpostavkom da se u prirodi lek nalazi u blizini izvora bolesti. S obzirom da je prirodno stanište vrbe vlažno zemljište gde su malarične groznice česta pojava, došao je na ideju da bi vrba bila potencijalni lek. Sakupio je koru vrbe, sušio tokom 3 meseca i dobio prašak koji je davao obolelima u malim dozama na svaka 4 sata. Tokom 5 godina uspešno je izlečeno oko 50 bolesnika i ovo otkriće je predstavljalo veliki podstrek za nastavak istraživanja <sup>20</sup>. Aktivna komponenta kore vrbe je salicin. Hemičar *Charles Gerhardt* je 1832. godine, eksperimentišući sa salicinom došao do salicilne kiseline, koju su 1860. godine *Kolbe* i *Lautemann* sintetisali iz fenola visokoefikasnim postupkom. Ovo je dovelo do široke primene salicilne kiseline u terapiji groznice (antiseptik i antipiretik). Međutim, *Gerhardt* je 1853. godine razvio novo jedinjenje kao proizvod reakcije natrijum-salicilata i acetil-hlorida za koje se ispostavilo da prouzrokuje manje neželjenih gastrointestinalnih efekata. Ovo otkriće nije u to vreme bilo široko prihvaćeno obzirom da je *Gerhardt* izgubio interesovanje za dalji rad na projektu <sup>21</sup>. Tek više od 30 godina kasnije, preciznije 1897. godine, *Felix Hoffman* je razvio acetilsalicilnu kiselinu pod nazivom „aspirin” pod okriljem kompanije *Bayer*. Već 1899. godine aspirin se našao na tržištu u obliku praška i tableta, što je predstavljalo istorijski izuzetno značajan događaj u farmaceutskoj industriji (**Slika 3**). Tokom godina koje su usledile dosta je rađeno na razvoju novih jedinjenja koja bi ispoljavala analgetički, antipiretički i antiinflamatorni efekat. *Vane* je 1971. godine došao do otkrića da aspirin, indometacin i natrijum-salicilat ispoljavaju antiinflamatorni efekat inhibicijom stvaranja prostaglandina <sup>22</sup>. Takođe, 1971. godine *Willis* i *Smith* su došli do istog zaključka da se u trombocitima iz krvi pacijenata koji su primenjivali aspirin više ne stvaraju prostaglandini <sup>23</sup>. *Hamberg* i *Samuelsson* su 1967. godine okarakterisali proizvode oksidacije nezasićenih masnih kiselina (prostaglandine) koristeći ovčiju vezikularnu žlezdu kao preparat <sup>24</sup>. *Vane*, *Bergstrom* i *Samuelson* su 1982. godine dobili Nobelovu nagradu za otkrića vezana za prostaglandine <sup>13</sup>. Enzim prostaglandin endoperoksid sintaza (COX enzim) je izolovan 1976. godine iz mikrozoma goveđe vezikularne žlezde <sup>25</sup>.



Slika 3. Razvoj antiinflamatornih agenasa

### 1.2.2. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), inhibitori COX enzima

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) su prema mehanizmu dejstva inhibitori enzima ciklooksigenaze (COX). Još 1994. godine bilo je poznato da NSAIL inhibiraju enzim COX, međutim, precizan način vezivanja unutar aktivnog mesta nije bio poznat. Otkriće kristalne strukture ovčijeg COX-1 enzima u kompleksu sa flurbiprofenom doprinelo je razumevanju načina vezivanja liganada unutar aktivnog mesta enzima <sup>12</sup>. Razjašnjeno je kako se ligandi pozicioniraju unutar aktivnog mesta i koje su interakcije važne za ispoljavanje inhibitornog efekta (npr. karboksilna kiselina flurbiprofena stupa u interakciju sa polarnim aminokiselinama Arg120 i Glu524, dok aspirin vrši acetilaciju aminokiseline Ser530) <sup>12, 26</sup>. Nedugo zatim je razrešena kristalna struktura COX-2 enzima: mišjeg COX-2 enzima bez liganda i u kompleksu sa flurbiprofenom, indometacinom i SC-558 <sup>17</sup>, kao i humanog COX-2 enzima <sup>27</sup>. Tradicionalni NSAIL pokazuju neselektivnu inhibiciju obe izoforme COX enzima (COX-1 i COX-2). Ovi lekovi ostvaruju jedan od tri različita načina vezivanja: reverzibilni tip vezivanja (npr. ibuprofen), brz reverzibilni tip vezivanja niskog afiniteta, za kojim sledi vremenski zavisani, spor reverzibilni tip vezivanja većeg afiniteta (npr. flurbiprofen) i kovalentno vezivanje modifikacijom enzima (npr. aspirin) <sup>28</sup>.

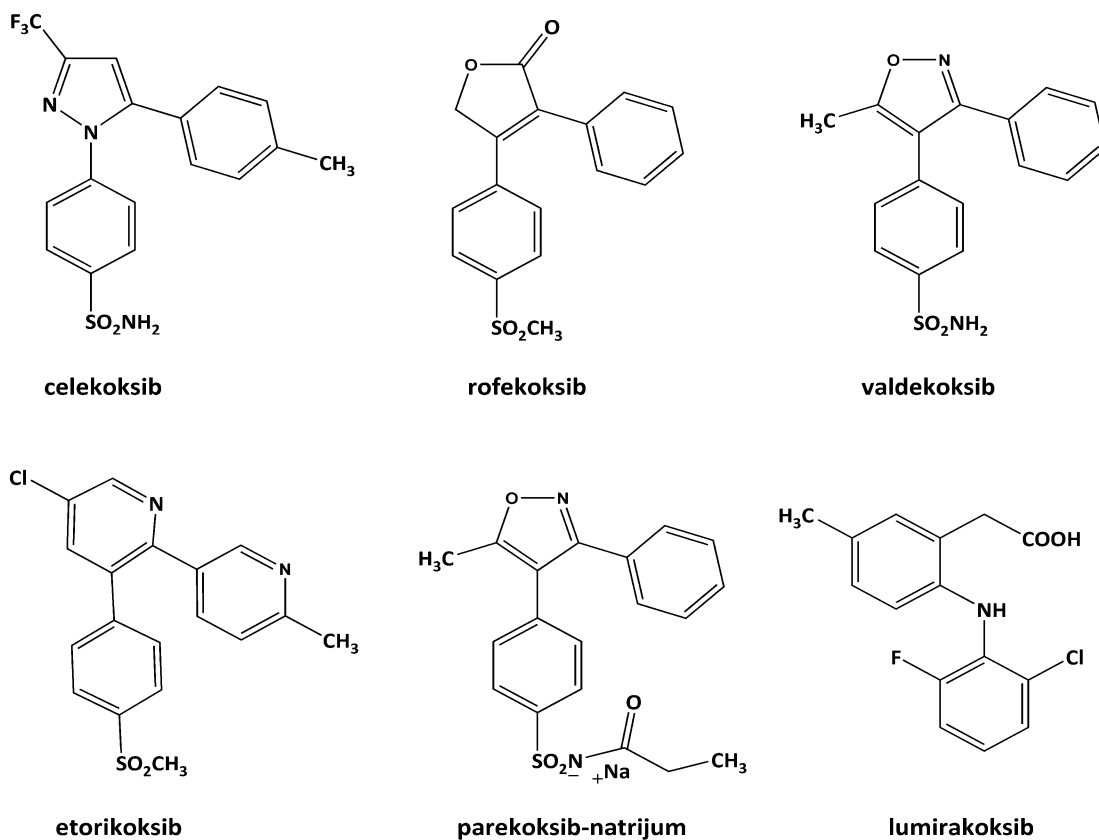
NSAIL ispoljavaju antiinflamatorni, analgetički i antipiretički efekat, a međusobno se strukturno i farmakokinetički razlikuju i klasifikuju u više različitih grupa. U zavisnosti od fizičko-hemijskih svojstava različito se distribuiraju u organizmu, što se odražava na terapijski efekat. Uglavnom su slabe kiseline čija pKa vrednost se kreće u opsegu od 3 do 5. NSAIL mogu biti derivati salicilne kiseline (aspirin, diflunisal, Na-salicilat), sirćetne kiseline (diklofenak, indometacin, sulindak, etodolak, tolmentin), propionske kiseline (ibuprofen, naproksen, flurbiprofen, fenoprofen, ketoprofen), fenaminske kiseline (flufenaminska, mefenaminska, meklofenaminska kiselina), oksikama (meloksikam, tenoksikam, piroksikam). Pojedini lekovi se nalaze u obliku racemske smeše u kojoj samo jedan enantiomer ispoljava aktivnost (npr. ibuprofen, ketoprofen, flurbiprofen predstavljaju smešu neaktivnog *R* i aktivnog *S* izomera). Iako se međusobno strukturno razlikuju, poseduju neke zajedničke farmakokinetičke osobine, kao što su dobra apsorpcija, vezivanje za albumin u visokom procentu i mali volumen distribucije. Na osnovu poluvremena eliminacije NSAIL se mogu podeliti na kratkodelujuće (manje od 6 sati) i dugodelujuće (više od 10 sati). Najznačajniji predstavnici sa kratkim poluvremenom eliminacije su aspirin, diklofenak, ibuprofen, indometacin i etodolak. Najznačajniji predstavnici sa dugim poluvremenom eliminacije su diflunisal, naproksen, piroksikam i sulindak <sup>29,30</sup>. Na osnovu COX-1/COX-2 selektivnosti NSAIL se dele na: lekove koji inhibiraju obe izoforme enzima podjednako (aspirin, ibuprofen, diklofenak, indometacin, naproksen, piroksikam), lekove koji imaju 5 - 50 puta veću selektivnost ka COX-2 izoformi (nimesulid, celekoksib, meloksikam, etodolak) i lekove koji su preko 50 puta selektivniji ka COX-2 izoformi (NS398, rofekoksib) <sup>31</sup>.

Najveći problem sa primenom NSAIL-a je pojava različitih neželjenih efekata. Neželjeni efekti povezani sa primenom NSAIL-a spadaju među najčešće prijavljivanim odgovarajućim regulatornim telima. Ove neželjene reakcije na lek se značajno povećavaju sa godinama, a s obzirom na široku upotrebu ovih lekova među starijim osobama, mogu predstavljati značajan rizik. Glavni neželjeni efekti su gastrointestinalni, bubrežni i kardiovaskularni. Ovi lekovi mogu izazvati i alergijske reakcije. Svi NSAIL izazivaju dispepsiju, a postoji opasnost i od pojave čira. Neželjeni efekti koji su povezani sa gastrointestinalnim traktom su posledica inhibicije stvaranja prostaglandina čija je funkcija održavanje homeostaze gastrointestinalnog trakta. Bubrežni neželjeni efekti su takođe povezani sa inhibicijom stvaranja prostaglandina koji učestvuju u autoregulaciji bubrežnog krvnog protoka i glomerularnoj filtraciji (mogu dovesti do akutne bubrežne insuficijencije, pogoršanja bubrežne insuficijencije, hiperkalemije i povremeno do intersticijalnog nefritisa). Kardiovaskularni efekti su relativno česti, sa procenjenim prosečnim povećanjem srednjeg arterijskog pritiska od 10 mm Hg, a ovi neželjeni efekti su posebno izraženi kod starijih pacijenata. Poseban oprez je neophodan kod primene ovih lekova sa antihipertenzivnom terapijom (beta blokatori i inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima). Na nivou kardiovaskularnog sistema mogu dovesti do zadržavanja tečnosti, pogoršavajući kongestivnu srčanu insuficijenciju <sup>29,30</sup>.

### 1.2.3. Selektivni inhibitori COX-2 enzima

COX-2 selektivni inhibitori razvijeni su sa ciljem da se prevaziđu neželjeni efekti konvencionalnih NSAID koji nastaju kao posledica inhibicije konstitutivnog COX-1 enzima (gastrointestinalni neželjeni efekti). Razvoj selektivnih COX-2 inhibitora, takozvanih koksiba je otpočeo 90-tih godina prošlog veka kada je otkrivena inducibilna, COX-2 izoforma enzima. *Pfizer* je 1999. godine plasirao na tržište celekoksib (Celebrex®), a iste godine je *Merck* registrovao rofekoksib (Vioxx®). 2002. godine, na tržištu su se našli i valdekoksib (Bextra®, *Pfizer*), etorikoksib (Arcoxia®, *Merck*) i parekoksib-natrijum (Dynastat®, *Pfizer*)<sup>32</sup>. Već 2004. godine *Merck* je povukao rofekoksib sa tržišta nakon sprovedene APPROVe (*Adenomatous Polyp Prevention On Vioxx*) studije u kojoj je utvrđeno da je nakon 18 meseci od početka primene rofekoksiba rizik od nastanka ozbiljnih tromboembolijskih događaja povećan u odnosu na placebo<sup>33</sup>. Sprovedene su još dve velike randomizovane studije, VIGOR (*Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research*) i CLASS (*Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*). Na osnovu rezultata studija došlo se do zaključka da je verovatnoća pojave ozbiljnih tromboembolijskih kardiovaskularnih neželjenih efekata povećana u slučaju rofekoksiba u odnosu na naproksen, a u slučaju celekoksiba i naproksena nije postojala statistički značajna razlika<sup>34</sup>. Nakon pojave neželjenih reakcija posle primene selektivnih COX-2 inhibitora, došlo se do zaključka da COX-2 nije isključivo inducibilna, inflamatorna forma enzima, već da ima i fiziološke uloge u organizmu. COX-2 enzim je eksprimiran u vaskularnom endotelu, mozgu i bubrezima u fiziološkim uslovima. COX-1 enzim, konstitutivno eksprimiran u trombocitima, utiče na stvaranje tromboksana TXA<sub>2</sub>, koji ispoljava vazokonstriktorni efekat i dovodi do agregacije trombocita. Dugo se smatralo da prostaciklin nastaje dejstvom COX-1 iz endotela, međutim studijama je pokazano da je COX-2 važan za stvaranje prostaciklina koji ispoljava vazodilatatoran efekat i inhibira agregaciju trombocita. Smatra se da su neželjeni efekti koksiba posledica disbalansa u stvaranju tromboksana i prostaciklina koji nastaje zbog inhibicije COX-2 enzima. Na taj način dolazi do smanjenja stvaranja vazodilatatornog prostaciklina, a ravnoteža se pomera ka vazokonstriktornom i proagregacionom tromboksanu<sup>32</sup>. Pojedini koksibi su ostali na tržištu i primenjuju se uz mere opreza.

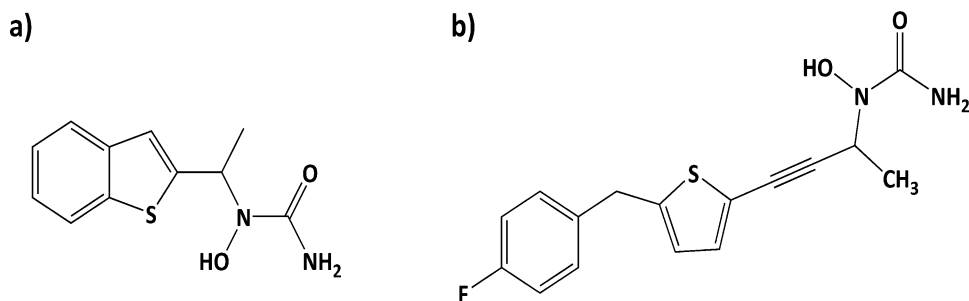
Koksibi se razlikuju od konvencionalnih NSAID jer nemaju karboksilnu grupu u svojoj strukturi, što utiče na različitu orijentaciju molekula unutar aktivnog mesta, a izostaje i jonska interakcija u hidrofobnom kanalu. Opšta podela koksiba bi bila na triciklike i netriciklike. Svi triciklici poseduju 1,2-diaril supstituente na centralnom hetero- ili karbocikličnom prstenu. Za COX-2 selektivnost je bitno prisustvo voluminoznije grupe na jednom od dva aril supstituenta, kao što su metansulfonil, sulfonamidska, metansulfonamidska i druge grupe. Centralni prsten može biti 4-, 5- ili 6-člani, a može biti i biciklični sistem. Petočlani prsten je zastupljen u većini prethodno spomenutih koksiba: pirazol (celekoksib), furanon (rofekoksib), izoksazol (valdekoksib) i drugi<sup>35</sup> (**Slika 4**).



**Slika 4.** Strukture koksiba

#### 1.2.4. Inhibitori 5-LOX enzima

Pod dejstvom 5-LOX enzima stvaraju se leukotrieni koji imaju važnu ulogu u patogenezi astme, alergije i artritisa. Leukotrieni LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> i E<sub>4</sub> su odgovorni za nastanak bronhokonstrikcije i sekreciju mukusa u astmi. Iako je dosta rađeno na razvoju 5-LOX inhibitora koji bi imali primenu u terapiji, samo je zileuton (**Slika 5a**) dostupan na tržištu. Koristi se u terapiji astme, a više puta je bio povučen sa tržišta zbog lošije farmakokinetike (kratko poluvreme života) i hepatotoksičnosti<sup>15</sup>. 5-LOX inhibitor atreleuton (**Slika 5b**) nalazi se u fazi kliničkih studija za primenu u terapiji kardiovaskularnih bolesti<sup>36</sup>.



**Slika 5.** Strukture 5-LOX inhibitora: a) zileuton, b) atreleuton

### 1.2.5. Dualni inhibitori COX-2 i 5-LOX enzima

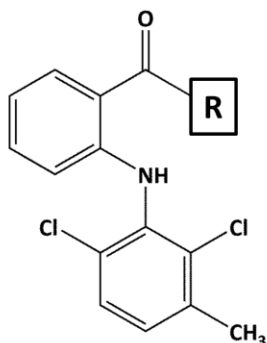
Neželjeni efekti koksiba ukazuju na mogućnost potenciranja jednog biosintetskog puta oksidacije arahidonske kiseline inhibicijom drugog puta. Smatra se da dualna inhibicija COX-2 i 5-LOX enzima, tj. inhibicija oba puta oksidacije arahidonske kiseline, obezbeđuje zadovoljavajući antiinflamatorni efekat uz smanjenje neželjenih efekata. Dualna inhibicija COX-2 i 5-LOX enzima predstavlja racionalnu metodu razvoja novih antiinflamatornih lekova sa bezbednijim profilom neželjenih efekata. Koncept dizajna dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora zasniva se na modifikaciji već postojećih nesteroidnih antiinflamatornih lekova u smislu uvođenja 5-LOX farmakofore i dizajnu novih *lead* molekula kompjuterskim tehnikama <sup>37</sup>.

#### 1.2.5.1. Modifikacija konvencionalnih nesteroidnih antiinflamatornih lekova

Jedan od pravaca u dizajnu dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora bila je modifikacija konvencionalnih NSAIL. Ideja je proistekla iz saznanja da modifikacijom arahidonske kiseline do hidroksamske kiseline dolazi do ispoljavanja 5-LOX inhibitorne aktivnosti kao posledice sposobnosti hidroksamata da helira gvožđe aktivnog centra 5-LOX enzima <sup>38</sup>. Izazov je predstavljalo postizanje 5-LOX inhibitorne aktivnosti uz zadržavanje aktivnosti na COX enzimu.

Devedesetih godina prošlog veka jedna istraživačka grupa je otpočela rad na modifikaciji konvencionalnih NSAIL-a uvođenjem hidroksamske grupe u strukturu jedinjenja. Meklofenaminska kiselina je oko 240 puta selektivniji COX nego 5-LOX inhibitor. Uvođenjem hidroksamske funkcionalne grupe u strukturu meklofenaminske kiseline, dobijeno je jedinjenje koje ispoljava potentnu inhibiciju 5-LOX enzima. Nesupstituisana hidroksamska kiselina se pokazala kao najoptimalniji dualni inhibitor u odnosu na ostale supstituisane derivate hidroksamske kiseline (**Tabela 1**). Isti trend inhibicije 5-LOX enzima se zapaža i na primeru ostalih NSAIL - hidroksamata koji su testirani (derivati indometacina, sulindaka i ibuprofena). Antiinflamatorna aktivnost ovih derivata se može pripisati i *in vivo* hidrolizi hidroksamata do kiseline. Ovom metaboličkom reakcijom nastaju polazna jedinjenja - konvencionalni NSAIL, pa se hidroksamski derivati mogu smatrati i prolek jedinjenjima <sup>39</sup>.

**Tabela 1.** *In vitro* profili meklofenaminske kiseline i derivata nastalih uvođenjem hidroksamske funkcionalne grupe



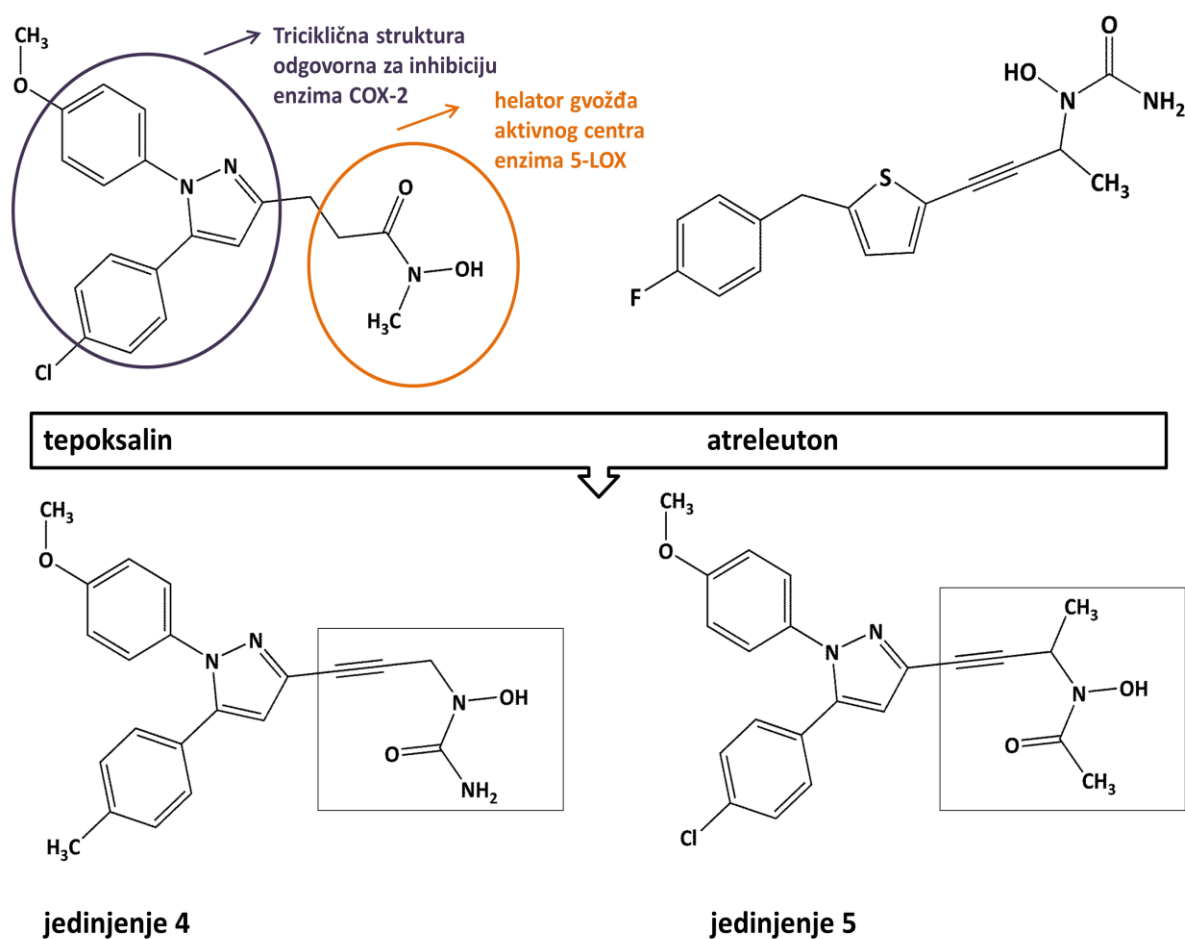
R	IC <sub>50</sub> [μM]		
	COX	5-LOX	5-LOX/COX
O <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> meklofenaminska kiselina	0,10	24,00	240,00
NHOMe	0,55	16,00	29,00
NHOH	1,10	3,90	3,50
N(Me)OH	15,00	1,50	0,10

Zamenom karboksilne grupe u strukturi NSAIL *N*-hidroksiureom došlo je do ispoljavanja 5-LOX inhibitorne aktivnosti. U ovom istraživanju <sup>40</sup> sintetisani su (terminalni i unutrašnji) *N*-hidroksiurea derivati konvencionalnih NSAIL-a i ispitana je njihova *in vitro* enzimska aktivnost. Očekivano, konvencionalni NSAIL nisu inhibirali 5-LOX enzim, dok su njihovi *N*-hidroksiurea derivati ispoljili zadovoljavajuću 5-LOX inhibitornu aktivnost. Kao standard je korišćen zileuton. Opšti zaključak je da se zamenom karboksilne grupe *N*-hidroksiureom postiže preferencija ka enzimu 5-LOX.

### 1.2.5.2. Kombinovanje farmakofora

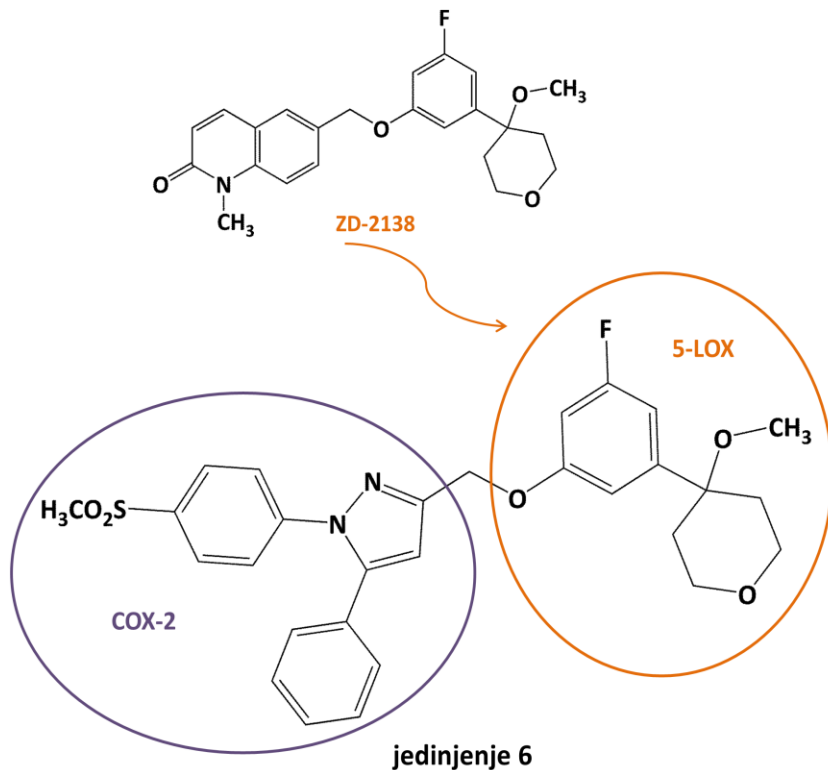
Pristupom kombinovanja farmakofora dizajniran je dualni inhibitor tepoksalin. On se sastoji iz triciklične strukture selektivnih COX-2 inhibitora, tj. u svom sastavu sadrži di-aril supstituisani pirazol i hidroksamsku kiselinu koja je odgovorna za heliranje ne-hemskog atoma gvožđa koje ulazi u sastav enzima 5-LOX (**Slika 6**)<sup>41</sup>. Ovo jedinjenje je u fazi kliničkih ispitivanja za indikacije psorijaza i reumatoidni artritis. Danas ima primenu u veterinarskoj medicini u terapiji osteoartritisa kod životinja (Zubrin®).

U cilju povećanja metaboličke stabilnosti hidroksamata, struktura *in vivo* aktivnog 5-LOX inhibitora atreleuton inkorporirana je u strukturu tepoksalina, pri čemu su dobijena jedinjenja 4 i 5 (**Slika 6**), koja su se pokazala kao potentni dualni inhibitori<sup>42</sup>.



**Slika 6.** Strukture dualnog inhibitora (tepoksalin), 5-LOX inhibitora (atreleuton) i jedinjenja 4 i 5, dobijenih pristupom kombinovanja farmakofora (tepoksalin + atreleuton)

Kombinovanjem klasične triciklične strukture COX-2 inhibitora, prisutnog u strukturi celekoksiba, i 4-metoksitetrahidropiranskog supstituenta 5-LOX inhibitora ZD-2138, dobijeno je jedinjenje 6 (**Slika 7**), koje je ispoljilo dualnu inhibitornu aktivnost <sup>43</sup>.

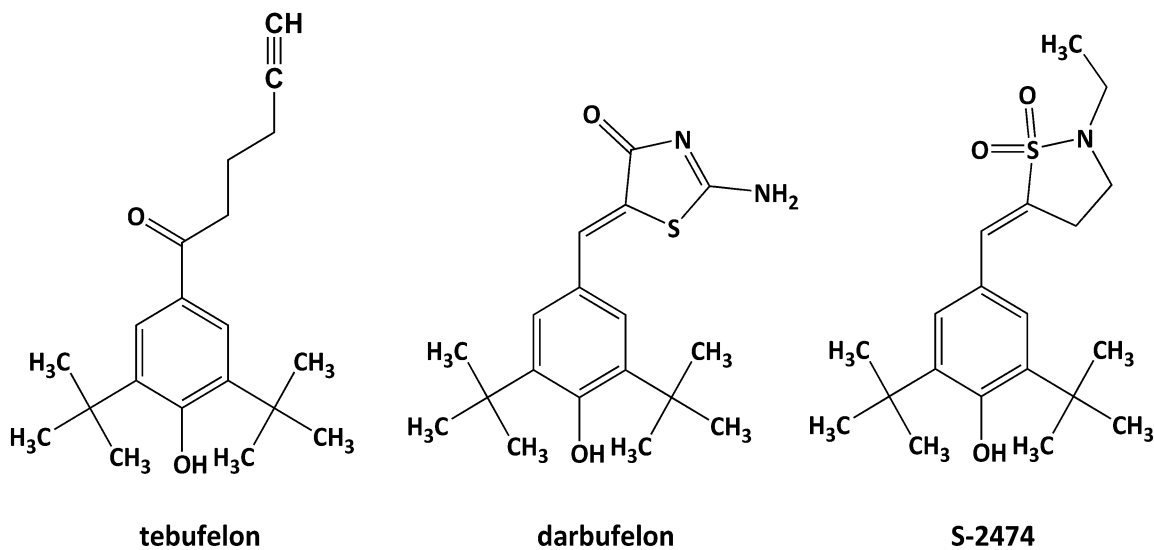


**Slika 7.** Struktura jedinjenja 6 - dualni inhibitor, nastao kombinovanjem COX-2 i 5-LOX farmakofore

### 1.2.5.3. Derivati di-*terc*-butilfenola

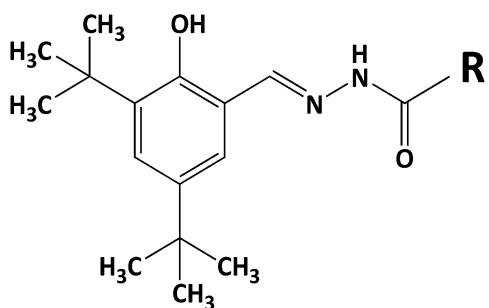
Klasa derivata di-*terc*-butilfenola je široko istraživana u cilju razvoja novih jedinjenja, dualnih inhibitora enzima ciklooksigenaze i lipoksigenaze. 2,6-di-*terc*-butil-1-hidroksi-benzen supstituisan u položaju 4 predstavlja opštu strukturu ove grupe jedinjenja. Smatra se da je fenol odgovoran za antioksidativne osobine jedinjenja, antiinflamatorni potencijal, kao i za smanjenje gastrointestinalnih neželjenih efekata. Razvoj ove grupe jedinjenja otpočela je sa tebufelonom (**Slika 8**), koji se našao i u kliničkim studijama. Tebufelon se pokazao kao potentni antiinflamatorni, analgetički i antipiretički lek-kandidat u brojnim animalnim modelima. U *in vitro* testovima ispoljio je potentnu inhibiciju sinteze prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) i leukotriena (LTB<sub>4</sub>) <sup>44</sup>. Dizajnirani su brojni imidazolni, tiazolni, benzilidenoksazolni derivati 2,6-di-*terc*-butilfenola. Analog označen kao CI-1004 (darbufelon) izdvojio se kao najpotentniji dualni inhibitor. CI-1004 (**Slika 8**) je selektivno inhibirao enzime COX-2 i 5-LOX, pri čemu je pokazao efikasniju inhibiciju enzima 5-LOX od tebufelona <sup>45</sup>. U skorije vreme su rađene studije u kojima se ispitivao antikancerski efekat darbufelona. Rezultati studija su bili obećavajući. Kao zaključak se navodi da bi darbufelon mogao da ima potencijalnu primenu u terapiji kancera pluća <sup>46</sup>.

Dizajnirano je i sintetisano nekoliko 1,2-izotiazolidin-1,1-dioksid ( $\gamma$ -sultam) derivata 2,6-di-*terc*-butilfenola u cilju ispitivanja efekta inhibicije COX i 5-LOX enzima. Derivati koji su u položaju 2  $\gamma$ -sultama sadržali manji alkil niz ispoljili su potentniju inhibiciju enzima COX-2 i 5-LOX u *in vitro* testovima. Ovi derivati su se pokazali kao efikasni antiaritmijski agensi u nekoliko animalnih modela, bez ispoljenog ulcerogenog efekta. Kao lek-kandidat za terapiju artritisa izdvojio se derivat označen kao S-2474 (**Slika 8**). Pored osobina karakterističnih za nesteroidne antiinflamatorne lekove, ovo jedinjenje je ispoljilo i sposobnost modulacije produkcije citokina <sup>47</sup>.

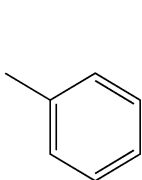


**Slika 8.** Strukture derivata di-*terc*-butilfenola: tebufelon, darbufelon i S-2474

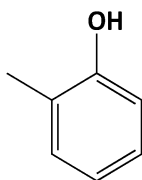
Derivati di-*terc*-butilfenilhidrazona pokazali su se kao efikasni dualni inhibitori enzima COX-2 i 5-LOX. Ova jedinjenja su ispoljila i antiproliferativni efekat na ćelijskim linijama kancera kolona HCA-7, HT-29, SW480, intestinalnim Apc10.1 ćelijskim linijama, kao i na kancerskim ćelijskim linijama kolona koje pojačano eksprimiraju enzim hijaluronan-sintazu-2 (Has2). Sintetisano je i ispitano četiri derivata di-*terc*-butilfenilhidrazona: DTPBHZ, DTPSAL, DTPNHZ i DTPINH (**Slika 9**). Aktivnost sintetisanih derivata je ispitana *in vitro* testovima (inhibicija enzima COX-1, COX-2 i 5-LOX). Svi derivati su imali niže IC<sub>50</sub> vrednosti u testu inhibicije COX-2 enzima. Derivat DTPSAL se pokazao kao najpotentniji 5-LOX inhibitor sa IC<sub>50</sub> vrednošću od 8  $\mu$ M. Kao standardi su korišćeni selektivni COX-2 inhibitor celekoksib i dualni inhibitor likofelon. Kao zaključak studije se navodi da su svi derivati ispoljili zadovoljavajuću dualnu inhibiciju COX-2 i 5-LOX enzima, kao i antiproliferativnu aktivnost na COX-2 pozitivnim ćelijskim linijama kancera kolona <sup>48</sup>.



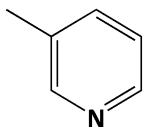
**R:**



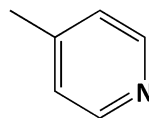
DTPBHZ



DTPSAL



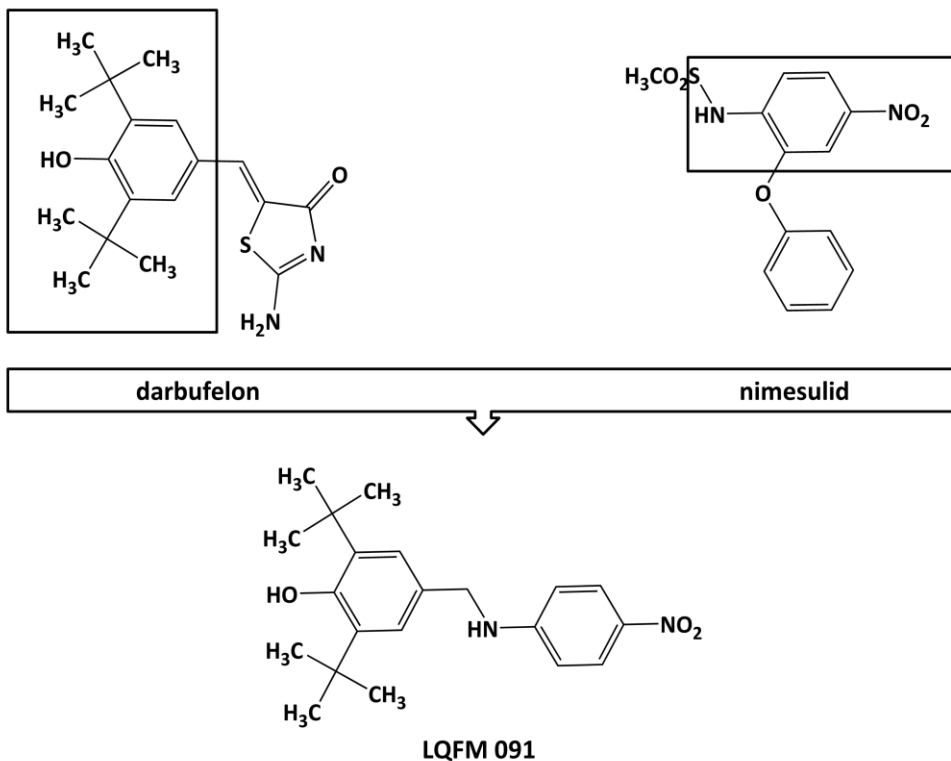
DTPNHZ



DTPINH

**Slika 9.** Strukture derivata di-*tert*-butilfenilhidrazona

Derivat di-*tert*-butilfenola, LQFM 091 (**Slika 10**), dizajniran je tehnikom molekulske hibridizacije. Sastoji se iz 2,6-di-*tert*-butilfenola (iz darbufelona) i 4-nitroanilina (iz nimesulida). Ovo jedinjenje je pokazalo zadovoljavajuću antinociceptivnu, antiinflamatornu aktivnost sa značajnom inhibicijom obe izoforme COX enzima i enzima 5-LOX <sup>49</sup>.



**Slika 10.** Dizajn dualnog inhibitora LQFM 091

### 1.3. Antiinflamatorni lekovi kao potencijalni citostatici – veza između inflamacije, kancera i oksidativnog stresa

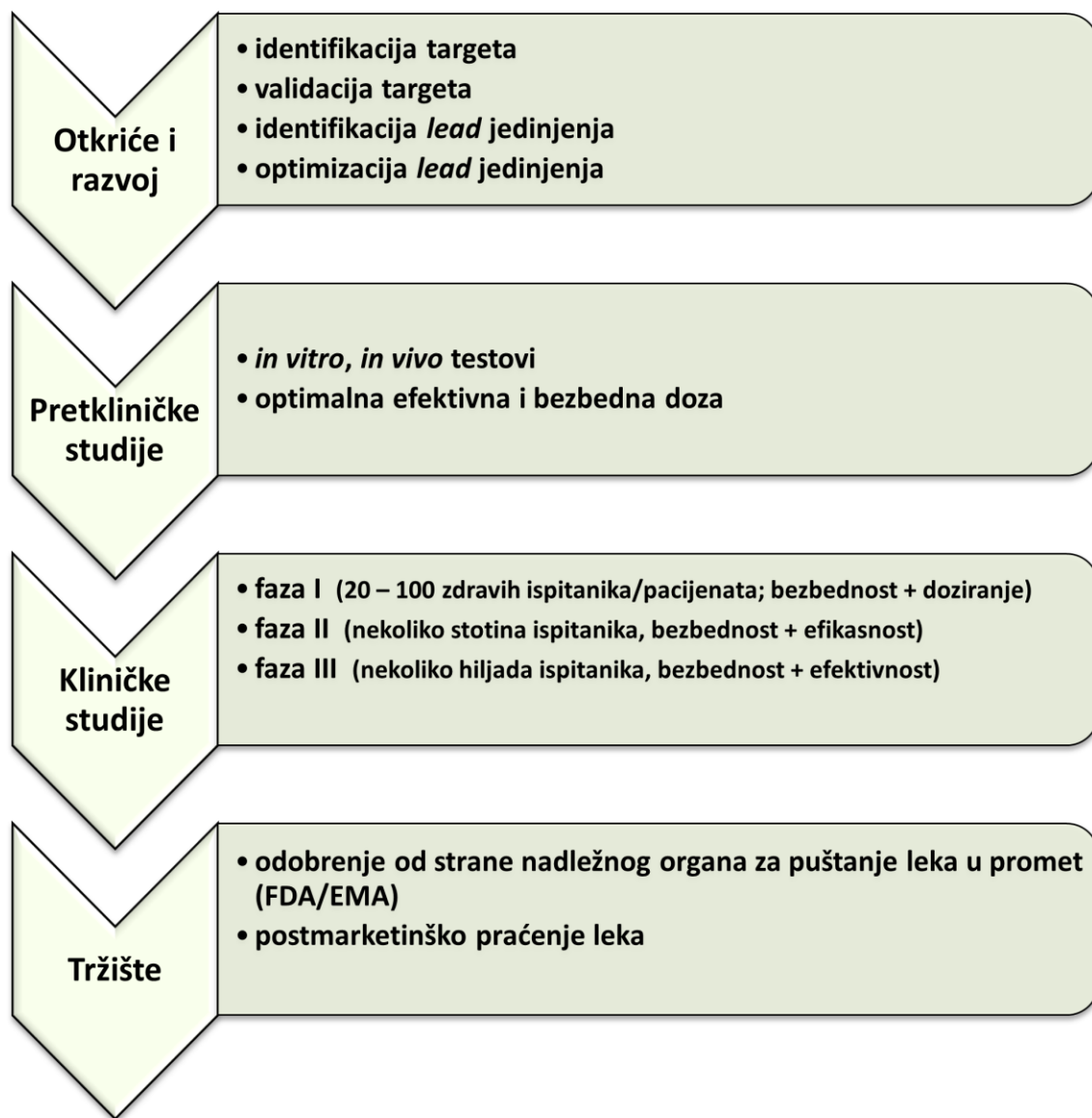
Inflamacija koja je prešla u hronični oblik često je blisko povezana sa nizom oboljenja kao što su kancer, artritis, kardiovaskularna, neurološka i autoimuna oboljenja. Prekomerno stvaranje medijatora inflamacije koji nastaju pod dejstvom COX i LOX enzima ima ključnu ulogu u razvoju hroničnog inflamatornog procesa u organizmu, te se smatra da nastali medijatori imaju ulogu i u patogenezi drugih oboljenja povezanih sa inflamacijom<sup>37</sup>. Mnogi oblici kancera potiču sa mesta hronične iritacije, upale ili infekcije, te je sve više zastupljena ideja da je inflamatorni proces kritična komponenta u progresiji tumora. Pretpostavka da su inflamacija i kancer na neki način povezani prvi put je predložena još 1863. godine. Proliferacija ćelija sama po sebi nije direktan uzrok nastanka kancera, međutim, okruženje bogato inflamatornim ćelijama i faktorima rasta može povećati rizik od nastanka kancera. Mikrookruženje tumora, koje je koordinisano od strane inflamatornih ćelija, učestvuje u neoplastičnim procesima proliferacije, migracije i ćelijskog preživljavanja. Dodatno, tumorske ćelije koriste i signalne molekule nastale aktivacijom urođenog imunskog sistema za migraciju, invaziju i metastaziranje. Sve navedeno je uticalo na razvoj novog pristupa koji uključuje antiinflamatorne lekove u terapiju kancera<sup>50</sup>. Povezanost hronične inflamacije sa kancerom je najuočljivija na primeru kancera kolona kod osoba koje boluju od hroničnih inflamatornih oboljenja kao što su hronični ulcerozni kolitis i Kronova bolest<sup>51</sup>. Rađene su brojne studije u kojima je ispitivan efekat primene antiinflamatornih lekova kod osoba obolelih od kancera. Rezultati studija su ukazali na to da dugotrajna primena NSAIL (posebno aspirina) dovodi do klinički značajnog antikancerskog efekta u gastrointestinalnom traktu. Zaštitni efekat redovne upotrebe aspirina primećen je i na primeru kancera kolona i rektuma, bez obzira na pol pacijenta. NSAIL su ispoljili značajne pozitivne efekte i u slučaju eksperimentalne tumorigeneze sprečavanjem indukovanih kancera creva. Jedinствен zaključak sprovedenih studija je da primena NSAIL i aspirina smanjuje rizik od razvoja kolorektalnog kancera<sup>52</sup>. Pokazano je da primena NSAIL smanjuje rizik od nastanka kolorektalnog kancera nakon 6 meseci kontinuirane primene, dok je dugotrajna primena aspirina smanjila rizik samo u dozama od 300 mg dnevno<sup>53</sup>. Uprkos pozitivnim rezultatima sprovedenih studija, precizan mehanizam antikancerskog efekta NSAIL nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavka je da su COX-2 i 5-LOX enzimi istovremeno eksprimirani, te da rezultujuća proizvodnja eikozanoida ima značajnu ulogu u ovom tipu kancera<sup>54</sup>. Prekomerna ekspresija COX i LOX enzima, osim kod kolorektalnog kancera, zastupljena je i kod kancera dojke, pluća, pankreasa i jednjaka. Prekomernu ekspresiju COX-2 enzima u tumorskim ćelijama indukuju različiti faktori kao što su citokini, onkogeni i faktori rasta, a doprinos tumorigenezi se ostvaruje kroz regulaciju apoptoze, povećanu angiogenezu, invazivnost i modulaciju upale. Prekomerna ekspresija COX-2 i 5-LOX enzima neminovno dovodi do ometanja normalnih fizioloških funkcija ćelija, a njihova povezanost sa progresijom kancera je dodatno potkrepljena zapažanjima da je proizvodnja LTB<sub>4</sub> i PGE<sub>2</sub> povećana kod kancerskih ćelija. Dualni inhibitori COX i 5-LOX enzima (likofelon, flavoksid i psoralidin) uticali su na usporavanje progresije kancera<sup>55</sup>. Celekoksib, selektivni COX-2 inhibitor, ispoljio je inhibitorne efekte na rast ćelija kancera pankreasa međutim, rađene su

studije koje sugerišu da COX-2 inhibitori poseduju ograničenu sposobnost inhibicije rasta ćelija kancera pankreasa *in vivo*. Kombinovana primena celekoksiba i 5-LOX inhibitora - MK886 značajno ometa rast ćelija kancera pankreasa *in vitro*, a u poređenju sa upotrebom jednog inhibitora, primena oba inhibitora dovela je do ispoljavanja dodatnih antikancerskih efekata, kao i smanjenja neželjenih reakcija <sup>56</sup>. Kombinovana primena radioterapije i selektivnih COX-2 inhibitora predstavlja potencijalno efikasniju strategiju u terapiji kancera. Inhibicija COX-2 enzima dovodi do aktivacije apoptoze u brojnim tumorskim ćelijama, a za celekoksib je pokazano da pojačava odgovor tumorskih ćelija na radioterapiju <sup>57</sup>. Efekti COX-2 inhibitora na ćelijsku proliferaciju i pojačavanje odgovora na radioterapiju bili su nezavisni od COX-2 ekspresije u ćelijama <sup>58</sup>. Velika pokretljivost ćelija ima značajan uticaj na invaziju i metastaziranje kancerskih ćelija. Prekomerna ekspresija COX-2 enzima i posledična proizvodnja PGE<sub>2</sub>, može pospešiti pokretljivost kolorektalnih kancerskih ćelija <sup>59</sup>. Rađene su različite studije u kojima je ispitivan antimigratorni efekat COX-2 inhibitora <sup>59,60</sup>. U studiji koja je uključivala dualni COX-2 i 5-LOX inhibitor psoralidin, utvrđena je potentna citotoksičnost jedinjenja na HT-29 i MCF-7 kancerskim ćelijskim linijama, kao i smanjenje migracije fibroblasta uzrokovano zračenjem. S obzirom na uočene efekte, psoralidin bi mogao biti potencijalno vodeće jedinjenje za razvoj novih radioprotektivnih agenasa <sup>61, 62</sup>.

Biološki sistemi se odlikuju ravnotežom između stvaranja i neutralizacije slobodnih radikala. Reaktivne kiseonične vrste (ROS) se stvaraju pod dejstvom endogenih i egzogenih stimulusa. Oksidativni stres nastaje kao posledica nesposobnosti homeostatskih, endogenih antioksidativnih mehanizama da neutrališu prekomerno stvorene slobodne radikale <sup>63</sup>. Oksidativni stres koji se karakteriše prekomernom produkcijom ROS-a povezuje se sa brojnim oboljenjima, među kojima su kardiovaskularna, neurodegenerativna oboljenja, kancer i mnoga druga. Visoki nivoi ROS-a ispoljavaju prokancerogene i citotoksične efekte <sup>64</sup>. Kod hronične inflamacije javlja se povećano stvaranje ROS-a poreklom od mijeloidnih ćelija, koje dovodi do brojnih mutacija, oštećenja DNK i kancera <sup>65</sup>. S druge strane, radioterapija ubija kancerske ćelije jonizujućim zračenjem, pri čemu dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji dovode do ispoljavanja ozbiljnih neželjenih efekata. Na osnovu rezultata brojnih studija, smatra se da primena antioksidanasa tokom terapije kancera ne interferira sa terapijom, a potencijalno može ispoljiti i pozitivne efekte u smislu boljeg odgovora tumora na terapiju i preživljavanja pacijenata <sup>63</sup>.

## 1.4. Kompjuterske metode u dizajniranju lekova

Procenjuje se da proces razvoja leka, koji obuhvata sve faze od identifikacije vodećeg jedinjenja do kliničkih studija na ljudima (**Slika 11**), traje u proseku oko 10 do 15 godina, a može koštati i preko milijardu dolara <sup>66, 67</sup>.



**Slika 11.** Proces razvoja novog leka

Početak devedesetih godina prošlog veka došlo je do razvoja kombinatorijske hemije i tehnika visokopropusnog skrininga. Kreirane su velike biblioteke jedinjenja pomoću kojih je bilo moguće sintetisati i testirati veći broj jedinjenja, potencijalnih kandidata za lek, u kraćem vremenskom periodu. Nažalost, ovi pristupi dizajnu i razvoju novih lekova nisu doveli do očekivanog povećanja broja novih lekova na tržištu. Objašnjenje leži u lošim ADMET karakteristikama lekova-kandidata koje su zapažene u kasnijim fazama razvoja. Novi pristup u otkrivanju i razvoju novih lekova se sastojao u ranoj proceni aktivnosti, selektivnosti i potencijalnih ADMET karakteristika <sup>67, 68</sup>.

U cilju ubrzavanja i ekonomske racionalizacije procesa razvoja novih lekova, primena CADD tehnika (*CADD - computer-aided drug discovery*) od strane farmaceutskih kompanija i drugih istraživačkih grupa postala je izuzetno značajna u pretkliničkoj fazi otkrivanja lekova <sup>69</sup>. CADD obuhvata sve kompjuterske alate koji omogućavaju skladištenje, analizu, upravljanje i modelovanje jedinjenja <sup>67</sup>, upotrebu raznovrsnih informacija o brojnim ligandima/targetima, *in silico* filtere za eliminaciju jedinjenja nepoželjnih karakteristika, a sve u cilju olakšavanja procesa otkrivanja i razvoja novih lekova <sup>70</sup>.

Baze podataka predstavljaju veoma bitnu komponentu procesa kompjuterskog dizajniranja lekova. Veliki broj hemijski relevantnih podataka je prikupljen iz naučne literature i razvrstan u odgovarajuće baze podataka (**Tabela 2**). Među najznačajnijim bazama podataka koje sadrže informacije o ligandima su: *PubChem* <sup>71</sup>, koji predstavlja široko dostupnu, otvorenu bazu podataka kreiranu od strane *NIH (National Institutes of Health)* i sadrži veliki broj molekula, *ChEMBL* (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) baza <sup>72</sup>, *ZINC* baza, koja je besplatna i sadrži veliki broj komercijalno dostupnih jedinjenja koja su prisutna i u odgovarajućim formatima pogodnim za doking studije <sup>73</sup>, *LIGAND* baza <sup>74</sup>, *DRUGBANK* baza, *ChemDB* baza <sup>75</sup> i ostale baze.

Biološke baze podataka sadrže nukleotidne sekvence: *GenBank* <sup>76</sup>, *DDBJ (DNA Data Bank of Japan)* <sup>77</sup>, *ENA (European Nucleotide Archive)* <sup>78</sup>, proteinske sekvence: *Swiss-Prot* <sup>79</sup>, *Protein Information Resource (PIR)* <sup>80</sup>, *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>); strukture proteina: *PDB (Protein Data Bank)* <sup>81</sup>.

*GenBank* predstavlja bazu podataka kreiranu od strane *NCBI (National Center for Biotechnology Information, pripada NIH)*, koja sadrži podatke o svim dostupnim DNK sekvencama. *GenBank* je, zajedno sa *DDBJ* i *ENA*, deo *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* i ove tri organizacije svakodnevno razmenjuju podatke <sup>76</sup>. *Swiss-Prot* baza sadrži i detaljnije informacije o proteinima kao što su opisi funkcije, strukturnih domena, varijacija i dr. Visoko je integrisana sa drugim bazama i pruža sveobuhvatne trenutno dostupne informacije. Ova baza sadrži *TrEMBL (Translation of EMBL nucleotide sequence database)* tj. kompjuterski dodatak koji sadrži sve prevode *EMBL (DNK) baze* <sup>79</sup>. *PDB* baza predstavlja veliku arhivu svih dostupnih struktura makromolekula <sup>81</sup>.

**Tabela 2.** Najznačajnije baze podataka

Baze malih molekula		Biološke baze	
PubChem	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	GenBank	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>
ZINC	<a href="https://zinc.docking.org/">https://zinc.docking.org/</a>	DDBJ	<a href="https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html">https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html</a>
LIGAND	<a href="https://www.genome.jp/kegg/compound/">https://www.genome.jp/kegg/compound/</a>	ENA	<a href="https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home">https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home</a>
DRUGBANK	<a href="https://go.drugbank.com/">https://go.drugbank.com/</a>	Swiss-Prot	<a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb">https://www.uniprot.org/uniprotkb</a>
ChemDB	<a href="https://cdb.ics.uci.edu/">https://cdb.ics.uci.edu/</a>	PIR	<a href="https://proteininformationresource.org/">https://proteininformationresource.org/</a>
		PDB	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>

Visokopropusni skrining (*HTS, high-throughput screening*) predstavlja proces automatizovanog testiranja biološke aktivnosti velikog broja jedinjenja. Osnovna svrha HTS je identifikacija vodećeg jedinjenja koje ispoljava željeni efekat u što nižoj primenjenoj koncentraciji. HTS ima dosta ograničenja u pogledu identifikacije budućeg leka. Da bi neko jedinjenje bilo lek nije dovoljno da poseduje samo biološku aktivnost na određenom targetu, već je neophodno i da ima zadovoljavajuću farmakokinetičke osobine, specifičnost (aktivnost samo na željenim targetima) i odsustvo toksičnosti. Jedinjenja koja proisteknu iz HTS su *lead* jedinjenja koja se dalje optimizuju <sup>82</sup>.

Virtuelni visokopropusni skrining (vHTS) predstavlja pretragu virtuelnih baza u cilju identifikacije *hit* jedinjenja, pri čemu se znatno manje novca i vremena troši u odnosu na klasičan HTS. Postoji više tipova vHTS, a glavna podela je na vHTS koji se zasniva na strukturi liganda (LBVS) i vHTS koji se zasniva na strukturi ciljnog mesta dejstva (SBVS) (**Slika 12**). Virtuelni skrining koji se zasniva na strukturi liganda podrazumeva pretragu na osnovu sličnosti (*fingerprint-based pristup*), kao i odabir jedinjenja na osnovu razvijenog QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) ili farmakofornog modela. Pretraga na osnovu sličnosti se zasniva na pretrazi i odabiru jedinjenja koje poseduje slične hemijske i fizičke karakteristike kao poznato, aktivno jedinjenje na ciljnom mestu <sup>83, 84</sup>. Jedna od najčešće korišćenih metoda strukturno-zavisnog virtuelnog skrininga je molekularni doking <sup>85</sup>. Osim molekularnog dokinga, SBVS je moguće izvesti i pristupom strukturno-zavisnog farmakofornog modelovanja u kome se pri definisanju farmakofore uzima u obzir i struktura vezivnog mesta proteina. Sa ubrzanim hardverskim i softverskim razvojem, kompleksni SBVS protokoli koji uzimaju u obzir i konformacionu fleksibilnost ciljnog mesta dobijaju sve veći značaj.



**Slika 12.** vHTS koji se zasniva na poznavanju strukture liganda (LBVS) i poznavanju strukture ciljnog mesta dejstva (SBVS)

CADD metode se mogu podeliti na metode koje se zasnivaju na poznavanju strukture liganda (LB, *ligand-based*) i metode koje se zasnivaju na poznavanju strukture ciljnog mesta (SB, *structure-based*).

#### 1.4.1. Metode koje se zasnivaju na poznavanju strukture liganda

Metode koje se zasnivaju na strukturi liganda se baziraju na poznavanju strukturnih karakteristika malih molekula, koji se vezuju za target preko kog ispoljavaju aktivnost. Ove metode se pretežno koriste u slučajevima kada struktura ciljnog mesta nije dostupna. Najčešće korišćene LB metode su QSAR modelovanje, farmakoforno modelovanje i pretraga prema sličnosti.

##### 1.4.1.1. Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti (QSAR metoda)

QSAR predstavlja jednu od najznačajnijih kompjuterskih tehnika za molekularno modelovanje. QSAR metodom se uspostavlja kvantitativni odnos između strukturnih, fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja i njihove biološke aktivnosti, pri čemu se razvijaju modeli koji će posedovati sposobnost pouzdanog predviđanja biološke aktivnosti novih jedinjenja. Deskriptori sadrže specifične informacije o jedinjenjima u obliku numeričkih vrednosti koje su relevantne za ispoljavanje biološke aktivnosti. Postoji više vrsta molekularnih deskriptora, a neki od njih su: fizičko-hemijski (hidrofobni, elektronski, sterni), strukturni (broj određenih atoma, veza), topološki (informativniji od strukturnih, 2D deskriptori), geometrijski (3D deskriptori) i dr.<sup>86</sup> Osim uspostavljanja kvantitativnog odnosa između strukture i biološke aktivnosti jedinjenja, može se ispitivati korelacija između strukture i neke druge karakteristike jedinjenja, što predstavlja QSPR metodu (*Quantitative Structure - Property Relationship*). QSAR metoda se tokom godina dosta razvijala, te se od jednostavnijih deskriptora (*Hansch, Free-Wilson's*) prešlo

na kompleksnije i informativnije deskriptore koji se oslanjaju na 3D strukturu jedinjenja (3D-QSAR metoda). Hemometrijske metode koje se upotrebljavaju u QSAR modelovanju mogu biti linearne i nelinearne. U linearne metode spadaju linearna regresija (LR), multilinearna regresija (MLR), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS - *Partial Least-Squares*) i analiza glavnih komponenti (PCA - *Principal Component Analysis*). U nelinearne metode spadaju veštačke neuronske mreže ANN (*Artificial Neural Network*), kNN (*k-nearest neighbors*) i ostale<sup>87, 88</sup>.

#### 1.4.1.2. 3D-QSAR metoda

Dostupno je više različitih 3D-QSAR metoda, a neke od njih su CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*), CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*), GRIND (*GRid-INdependent Descriptor*) itd. CoMFA i CoMSIA metode su zavisne od poravnanja jedinjenja. CoMFA metoda se zasniva na generisanju elektrostatičkih i sternih polja oko ispitivanih molekula kroz proračune interakcione energije ispitivanog molekula sa određenim hemijskim probama. Mapirana polja na 3D mreži oko molekula se dalje koriste kao deskriptori i primenom određene statističke metode, poput PLS regresije, moguće je uspostaviti 3D-QSAR model. Preduslov za uspostavljanje QSAR modela jeste adekvatno poravnavanje jedinjenja unutar seta podataka<sup>89</sup>. Iako se načelno CoMSIA zasniva na sličnom principu generisanja polja oko ispitivanog molekula, opisana polja se ne izvode iz proračuna energije direktne interakcije između hemijske probe i molekula, već se računaju tzv. indeksi sličnosti hemijske probe i ispitivanog molekula u svakoj tački mreže. Indeksi sličnosti molekula sa hemijskom probom u određenoj tački 3D mreže se računaju sumacijom pojedinačnih indeksa sličnosti atoma u molekulu koristeći *Gaussian* funkciju za opisivanje uticaja distance između hemijske probe i posmatranog atoma. Glavna prednost CoMSIA metode u odnosu na CoMFA leži upravo u primeni *Gaussian* funkcije kojom je omogućeno opisivanje finijih površina oko molekula, čime se smanjuje uticaj greške pri pogrešnom poravnanju molekula, a olakšava interpretacija finalnog 3D-QSAR modela. I jedna i druga metoda pripadaju *Triplos Inc.*, a dostupne su unutar *Sybyl* softvera<sup>88, 90</sup>. GRIND predstavlja metodu kod koje je rešen problem poravnanja konformacija jedinjenja. Program GRID je prezentovan davne 1984. godine i od tada preuzima bitnu ulogu u daljem razvoju novih 3D-QSAR metoda<sup>91</sup>. Koristi se za izračunavanje interakcionih energija polja (MIF, *Molecular Interaction Fields*) između ispitivanih molekula i proba koje predstavljaju specifične grupe receptora, a mogu biti: DRY proba (hidrofobne interakcije), O proba (grupe koje su akceptori vodonične veze; karbonilni kiseonik), N1 proba (grupe koje su donori vodonične veze; azot amidske grupe) i TIP proba (oblik jedinjenja, sterne interakcije)<sup>92</sup>. GRIND (*GRid INdependent Descriptors*) molekulski deskriptori su nastali iz seta MIF-ova, računanjem pomoću GRID programa, a predstavljaju geometrijsku distancu dva polja interakcija. Ovi deskriptori su laki za izračunavanje i interpretaciju, nezavisni su od poravnanja molekula i pouzdani za opisivanje biološke aktivnosti. Proces izračunavanja GRIND deskriptora se sastoji iz više koraka. Najpre se izračunava set MIF-ova pomoću GRID programa. U ovom koraku se identifikuju regioni između liganda i hemijskih proba (koje opisuju virtuelno receptorsko mesto) gde se javljaju povoljne interakcije (čvorni regioni). Potom se vrši filtriranje MIF-ova u cilju definisanja virtuelnog receptorskog

mesta (VRS, *virtual receptor site*) upotrebom optimizacionih algoritama (ALMOND, AMANDA) koji ekstrahuju relevantne regione. Kodiranje VRS u GRIND deskriptore vrši se pomoću odgovarajućih algoritama, MACC (*Maximum Auto and Cross Correlation*) ili CLACC algoritma (*Consistently Large Auto and Cross Correlation*)<sup>93, 94</sup>. Navedeni algoritmi su u sastavu programa *Pentacle*<sup>95</sup>, koji se koristi za kreiranje 3D-QSAR modela. GRIND promenljive su u programu *Pentacle* prikazane u obliku korelograma (auto- i kroskorelograma, u zavisnosti od toga da li su čvorni parovi istih ili različitih proba). GRIND deskriptori se dalje koriste u brojnim hemometrijskim analizama, kao što su PCA, PLS, a vizuelno posmatranje korelograma je takođe veoma informativno<sup>93</sup>. PCA analiza se koristi za analizu hemijskog prostora obuhvaćenim ispitivanim setom jedinjenja, kao i za podelu datog seta na test i trening set, dok se PLS regresiona analiza koristi za formiranje 3D-QSAR modela (odnos između GRIND varijabli i biološke aktivnosti)<sup>92</sup>. Frakcioni faktorski dizajn (*FFD – Fractional Factorial Design*) se dalje koristi za odabir varijabli. Vršiti se smanjenje broja inicijalno izračunatih deskriptora kako bi se zadržale najinformativnije varijable i izbeglo pretreniranje modela<sup>96</sup>.

Neki od primera lekova koji su odobreni od strane FDA (*Food and Drug Administration*) i nalaze se na tržištu, a dizajnirani su pomoću QSAR i ostalih kompjuterskih tehnika su: kaptopril (1981), norfloksacin (1986), dorzolamid (1994), zanamivir (1999), tirofiban (2000), imatinib (2003) i mnogi drugi<sup>86, 97</sup>.

### 1.4.1.3. Validacija 3D-QSAR modela

Kreiranje validnog, pouzdanog i visoko prediktivnog 3D-QSAR modela predstavlja najvažniji segment 3D-QSAR studije. Još 2002. godine postavljeni su takozvani „Setubal principi” vezani za procenu validnosti razvijenih QSAR modela. Ovi principi su modifikovani od strane OECD (Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj) 2004. godine i nazvani su „OECD principi za validaciju QSAR modela”. QSAR model mora ispuniti sledeće zahteve: 1) definisana krajnja tačka, 2) nedvosmislen algoritam, 3) definisan domen primenljivosti, 4) ispunjeni kriterijumi koji ukazuju na to da je model pouzdan, robustan i predvidiv, 5) mehaničko tumačenje<sup>98</sup>.

Validacija razvijenog modela obuhvata internu i eksternu validaciju. Interna validacija se oslanja na jedinjenja koja su korišćena za razvoj modela (trening set jedinjenja), dok se za eksternu validaciju koriste test set jedinjenja. Internom validacijom se procenjuje kvalitet i pouzdanost samog modela, međutim nije moguće proceniti performanse modela u uslovima realne primene modela, pri radu sa jedinjenjima koja nisu bila uključena u trening modela. Eksternom validacijom se procenjuje prediktivnost razvijenog modela, tj. sposobnost modela da pouzdano predvidi aktivnost novih jedinjenja (test set jedinjenja koja nisu korišćena u formiranju modela)<sup>86</sup>.

Parametri interne validacije su: koeficijent determinacije -  $R^2$ , kvadrat koeficijenta korelacije dobijen *leave-one-out* metodom -  $Q^2_{LOO}$  (*Leave-One-Out Cross Validated squared correlation coefficient*) i greška predviđanja trening set modela - **RMSEE** (*Root Mean Square Error of Estimation*)<sup>95, 99, 100</sup>.  $R^2$  predstavlja kvadrat koeficijenta korelacije između eksperimentalnih vrednosti biološkog odgovora i modelom predviđenih vrednosti biološkog odgovora.  $R^2$  se

izračunava pomoću jednačine (1), gde je RSS (*Residual Sum of Squares*) suma kvadrata reziduala, a TSS (*Total Sum of Squares*) ukupna suma kvadrata. Vrednost  $R^2$  određuje stepen pouzdanosti modela (kvadrat koeficijenta korelacije između eksperimentalnih vrednosti i vrednosti predviđenih modelom).  $Q^2_{LOO}$  i **RMSEE** se koriste za procenu sposobnosti predviđanja i robusnosti modela.  $Q^2_{LOO}$  je izračunat primenom *leave-one-out* metode (metoda izostavljanja po jednog jedinjenja trening seta dok se svako jedinjenje ne izostavi po jednom). Izračunava se primenom jednačine (2), gde  $Y_{obs(training)}$  predstavlja eksperimentalno dobijenu vrednost zavisne varijable za trening set jedinjenja, a  $\bar{Y}_{training}$  predstavlja srednju vrednost zavisne varijable za trening set jedinjenja. PRESS (*Predicted Residual Sum of Squares*) je izračunat korišćenjem jednačine (3), gde  $e_{(i)}^2$  predstavlja kvadratnu sumu razlika između eksperimentalnih Y vrednosti i Y vrednosti predviđenih LOO metodom. **RMSEE** vrednost pretpostavlja grešku između srednje vrednosti eksperimentalnih Y i predviđenih Y vrednosti<sup>95, 99</sup> i izračunava se pomoću jednačine (4):

$$R^2 = 1 - \left(\frac{RSS}{TSS}\right) \quad (1)$$

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

$$PRESS = \Sigma_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (3)$$

$$RMSEE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (4)$$

Smatra se da je visoka vrednost  $Q^2_{LOO}$  parametra ( $Q^2_{LOO} > 0,5$ ) pokazatelj da kreirani 3D-QSAR model ima visoku prediktivnu sposobnost (tačnost predviđanja QSAR modela za trening set jedinjenja). Visoka vrednost  $Q^2$  je neophodan, ali ne i dovoljan uslov da model ima visoku prediktivnu sposobnost.

U cilju procene stvarne moći predviđanja razvijenog modela, vrši se eksterna validacija. Za eksternu validaciju se koriste test set jedinjenja, a parametri koeficijent korelacije za test set -  $R^2_{pred}$  (stepen korelacije između eksperimentalnih i predviđenih Y vrednosti za test set) i srednja kvadratna greška predviđanja - **RMSEP** (*Root Mean Square Error of Prediction*) se računaju korišćenjem jednačina (5) i (6). Kod izračunavanja **RMSEP** (jednačina (6)), PRESS ne podrazumeva LOO vrednosti. Smatra se da razvijeni QSAR modeli poseduju visoku moć predviđanja ukoliko je vrednost  $R^2_{pred}$  veća od 0,6<sup>87, 101</sup>.

$$R^2_{pred} = 1 - \frac{\Sigma(Y_{obs(test)} - Y_{pred(test)})^2}{\Sigma(Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (5)$$

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

U cilju što preciznije procene moći predviđanja razvijenog QSAR modela, uvedena je nova metoda eksterne validacije –  $r^2$  metrika,  $r^2_{m(\text{test})}$  koja obezbeđuje stroži kriterijum <sup>102</sup>. Za procenu dobre sposobnosti predviđanja kreiranih modela izračunata su dva parametra:  $\overline{r_m^2}$  i  $\Delta r_m^2$  (jednačine (7) i (8)). Parametar  $r_m^2$  (izračunat korišćenjem jednačine (9)) predstavlja kvadrat koeficijenta korelacije između posmatranih (Y osa) i predviđenih (X osa) vrednosti jedinjenja sa odsečkom ( $r^2$ ) i bez odsečka ( $r_0^2$ ).  $r^2$  i  $r_0^2$  su koeficijenti determinacije regresione prave izračunate upotrebom eksperimentalnih i predviđenih vrednosti test seta sa forsiranjem kroz nulu ( $r_0^2$ ) ili bez ( $r^2$ ). Za određivanje  $r_m'^2$  vrednosti (jednačina (10)) koristi se  $r_0'^2$  koje je izračunato zamenom osa X i Y.  $r^2$  i  $r_0^2$  su koeficijenti determinacije regresione prave izračunate upotrebom eksperimentalnih i predviđenih vrednosti test seta sa forsiranjem kroz nulu ( $r_0^2$ ) ili bez ( $r^2$ ).

$$\overline{r_m^2} = (r_m^2 + r_m'^2)/2 \quad (7)$$

$$\Delta r_m^2 = |r_m^2 - r_m'^2| \quad (8)$$

$$r_m^2 = r^2 \times (1 - \sqrt{r^2 - r_0^2}) \quad (9)$$

$$r_m'^2 = r^2 \times (1 - \sqrt{r^2 - r_0'^2}) \quad (10)$$

$\overline{r_m^2}$  vrednost treba da bude veća od 0,5 (prosek od  $r_m^2$  i  $r_m'^2$ ), a  $\Delta r_m^2$  treba da bude manja od 0,2 kako bi se razvijeni model okarakterisao kao visoko prediktivan <sup>97</sup>.

#### 1.4.1.4. Domen primenljivosti 3D-QSAR modela

Domen primenljivosti je jedan od zahteva OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) koji se mora ispuniti kako bi se dobio zadovoljavajući 3D-QSAR model. Validirani 3D-QSAR model ne može pouzdano predvideti aktivnost svakog jedinjenja, već samo jedinjenja koja se nalaze u definisanom deskriptorskom prostoru. Stoga, jako je važno odrediti teorijski region opisan deskriptorima modela u okviru koga se može pouzdano predvideti aktivnost novog jedinjenja. Korišćenjem *Leverage* pristupa može se odrediti da li je neko jedinjenje *outlier*. Granična vrednost (*threshold*,  $h^*$ ) se dobija na osnovu jednačine:

$$h^* = \frac{3(p+1)}{n} \quad (11)$$

gde je p broj varijabli modela, a n broj jedinjenja trening seta.

*Williams*-ov dijagram se konstruiše kao zavisnost standardizovanih reziduala u odnosu na *leverage* h vrednosti. *Outlier*-i su sva jedinjenja za koja važi  $Y > \pm 3SD$  i/ili  $h > h^*$  <sup>98</sup>.

## 1.4.2. Metode koje se zasnivaju na strukturi ciljnog mesta

Metode koje se zasnivaju na strukturi ciljnog mesta (SBDD) se koriste kada je poznata struktura ciljnog mesta dejstva. Najčešće korišćeni pristupi u dizajnu su molekulski doking i *de novo* dizajn. Kristalografija zasnovana na difrakciji X zraka, NMR spektroskopija i kriogena elektronska mikroskopija predstavljaju glavne metode kojima se razrešava 3D struktura željenog proteina. Ove metode imaju i nedostatke koji su uglavnom vezani za cenu i dužinu trajanja eksperimenata, a kristalografija zasnovana na difrakciji X zraka je izvodljiva samo ukoliko protein kristališe, dok je NMR spektroskopija pogodna prevashodno u slučaju malih proteina. Kada nepoznatu strukturu proteina nije moguće razrešiti eksperimentalnim tehnikama, koriste se kompjuterske metode. Jedna od najviše korišćenih metoda je homologo modelovanje kojim se vrši predviđanje strukture ciljnog mesta (dobijaju se 3D koordinate strukture) <sup>84</sup>. Kada je struktura ciljnog mesta dejstva poznata, potrebno je utvrditi vezivno mesto liganda, kao i tip interakcija koje se ostvaruju. Najefikasniji način je tumačenje ključnih interakcija iz ligand – receptor kompleksa koji je definisan kristalografski <sup>103, 104</sup>. Najčešće korišćene SBDD metode su molekulski doking, virtuelni skrining baziran na strukturi receptora (SBVS) i molekulska dinamika <sup>85</sup>.

### 1.4.2.1. Molekulski doking

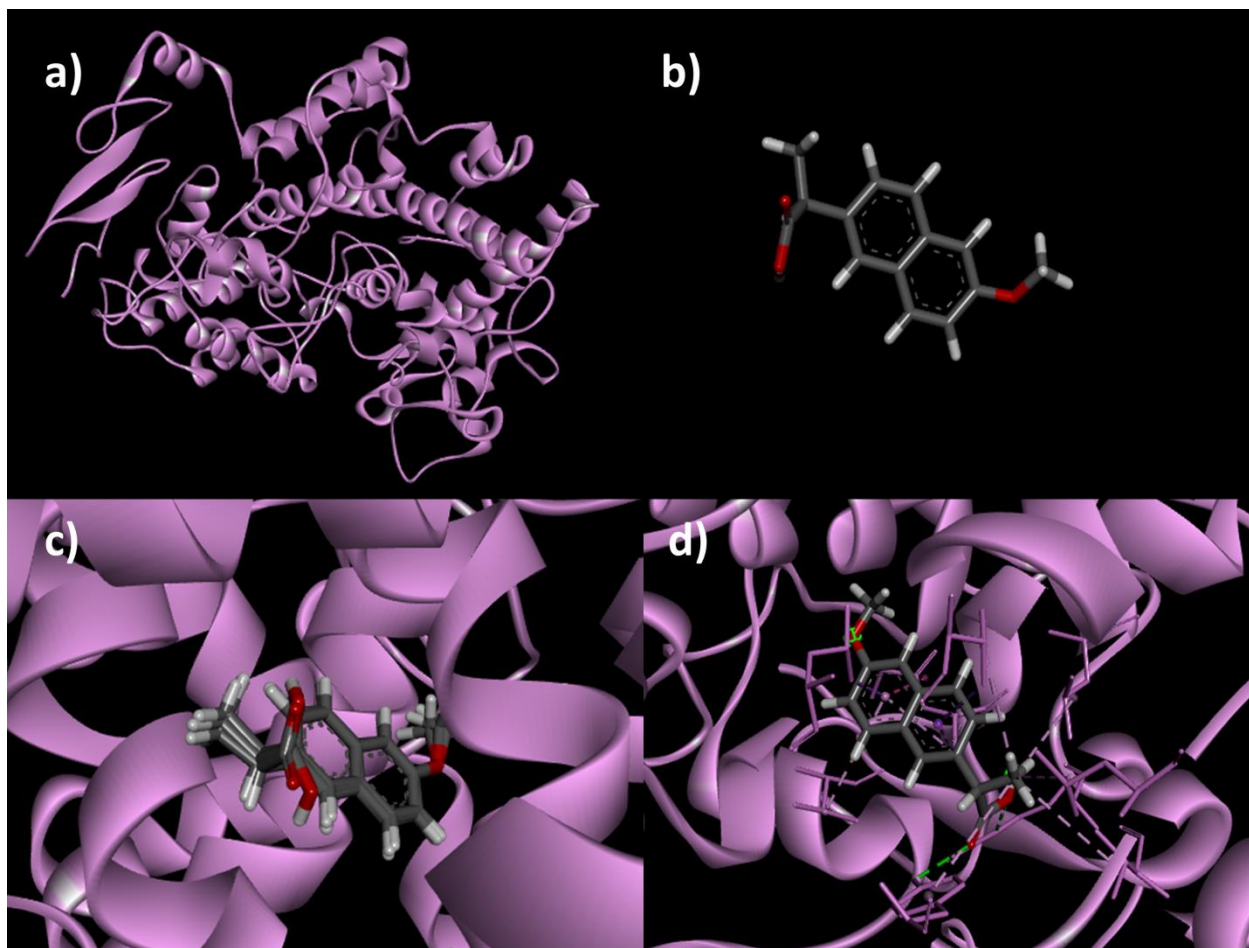
Molekulski doking predstavlja najčešće korišćenu SBDD metodu čiji je cilj predvideti konformaciju liganda unutar aktivnog mesta proteina. Dokingom liganda u protein dobijaju se konformacije liganda koje se analiziraju (**Slika 13**) i kao rezultat se izdvaja najverovatnija vezivna konformacija i definišu se značajne intermolekulske interakcije ligand – protein (**Slika 13**) <sup>85</sup>.

Protein Data Bank (PDB) sadrži sve do sada razrešene 3D strukture ciljnih mesta. Kada je struktura proteina poznata, naredna faza je definisanje vezivnog mesta liganda. Ono se može predvideti upotrebom geometrijskih i energetskih algoritama za pretragu <sup>84</sup>. Algoritmi vrše pretragu konformacija liganda sistematskim i stohastičkim pristupom. Kod sistematskog pristupa konformacije liganda se postepeno menjaju usled malih promena strukturnih parametara, i nakon više ciklusa izdvaja se konformacija sa izračunatom minimalnom energijom koja predstavlja najverovatniju vezivnu konformaciju. Kod stohastičkog pristupa pretraga konformacije liganda se vrši nasumičnim promenama strukturnih parametara, pri čemu se generiše veliki broj molekulskih konformacija liganda sa širokim spektrom izračunatih energija. Ovim pristupom se izbegava problem lokalnog energetskog minimuma koji se javlja prilikom sistematske pretrage, tj. glavni nedostatak sistematskih algoritama je rizik da ligand ostane zarobljen u lokalnom energetskom minimumu, odnosno van globalnog energetskog minimuma što se donekle izbegava primenom stohastičkog pristupa.. Genetski algoritam (GA) funkcioniše prema stohastičkom pristupu a inkorporiran je u programima kao što su AutoDock i GOLD <sup>85</sup>.

Scoring funkcije (funkcije vrednovanja) se koriste za procenu vezivnog afiniteta liganda za receptor. Funkcije vrednovanja mogu biti empirijske, bazirane na znanju i bazirane na poljima sila<sup>84, 105</sup>. Pre izvođenja studije molekuskog dokinga potrebno je validirati metodu i proceniti da li je odabrana funkcija vrednovanja zadovoljavajuća. Validacija se vrši tako što se predviđa bioaktivna konformacija ko-kristalnog liganda u strukturi proteina i izračuna RMSD (*Root Mean Square Deviation*) vrednost između ko-kristalne i predviđene poze. Ukoliko je RMSD vrednost  $\leq 2 \text{ \AA}$ , smatra se da je protokol molekuskog dokinga validan<sup>106</sup>.

GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) program sadrži genetski algoritam za dokovanje fleksibilnih liganda unutar vezivnog mesta proteina (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/gold/>). U okviru GOLD programa dostupne su različite funkcije vrednovanja, kao što su ChemPLP, GoldScore, ChemScore i ASP.

Ovaj program je pogodan za dizajn inhibitora metaloenzima, a 5-LOX enzim sadrži gvožđe unutar aktivnog mesta enzima. Kao i svi drugi programi za doking, GOLD se sastoji iz bitnih delova kao što su: funkcije vrednovanja (kojih ima više, gore navedene) i genetskog algoritma pretrage<sup>107</sup>.



**Slika 13.** Molekulski doking: a) receptor, b) ligand, c) konformacije liganda unutar aktivnog mesta proteina, d) najverovatnija vezivna konformacija i interakcije ligand – receptor

## 1.5. Metode za procenu lipofilnosti jedinjenja

Lipofilnost jedinjenja predstavlja izuzetno važnu fizičko-hemijsku karakteristiku koja ima uticaj na metabolizam, farmakokinetiku i toksičnost jedinjenja <sup>108</sup>. Lipofilnost leka određuje prolaz leka kroz lipidne membrane i ima direktan uticaj na ispoljavanje biološke aktivnosti. Izražava se kao particioni koeficijent (P) u sistemu n-oktanol / voda i što je veći koeficijent, jedinjenje je lipofilnije. Češće se upotrebljava vrednost logP kao mera lipofilnosti jedinjenja i ona je ekvivalentna logD vrednosti za nejonizovana jedinjenja. Za razliku od logP vrednosti, logD uzima u obzir jonizaciju molekula pri određenoj pH vrednosti <sup>109</sup>. Smatra se da logP (logD) vrednosti od 1 do 3 ukazuju na to da će jedinjenje imati optimalne karakteristike važne za dobru farmakokinetiku leka, dok će jedinjenja koja imaju logP > 5 ispoljavati visoku lipofilnost, pa samim tim i slabu rastvorljivost i lošu apsorpciju, što je u skladu sa pravilom petice po Lipinskom. Pravilo petice po Lipinskom definiše optimalne karakteristike koje jedinjenje treba da poseduje u svojoj strukturi: 1) do 5 donora vodonične veze, 2) do 10 akceptora vodonične veze, 3) molekulska masa < 500 Da, 4) logP < 5 <sup>108</sup>. Lipofilnost jedinjenja se može odrediti eksperimentalno analitičkim metodama i kompjuterski. Najstarija i najpoznatija metoda je *shake flask*. Princip ove direktne metode je preraspodela ispitivanog jedinjenja između dve faze, vodene i organske (n-oktanol). Nakon mućkanja u levku za odvajanje i postizanja stanja ravnoteže, koncentracija analita u obe faze se određuje pomoću odgovarajuće analitičke metode (npr. UV-VIS spektrofotometrija). Nedostaci *shake-flask* metode su što je dugotrajna, zahteva veliku količinu analita i rastvarača, pouzdana je u relativno uskom opsegu logP vrednosti (od -3 do 4), te ova metoda nije pogodna za određivanje logP vrednosti lipofilnijih jedinjenja. Od eksperimentalnih metoda koriste se još i hromatografske i elektroanalitičke metode za određivanje lipofilnosti. U hromatografske metode spadaju hromatografija na tankom sloju (TLC, *Thin layer chromatography*) i reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (RP-HPLC, *Reversed-phase High-performance liquid chromatography*). RP-HPLC metoda je jedna od najčešće korišćenih za određivanje lipofilnosti i preporučena je od strane OECD. To je indirektna metoda određivanja lipofilnosti koja se koristi kao alternativa *shake flask* metodi. Posедуje niz prednosti, među kojima su skraćene vremena rada, dobra ponovljivost, mala količina testiranih jedinjenja i širi opseg logP vrednosti koji se može odrediti <sup>110</sup>. Zasniva se na određivanju afiniteta ispitivanog jedinjenja ka stacionarnoj fazi koji je opisan retencionim faktorom **k** ( $k = (t_R - t_0) / t_0$ ,  $t_R$  - retenciono vreme;  $t_0$  - mrtvo vreme) <sup>111</sup>. Hromatografski parametri **log<sub>w</sub>k**, **a** i **φ<sub>0</sub>** dobijaju se korelisanjem logk vrednosti sa procentom organskog modifikatora u mobilnoj fazi <sup>112</sup>.

## 1.6. Procena gastrointestinalne apsorpcije jedinjenja primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i PAMPA testa

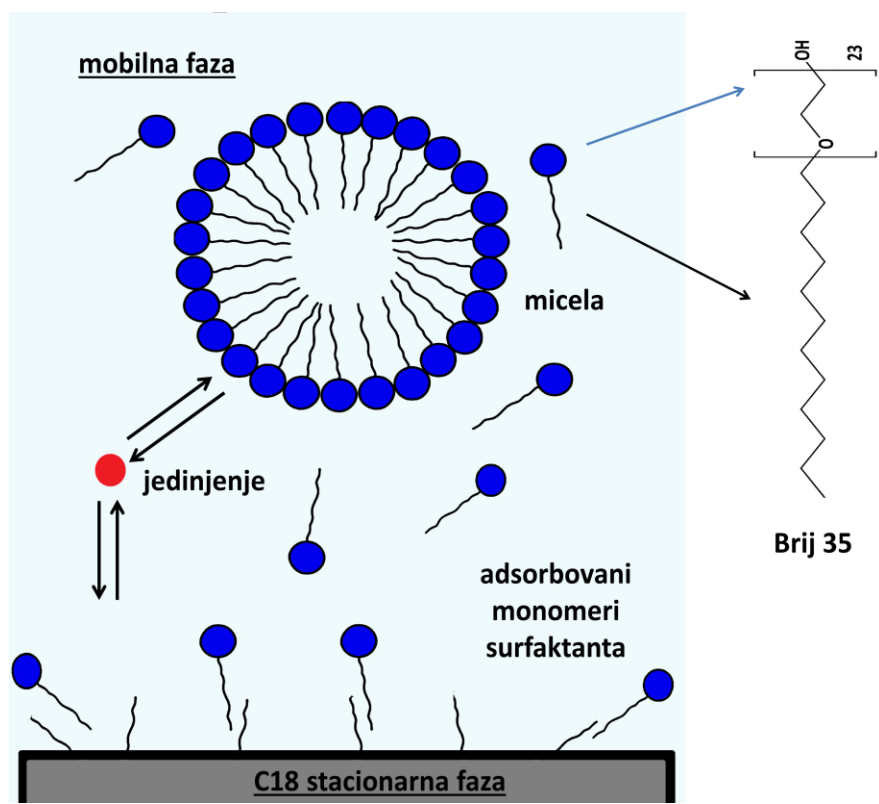
Farmakokinetički testovi predstavljaju izuzetno važan segment u procesu razvoja novog leka. Farmakokinetički profil leka se uglavnom ispituje *in vivo*. Kako su *in vivo* testovi zahtevni i skupi, postoje naponi da se zamene *in vitro* testovima iz etičkih i ekonomskih razloga. Oralna primena lekova je jedan od najpoželjnijih načina primene. U tom slučaju glavna apsorpciona barijera je crevna sluzokoža, kroz koju lekovi obično prolaze mehanizmom pasivne difuzije. Postoji mnogo faktora koji utiču na apsorpciju leka iz gastrointestinalnog trakta kao što su rastvorljivost, lipofilnost, pKa vrednost itd. Za procenu gastrointestinalne apsorpcije u velikoj meri su zastupljeni i eksperimenti koji uključuju ćelijske kulture <sup>113</sup>.

### 1.6.1. Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC)

Micelarna tečna hromatografija predstavlja alternativnu reverzno-faznu tečnu biohromatografiju, gde se kao mobilna faza koriste rastvori surfaktanata iznad kritične micelarne koncentracije kako bi se formirale micelle. Prisustvo micela i monomera surfaktanta u mobilnoj fazi dovodi do modifikacija stacionarne faze, pri čemu se formira sistem koji simulira ćelijsku membranu. Sličnost sa biološkim okruženjem leži i u činjenici da holesterol, fosfolipidi, trigliceridi i masne kiseline, prisutne u intraćelijskoj i vanćelijskoj tečnosti, formiraju micelle sa proteinima (lipoproteini). Zbog navedenih sličnosti, micelarna tečna hromatografija naziva se bioparticiona micelarna hromatografija (BMC, *Biopartitioning micellar chromatography*). BMC ima primenu u ispitivanju apsorpcije jedinjenja na nivou gastrointestinalnog trakta, kože i krvno-moždane barijere, a koristi se i za predviđanje toksičnosti <sup>114, 115</sup>. Surfaktant koji se najčešće koristi je polioksietilen (23) lauril etar (Brij 35). Koriste se i drugi surfaktanti kao što su natrijum lauril sulfat i natrijum deoksiholat, ali je Brij 35 ispoljio najoptimalnije osobine. Uslovi BMC eksperimenata variraju, međutim, najčešće se eksperimenti izvode na temperaturi od 36,5 °C, 37 °C i 40 °C u cilju simulacije uslova u organizmu. Obično se dodaje 9,2 g/L NaCl kako bi se dobio fiziološki salinitet <sup>114</sup>. Kod procene transporta novih jedinjenja kroz biološke membrane, retencija jedinjenja u hromatografskom sistemu uglavnom zavisi od njihove lipofilnosti <sup>116</sup>. Hromatografski modeli za procenu apsorpcije jedinjenja u organizmu su se pokazali jednostavnijim za izvođenje od modela koji uključuju ćelijske kulture. Sličnosti BMC sistema sa biološkim barijerama utiču na pouzdanost metode. Model za procenu gastrointestinalne apsorpcije se uglavnom sastoji od C18 stacionarne faze i Brij 35 micelarne mobilne faze. Stacionarna faza je modifikovana adsorpcijom lipofilnih regiona Brij 35 surfaktanta koji simuliraju ugljovodonične lance membrane, dok hidrofilne karakteristike surfaktanta simuliraju polarne regione membrane. Retencija jedinjenja zavisi od interakcija sa modifikovanom stacionarnom fazom i micelama mobilne faze (**Slika 14**) <sup>117</sup>. Eluciono ponašanje ispitivanog jedinjenja u BMC sistemu zavisi od kombinovanih efekata tri particiona koeficijenta između :

1) micela i vode, 2) stacionarne faze i vode i 3) stacionarne faze i micela <sup>118, 119</sup>. Surfaktanti u koncentracijama ispod kritične micelarne koncentracije se koriste kao modifikatori mobilne faze za poboljšavanje razdvajanja rastvora suprotno naelektrisanih jona, ali se ne koriste u BMC zbog amfifilne prirode surfaktanta i mogućih problema sa retencijom. Kritična tačka metode je podešavanje optimalnog odnosa organskog rastvarača i vodene faze <sup>119, 120</sup>. BMC se koristi kao *in vitro* model i za predviđanje permeabilnosti jedinjenja kroz kožu <sup>121</sup>. Upotrebom BMC sistema može se proceniti odnos retencija/toksičnost, te se ova metoda može koristiti i u proceni ekotoksičnosti <sup>122</sup>. Za jedinjenja koja se slabo zadržavaju na C18 koloni korišćene su različite stacionarne faze, među kojima su aminopropil i cijanopropil. Umesto Brij 35 mogu se koristiti i anjonski surfaktanti, kao što je natrijum deoksiholat <sup>123</sup>. Prednosti BMC su ponovljivost i ekonomičnost. Ova metoda je pogodna jer pruža i široku mogućnost odabira različitih stacionarnih faza, kao i koncentraciju i vrstu surfaktanta koji se dodaju u zavisnosti od eksperimenta <sup>114</sup>.

Imobilisane veštačke membrane (IAMs, *immobilized arteficial membranes*) pripremaju se od analoga fosfatidilholina kovalentno vezanih za inertnu siliku, koji predstavljaju stacionarnu fazu HPLC sistema, čija je uloga da oponaša ćelijsku membranu. Koriste se za predviđanje transporta kroz krvno-moždanu barijeru, intestinalnu apsorpciju i transport kroz kožu <sup>124</sup>. IAM omogućava analizu i naelektrisanih analita s obzirom na to da sadrži polarne i nepolarne delove. U studiji u kojoj je vršeno ispitivanje permeabilnosti fenola kroz krvno-moždanu barijeru obe metode, IAM i BMC, su se pokazale efikasnim <sup>115</sup>.



Slika 14. Raspodela jedinjenja u BMC sistemu

### 1.6.2. PAMPA test

PAMPA test (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama) se koristi za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz veštačku membranu koja simulira odgovarajuću fiziološku membranu. Ovaj test se koristi za procenu transporta jedinjenja pasivnom difuzijom, dok aktivni transport nije moguće simulirati. Ovo ograničenje testa ne predstavlja ozbiljan problem, s obzirom da se oko 95 % poznatih lekova apsorbuje pasivnom difuzijom. Čelijska linija Caco-2 (humanog kolorektalnog kancera) je široko zastupljena u testovima permeabilnosti kao model crevnog epitela međutim, sve je više u upotrebi PAMPA test koji predstavlja ekonomičniju alternativu za rani ADME skrining jedinjenja <sup>125</sup>.

PAMPA test se prvi put spominje 1998. godine u publikaciji <sup>126</sup> gde je opisano da se sistem sastoji od ploče sa 96 polja koja su obložena hidrofobnim filter materijalom impregniranim pogodnim rastvorom (npr. 1 – 20 % lecitin u dodekanu), pri čemu se formira veštačka membrana. Veštačka membrana razdvaja donorske i akceptorske ćelije (odeljke), i na ovaj način se formira PAMPA „sendvič“ (**Slika 15**). U donorskim ćelijama su rastvori ispitivanih jedinjenja koji su uglavnom u puferu pH 5,5, dok akceptorske ćelije sadrže samo rastvarač čiji je pH podešen na 7,4. Difuzija ispitivanih jedinjenja kroz veštačku membranu se odvija u pravcu gradijenta koncentracije (iz donorskih u akceptorske ćelije) <sup>126</sup>.

PAMPA se može koristiti za simulaciju transporta ispitivanih jedinjenja kroz različite membrane u organizmu (transport na nivou gastrointestinalnog trakta, kože i krvno-moždane barijere) <sup>127-129</sup>. Svaki PAMPA „sendvič“ se sastoji od lipofilne barijere (veštačka membrana) koja razdvaja dve vodene ćelije (donorsku i akceptorsku), i ukoliko su donorske ćelije sa rastvorom ispitivanog jedinjenja iznad, difuzija se odvija u smeru delovanja sile Zemljine teže. Raspored donorskih i akceptorskih ćelija može biti i obrnut u zavisnosti od dizajna eksperimenta. Za formiranje veštačke membrane se može koristiti hidrofobni ili hidrofilni tip filtera uz različite kombinacije lipida i organskih rastvarača. U velikoj meri je zastupljena upotreba lecitina jajeta (fosfatidilholina) rastvorenog u dodekanu, koji simulira prisustvo lipida u membranama. Inertni rastvarač heksadekan se takođe pokazao kao dobar izbor za simulaciju membrane GIT <sup>125</sup>. Fosfolipidi se najčešće koriste za simulaciju transporta na nivou gastrointestinalnog trakta (npr. lecitin/dodekan) i rožnjače (npr. fosfatidilholin/dodekan:heksan:hloroform), a smeše fosfolipida su se pokazale kao dobra opcija za oponašanje krvno-moždane-barijere (npr. fosfatidilholin/fosfatidilserin/dodekan) <sup>130</sup>. Rađene su brojne studije u kojima su vršene modifikacije testa u smislu promene organskih rastvarača, kako bi se ispitaio uticaj na permeabilnost ispitivanih jedinjenja. U jednoj studiji je pokazano da se upotrebom alkildiena kratkih lanaca povećava permeabilnost jedinjenja u odnosu na 1,9-dekadien <sup>131</sup>. Upotreba hidrofobnih membrana usporava transport jedinjenja, sam eksperiment može jako dugo trajati, a u slučaju hidrofilnih i jedinjenja koja jonizuju se mogu javiti i lažno negativni rezultati. Shodno tome, rađene su i studije sa hidrofilnim filtracionim membranama i rezultati su bili zadovoljavajući <sup>132</sup>. DS-PAMPA (*Double-Sink PAMPA*) predstavlja isplativiju verziju PAMPA eksperimenta u odnosu na tradicionalni PAMPA test za simulaciju gastrointestinalne apsorpcije.

Kod DS-PAMPA testa postoji gradijent između donorskih i akceptorskih ćelija. Uglavnom je u donorskim ćelijama pH orijentaciono od 3 do 10, dok su akceptorske ćelije pH 7,4. DS-PAMPA ima prednost što je vreme inkubacije dosta kraće i omogućeno je određivanje permeabilnosti i slabo permeabilnih jedinjenja. Primenuju se i surfaktanti koji imaju ulogu u transportu lipofilnih jedinjenja <sup>125</sup>. Neki od surfaktanata koji se koriste su Tween 80 i Brij 35 <sup>133</sup>. Kako se ceramidi prirodno nalaze u ćelijskim membranama, ispitivana je i uloga ceramida u PAMPA testu. Došlo se do zaključka da se dodatkom ceramida povećava preciznost predviđanja transporta PAMPA testom jer pomažu u simulaciji crevne membrane <sup>134</sup>.



**Slika 15.** PAMPA „sendvič” <sup>130</sup>

## 1.7. Biološka ispitivanja novih jedinjenja, dualnih inhibitora COX-2 i 5-LOX enzima

### 1.7.1. In vitro enzimski testovi za procenu inhibicije COX-1, COX-2 i 5-LOX enzima

*In vitro* enzimski testovi predstavljaju jednostavne, brze i pouzdane testove pogodne za visokopropusni skrining inhibitora. U sklopu enzimskog eseja se nalazi odgovarajući enzim, supstrat i ostale neophodne komponente, a test se izvodi prema protokolu proizvođača. Prati se nastanak odgovarajućih intermedijera, proizvoda koji nastaju iz supstrata pod dejstvom enzima. Komercijalno dostupni enzimski testovi na različite načine vrše detekciju proizvoda enzimske reakcije, te se mogu podeliti na fluorimetrijske i kolorimetrijske.

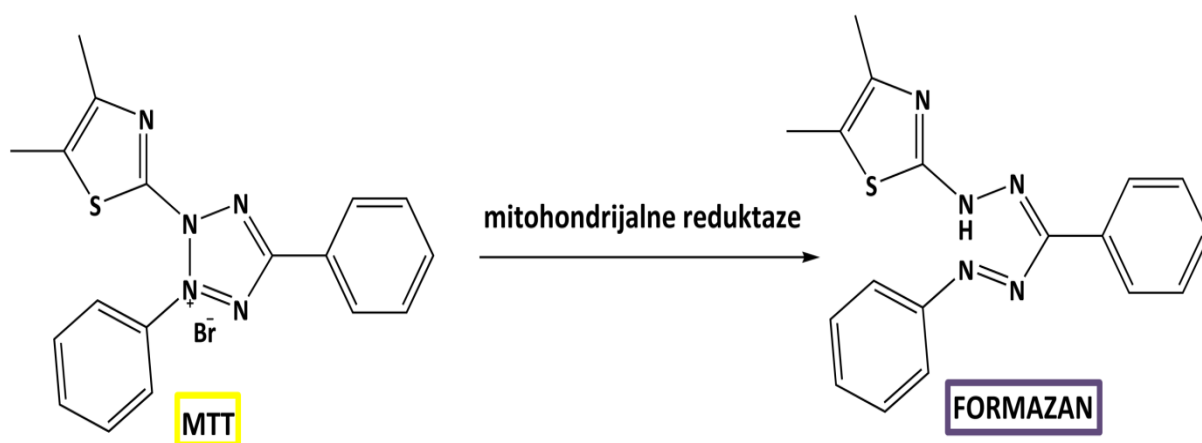
Fluorimetrijski komercijalno dostupni COX-1, COX-2 i 5-LOX *in vitro* enzimski testovi su jednostavni, brzi za izvođenje i pouzdani. Procedura za izvođenje ovih testova je jednostavnija od procedure za komercijalno dostupne kolorimetrijske enzimske testove.

COX-1 i COX-2 fluorimetrijski inhibitorni skrining eseji se zasnivaju na fluorimetrijskoj detekciji prostaglandina G<sub>2</sub> koji nastaje kao intermedijerni proizvod iz arahidonske kiseline pod dejstvom COX enzima. U prisustvu COX inhibitora dolazi do smanjenja produkcije PGG<sub>2</sub>. Meri se fluorescencija i prema odgovarajućim formulama izračunava procenat relativne inhibicije enzima.

5-LOX fluorimetrijski inhibitorni skrining esej se zasniva na fluorimetrijskoj detekciji intermedijera koji nastaju iz arahidonske kiseline pod dejstvom 5-LOX enzima. U prisustvu 5-LOX inhibitora dolazi do smanjenja produkcije intermedijera. Meri se fluorescencija i prema odgovarajućim formulama izračunava procenat relativne inhibicije enzima.

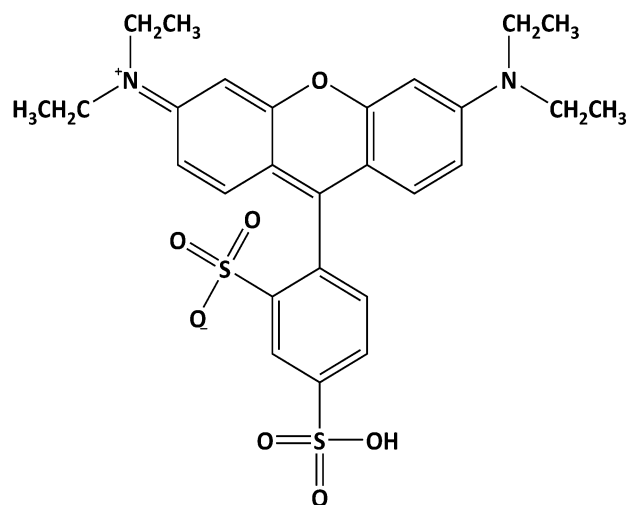
### 1.7.2. Testovi za ispitivanje ćelijske vijabilnosti (MTT i SRB test)

Citotoksičnost novosintetisanih jedinjenja se može odrediti MTT testom koji se zasniva na ispitivanju vijabilnosti ćelija. Koristi se žuti MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum-bromid). Kod živih ćelija MTT reagens prolazi kako kroz ćelijsku, tako i kroz mitohondrijalnu membranu, gde se redukuje do ljubičastog formazana posredstvom enzima oksidoreduktaza i dehidrogenaza (**Slika 16**). Kako je formazan nerastvoran u vodi, dodaju se reagensi koji poboljšavaju rastvorljivost i očitava se apsorbancija na oko 570 nm<sup>135</sup>.



**Slika 16.** MTT test

Sulforodamin B (SRB) test predstavlja jedan od najčešće korišćenih *in vitro* testova za ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja koji se zasniva na osobini SRB da vezuje proteinske komponente ćelije. SRB (**Slika 17**) predstavlja fluorescentnu svetlo roze boju koja u strukturi poseduje dve sulfonske grupe koje se vezuju za bazne aminokiselinske ostatke u slabo kiselj sredini, dok u baznoj sredini dolazi do njihove disocijacije. Količina boje je direktno proporcionalna ćelijskoj masi. Za razliku od MTT testa, ovaj test ne pravi razliku između mrtvih i živih ćelija. Međutim, ova razlika u testovima ne utiče na pouzdanost SRB testa u ispitivanju citotoksičnosti. Kako je SRB test nezavisan od ćelijskog metabolizma, zahteva manje optimizacije uslova u odnosu na MTT test <sup>136</sup>.



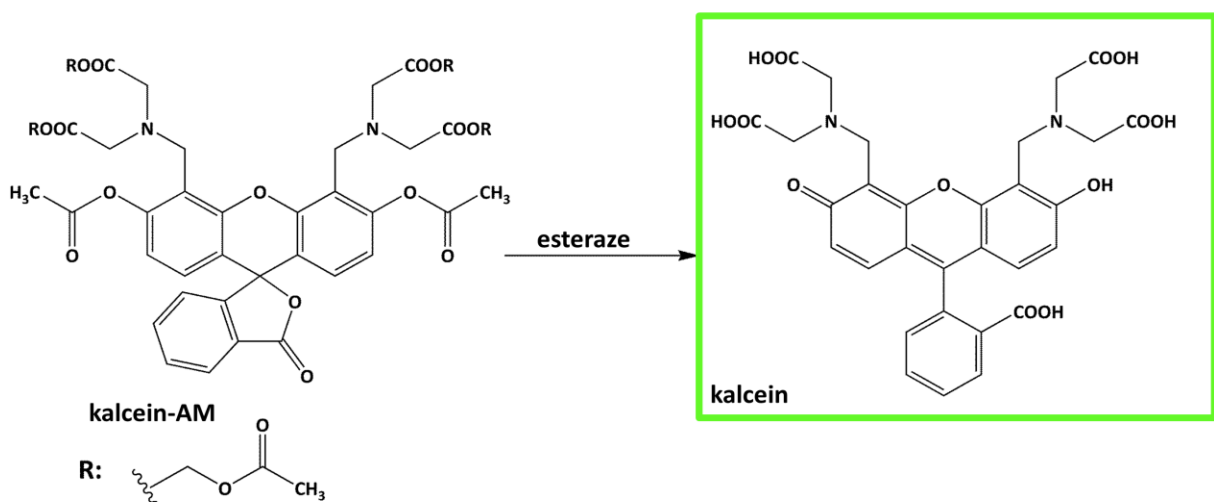
**Slika 17.** Struktura boje sulforodamin B

### 1.7.3. Ispitivanje inhibicije migracije ćelija

Uticaj testiranih jedinjenja na inhibiciju migracije metastatske kancerske linije može se ispitati testom zarastanja rana (*Wound healing assay*). Ovaj test je jednostavan, ekonomičan, a povreda (rana) se najčešće pravi fizičkim putem (npr. sterilnim nastavkom) u ćelijskom monosloju. Povreda se može praviti još i termičkim ili hemijskim putem. Sposobnost migracije ćelija ispoljavaju epitelni/endotelni monoslojevi koji se kreću u dve dimenzije, pri čemu se zadržavaju međućelijske veze. Migracija se pokreće izlaganjem monosloja slobodnom prostoru, tj. formiranjem povrede, a značajna informacija koja proizilazi iz ovog testa je brzina zarastanja povrede. Migracija ćelija nakon povrede se prati u odgovarajućim intervalima i snima. Kako bi se izvršila procena da li testirana jedinjenja ispoljavaju antimigratorni efekat, nanose se na ćelijski monosloj i prati se zarastanje povrede u odnosu na kontrolu (povreda bez tretmana ispitivanim jedinjenjima) u određenim intervalima <sup>137, 138</sup>.

#### 1.7.3.1. Kalcein-AM test i propidijum-jodid ćelijsko bojenje

Kalcein-AM je lipofilna boja bez fluorescencije koja lako prolazi kroz membrane živih ćelija. Pomoću enzima esteraza prisutnih u ćelijama, dolazi do hidrolize kalcein-AM boje, pri čemu nastaje kalcein koji je hidrofilan i zeleno fluorescentan (**Slika 18**). Fluorescencija koja potiče od kalceina ukazuje na broj živih ćelija <sup>139, 140</sup>. Dok se kalcein-AM boja koristi za detekciju živih ćelija, propidijum-jodid (PI) se koristi za detekciju mrtvih ćelija. PI je fluorescentno jedinjenje koje ne može pasivno proći kroz neoštećene membrane, već samo kroz membrane koje su postale propusne, bez obzira na mehanizam smrti ćelija. Zbog ove osobine je koristan za dodatno pravljenje razlike između živih i mrtvih ćelija s obzirom na to da dolazi do bojenja samo mrtvih ćelija <sup>141</sup>.



**Slika 18.** Hidroliza kalcein-AM boje do fluorescentno zelenog kalceina u živim ćelijama

## **2. CILJ RADA**

## **1. Dizajn potencijalnih dualnih inhibitora enzima COX-2 i 5-LOX**

- SAR analiza dualnih inhibitora COX-2 i 5-LOX koji su preuzeti iz literature;
- 3D-QSAR studija i molekularni doking.

## **2. Sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija dizajniranih jedinjenja**

- Jedinjenja dizajnirana modifikacijom postojećih NSAIL;
- Analizi butilhidroksitoluena (amidi 3,5-di-terc-butil-4-hidroksibenzojeve kiseline i imini 3,5-di-terc-butil-4-hidroksibenzaldehida);
- Analizi uree
- Jedinjenja dizajnirana na osnovu 3D-QSAR i molekularnog dokinga.

## **3. *In vitro* ispitivanje COX-1, COX-2 i 5-LOX inhibitorne aktivnosti sintetisanih jedinjenja primenom komercijalno dostupnih enzimskih kitova.**

## **4. Ispitivanje i poređenje redoks potencijala sintetisanih jedinjenja u biološkom materijalu – serumskom pulu zdravih ispitanika u nativnim uslovima, kao i u uslovima *in vitro* indukovano oksidativnog stresa.**

## **5. Procena lipofilnosti sintetisanih jedinjenja**

- Razvoj alternativne RP-HPLC metode za procenu lipofilnosti.

## **6. Procena gastrointestinalne apsorpcije primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i PAMPA testa.**

## **7. Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja na odabranim ćelijskim linijama i njihov efekat u kombinaciji sa zračenjem**

- Ispitivanje citotoksičnosti na dve ćelijske linije kancera kolona (HCT 116 i HT-29), jednoj ćelijskoj liniji kancera pankreasa (BxPC-3) i jednoj zdravoj ćelijskoj liniji normalnih humanih fibroblasta (MRC-5);
- Ispitivanje osetljivosti ćelija na zračenje i kombinaciju zračenja i odabranih jedinjenja.

## **8. Ispitivanje antimigratornog potencijala odabranih jedinjenja primenom testa zarastanja rana**

### **3. EKSPERIMENTALNI DEO**

### 3.1. Opšti podaci

#### 3.1.1. Softver

- *Marvin Sketch* 6.1.0 (ChemAxon, Budapest, Mađarska, 2013)
- *Chem3D Ultra* 7 (CambridgeSoft Corporation 2013, Cambridge, MA, SAD)
- *Pentacle* 1.07 (Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italija 2013)
- *GOLD Software* 5.6.0 (The Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, Velika Britanija)
- *ADMET Predictor™* 9.5.0.16 (Simulation Plus, Inc., Lancaster, CA, SAD)
- *SPSS* 18.0 (SPSS, INC. Chicago, IL, SAD)
- *ImageJ software* v. 1.52p (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD)
- *CellReporterXpress®* v. 2.8.2.669 (Molecular Devices®, San Jose, CA, SAD)
- *GraphPad Prism* v. 8.0.2 (San Diego, CA, SAD)

#### 3.1.2. Prekursori u sintezi, reagensi i rastvarači

- Indometacin (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Flurbiprofen (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Diklofenak (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Benzen (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Trietilamin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Difenilfosforilazid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Hidroksilamin-hidrohlorid (VWR Chemicals BDH, VWR International - Radnor, PA, SAD)
- 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzoeva kiselina (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- *N,N*-dimetilformamid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Metil ester glicina, hidrohlorid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Metil ester L-histidina, dihidrohlorid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Alilamin (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Hidroksibenzotriazol (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- *o*-fenitidin (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 4-nitrofenil-izocijanat (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Dihlormetan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Dimetilkarbamoil-hlorid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- *O*-etilhidroksilamin-hidrohlorid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Natrijum-karbonat (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Tetrahidrofuran (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- 2-sulfobenzoeva kiselina, ciklični anhidrid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Antranilna kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija)

- Metanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Amonijak, 2M rastvor u metanolu (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Tionil-hlorid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Natrijum-hidrogenkarbonat (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Etanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- 1,4-benzodioksan-6-sulfonilhlorid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- 4-bifenilsulfonska kiselina (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- 4'-metoksibifenil-4-sulfonilhlorid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- 4'-izobutilacetofenon (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 2-acetil-6-metoksinaftalen (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Piridin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Boran-piridin kompleks (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Acetil-hlorid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzaldehid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- 3-aminorodanin (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Natrijum-acetat (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Sirćetna kiselina (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Magnezijum-sulfat (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Natrijum-hidroksid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Hlorovodonična kiselina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Litijum-hidroksid (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- 1-propanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Cikloheksan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Etilacetat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Hloroform (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Dimetilsulfoksid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Acetonitril, HPLC čistoće (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Metanol, HPLC čistoće (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Dinatrijum-fosfat, anhidrovani (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Fosforna kiselina (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Dejonizovana voda
- Natrijum-dihidrogenkarbonat, monohidrat (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- 60 % lecitin jajeta (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Dodekan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Heksadekan (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Heksan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- 5 % CO<sub>2</sub> (Heraeus, Hanau, Nemačka)
- Kalcein-AM (Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija)
- Propidijum-jodid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemačka)

### 3.1.3. Biološki testovi

#### 3.1.3.1. Enzimski in vitro eseji

- COX-1 (kataloški broj: ab204698, Abcam, Velika Britanija)
- COX-2 (kataloški broj: ab283401, Abcam, Velika Britanija)
- 5-LOX (kataloški broj: MBS846911, MyBioSource, San Diego, CA, SAD)

#### 3.1.3.2. Čelijske linije i medijumi

- Čelijska linija humanog kancera kolona HT-29 (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- Čelijska linija humanog kolorektalnog kancera HCT116 (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- Čelijska linija humanog kancera pankreasa BxPC-3 (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- Čelijska linija normalnih humanih fibroblasta MRC-5 (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- Čelijska linija humanog kolorektalnog kancera SW620 (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- *McCoy's 5A Medium* (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- *RPMI-1640 Medium* (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, SAD)
- SRB, sulforodamin B (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka)
- MTT (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka)

#### 3.1.4. Oprema

- *AS 220.R2.PLUS* analitička vaga (Radwag, Bydgoszcz, Poljska)
- *Rotamix* SHP-10 magnetna mešalica (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- *ROTAVAPOR-R* vakuum uparivač (BUCHI, Flawil, Švajcarska)
- *TKA GenPure* sistem za prečišćavanje vode (Niederelbert, Nemačka)
- *PHM240 pH/Ion meter* (Radiometer analytical, Villeurbanne, Francuska)
- *Kieselgel 60 GF<sub>254</sub>* TLC ploče (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Hidrofobna *Millipore PVDF* ploča (Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, SAD)
- Polikarbonantna ploča (Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, SAD)
- *MSSACCEPTOR Multiscreen* ploča sa 96 bunarića, Millipore Sigma (Burlington, Massachusetts, SAD)
- Posuda T25 za čelijsku kulturu (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Nemačka)

- *Agilent 1200* HPLC hromatograf (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- *Dionex Ultimate 3000* hromatograf (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- *Thermo Nicolet iS10* FT-IR spektrofotometar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- *Bruker Ascend 400* (400 MHz) spektrometar (Bruker, Billerica, Massachusetts, SAD)
- *TSQ Quantum Access MAX triple quadrupole* maseni spektrometar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- *Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL* maseni spektrometar visoke rezolucije (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- *Boetius PHMK 05* aparat za određivanje temperature topljenja (VEB Wagetechnik, Rapido, Radebeul, Nemačka)
- *UV-Cabinet II* lampa (Camag, Muttenz, Švajcarska)
- *BioTek Sinergy LX multi-mode* čitač (Winooski, VT, SAD)
- *SPECTROstar Nano Microplate Reader* (BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka)
- *Wallac, VICTOR2 1420 Multilabel counter* čitač (PerkinElmer, Turku, Finska)
- *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System* (Molecular Devices®, San Jose, CA, SAD)
- *Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical* 4,6 × 150 mm; 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- *Zorbax SB-CN Rapid Resolution* 4,6 mm × 150 mm; 3,5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- *Zorbax NH<sub>2</sub> Analytical* 4,6 × 150 mm; 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- *ZORBAX Extend-C18 Analytical* 4,6 × 150 mm; 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- *Acclaim™ HILIC-10 120 Å* 4,6 x 150 mm; 3 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

## 3.2. 3D-QSAR studija

### 3.2.1. Priprema seta jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje

Set od 28 jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje je dobijen izdvajanjem jedinjenja iz literaturnih izvora, dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora, prikupljenih iz literature <sup>142, 143, 144, 145, 146</sup> (Tabela P1, Prilozi). Jedinjenja koja ulaze u set za 3D-QSAR modelovanje su odabrana tako da je njihova COX-2 i 5-LOX inhibitorna aktivnost ispitana upotrebom istih enzimskih eseja, humanog rekombinantnog COX-2 i krompirovog 5-LOX enzimskog eseja. Aktivnost ovih jedinjenja je izražena kao IC<sub>50</sub> vrednost, a u cilju predstavljanja Y promenljive (zavisna promenljiva) izračunat je negativni logaritam IC<sub>50</sub> vrednosti tj. pIC<sub>50</sub> vrednost. Preporučljivo je da aktivnosti odabranih jedinjenja budu u rasponu od minimum 3 log jedinice <sup>97</sup>. Opseg pIC<sub>50</sub> vrednosti bio je u rasponu od 4,402 do 7,155 kada je u pitanju COX-2 inhibitorna aktivnost i od 4,101 do 6,699 u slučaju 5-LOX inhibitorne aktivnosti. Program Marvin Sketch 6.1.0 je korišćen za odabir dominantne forme jedinjenja na fiziološkoj pH vrednosti (pH 7,4). Sva jedinjenja (dominantne forme na pH 7,4) su prethodno optimizovana semiempirijskom/PM3 (*Parameterized Model Revision 3*) metodom <sup>147, 148</sup>, a zatim dodatno optimizovana korišćenjem kvantno-mehaničke Hartree-Fock/3-21 G metode <sup>149</sup> za minimizaciju energije. Optimizacije su izvršene upotrebom *Gaussian* softvera implementiranog u okviru programa Chem3D Ultra 7 <sup>150</sup>.

### 3.2.2. Razvoj 3D-QSAR modela

Odabrani set jedinjenja za razvoj COX-2 i 5-LOX 3D-QSAR modela podeljen je na trening (21 jedinjenje – za razvoj modela) i test set (7 jedinjenja – za eksternu validaciju). Podela na trening i test set je izvršena nasumičnim odabirom, vodeći računa o homogenosti distribucije strukturnih karakteristika i aktivnosti jedinjenja unutar test i trening seta. Bitno je obezbediti da test i trening set, svaki pojedinačno, obuhvataju ceo prostor deskriptora koji je definisan ukupnim setom jedinjenja <sup>151, 99</sup>. Za podelu na test i trening set korišćena je PCA analiza <sup>98</sup>, pomoću koje su jedinjenja klasterovana na osnovu sličnosti unutar deskriptorskog prostora. U okviru svakog klastera izvršena je podela jedinjenja na test i trening set vodeći računa o homogenosti distribucije aktivnosti u oba seta podataka. Odnos trening : test set jedinjenja je bio 75 : 25, što je u skladu sa literaturnim preporukama <sup>99</sup>. COX-2 i 5-LOX 3D-QSAR modeli su razvijeni u programu Pentacle 1.07 <sup>93</sup>. Ovaj softver, za razliku od ostalih tradicionalnih metoda, izračunava GRIND deskriptore koji su nezavisni od poravnanja molekula koje je vremenski zahtevno i može imati bitan uticaj na kvalitet formiranog modela <sup>98, 152</sup>. Rastojanje između mrežnih tačaka se podešava na 0,5 Å. Optimizacioni algoritam ALMOND se koristi u narednom koraku kako bi se izdvojili najrelevantniji regioni iz svakog polja koji predstavljaju energetske najpovoljnije interakcije između probe i liganda (*nodes* - čvorni regioni) <sup>92</sup>. Izdvajanje se zasniva na intenzitetu polja u čvornom regionu, kao i međusobnom rastojanju između odabranih čvorova. Broj čvorova za izdvajanje je podešen na 100, što je najčešće korišćeno i pokazano kao optimalna

opcija. Upotrebom CLACC algoritma vrši se prevođenje informacija iz MIF-ova (*VRS – virtual receptor site*) u GRIND deskriptore<sup>94</sup>, a izvršena je auto korelacija (između istih proba) i unakrsna korelacija (između različitih proba) pri čemu je *smoothing window* podešen na 0,8. Konačni rezultati su prikazani u obliku korelograma koji predstavljaju čvorne parove istih (npr. O-O) ili različitih (npr. O-TIP) proba, kao i raspodelu deskriptora u zavisnosti od njihove udaljenosti. GRIND deskriptori se dalje koriste u pojedinim hemometrijskim analizama kao što su PCA i PLS. Frakcioni faktorski dizajn se dalje koristi za odabir varijabli pri čemu se poboljšava kvalitet modela. Kreirani su modeli sa smanjenim brojem deskriptora i izračunati su parametri modela. Dalje analize su vršene pomoću PLS regresione metode (analizira se odnos između odabranih varijabli i Y varijable - pIC<sub>50</sub> vrednosti inhibicije).

### 3.2.3. Validacija kreiranih 3D-QSAR modela

U cilju procene kvaliteta (pouzdanosti i prediktivnosti) razvijenih 3D-QSAR modela izvršena je interna i eksterna validacija.

Izračunati su sledeći parametri interne validacije:  $R^2$  (koeficijent determinacije),  $Q^2_{L00}$  (kvadrat koeficijenta korelacije dobijen *leave-one-out* metodom) i **RMSEE** (greška predviđanja trening set modela). Navedeni parametri su izračunati korišćenjem jednačina (1) - (4) (poglavlje 1.4.1.3). Smatra se da dobijena vrednost  $Q^2_{L00}$  veća od 0,5 ukazuje na to da razvijeni 3D-QSAR model ima dobru prediktivnu sposobnost, međutim visoka vrednost  $Q^2$ , iako je neophodna, nije dovoljan uslov.

Eksterna validacija je izvršena u cilju procene stvarne moći predviđanja razvijenog modela, a test set jedinjenja su korišćena za izračunavanje parametara. Parametri  $R^2_{pred}$  (koeficijent korelacije za test set) i **RMSEP** (srednja kvadratna greška predviđanja) su izračunati korišćenjem jednačina (5) i (6) (poglavlje 1.4.1.3). Dobijena vrednost  $R^2_{pred}$  veća od 0,6 ukazuje na visoku stvarnu prediktivnu sposobnost razvijenog modela.

U cilju što preciznije procene moći predviđanja razvijenog 3D-QSAR modela, uvedena je još jedna metoda eksterne validacije – r metrika ( $r^2_{m(test)}$ ). Za izračunate parametre  $\overline{r^2_m}$  i  $\Delta r^2_m$  (jednačine (7) i (8), poglavlje 1.4.1.3) treba da se dobiju vrednosti veće od 0,5, odnosno manje od 0,2.

### 3.2.4. Domen primenljivosti 3D-QSAR modela

U cilju što pouzdanijeg predviđanja aktivnosti novodizajniranih jedinjenja, uveden je zahtev za definisanjem domena primenljivosti (AD – *applicability domain*) prema principu 3, koji je deo radnog programa OECD <sup>153</sup>. AD se definiše kao odgovor i teorijski region unutar hemijskog prostora koji se koristi za procenu pouzdanosti u predviđanju aktivnosti novodizajniranih jedinjenja na osnovu sličnosti sa jedinjenjima trening seta <sup>153</sup>. Predviđanje aktivnosti novodizajniranih jedinjenja se može smatrati pouzdanim samo ukoliko je ispitivano jedinjenje unutar definisanog AD za razvijeni model. U ovoj studiji je korišćen *leverage* pristup za definisanje AD razvijenih QSAR modela. Upotrebom *leverage* pristupa je moguće proveriti da li se novodizajnirano jedinjenje nalazi unutar ili izvan AD. Kritični prag ( $h^*$ ) se izračunava na osnovu jednačine (11) (poglavlje 1.4.1.4). Smatra se da je predviđanje nepouzđano ako jedinjenje ima visoku *leverage* vrednost –  $h$  ( $h > h^*$ ) <sup>99</sup>.

### 3.3. Molekulski doking

Program GOLD v.5.7 <sup>154</sup> je korišćen za predviđanje predviđanje bioaktivnih konformacija već objavljenih <sup>142</sup> i novodizajniranih dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora unutar aktivnih mesta COX-1, COX-2 i 5-LOX enzima. GOLD softver se zasniva na genetskom algoritmu (GA, *Genetic Algorithm*) koji generiše vezujuće poze fleksibilnih liganada unutar aktivnog mesta ciljnog proteina. GA optimizuje funkciju vrednovanja kroz generisanje velikog broja različitih poza jedinjenja. Oslanja se na evolucioni princip na osnovu kog se vrši pozitivna selekcija onih poza koje su najbolje rangirane primenom odabrane funkcije vrednovanja. Nakon jednog ciklusa optimizacije, odabrane poze ulaze u naredne cikluse optimizacije do dobijanja optimalnog rešenja. Funkcije vrednovanja ASP (*Astex Statistical Potential*) i CHEMPLP (*Piecewise Linear Potential*) su odabrane za predviđanje i evaluaciju poza. ASP se preporučuje kada su prisutne interakcije metal-ligand i ova funkcija vrednovanja je korišćena za doking na 5-LOX enzimu <sup>155</sup>. CHEMPLP je korišćena za doking na COX-1 i COX-2 izoenzimima <sup>156</sup>. Kristalne strukture enzima su preuzete sa internet stranice PDB (*Protein Data Bank*) (<https://www.rcsb.org>): 5WBE (za COX-1), 1CX2 (za COX-2) i 3O8Y (za 5-LOX). Za kristalne strukture enzima COX-1, COX-2 i 5-LOX određena su protonovana stanja na fiziološkom pH (7,4) upotrebom *online* servera *Play Molecule* (<https://www.playmolecule.com/>). Za podešavanje COX-1 i COX-2 doking protokola je korišćen *gold chemscore kinase* kao šablon. Vezivno mesto kod COX-1 enzima je definisano oko ko-kristalnog liganda celekoksiba i mofezolaka. Radijus vezivnog mesta je podešen na 8 Å. Pokretljivost bočnih lanaca aminokiselina Arg120, Tyr355 i Ser530 je postavljena na fleksibilnu opciju (pomoću inkorporirane *Lovell rotamer* biblioteke) <sup>155</sup>. Vezivno mesto u slučaju COX-2 enzima je definisano oko ko-kristalnog liganda SC-558. Radijus vezivnog mesta je podešen na 8 Å. Podešavanja GA su u oba slučaja bila sledeća: 200% efikasnost pretrage, podešavanje liganda 30 GA runs, a CHEMPLP je odabran kao funkcija vrednovanja. Kristalna struktura 5-LOX enzima je pripremljena upotrebom *ProteinPrepare* modula u okviru *online* servera *Play Molecule*, a kako su

aminokiselinske rezidue protonovane na fiziološkom pH, veze između metalnog jona ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i aminokiselinskih rezidua koje koordiniraju  $\text{Fe}^{2+}$  bivaju uklonjene (His367, His372, His550 i Ile673). Vezivno mesto za doking eksperiment je definisano u okolini  $\text{Fe}^{2+}$  sa opsegom rastojanja 10 Å. Za rangiranje jedinjenja je korišćena ASP (*Astex Statistical Potential*) funkcija vrednovanja. Prvi korak u studiji molekuskog dokinga se sastojao iz ispitivanja načina vezivanja i doking poza prethodno objavljenih dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora sličnih farmakofornih karakteristika <sup>142</sup>. Ova jedinjenja su uključena u studiju molekuskog dokinga kako bi se uspostavila dobra korelacija između eksperimentalno dobijenih 5-LOX inhibitornih profila ( $\text{IC}_{50}$  vrednosti) i izračunatih vrednosti (skorova) funkcija vrednovanja (ASP vrednosti). Poznata aktivna i neaktivna jedinjenja (Tabela P2, Prilozi) su uključena u doking da bi se ispitali načini vezivanja aktivnih jedinjenja i procenilo da li se ponašaju kao helatori gvožđa aktivnog centra 5-LOX enzima.

### 3.4. ADMET predviđanja

ADMET Predictor™ 9.5.0.16 softver je korišćen za predviđanje odabranih ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost) i fizičko-hemijskih osobina odabranog seta jedinjenja i novodizajniranih jedinjenja. Pomoću ovog softvera moguće je predvideti više različitih parametara, kao što su konstanta jonizacije (pKa), difuzivnost, particioni koeficijent, permeabilnost, rastvorljivost u vodi, farmakokinetički volumen distribucije, pravilo 5, intrinzički klirens usled metabolizma posredovanog CYP 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 i 3A4 enzimima kod ljudi, supstrati za humane enzime CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 i 3A4, kvalitativni i kvantitativni modeli toksičnosti i uopšteni ADMET filter rizika <sup>157</sup>.

### 3.5. Sinteza jedinjenja 1-19

#### 3.5.1. Sinteza jedinjenja 1-3

Indometacin, flurbiprofen i diklofenak (0,84 mmol, 1 ekvivalent) se rastvaraju u benzenu (5 mL). U rastvor se potom dodaju trietilamin (TEA) (0,84 mmol, 1 ekvivalent) i difenilfosforilazid (DPPA) (0,84 mmol, 1 ekvivalent). Smeša se zagreva 1 h na 90 °C uz mešanje, nakon čega se dodaju rastvori hidroksilamin-hidrohlorida (1,68 mmol, 2 ekvivalenta) i trietilamina (1,68 mmol, 2 ekvivalenta) u vodi (0,3 ml). Reakciona smeša se ostavlja 18 h na temperaturi od 90 °C uz mešanje. Smeša se potom ohladi do sobne temperature, a proizvod se dalje prečišćava upotrebom preparativne hromatografije na tankom sloju (TLC), korišćenjem mobilne faze dihlormetan (DCM)-metanol (MeOH) 9,5:0,5 v/v (**1, 2**) ili 9:1 v/v (**3**).

#### 3.5.2. Sinteza jedinjenja 4-7

Polazno jedinjenje, 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzoeva kiselina (0,42 mmol, 1 ekvivalent) i odgovarajuća aminokiselina (L-histidin metil estar dihidrohlorid za jedinjenje **4**; glicin metil estar za jedinjenje **5**), alilamin (za jedinjenje **6**) ili propargilamin (za jedinjenje **7**) (0,5 mmol, 1,2 ekvivalent) se rastvaraju u dimetilformamidu (DMF, 6 mL) na sobnoj temperaturi. Potom se dodaju 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC, 0,63 mmol, 1,5 ekvivalent), hidroksibenzotriazol (HOBt, 0,63 mmol, 1,5 ekvivalent) i TEA (0,84 mmol, 2 ekvivalenta). Reakciona smeša se meša preko noći na sobnoj temperaturi i proizvod se dalje prečišćava preparativnom TLC koristeći mobilne faze dihlormetan-metanol 9,5:0,5 v/v (**4, 6**), 9:1 v/v (**4, 7**) i 20:0,5 v/v (**5**).

#### 3.5.3. Sinteza jedinjenja 8 i 9

Polazna jedinjenja, 2-etoksianilin (*o*-fenetidin) (za sintezu jedinjenja **8**) ili antranilna kiselina (za sintezu jedinjenja **9**) (7,66 mmol, 1 ekvivalent) rastvorena su u 15 mL dihlormetana. Ovako dobijeni rastvor je potom ohlađen na 0 °C. U ohlađenu smešu su dodati TEA (7,66 mmol, 1 ekvivalent) i dimetilkarbamoil-hlorid (9,19 mmol, 1,2 ekvivalenta). Reakciona smeša se ostavlja preko noći na sobnoj temperaturi uz mešanje, nakon čega se prečišćava preparativnom TLC, korišćenjem mobilnih faza cikloheksan-etilacetat 6:3 v/v (jedinjenje **8**) ili cikloheksan-etilacetat 1:1 v/v, a zatim hloroform-metanol 9:1 v/v (jedinjenje **9**).

#### 3.5.4. Sinteza jedinjenja 10

U rastvor 2-etoksianilina (0,73 mmol, 1 ekvivalent) u dimetilformamidu (1 mL), dodat je 4-nitrofenilizocijanat (1,46 mmol, 2 ekvivalenta) na 0 °C. Reakciona smeša je mešana preko noći na sobnoj temperaturi. Dobijeni proizvod je prečišćen preparativnom TLC korišćenjem mobilne faze hloroform:metanol 99:1 v/v.

### 3.5.5. Sinteza jedinjenja 11-12

Polazno jedinjenje 4'-izobutilacetofenon (za sintezu jedinjenja **11**) ili 2-acetil-6-metoksinaftalen (za sintezu jedinjenja **12**) (17 mmol, 1 ekvivalent) i hidroksilamin-hidrohlorid (35 mmol, 2,06 ekvivalenata) rastvoreni su u smeši etanola (25 mL) i piridina (25 mL). Reakciona smeša se zagreva na 50 °C tokom 2 h. Rastvarač je uparen na uparivaču sa vakuum pumpom, a ostatak nakon uparavanja se rastvara u etru i ispira sa 2M HCl (50 mL). Dobijeni rastvor se potom suši upotrebom MgSO<sub>4</sub> i uparava, pri čemu se izoluje jedinjenje B. Dobijeni oksim (jedinjenje B) (5 mmol, 1 ekvivalent) se rastvara u etanolu (10 mL). Rastvor se hladi na 0 °C, nakon čega se dodaje boran-piridin kompleks (15 mmol, 3 ekvivalenta) putem šprica pod azotom, a 10 minuta kasnije i 6M rastvor HCl (5 mL). Nakon 30 minuta se reakcija završava, a pH vrednost se podešava na 9 upotrebom 2M NaOH. Jedinjenje C se izoluje ekstrakcijom sa etilacetatom, a ekstrakt suši pomoću MgSO<sub>4</sub>. Acetil-hlorid (5,73 mmol, 2,2 ekvivalenta) se dodaje u prethodno pripremljen rastvor TEA (7,8 mmol, 3 ekvivalenta) i jedinjenja C (2,6 mmol, 1 ekvivalent) u dihlormetanu (10 mL) na 0 °C. Nakon mešanja u trajanju od 30 minuta, reakciona smeša se prenosi u 2M rastvor HCl (10 mL). Organski sloj se odvaja i suši upotrebom MgSO<sub>4</sub>, nakon čega se uparavanjem izoluje jedinjenje D. Jedinjenje D (0,36 mmol, 1 ekvivalent) se rastvara u 2-propanolu (1 mL), a onda se dodaje rastvor litijum-hidroksida (207 mg/mL) u vodi (0,5 mL). Ovako pripremljena reakciona smeša se meša 30 minuta i ekstrahuje korišćenjem 2M HCl (5 mL) i etra (10 mL). Organski sloj se suši i uparava. Proizvod se dalje prečišćava preparativnom TLC koristeći mobilnu fazu etilacetat-cikloheksan 15:1 v/v (**11** i **12**).

### 3.5.6. Sinteza jedinjenja 13

Suspenzija 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzaldehida (7 mmol, 1,08 ekvivalenata), 3-aminorodanina (6,5 mmol, 1 ekvivalent) i natrijum-acetata (23,25 mmol, 3,58 ekvivalenata) u sirćetnoj kiselini (10 mL) se meša 48 h na refluxu. Ohlađena smeša se dodaje u vodu (oko 200 mL), nakon čega se vrši filtracija i sakuplja talog. Talog se ispere vodom i prečišćava preparativnom TLC korišćenjem dihlormetana (**13**).

### 3.5.7. Sinteza jedinjenja 14

*O*-etilhidroksilamin-hidrohlorid (1 mmol, 1 ekvivalent) i Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 mmol, 2 ekvivalenta) se rastvaraju u anhidrovanom THF (5 mL) i mešaju na temperaturi od 25 °C 10 minuta, kako bi se neutralisala so *O*-etilhidroksilamin-hidrohlorida. Reakciona smeša je potom ohlađena na 0 °C, a ciklični anhidrid 2-sulfobenzoeve kiseline (1 mmol, 1 ekvivalent) u anhidrovanom THF (5 mL) se dodaje postepeno, u kapima, u smešu. Reakciona smeša se intenzivno meša na temperaturi od 25 °C tokom 1h. Kao proizvod reakcije se dobija jedinjenje **14**.

### 3.5.8. Sinteza jedinjenja 15-16

Anhidrid 2-sulfobenzojeve kiseline (13,57 mmol) se rastvara u 8 mL metanola (**15**) ili 1-propanola (**16**) i ostavlja preko noći na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Narednog dana se dodaje 6 mL metanalnog rastvora amonijaka i smeša se ostavlja još 2 h na magnetnoj mešalici. Reakciona smeša poprima belu boju koja se izbistri dodatkom 8 mL metanola. Rastvarač iz reakcione smeše se upari. Dobijeni proizvod se koristi u sledećem koraku sinteze bez prečišćavanja.

Prethodno dobijeni proizvod (12,9 mmol) se rastvara u DMF (2 mL) i dodaje se tionil-hlorid (16 mL). Reakciona smeša se zagreva pod reflusom preko noći, hladi u ledenom kupatilu i dodaje u 200 mL usitnjenog leda. Ohlađena smeša se odmah ekstrahuje sa dihlormetanom (3 x 20 mL), a organski sloj se ispira 5 % rastvorom NaHCO<sub>3</sub> (1 x 30 mL) i vodom (1 x 30 mL) i suši (anhidrovani MgSO<sub>4</sub>). Uparavanjem rastvarača se dobija ulje (hlorid).

U rastvor hlorida (4 mmol) u THF (13 mL) se dodaje rastvor hidroksilamin-hidrohlorida (8 mmol) u vodi (4 mL). Smeša je ohlađena u ledenom kupatilu i 10 % rastvor NaHCO<sub>3</sub> (16 mmol) se dodaje u kapima uz mešanje tokom 1 h. Smeša se ostavlja još 1 h uz konstantno mešanje, nakon čega se odvajaju dva sloja (vodeni i THF sloj). Vodeni (donji sloj) ekstrahovan je dva puta sa DCM (1 x 10 mL i 1 x 5 mL). Organski sloj (spojeni THF i DCM slojevi) se ispira vodom (1 x 10 mL), suši (anhidrovani MgSO<sub>4</sub>) i uparava, pri čemu se dobija ulje. Ulje kasnije kristališe iz etilacetata i heksana (5 mL i 10 mL) (**15** i **16**).

### 3.5.9. Sinteza jedinjenja 17

4-bifenilsulfonska kiselina (0,85 mmol, 1 ekvivalent) se rastvara u tionil-hloridu (24,7 mmol, 29 ekvivalenta) i dodaje se katalitička količina DMF (dve kapi). Smeša se zagreva na 80 °C i ostavlja preko noći na magnetnoj mešalici. Reakciona smeša se potom uparava, a zaostali tionil-hlorid se uklanja pomoću toluena (3 x 2 mL) na vakuum uparivaču.

Dobijeni proizvod (0,8 mmol, 1 ekvivalent) se rastvara u THF (2 mL) i u njega se dodaje rastvor hidroksilamin-hidrohlorida (1,6 mmol, 2 ekvivalenta) u vodi (1 mL). Reakciona smeša je potom ohlađena u ledenom kupatilu, a 10 % rastvor NaHCO<sub>3</sub> (3,2 mol, 4 ekvivalenta) se dodaje u kapima uz mešanje u trajanju od 1 h. Reakciona smeša se ostavlja još 1 h na magnetnoj mešalici, nakon čega dolazi do odvajanja dva sloja, vodenog i THF sloja. Vodeni sloj (donji) se ekstrahuje dva puta sa DCM (1 x 10 mL i 1 x 5 mL). Organski sloj (spojeni THF i DCM slojevi) se ispire vodom (1 x 10 mL), suši (anhidrovani MgSO<sub>4</sub>) i uparava, pri čemu se dobija proizvod koji se dalje prečišćava preparativnom TLC, korišćenjem mobilne faze heksan:etilacetat u različitim odnosima (najpre 2:1 v/v i na kraju 1:1 v/v).

### 3.5.10. Sinteza jedinjenja 18

U rastvor 1,4-benzodioksan-6-sulfonilhlorida (0,43 mmol, 1 ekvivalent) u tetrahidrofuranu (2 mL) dodaje se rastvor hidroksilamin-hidrohlorida (0,86 mmol, 2 ekvivalenta) u vodi (0,4 mL). Reakciona smeša je potom ohlađena u ledenom kupatilu, a 10 % rastvor NaHCO<sub>3</sub> (1,72 mmol, 4 ekvivalenta) se dodaje u kapima uz mešanje u trajanju od 1 h. Reakciona smeša se ostavlja još 1 h na magnetnoj mešalici, nakon čega dolazi do odvajanja dva sloja, vodenog i THF sloja. Vodeni sloj (donji) se ekstrahuje dva puta sa dihlormetanom (1 x 10 mL i 1 x 5 mL). Organski sloj (spojeni THF i DCM slojevi) se ispira vodom (1 x 10 mL), suši (anhidrovani MgSO<sub>4</sub>) i uparava (**18**).

### 3.5.11. Sinteza jedinjenja 19

U rastvor 4'-metoksibifenil-4-sulfonilhlorida (0,43 mol, 1 ekvivalent) u tetrahidrofuranu (2 mL) dodaje se rastvor hidroksilamin-hidrohlorida (0,86 mmol, 2 ekvivalenta) u vodi (0,4 mL). Reakciona smeša je potom ohlađena u ledenom kupatilu, a 10 % rastvor NaHCO<sub>3</sub> (1,72 mmol, 4 ekvivalenta) se dodaje u kapima uz mešanje u trajanju od 1 h. Reakciona smeša se ostavlja još 1 h na magnetnoj mešalici, nakon čega dolazi do odvajanja dva sloja, vodenog i THF sloja. Vodeni sloj (donji) se ekstrahuje dva puta sa dihlormetanom (1 x 10 mL i 1 x 5 mL). Organski sloj (spojeni THF i DCM slojevi) se ispere vodom (1 x 10 mL), suši (anhidrovani MgSO<sub>4</sub>) i uparava, pri čemu se dobija proizvod koji se dalje prečišćava preparativnom TLC korišćenjem mobilne faze DCM:MeOH 9,5:0,5 v/v (**19**).

### 3.6. *In vitro* testiranje COX-1, COX-2 i 5-LOX inhibitornog efekta novosintetisanih jedinjenja

#### 3.6.1. Inhibicija COX-1 i COX-2 enzima

Upotrebom fluorimetrijskih COX-1 i COX-2 enzimskih testova ispitivana je inhibitorna aktivnost novosintetisanih jedinjenja. Navedeni testovi se zasnivaju na fluorimetrijskoj detekciji prostaglandina G<sub>2</sub>, koji se proizvodi pod dejstvom COX enzima (COX-1 i COX-2) na supstrat. Test se sastoji iz COX esej pufera, COX probe (DMSO rastvor), COX kofaktora (DMSO rastvor), arahidonske kiseline (supstrat) i NaOH. COX-1 enzimski esej sadrži ovčiji COX-1 enzim i poznati COX-1 inhibitor SC560 rastvoren u DMSO. COX-2 enzimski esej sadrži humani rekombinantni COX-2 enzim i poznati COX-2 inhibitor celekoksib (DMSO rastvor). Novosintetisana jedinjenja koja se podvrgavaju testiranju se najpre rastvaraju u DMSO (opseg koncentracija je od 5000 µM do 0,5 µM), a potom pet puta razblažuju COX esej puferom. Inhibitorska kontrola (IC, *inhibitor control*) se priprema dodavanjem 2 µL COX-1 ili COX-2 poznatog inhibitora i 8 µL COX esej pufera u odgovarajući bunarić (ploča sa 96 polja-bunarića). Kontrola uticaja rastvarača (SC, *solvent control*) se priprema dodavanjem 2 µL DMSO i 8 µL esej pufera po bunariću, dok se testirana jedinjenja, uzorci (S, *sample*, razblažena test jedinjenja) i enzimaska kontrola (EC, *enzyme control*, esej pufer) dodaju u količinama od 10 µL po bunariću. EC, SC, IC i testirana jedinjenja u svim ispitivanim koncentracijama se nanose u triplicatu. Pripremljena reakciona smeša (*Master mix*) koja se sastoji iz COX esej pufera, COX probe, razblaženog COX kofaktora i COX-1/COX-2 enzima, dodaje se u zapremini od 80 µL u svaki bunarić. U međuvremenu se priprema etanolni rastvor arahidonske kiseline u NaOH prema uputstvu proizvođača i u svaki bunarić se dodaje po 10 µL pomoću multikanalne pipete, kako bi se pokrenule sve reakcije istovremeno. Vrednosti fluorescencija (Ex/Em = 535/587 nm) testiranih jedinjenja se kinetički mere na 25 °C u intervalima od 1 min tokom 10 min. Izabrane su dve tačke (T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>) u linearnom opsegu kreiranog grafikona i dobijene su odgovarajuće vrednosti fluorescencija (RFU<sub>1</sub> i RFU<sub>2</sub>). Nagib se izračunava deljenjem ΔRFU (RFU<sub>2</sub>-RFU<sub>1</sub>) sa vremenom Δt (T<sub>2</sub>-T<sub>1</sub>). Procenat inhibicije se izračunava prema jednačini (12):

$$\% \text{ Relativna inhibicija} = \frac{\text{Nagib EC} - \text{Nagib S}}{\text{Nagib EC}} * 100 \quad (12)$$

### 3.6.2. Inhibicija 5-LOX enzima

Upotrebom fluorimetrijskog 5-LOX enzimskog esejja ispitivana je 5-LOX inhibitorna aktivnost novosintetisanih jedinjenja. Ovaj esej se zasniva na fluorimetrijskoj detekciji intermedijera koji nastaju pod dejstvom 5-LOX enzima. Test se sastoji iz LOX esej pufera, LOX probe, LOX supstrata, poznatog 5-LOX inhibitora (zileuton) i 5-LOX enzima. Novosintetisana jedinjenja se rastvaraju u DMSO (opseg koncentracija je od 5000  $\mu\text{M}$  do 0,5  $\mu\text{M}$ ) i dodaju u bunariće u zapremini od 2  $\mu\text{L}$  od ukupnih 100  $\mu\text{L}$  reakcione zapremine po bunariću. EC, SC i IC se pripremaju dodavanjem po 2  $\mu\text{L}$  esej pufera, DMSO i zileutona u odgovarajući bunarić. EC, SC, IC i testirana jedinjenja u svim koncentracijama se nanose u triplikatu. Dodatkom 38  $\mu\text{L}$  esej pufera u svaki bunarić postiže se ukupna zapremina od 40  $\mu\text{L}$ . Pripremljena reakciona smeša koja se sastoji iz LOX esej pufera, LOX probe i LOX enzima, dodaje se u zapremini od 40  $\mu\text{L}$  u svaki bunarić. Ploča se potom inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta pre dodavanja supstrata razblaženog u esej puferu (faktor razblaženja 1:2500). Konačni rastvor supstrata se dodaje u količini od 20  $\mu\text{L}$  u svaki bunarić upotrebom multikanalne pipete da bi se pokrenule sve reakcije u isto vreme. Vrednosti fluorescencije (Ex/Em = 500/536 nm) testiranih jedinjenja su kinetički merene u drugom minutu nakon dodavanja supstrata u intervalima od 30s tokom 10–20 minuta. Izabrane su dve tačke ( $T_1$  i  $T_2$ ) u linearnom opsegu kreiranog grafikona i dobijene su odgovarajuće vrednosti fluorescencije ( $\text{RFU}_1$  i  $\text{RFU}_2$ ). Nagib za sve uzorke je izračunat deljenjem  $\Delta\text{RFU}$  ( $\text{RFU}_2 - \text{RFU}_1$ ) sa vremenom  $\Delta t$  ( $T_2 - T_1$ ). Procenat inhibicije je izračunat prema jednačini (12).

### 3.7. Procena antioksidativne aktivnosti novosintetisanih jedinjenja

#### 3.7.1. Priprema uzoraka

Uzorci seruma su sakupljeni od zdravih ispitanika koji su bili na sistematskom pregledu na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu. Serum se sakupljao nakon završenog radnog dana formiranjem serumskog pula koji je mešanjem različitih uzoraka postao homogen i sa potpuno novim karakteristikama. Nakon 3h mešanja na magnetnoj mešalici u cilju postizanja maksimalne homogenizacije, prikupljeni serumski pul je izdelfjen u porcije od po 450  $\mu$ L. Alikvoti se čuvaju na temperaturi od -80 °C. Uzorci za testiranje se pripremaju tako što se pet serijskih razblaženja testiranih jedinjenja (koncentracije: 1000  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M i 62,5  $\mu$ M) dodaju pojedinačno (u količini od 50  $\mu$ L) ili u kombinaciji (u količini od 25  $\mu$ L) sa poznatim oksidansom *terc*-butil-hidroperoksidom (TBH) (25  $\mu$ L) u 450  $\mu$ L seruma. Osnovni (*stock* rastvor) se pravi tako što se testirana jedinjenja rastvaraju u DMSO, dok se serijska razblaženja (500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M i 62,5  $\mu$ M) prave iz osnovnog rastvora dodatkom PBS pufera pH 7,4. Dejonizovana voda se koristi kao slepa proba, kao kontrola je korišćen rastvarač DMSO i pufer pH 7,4, dok je kao standard korišćen rastvor antioksidansa troloksa (2 mmol/L), koji predstavlja sintetski hidrosolubilni analog vitamina E. Svi uzorci se inkubiraju u duplikatu tokom 2h i 24h na 37 °C.

#### 3.7.2. Biohemijski parametri

Parametri redoks statusa i to parametri antioksidativne zaštite (totalni antioksidativni status (TAS) i ukupna koncentracija sulfhidrilnih grupa (SHG)) i parametri oksidativnog stresa (totalni oksidativni status (TOS) i prooksidativni-antioksidativni balans (PAB)) se određuju u cilju izračunavanja prooksidativnog skora, antioksidativnog skora i oksi skora (OS). Ovi parametri se određuju u alikvotima seruma.

##### 3.7.2.1. Metoda za određivanje TAS parametra

Totalni antioksidativni status (TAS) se određuje metodom po *Erel*-u <sup>158</sup>, koja je naknadno optimizovana <sup>159</sup>. ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) se oksiduje do zeleno obojenog ABTS<sup>+</sup> katjona pomoću vodonik-peroksida u acetatnom puferu čiji je pH 3,6. Ovaj stabilni katjon je zapravo hromogen, a prisustvo antioksidanasa u uzorcima dovodi do njegovog obezbojavanja koje je proporcionalno njihovim koncentracijama u uzorcima. Apsorbancija se meri upotrebom SPECTROstar Nano Microplate Reader uređaja na talasnoj dužini od 660 nm. Reakcija se kalibriše upotrebom troloksa, a TAS vrednosti su izražene kao  $\mu$ mol troloks ekvivalent/L.

##### 3.7.2.2. Metoda za određivanje TOS parametra

Totalni oksidativni status (TOS) se takođe određuje *Erel*-ovom metodom <sup>159, 160</sup>. Princip metode se zasniva na oksidaciji Fe<sup>2+</sup> jona, koje je u kompleksu sa *o*-dianizidinom, do Fe<sup>3+</sup> jona

posredstvom oksidanasa prisutnih u uzorcima.  $\text{Fe}^{3+}$  jon potom formira obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini u prisustvu glicerola, čiji intenzitet obojenja je proporcionalan ukupnom sadržaju oksidanasa u uzorcima. Apsorbancija se meri na 560 nm. Reakcija se kalibriše sa vodonik-peroksidom, a TOS vrednosti su izražene kao  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  ekvivalent/L.

### 3.7.2.3. Metoda za određivanje PAB parametra

Prooksidativni-antioksidativni balans (PAB) se određuje prema literaturnoj proceduri <sup>159, 161</sup>. Metoda se zasniva na određivanju vodonik-peroksida u prisustvu antioksidanasa u uzorcima. Vodonik-peroksid i antioksidansi (uključujući mokraćnu kiselinu) istovremeno reaguju sa hromogenom TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin). Reakcija između vodonik-peroksida i hromogena je katalizovana enzimom peroksidazom, dok je reakcija antioksidanasa i hromogena neenzimska. Intenzivna plava boja, nastala kao rezultat reakcije između vodonik-peroksida i hromogena TMB, obezbojava se zbog reakcije koja se odigrava između antioksidanasa i TMB. Boja koja nastaje kao rezultat dve kompetitivne reakcije je proporcionalna odnosu prooksidanasa i antioksidanasa u uzorku. Apsorbancija se meri na 450 nm, a za izradu standardne krive korišćeni su različiti odnosi rastvora vodonik-peroksida i mokraćne kiseline. Rezultati PAB se izražavaju kao koncentracija vodonik-peroksida.

### 3.7.2.4. Metoda za određivanje SHG parametra

Ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa (SHG) se određuje korišćenjem modifikovane verzije *Ellman-ove* metode <sup>159, 162</sup>. Ova metoda se zasniva na reakciji između DTNB (2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoeva kiselina) i alifatičnih tiolnih jedinjenja u alkalnoj sredini (pH 9,0). Apsorbancija se meri na 412 nm, a kao rezultat reakcije se dobija 1 mol žuto obojenog *p*-nitrofenolnog anjona po molu tiola.

### 3.7.2.5. Oksi skor vrednosti

Oksi skor (OS) predstavlja razliku između prooksidativnog skora (prosečna vrednost Z skor vrednosti svih merenih prooksidanasa, tj. TOS i PAB) i antioksidativnog skora (prosečna vrednost Z skor vrednosti svih merenih antioksidanasa, tj. TAS i SHG). Z skor vrednost je razlika između originalne i prosečne vrednosti određenog parametra dobijene u kontrolnim uzorcima (uzorci seruma bez dodatka ispitivanih jedinjenja) i podeljeno standardnim devijacijama za taj parametar u kontrolnim uzorcima. Niža OS vrednost ukazuje na jači antioksidativni potencijal u tom uzorku.

## 3.7.3. Statistika

Vrednosti OS su predstavljene kao medijane  $\pm$  (interkvartilni opseg). *Wilcoxon-ov* test parova (*Wilcoxon's paired tests*) je korišćen da bi se uporedilo i utvrdilo da li postoje statistički značajne razlike između uzoraka sa i bez TBH, kao i tokom 2h i 24h inkubacije.

### 3.8. Ispitivanje lipofilnosti novosintetisanih jedinjenja

RP-HPLC analiza izvedena je na hromatografu Agilent 1200 Series. Retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja je testirano u različitim RP-HPLC sistemima korišćenjem C18, cijano i amino hromatografskih kolona kao stacionarne faze. Temperatura kolone je podešena na 25 °C, brzina protoka mobilne faze na 1 mL/min, a UV/VIS detekcija na nekoliko talasnih dužina: 220 nm, 240 nm, 254 nm, 270 nm i 400 nm. Mobilne faze su bile binarne smeše acetonitrila ili metanola (organska faza) i fosfatnog pufera pH 7,4 ili pH 5,5 (vodena faza) u različitim odnosima. Ispitivana su četiri odnosa, u kojima se sadržaj organskog modifikatora kretao u opsegu 40-70 %. Fosfatni pufer je pripremljen kao 10 mM rastvor anhidrovanog dinatrijum-fosfata u vodi HPLC čistoće, dok su pH vrednosti (7,4 i 5,5) pripremljenog pufera podešene dodavanjem 85 % *o*-fosforne kiseline. Logaritamske vrednosti faktora retencije ( $\log k$ ) su izračunate za svako testirano jedinjenje i vršena je korelacija sa procentom organskog modifikatora u mobilnoj fazi. Hromatografski parametri **logkw** (odsečak), **a** (nagib) i  **$\phi_0$**  (-odsečak/nagib) određeni su prema jednačini (13), u kojoj S označava procenat organskog modifikatora u mobilnoj fazi, i jednačini (14).

$$\log k = \log kw + aS \quad (13)$$

$$\phi_0 = -\log kw/a \quad (14)$$

Za ispitivanje lipofilnosti, sva jedinjenja su rastvorena u DMSO (u koncentraciji od 0,1 mg/mL) a zatim razblažena acetonitriлом da bi se dobili radni rastvori koncentracije 0,01 mg/mL. Uzorci su injektovani u duplikatu.

### 3.9. Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC) i PAMPA test

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

Za procenu gastrointestinalne apsorpcije novosintetisanih jedinjenja primenjena je i bioparticiona micelarna hromatografija. Bioparticiona micelarna hromatografija je izvedena na uređaju Agilent 1200 Series. Kao stacionarna faza je korišćena C18 hromatografska kolona (*ZORBAX Extend-C18 Analytical* 4,6 × 150 mm; 5 μm). Mobilna faza je smeša vodene faze (40 mmol/L rastvor Brij 35 u 7 mmol/L rastvoru dinatrijum-fosfata) i acetonitrila (70:30, v/v), a pH je podešen na 5,5 pomoću 85 % *o*-fosforne kiseline. Temperatura kolone je bila podešena na 36,5 °C, brzina protoka mobilne faze 1 mL/min, a UV/VIS detektor je bio podešen na nekoliko talasnih dužina: 240 nm, 254 nm i 400 nm. Sva jedinjenja su rastvorena u DMSO (0,1 mg/mL), a zatim razblažena acetonitriplom da bi se dobili radni rastvori koncentracije 0,01 mg/mL. Rastvori ispitivanih jedinjenja su injektovani u duplikatu. Mrtvo vreme kolone ( $t_0$ ) je određeno kao retenciono vreme pika DMSO (pik je detektovan na talasnoj dužini 220 nm). Retencioni faktori ( $k$ ) su izračunati iz dobijenih vrednosti retencionih vremena ( $t_R$ ), prema jednačini (19):

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (19)$$

#### 3.9.2. PAMPA test

##### 3.9.2.1. Priprema rastvora i izvođenje testa

Rastvor fosfatnog pufera je pripremljen odmeravanjem 0,5292 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i 0,0234 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i rastvaranjem u normalnom sudu od 200 mL u prečišćenoj vodi. Fosfatni pufer je podeljen na dva dela i pH je podešen na pH 5,5 i pH 7,4 pomoću 85 % *o*-fosforne kiseline. Rastvori ispitivanih jedinjenja su pripremljeni razblaživanjem štok rastvora jedinjenja u DMSO puferom pH 5,5 (0,05 mM rastvori, krajnja koncentracija DMSO u rastvoru je 1 %), dok akceptorski rastvor predstavlja 1 % DMSO rastvor pripremljen u puferu pH 7,4. Korišćena su dva PAMPA modela: model A, gde je veštačka membrana 1 % rastvor lecitina jajeta u dodekanu i model B, kod koga veštačku membranu predstavlja smeša heksadekana i heksana (5/95 v/v). PAMPA test je izveden na hidrofobnoj Millipore PVDF (model A) i polikarbonatnoj ploči (model B). Kod modela A, gde je svaki odeljak impregniran sa 5 μL 1 % rastvora lecitina jajeta u dodekanu, donorski odeljci su na donjoj ploči i u njih su dodati rastvori ispitivanih jedinjenja u puferu pH 5,5 (300 μL po odeljku). Akceptorski odeljci su na gornjoj ploči i u njih je dodat 1 % rastvor DMSO u puferu pH 7,4 (300 μL po odeljku). Inkubacija je trajala 17 h na sobnoj temperaturi bez mućkanja. Kod modela B, gde je svaki odeljak impregniran sa 15 μL smeše heksadekana i heksana, donorski odeljci su na gornjoj ploči i u njih su dodati rastvori ispitivanih jedinjenja u puferu pH 5,5 (300 μL po odeljku). Akceptorski odeljci su na donjoj ploči i u njih je

dodat 1 % rastvor DMSO u puferu pH 7,4 (300 µL po odeljku). Inkubacija je trajala 5 h na sobnoj temperaturi uz mućkanje na vibracionoj mešalici.

### 3.9.2.2. Određivanje koncentracija ispitivanih jedinjenja

Koncentracija ispitivanih jedinjenja u polaznim, donorskim i akceptorskim odeljcima je određena HPLC metodom korišćenjem uređaja Dionex Ultimate 3000 i dve hromatografske kolone: ZORBAX Eclipse XDB-C18 Analytical 4,6 x 150 mm; 5 µm i Acclaim™ HILIC-10 120 Å 4,6 x 150 mm; 3 µm. Kao mobilna faza korišćene su dve binarne smeše: acetonitril; pufer pH 7,4 (10 mM rastvor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> podešen na pH 7,4 sa 85 % *o*-fosfornom kiselinom) i acetonitril; pufera pH 4,5 (20 mM rastvor amonijum-formijata podešen na pH 4,5 sa koncentrovanom mravljom kiselinom). Temperatura kolone je bila podešena na 25 °C, protok mobilne faze 1 mL/min, a UV/VIS detekcija se vrši na nekoliko talasnih dužina: 220 nm, 240 nm, 254 nm, 270 nm i 400 nm.

### 3.9.2.3. Izračunavanje PAMPA parametara

Kod PAMPA modela A, gde je kao membrana korišćen 1 % rastvor lecitina u dodekanu, parametri gastrointestinalne apsorpcije, procenat transporta kroz membranu (% T) i prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) su izračunati na osnovu sledećih jednačina <sup>163</sup>.

$$\% T = 100 \frac{A_R V_R}{A_{DO} V_D} \quad (15)$$

$$P_{app} = \frac{V_D V_R}{(V_D + V_R) S t} \ln \left[ \frac{100 V_D}{100 V_D - \% T (V_D + V_R)} \right] \quad (16)$$

gde su  $A_R$  i  $A_{DO}$  površine HPLC pikova rastvora iz akceptorskih odeljaka nakon inkubacije i polaznih rastvora,  $V_R$  i  $V_D$  su zapremine akceptorskih i polaznih rastvora (300 µL po odeljku),  $S$  je površina veštačke membrane (0,28 cm<sup>2</sup>) i  $t$  je vreme inkubacije izraženo u sekundama (61,200 s).

Kod PAMPA modela B, parametar koji opisuje efektivnu pasivnu permeabilnost ( $P_e$ ) se računa na osnovu jednačina (17) i (18) <sup>164</sup>:

$$R = 1 - \frac{C_D(t) + C_A(t)}{C_D(0)} \quad (17)$$

$$P_e = -0,00036907 \cdot \log \left[ 1 - \left( \frac{2}{1-R} \right) \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right] \quad (18)$$

gde  $R$  predstavlja retenciju koja se definiše kao udeo ispitivanog jedinjenja koji se zadržava u PAMPA membrani,  $C_D(t)$  je koncentracija ispitivanog jedinjenja u donorskom odeljku nakon vremena  $t$ ,  $C_A(t)$  je koncentracija ispitivanog jedinjenja u akceptorskom odeljku nakon vremena  $t$ , dok  $C_D(0)$  predstavlja koncentraciju ispitivanog jedinjenja u donorskom odeljku na početku inkubacije (koncentraciju u polaznom rastvoru).

### 3.10. Ispitivanje citotoksičnosti novosintetisanih jedinjenja i njihove sposobnosti da povećaju osetljivost ćelija na zračenje

#### 3.10.1. Ćelijske linije

Za ispitivanje citotoksičnosti i radiosenzitizacije korišćene su ćelijske linije humanog kolorektalnog kancera (HC116 i HT-29), humanog kancera pankreasa (BxPC-3) i normalnih humanih fibroblasta (MRC-5), kao i odgovarajući medijumi za ćelijske kulture (*McCoy*-ov 5A, RPMI-1640 medijum i *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM)). U medijume su dodati 10 % FBS (fetalni goveđi serum), penicilin/streptomycin i L-glutamin i održavani u uslovima vlažne atmosfere koja sadrži 5 % CO<sub>2</sub> i na temperaturi od 37 °C. Ćelije su se pre početka eksperimenata uzgajale u boci T25 za ćelijsku kulturu na odgovarajućoj ćelijskoj gustini tokom 24 h i u odgovarajućem medijumu. Osnovni (*stock*) rastvori svakog testiranog jedinjenja su razblaženi medijumom kako bi se dobile odgovarajuće koncentracije. Procenat DMSO u tretiranim uzorcima nije prelazio 0,1 %<sup>165</sup>. U eksperimentima koji uključuju zračenje, ćelije su ozračene u vertikalnom položaju, pri čemu je ćelijski jednosloj okrenut ka <sup>60</sup>Co γ zracima (CIRUS-Cis Biointernational) na sobnoj temperaturi. U svim navedenim eksperimentima je primenjena klinički relevantna doza zračenja od 2 Gy uz brzinu doze od ~ 1 Gy/min.

#### 3.10.2. 2,5-difenil-2H-tetrazolijum-bromid (MTT) test

MTT test se koristi za određivanje vijabilnosti kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih testiranim jedinjenjima. Ćelije su zasejane na ploče sa po 96 bunarića (gustina 2000 ćelija po bunariću) nakon čega su tretirane rastućim koncentracijama testiranih jedinjenja. Sposobnost živih ćelija da redukuju 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid u plavoljubičaste kristale formazana određena je 72 h nakon tretmana, tako što se 1 mg/mL MTT reagensa dodaje u svaki bunarić i inkubira dodatnih 4 h. Nakon uklanjanja medijuma koji sadrži MTT dodato je 200 µL DMSO u svaki bunarić. Apsorbancija je merena upotrebom čitača mikroploča na test talasnoj dužini od 550 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Inhibicija rasta ćelija za svako testirano jedinjenje je izražena kao IC<sub>50</sub> vrednost, koja se definiše kao koncentracija koja je prouzrokovala 50 % smanjenja vijabilnosti ćelija.

#### 3.10.3. Sulforodaminski B (SRB) test

Za procenu ćelijske proliferacije nakon tretmana zračenjem, kao i nakon kombinovanih tretmana, korišćen je SRB test, koji se zasniva na merenju mase ukupnih ćelijskih proteina koja je proporcionalna broju ćelija. Uslovi pod kojima se izvodi SRB test su bili identični uslovima kod izvođenja MTT testa. Ćelije su se nakon izlaganja zračenju inkubirale tokom 72 h pod standardnim uslovima (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C), nakon čega su isprane PBS (*phosphate-buffered saline*) u cilju uklanjanja medijuma i fiksirane precipitacijom proteina upotrebom 10 % trihlorsirćetne kiseline, na temperaturi od 4 °C tokom 1 h. Ploče su potom isprane vodom i obojene primenom 0,4 % SRB u 1 % sirćetnoj kiselini na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta. Višak boje je uklonjen pranjem bunarića sa 1 % sirćetnom kiselinom, nakon čega su ploče sušene na vazduhu. Vezana

boja je rastvorena u 10 mM nepuferovanom Tris baza rastvoru (pH 10,5) uz mešanje na šejkeru u trajanju od 5 minuta. Apsorbancija je izmerena upotrebom čitača mikroploča na talasnoj dužini od 550 nm.

#### **3.10.4. Statistička analiza**

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*, standardna greška srednje vrednosti). Studentov t test je korišćen u cilju procene da li se dobijeni rezultati statistički značajno razlikuju između grupa, pri čemu je nivo značajnosti bio  $p < 0,05$ .

### **3.11. Ispitivanje antimigratornog potencijala testiranih jedinjenja i vitalnosti ćelija**

#### **3.11.1. Test zarastanja rana**

Test zarastanja rana je korišćen u cilju procene antimigratornog potencijala sintetisanih jedinjenja. SW620 ćelije (ćelijska linija humanog kolorektalnog kancera) su zasejane na mikroploče za kulturu tkiva koje sadrže po 24 bunarića (gustina 300000 ćelija po bunariću), a uzgajane su tokom 24 h u DMEM medijumu (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Po postizanju konfluencije, jednolično oštećenje (rana) je urezano u monosloj svakog bunarića pomoću sterilnog plastičnog vrha mikropipete od 200  $\mu$ l. Pripremljeni su 5 mM rastvori jedinjenja **1**, **2**, **3** i **5** u DMSO. Medijum je zamenjen nakon formiranja rane, a ćelije su potom tretirane rastvorima odabranih jedinjenja (koncentracija 25  $\mu$ M) tokom 48 h. Zatvaranje rane je praćeno slikanjem ćelija pri uvećanju od 4 puta, odmah i 48 h nakon ranjavanja. Snimljene slike su analizirane pomoću ImageJ software v. 1.52p kako bi se izmerio stepen zatvaranja povređene regije. Eksperiment je nezavisno ponovljen tri puta.

#### **3.11.2. Kalcein-AM test vijabilnosti ćelija (*viability assay*)**

U cilju procene vijabilnosti ćelija, SW620 ćelije su zasejane na mikroploče za kulturu tkiva koje sadrže po 24 bunarića (gustina 300000 ćelija po bunariću) u medijumu DMEM i ostavljene tokom noći da se pričvrste za podlogu. Ćelije su tretirane sa 25  $\mu$ M rastvorima odabranih jedinjenja tokom 48 h, a zatim obojene upotrebom kalcein-AM i propidijum-jodida kao živo/mrtno bojenje. SW620 ćelije su inkubirane 15 minuta na 37 °C u medijumu koji sadrži 4  $\mu$ M kalcein-AM i 5  $\mu$ M propidijum-jodid. Nakon ispiranja u PBS, ćelije su snimljene pri uvećanju od 10 puta korišćenjem ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System. Kvantifikacija živih i mrtvih ćelija je izvršena korišćenjem softvera CellReporterXpress® v. 2.8.2.669.

#### **3.11.3. Statistička analiza**

Statistička analiza je izvršena pomoću softvera GraphPad Prism v. 8.0.2. Rezultati su analizirani korišćenjem jednosmernog ANOVA testa (*one-way ANOVA*) i *Dunnett*-ovog testa za višestruka poređenja (*Dunnett's multiple comparison test*), a prihvaćeni nivo značajnosti je bio  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

## 4.1. 3D-QSAR studija

### 4.1.1. Interpretacija kreiranih 3D-QSAR modela

Kreirani COX-2 i 5-LOX 3D-QSAR modeli poseduju dve latentne varijable (LV=2), a izračunati parametri interne i eksterne validacije su predstavljeni u **Tabeli 3**. Na **Slici P1** (Prilozi) su grafički predstavljene eksperimentalne pIC<sub>50</sub> vrednosti (COX-2 i 5-LOX) ispitivanog seta jedinjenja u odnosu na modelima predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti istog seta jedinjenja.

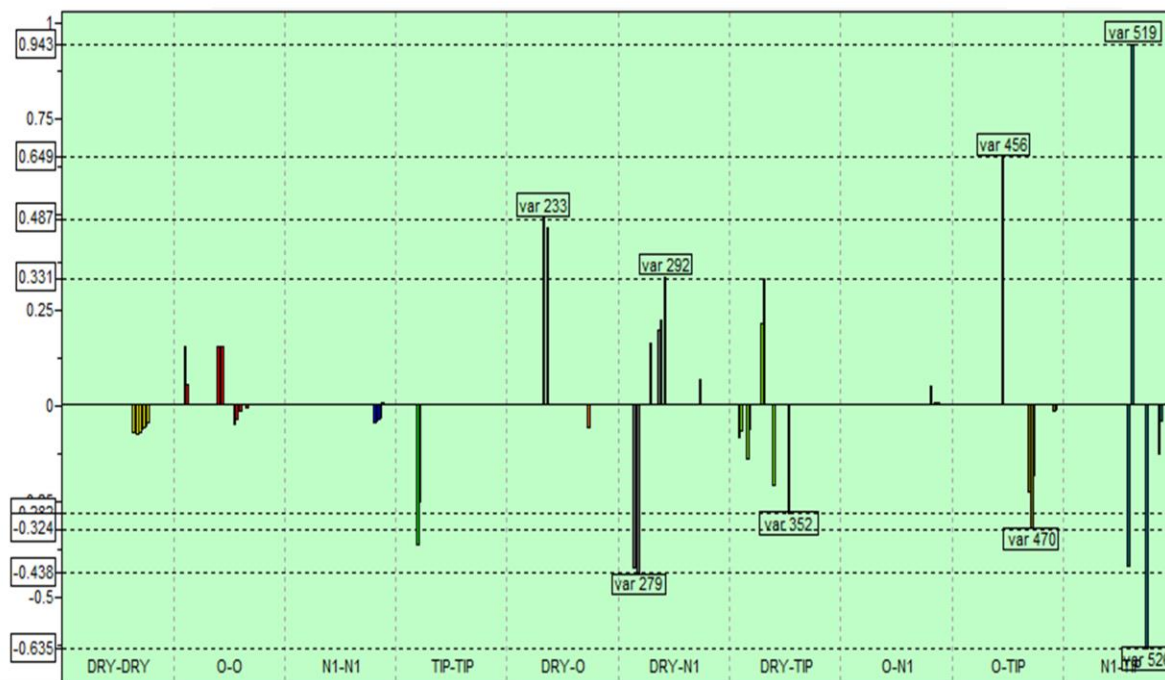
**Tabela 3.** Parametri validacije razvijenih COX-2 i 5-LOX 3D-QSAR modela

Model	LV	R <sup>2</sup>	RMSEE	Q <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>pred</sub>	RMSEP	r <sub>m</sub> <sup>2</sup>	r' <sub>m</sub> <sup>2</sup>	$\overline{r_m^2}$	$\Delta r_m^2$
COX-2	2	0,80	0,33	0,53	0,85	0,22	0,79	0,77	0,78	0,02
5-LOX	2	0,88	0,28	0,71	0,85	0,31	0,82	0,85	0,84	0,03

Kreirani COX-2 i 5-LOX 3D-QSAR modeli validno predviđaju aktivnost test set jedinjenja što je dokazano izračunatim vrednostima validacionih parametara: **RMSEP** 0,22 (COX-2) i 0,31 (5-LOX), kao i **R<sup>2</sup><sub>pred</sub>** 0,85, za oba enzima (kriterijumi prihvatljivosti: **R<sup>2</sup><sub>pred</sub>** > 0,6). Na osnovu dobijenih vrednosti parametara **Q<sup>2</sup>** (0,53 za COX-2 i 0,71 za 5-LOX enzim) i **R<sup>2</sup><sub>pred</sub>**, može se izvesti zaključak da kreirani modeli imaju dobru sposobnost predviđanja aktivnosti i da se mogu koristiti za predviđanje aktivnosti novodizajniranih jedinjenja. Parametri metrike validacije **r<sub>m</sub><sup>2</sup>** (eksterna validacija), koja ima stroži kriterijum, imali su sledeće vrednosti: **r<sub>m</sub><sup>2</sup>**, **r'<sub>m</sub><sup>2</sup>** i  **$\overline{r_m^2}$**  (> 0,5) i  **$\Delta r_m^2$**  (< 0,2), što ukazuje na visoku moć predviđanja kreiranih modela (**Tabela 3**).

#### 4.1.1.1. Interpretacija kreiranog COX-2 3D-QSAR modela

Izdvojene najznačajnije varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na inhibiciju COX-2 enzima prikazane su na **Slici 19** i u **Tabeli P3** (Prilozi). Najznačajnije varijable sa pozitivnim uticajem na ispoljavanje COX-2 inhibitornog efekta su: v233 (DRY-O), v292 (DRY-N1), v456 (O-TIP) i v519 (N1-TIP). Najznačajnije varijable sa negativnim uticajem na ispoljavanje COX-2 inhibitornog efekta su: v279 (DRY-N1), v352 (DRY-TIP), v470 (O-TIP) i v526 (N1-TIP).



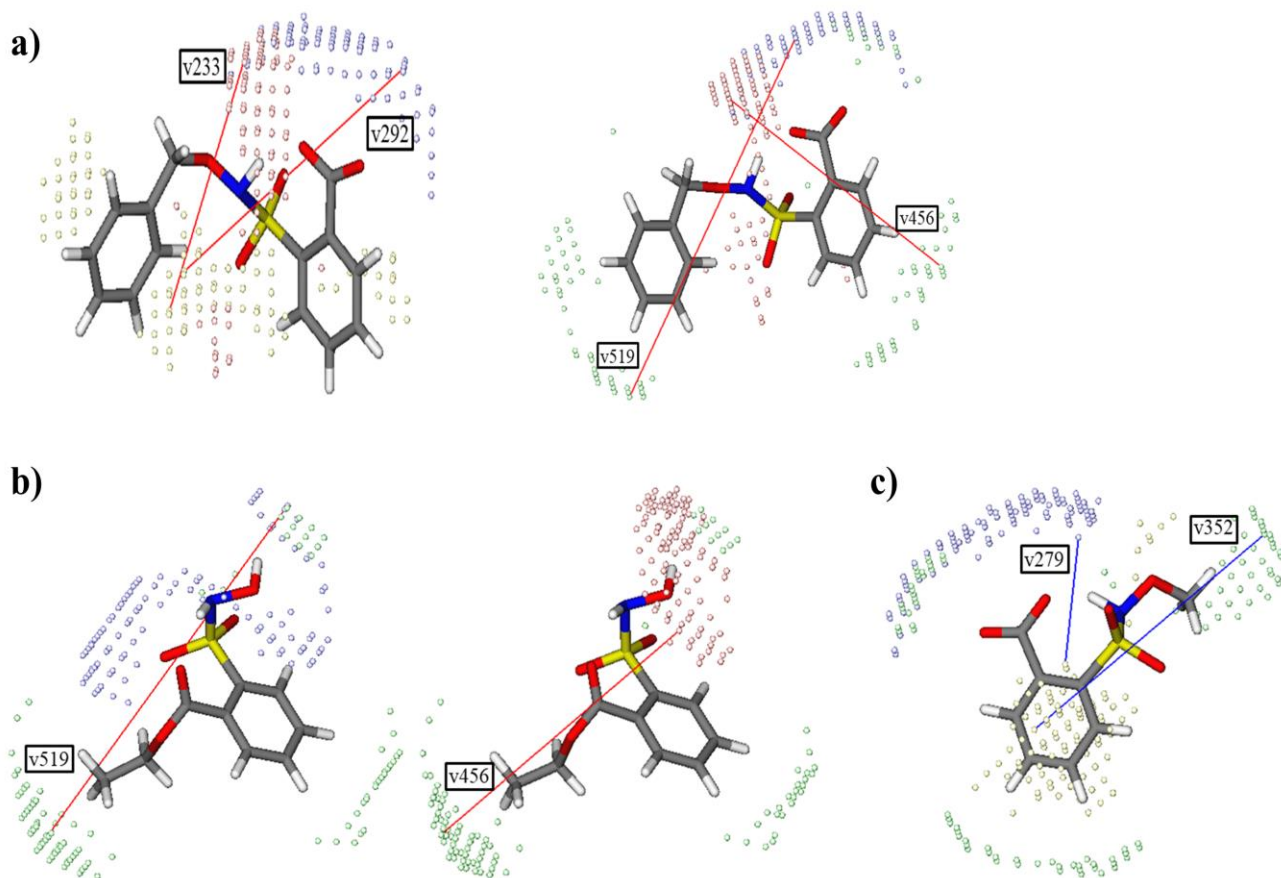
**Slika 19.** Dijagram PLS koeficijenata za COX-2 3D-QSAR model sa označenim najznačajnijim pozitivnim i negativnim GRIND varijablama

U slučaju najaktivnijeg COX-2 inhibitora iz odabranog seta jedinjenja za razvoj modela (jedinjenje **12\***,  $IC_{50} = 0,07 \mu M$ , **Tabela P1**, Prilozi), proba u blizini hidrofobne benzil grupe i proba u blizini grupe koja je donor vodonične veze (-NH-) su na optimalnom rastojanju i formiraju varijablu značajnu za ispoljavanje dobre aktivnosti (v233: DRY-O). Hidrofobna svojstva benzil grupe imaju ulogu u stvaranju značajne pozitivne interakcije sa grupom koja je akceptor vodonične veze (karboksilna grupa) (v292: DRY-N1). Varijabla v456 (O-TIP) pozitivno doprinosi COX-2 inhibitornoj aktivnosti, a lokalizovana je između sterne probe (sterna svojstva benzena povezanog sa sulfonamidskom grupom) i probe koja identifikuje donore vodonične veze u strukturi jedinjenja (-NH). Sterna proba (oko benzil grupe u jedinjenju **12\***) i proba donora

vodonične veze (identifikuje akceptore vodonične veze u jedinjenju, oko karboksilne grupe) su na udaljenosti 13,20-13,60 Å i ta varijabla pozitivno utiče na aktivnost (v519: N1-TIP) (**Slika 20a**).

Na primeru jedinjenja **16\*** iz odabranog seta ( $IC_{50} = 0,09 \mu M$ , **Tabela P1**, Prilozi), prisustvo etil estra sa sternim svojstvima i sulfhidroksamske grupe (donor vodonične veze) je identifikovano kao bitno za ispoljavanje COX-2 inhibitorne aktivnosti i opisano je varijablom v456: O-TIP na rastojanju 9,60-10,00 Å. Kod ovog jedinjenja varijabla v519: N1-TIP, sa pozitivnim uticajem na aktivnost, se formira na rastojanju 13,20-13,60 Å između sterne probe i probe donora vodonične veze (probe koja identifikuje akceptora vodonične veze u strukturi jedinjenja **16\***) (**Slika 20b**).

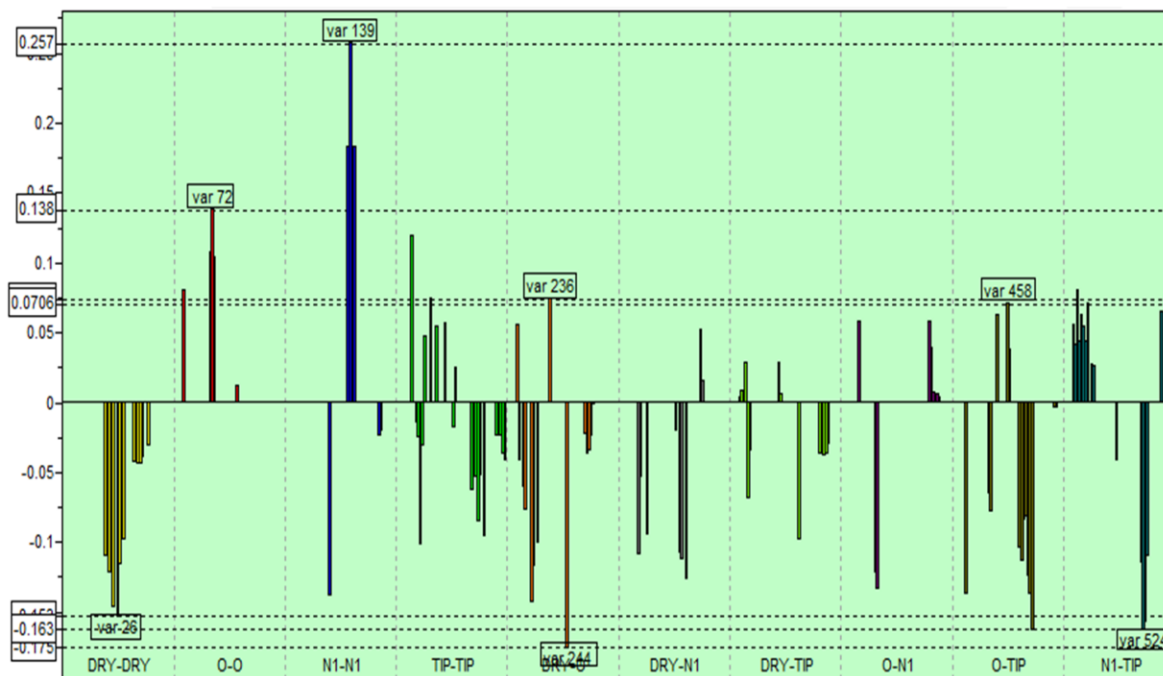
Prisustvo hidrofobne probe (u okolini benzenovog prstena) i probe donora vodonične veze (opisuje akceptora vodonične veze -NH iz sulfonamidskog ostatka) na rastojanju 3,60-4,00 Å (v279: DRY-N1) ima negativan uticaj na ispoljavanje COX-2 inhibitorne aktivnosti, što je zapaženo na najmanje aktivnom jedinjenju iz ovog klastera (jedinjenje **13\***,  $IC_{50} = 35,2 \text{ mM}$ , **Tabela P1**, Prilozi). Ova negativna varijabla nije prisutna u aktivnijim jedinjenjima iz ovog klastera. Hidrofobni region oko benzenovog prstena formira negativnu varijablu sa sternim centrom (metil grupa) na rastojanju 11,20-11,60 Å (v352: DRY-TIP) (**Slika 20c**). Zapaža se da uvođenje voluminozne grupe unutar sulfhidroksamskog ostatka negativno utiče na COX-2 inhibitornu aktivnost.



**Slika 20.** COX-2 3D-QSAR model za a) jedinjenje **12\***, b) jedinjenje **16\*** i c) jedinjenje **13\***; DRY probe su označene žutom, TIP probe zelenom, O probe crvenom i N1 probe plavom bojom; pozitivne interakcije su prikazane crvenim linijama, a negativne interakcije plavim linijama

#### 4.1.1.2. Interpretacija kreiranog 5-LOX 3D-QSAR modela

Izdvojene najznačajnije varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na inhibiciju 5-LOX enzima prikazane su na **Slici 21** i u **Tabeli P4** (Prilozi). Najvažnije pozitivne varijable su: v72 (O-O), v139 (N1-N1), v236 (DRY-O) i v458 (O-TIP). Najvažnije negativne varijable su: v26 (DRY-DRY), v244 (DRY-O) i v524 (N1-TIP).

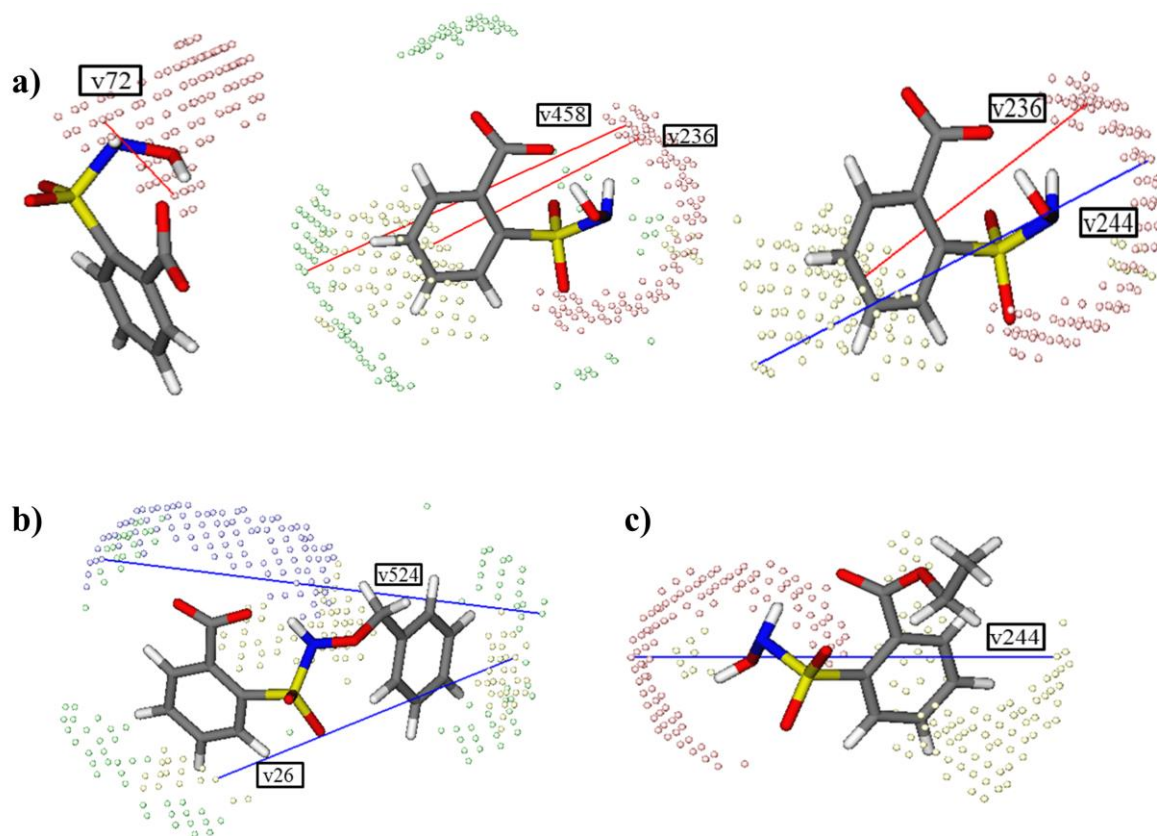


**Slika 21.** Dijagram PLS koeficijenta za 5-LOX 3D-QSAR model sa označenim najznačajnijim pozitivnim i negativnim GRIND varijablama

Kod najaktivnijeg 5-LOX inhibitora iz odabranog seta jedinjenja (jedinjenje **11\***,  $IC_{50} = 0,2 \mu M$ , **Tabela P1**, Prilozi) javlja se interakcija između dva vodonično-akceptorska polja na rastojanju 7,20-7,60 Å (v72: O-O) koja je važna za ispoljavanje 5-LOX inhibitorne aktivnosti. Pozitivna varijabla v236 (DRY-O) se formira između hidrofobne probe (oko benzenovog prstena) i probe akceptora vodonične veze (donor vodonične veze u okviru sulfhidroksamskog ostatka jedinjenja) na rastojanju 8,00-8,40 Å. Povećanje distance između ove dve probe ima negativan uticaj na ispoljavanje 5-LOX aktivnosti (v244: DRY-O, negativna varijabla). Sterne osobine benzenovog prstena i proba koja identifikuje donore vodonične veze (oko sulfhidroksamske grupe) na optimalnoj udaljenosti (10,40-10,80 Å) stvaraju značajnu pozitivnu varijablu v458: O-TIP (**Slika 22a**).

Kod manje aktivnog 5-LOX inhibitora iz odabranog seta (jedinjenje **12\***,  $IC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$ , **Tabela P1**, Prilozi), prisutna je negativna v26 (DRY-DRY) varijabla koja se formira između dva hidrofobna centra. Došlo se do zaključka da je prisustvo hidrofobnog i voluminoznog supstituenta važno za dobru 5-LOX inhibitornu aktivnost, međutim, prisustvo hidrofobne grupe unutar sulfhidroksamskog ostatka negativno utiče na aktivnost. Prisustvo fenil grupe (sterna proba) i grupe koja je donor vodonične veze (karboksilna grupa) čini negativnu varijablu v524: N1-TIP i utiče nepovoljno na aktivnost (**Slika 22b**).

Kod jedinjenja **16\*** ( $IC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$ , **Tabela P1**, Prilozi) prisustvo probe koja identifikuje donore vodonične veze unutar jedinjenja (sulfhidroksamski ostatak) i sterne probe (oko benzenovog prstena) na rastojanju 11,20-11,60 Å (v244: DRY-O) ima negativan uticaj na ispoljavanje 5-LOX inhibitorne aktivnosti (**Slika 22c**).



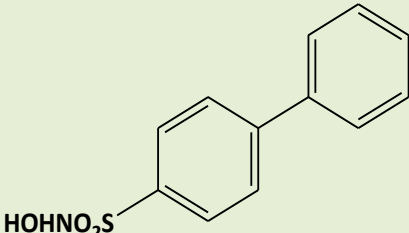
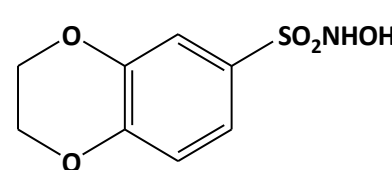
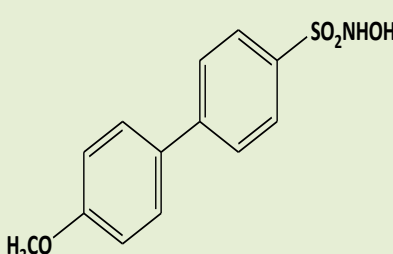
**Slika 22.** 5-LOX 3D-QSAR model za a) jedinjenje **11\***, b) jedinjenje **12\*** i c) jedinjenje **16\***; DRY probe su označene žutom, TIP probe zelenom, O probe crvenom i N1 probe plavom bojom; pozitivne interakcije su prikazane crvenim linijama, a negativne interakcije plavim linijama

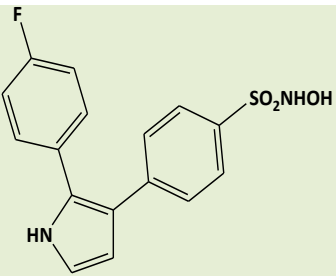
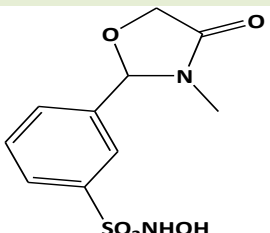
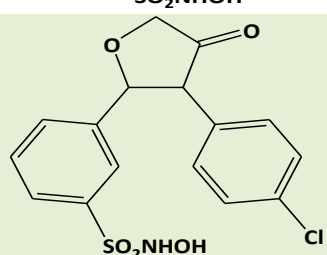
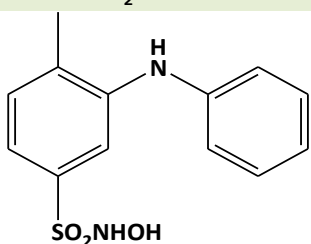
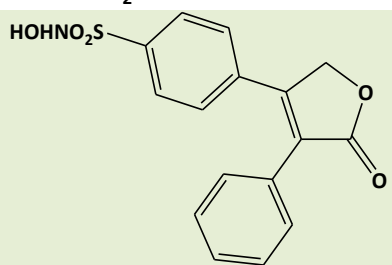
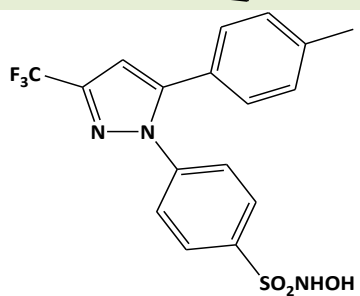
Domen primenljivosti (AD) razvijenih 3D-QSAR modela definisan je korišćenjem *leverage* metode. *Williams*-ovi dijagrami za razvijene COX-2 i 5-LOX modele su prikazani na **Slici P2** (Prilozi). Na osnovu *Williams*-ovog dijagrama se može zaključiti da nije bilo odstupanja, tj. sva testirana jedinjenja (jedinjenja iz odabranog seta i novodizajnirana jedinjenja) su bila unutar domena primenljivosti.

#### 4.1.2. Dizajn novih dualnih inhibitora COX-2 i 5-LOX enzima

Dizajnirano je 9 novih jedinjenja (**Tabela 4**) sa potencijalnom dualnom COX-2 i 5-LOX inhibitornom aktivnošću na osnovu podataka iz sprovedene 3D-QSAR studije. Kreirani COX-2 i 5-LOX 3D-QSAR modeli su korišćeni za predviđanje aktivnosti *in silico* dizajniranih jedinjenja i identifikaciju onih sa potencijalnom dualnom inhibicijom COX-2 i 5-LOX enzima.

**Tabela 4.** Strukture novodizajniranih jedinjenja sa predviđenim pIC<sub>50</sub> vrednostima (COX-2 i 5-LOX)

Naziv jedinjenja	Struktura	Predviđena vrednost pIC <sub>50</sub> (COX-2)	Predviđena vrednost pIC <sub>50</sub> (5-LOX)
<b>1f</b> (jedinjenje 17)		5,694	5,443
<b>1g</b> (jedinjenje 18)		6,222	6,270
<b>1h</b> (jedinjenje 19)		5,317	5,431

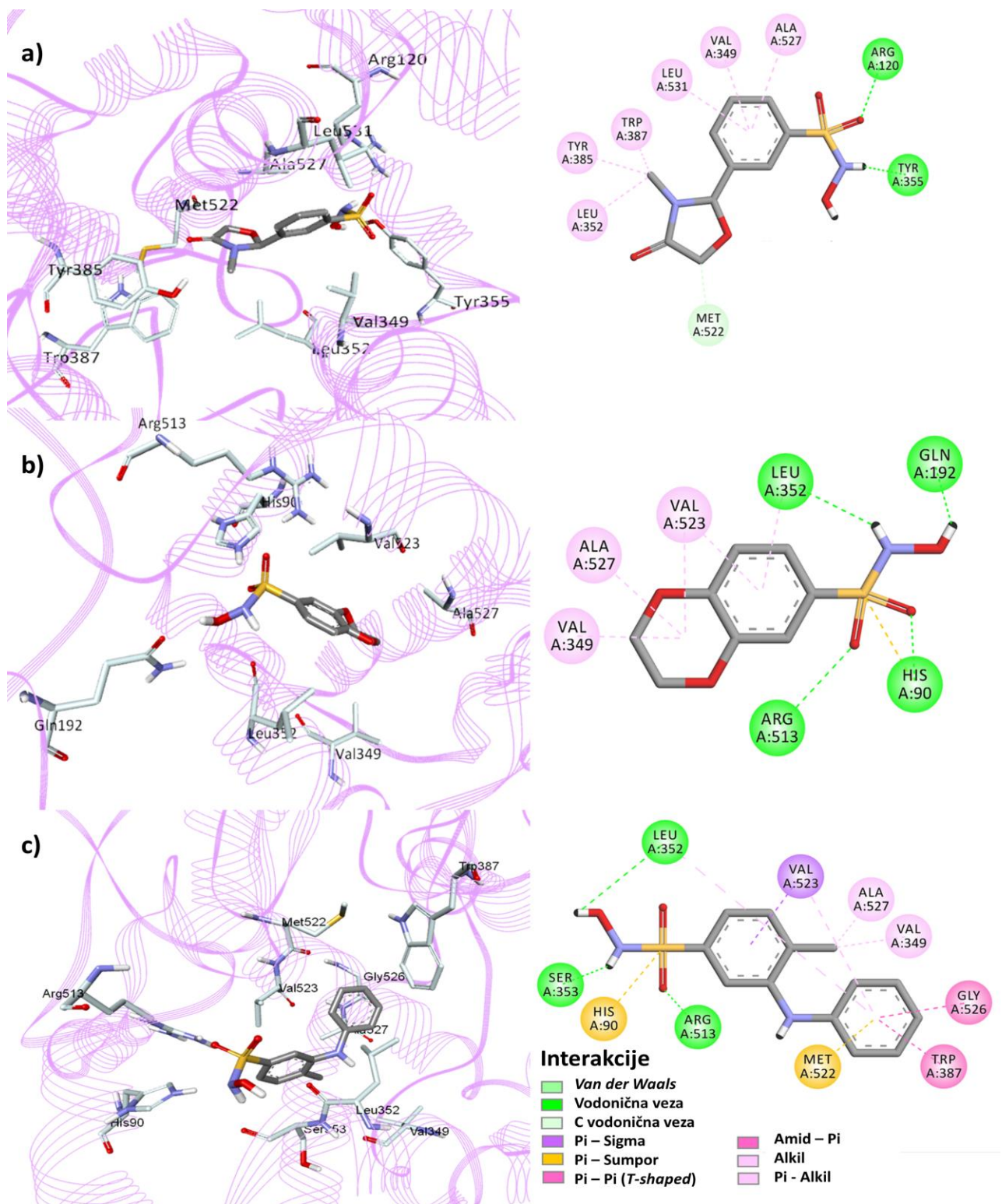
Naziv jedinjenja	Struktura	Predviđena vrednost pIC <sub>50</sub> (COX-2)	Predviđena vrednost pIC <sub>50</sub> (5-LOX)
1i		6,251	6,059
1j		6,100	6,160
1k		5,750	5,634
1l		6,360	6,272
1m		5,403	5,764
1n		5,921	5,052

Na osnovu sprovedene 3D-QSAR studije, zaključeno je da je prisustvo hidrofobnog centra (benzenov prsten) i grupe koja je donor vodonične veze (sulfhidroksamska grupa) važno za ispoljavanje COX-2 i 5-LOX inhibitorne aktivnosti. Ove funkcionalne grupe su prisutne u najaktivnijem COX-2 (jedinjenje **12\***) i 5-LOX inhibitoru (jedinjenje **11\***) iz odabranog seta jedinjenja za razvoj modela. Visoka COX-2 inhibitorna aktivnost jedinjenja **12\*** i **16\*** je povezana sa prisustvom sternog centra i grupe koja je donor vodonične veze (sulfhidroksamski ostatak) na optimalnom rastojanju (pozitivna varijabla v456: O-TIP; 9,60-10,00 Å). Za dobru aktivnost ovih jedinjenja zaslužno je i prisustvo sternog centra i grupe koja je akceptor vodonične veze, a koji se nalaze na optimalnom rastojanju 13,20-13,60 Å i opisani su varijablom v519: N1-TIP. Visoka 5-LOX inhibitorna aktivnost jedinjenja **11\*** (najaktivniji 5-LOX inhibitor) se dovodi u vezu sa prisustvom dve grupe koje su donori vodonične veze, prisustvom hidrofobnog, sternog centra (benzenov prsten) i grupe koja je donor vodonične veze, a nalaze se na optimalnom rastojanju, što je u skladu sa dobijenim 3D-QSAR rezultatima (pozitivne varijable: v72: O-O, v236: DRY-O i v458: O-TIP). Na osnovu svih prethodno dobijenih rezultata sprovedene 3D-QSAR studije, dizajnirana su jedinjenja koja će potencijalno biti dualni COX-2 i 5-LOX inhibitori. Novodizajnirana jedinjenja **1f (jedinjenje 17)**, **1g (jedinjenje 18)**, **1h (jedinjenje 19)**, **1i**, **1j**, **1k**, **1l**, **1m** i **1n** poseduju hidrofobni centar (benzenov prsten) direktno povezan sa sulfhidroksamskom grupom (donor vodonične veze). Razvijeni 3D-QSAR modeli su korišćeni i za predviđanje COX-2 i 5-LOX inhibitorne aktivnosti novodizajniranih jedinjenja. Predviđene aktivnosti pIC<sub>50</sub> za najaktivnije inhibitore COX-2 enzima (jedinjenje **12\***) i 5-LOX enzima (jedinjenje **11\***) bile su 6,278 i 6,520. Predviđena COX-2 pIC<sub>50</sub> vrednost za novodizajnirano jedinjenje **1l** (6,360) bila je viša od COX-2 pIC<sub>50</sub> vrednosti najaktivnijeg jedinjenja iz testiranog seta jedinjenja (jedinjenje **11\***, pIC<sub>50</sub> = 5,957), što se može objasniti uvođenjem grupe koja je donor vodonične veze (sulfhidroksamska grupa) i sternog centra (dva benzenova prstena) na optimalnom rastojanju.

## 4.2. Molekulski doking

### 4.2.1. Enzimi COX-1 i COX-2

Primenom molekulskih doking eksperimenata novodizajniranih jedinjenja unutar vezivnih mesta COX-1 i COX-2 enzima procenjena je COX-2 selektivnost istih. RMSD (*Root Mean Square Deviation*) vrednost između ko-kristalnog liganda i dokovanog liganda je iznosila 2 Å, što je dokaz da je doking studija bila validna u oba slučaja (COX-1, ko-kristalni ligand: mofezolak, RMSD = 0,586 Å; COX-2, ko-kristalni ligand: SC-558, RMSD = 0,9052 Å). Na **Slici 23** su prikazani položaji potencijalno najaktivnijih novodizajniranih jedinjenja **1j**, **1g** i **1l** unutar aktivnog mesta COX-2 enzima.



**Slika 23.** Prikaz vezivnih poza novodizajniranih jedinjenja a) **1j**, b) **1g**, c) **1l** unutar aktivnog mesta COX-2 enzima; 3D prikaz (levo), 2D prikaz interakcija ligand - COX-2 enzim (desno)

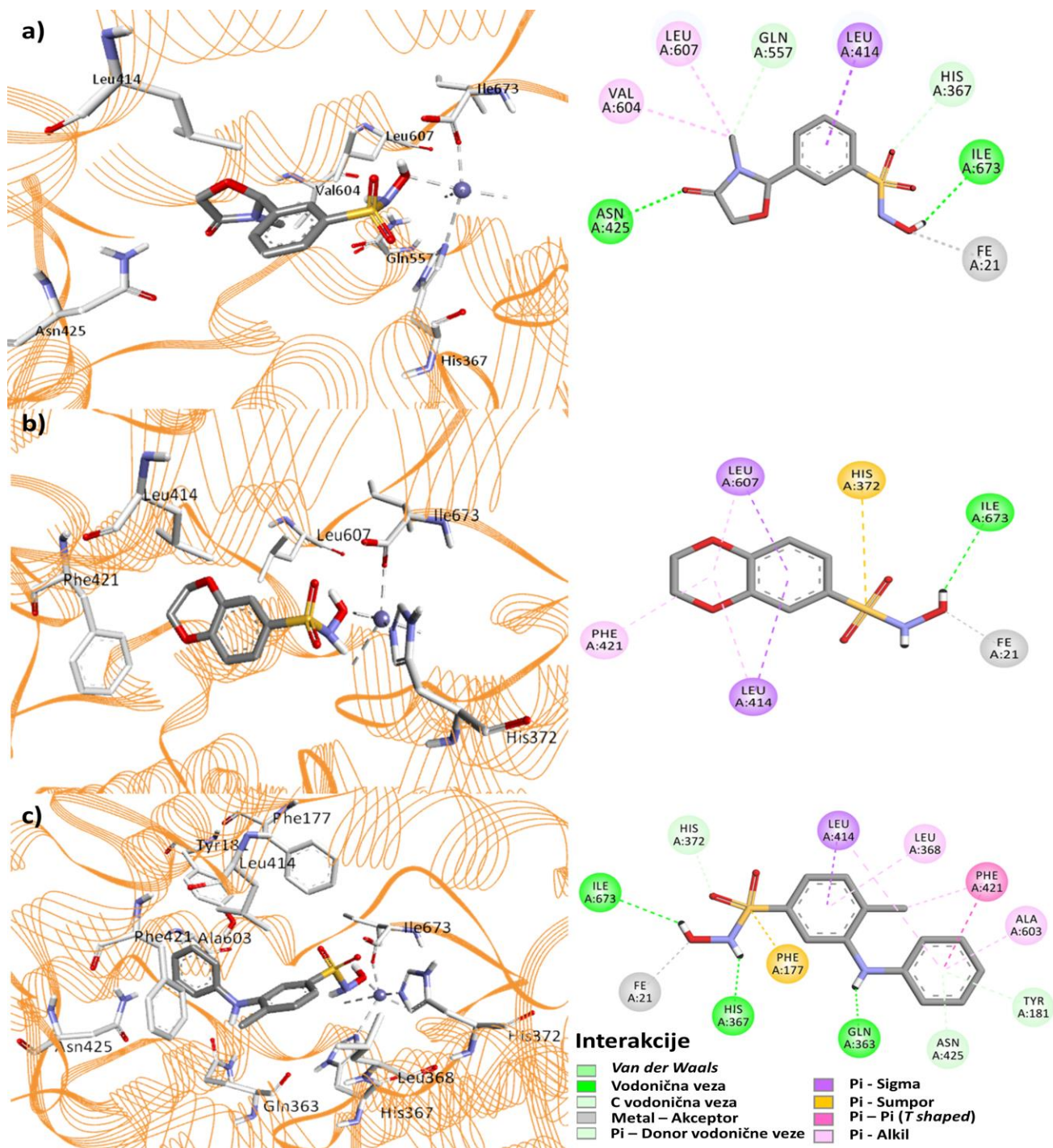
Odabrana kristalna struktura COX-2 enzima (PDB kod: 1CX2) predstavlja COX-2 enzim u kompleksu sa selektivnim inhibitorom SC-558, koji ima 1900 puta veću selektivnost ka COX-2 u odnosu na COX-1 enzim. Inhibitor SC-558 zauzima hidrofobnu šupljinu (Tyr385, Trp387, Ser530) aktivnog centra COX-2 enzima. Sulfonamidska grupa SC-558 stupa u interakciju sa aminokiselinama His90 (vodonična veza sa jednim od atoma kiseonika), Arg513 (vodonična veza sa drugim kiseonikom), Phe518 (vodonična veza sa azotom amida) i aminokiselinom Gln192 koja je odgovorna za selektivnost <sup>26</sup>.

Sprovedena je COX-1 i COX-2 doking studija novodizajniranih jedinjenja sličnog skeleta (derivati sulfhidroksamske kiseline). Jedinjenja **1f**, **1g**, **1h**, **1i**, **1j**, **1k**, **1l**, **1m** i **1n** stupaju u interakciju sa aminokiselinama bočnog džepa COX-2 enzima na isti način kao i ko-kristalni ligand SC-558. Sulfhidroksamska grupa ovih jedinjenja je pozicionirana u blizini bočnog džepa COX-2 enzima koji se sastoji od aminokiselina His90, Arg513, Phe518, Gln192 i Ser353. Aromatična regija jedinjenja **1g** formira hidrofobne interakcije sa aminokiselinom Val523 koja je karakteristična za COX-2 enzim i omogućava pristup bočnom džepu. Sulfhidroksamska grupa se inkorporira unutar bočnog džepa gde formira značajne interakcije po tipu vodoničnih veza sa aminokiselinama His90, Arg513, Gln192 i Leu352. U slučaju jedinjenja **1l** nesupstituisana fenil grupa je potpuno umetnuta u hidrofobni džep COX-2 enzima i okružena je aminokiselinama Ser530, Met522, Phe518, Tyr385, Leu384 i Trp387. Fenil grupa koja je vezana za sulfhidroksamsku grupu stupa u hidrofobnu interakciju sa aminokiselinom Val523, dok je sulfhidroksamski ostatak umetnut u bočni džep i stupa u interakciju (vodonične veze) sa aminokiselinama His90 (Pi-sumpor), Arg513, Ser353 i Leu352, koje su važne za COX-2 selektivnost.

Dokingom novodizajniranih jedinjenja u COX-1 enzim (PDB kod: 5WBE) nisu zapažene značajne intermolekulske interakcije (**Slika P3**, Prilozi). Jedan od razloga niskog afiniteta novodizajniranih jedinjenja za COX-1 enzim može biti njihova veličina. Jedinjenja **1j**, **1g** i **1l** nisu ostvarila interakcije sa aminokiselinama u bočnom džepu enzima (His90, Phe518, Arg513) koje su važne za selektivnost COX-1/COX-2. U slučaju dokinga ko-kristalnog liganda mofezolaka (selektivni COX-1 inhibitor) u COX-1 enzim, vrednost CHEMPLP skora je bila 68,87. Za novodizajnirana jedinjenja **1j**, **1g** i **1l** dobijeni su niži skorovi u poređenju sa COX-2 (**Tabela P5**, Prilozi), te se može pretpostaviti da imaju niži afinitet za COX-1 enzim (51,21, 49,77 i 62,53, redom). Na osnovu dobijenih rezultata se pretpostavlja da dizajnirana jedinjenja imaju izvesnu COX-2 selektivnost.

#### 4.2.2. Enzim 5-LOX

Molekulski doking eksperimenti novodizajniranih jedinjenja su primenjeni i unutar vezivnog mesta 5-LOX enzima. Na **Slici 24** su prikazani položaji potencijalno najaktivnijih novodizajniranih jedinjenja **1j**, **1g** i **1l** unutar aktivnog mesta 5-LOX enzima.



**Slika 24.** Prikaz vezivnih poza novodizajniranih jedinjenja a) **1j**, b) **1g**, c) **1l** unutar aktivnog mesta 5-LOX enzima; 3D prikaz (levo), 2D prikaz interakcija ligand – 5-LOX enzim (desno)

Poslednjih godina sintetisano je nekoliko 5-LOX inhibitora kojima je ciljno mesto bio Fe<sup>2+</sup> jon u katalitičkom džepu 5-LOX enzima <sup>166</sup>. Pretpostavlja se da je mehanizam inhibicije 5-LOX enzima posledica koordinacije na nivou gvožđe - ligand, dok sulfhidroksamska grupa oponaša sulfonamidsku grupu koja je prisutna u strukturi velikog broja COX-2 inhibitora. U prethodno sprovedenim studijama je rađen molekularni doking sa poznatim 5-LOX helirajućim inhibitorom – zileutonom, kako bi se procenila interakcija ligand – protein. U prethodno sprovedenoj studiji je izvršen doking zileutona u kristalnu strukturu 5-LOX enzima (PDB kod: 3v99) i došlo se do zaključka da je molekul orijentisan ka hidrofobnoj regiji aktivnog centra 5-LOX enzima, a hidroksiurea zileutona stupa u interakciju sa gvožđem <sup>167</sup>.

Najpre je izvršen molekularni doking prethodno publikovanih dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora <sup>142</sup>, sličnih farmakofornih karakteristika, i aspirina (**Tabela P2, Prilozi**) u cilju ispitivanja načina vezivanja i doking poza, kao i validacije metode, s obzirom na nedostatak kristalnog liganda. Za rangiranje jedinjenja je odabrana ASP (*Astex Statistical Potential*) funkcija vrednovanja jer je u pitanju metalo-enzim. Rezultati dokinga (ASPPF vrednosti), kao i način vezivanja unutar 5-LOX enzima prikazani su u **Tabeli P6** (Prilozi). Dobijena je dobra korelacija ( $R^2 = 0,9473$ ) između eksperimentalno određenih 5-LOX inhibitornih vrednosti (IC<sub>50</sub> vrednosti) i izračunatih skoring funkcija (ASPPF vrednosti) (**Slika P4**, Prilozi). Za jedinjenje **11\***, koje predstavlja najpotentniji 5-LOX inhibitor preuzet iz literature (**Tabela P2**, Prilozi), *in vitro* određena 5-LOX inhibitorna aktivnost iznosi IC<sub>50</sub> = 0,2 μM. Dobijena ASPPF vrednost je 29,493, a pokazano je da sulfhidroksamska grupa jedinjenja **11\*** koordinira gvožđe aktivnog centra 5-LOX enzima. Predviđena vezivna konformacija jedinjenja je bila u skladu sa predviđenom konformacijom zileutona (jedinjenje je bilo orijentisano ka hidrofobnom regionu enzima: Gln557, Leu607 i Phe177). Benzenov prsten ovog jedinjenja formira hidrofobne interakcije sa Leu368 i Leu414, dok terminalna hidroksilna grupa sulfhidroksamata formira vodoničnu vezu sa aminokiselinom Ile673 (**Slika P5**, Prilozi).

Izvršen je doking test derivata sulfhidroksamske kiseline **1a**, **1b** i **1c** unutar aktivnog centra 5-LOX enzima. Na osnovu doking rezultata primećeno je da jedinjenje **1b** ispoljava klasičnu metal – ligand interakciju unutar aktivnog centra 5-LOX enzima, dok se za jedinjenja **1a** i **1c** očekuje da se vežu u blizini Fe<sup>2+</sup> jona (**Slika P6 – P8**). U slučaju jedinjenja **1a**, karboksilni jon stupa u interakciju sa Gln363 (vodonična veza) kao i karboksilatni anjon jedinjenja **11\***.

Izvršen je doking svih novodizajniranih jedinjenja (derivati sulfhidroksamske kiseline) u 5-LOX enzim. Novodizajnirana jedinjenja **1j**, **1f**, **1g** i **1l** formiraju interakciju tipa metal - ligand unutar aktivnog centra 5-LOX enzima zahvaljujući prisustvu sulfhidroksamske grupe u strukturi. Terminalna hidroksilna grupa sulfhidroksamata ima ulogu u heliranju gvožđa aktivnog centra (preko kiseonika), dok atom vodonika hidroksilne grupe formira vodoničnu vezu sa Ile673. Aromatične regije ovih jedinjenja formiraju hidrofobne interakcije sa Leu368 i Leu414. Na osnovu dokingom dobijenih ASPPF vrednosti (**1a**: 25,527, **1b**: 25,107, **1c**: 23,642, **1j**: 32,354, **1f**: 28,656, **1g**: 25,551 i **1l**: 29,881) kao i predviđenih IC<sub>50</sub> vrednosti koje su bile u niskom mikromolarnom opsegu (izračunato preko jednačine prikazane na **Slici P4**, Prilozi) može se zaključiti da su testirana jedinjenja potencijalni 5-LOX helirajući inhibitori.

Doking studijom se došlo do zaključka da jedinjenja **1j**, **1g** i **1l** predstavljaju potencijalno najaktivnije dualne COX-2 i 5-LOX inhibitore iz više razloga. Ova jedinjenja formiraju metal – ligand interakciju unutar aktivnog centra 5-LOX enzima zahvaljujući prisustvu sulfhidroksamske grupe (heliraju gvožđe aktivnog centra), dok su u slučaju dokinga unutar COX-2 enzima stupala u interakciju sa aminokiselinama značajnim za ispoljavanje COX-2 selektivnosti. Način vezivanja unutar aktivnog centra bio je isti kao u slučaju visokoselektivnog COX-2 inhibitora SC-558 (kokristalni ligand). Za ova jedinjenja su izračunate najviše CHEMPLP i ASPFF vrednosti. Dobijeni rezultati su bili u skladu sa rezultatima 3D-QSAR studije kojom je pokazano da je prisustvo grupe koja je donor vodonične veze (sulfhidroksamska grupa) i hidrofobnog regiona (aromatični deo) bitno za ispoljavanje 5-LOX inhibitorne aktivnosti (značajna pozitivna varijabla v236: DRY-O). 3D-QSAR studijom je pokazano da je za dobru COX-2 inhibitornu aktivnost od velike važnosti prisustvo sternog centra (aromatična regija) i grupe koja je donor vodonične veze (sulfhidroksamska grupa) na optimalnom rastojanju (v456: O-TIP), što je u skladu sa rezultatima doking studije. Naime, doking studijom je pokazano da se sulfhidroksamska grupa vezala za bočni džep COX-2 enzima gde ostvaruje značajne interakcije po tipu vodoničnih veza, dok aromatična regija jedinjenja zauzima hidrofobni džep enzima.

### 4.3. ADMET predviđanja

Odabrani parametri za *dataset* jedinjenja i novodizajnirana jedinjenja su izračunati u programu ADMET, a dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 5**.

**Tabela 5.** Odabrani ADMET parametri izračunati za *dataset* i novodizajnirana jedinjenja

Jedinjenje	ADMET_Risk <sup>a</sup>	S+S_Intrins <sup>b</sup>	Vd <sup>c</sup>	Hum_fup% <sup>d</sup>	RuleOf5 <sup>e</sup>	CYP_Risk <sup>f</sup>	Tox_Risk <sup>g</sup>	hERG_Filter <sup>h</sup>
<b>Jedinjenja preuzeta iz literature</b>								
<b>11*</b>	1	7,946	0,243	28,062	0	0	0	Ne (96%)
<b>12*</b>	1,413	0,411	0,165	5,491	0	0,413	0	Ne (96%)
<b>13*</b>	1	4,967	0,223	18,344	0	0	0	Ne (96%)
<b>16*</b>	1	5,593	0,289	18,177	0	0	0	Ne (96%)
<b>Novodizajnirana jedinjenja</b>								
<b>1j</b>	2,089	8,704	0,3	30,201	0	0,089	1	Ne (96%)
<b>1g</b>	2	3,139	0,276	18,854	0	0	1	Ne (96%)
<b>1l</b>	2,063	0,165	0,399	6,023	0	1,241	0	Ne (87%)

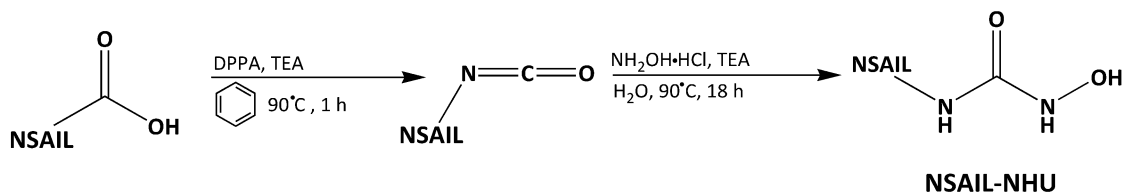
**Legenda:** **a** - potencijalne slabosti jedinjenja; **b** - intrinzična rastvorljivost; **c** - volumen distribucije; **d** - procenat nezvanog jedinjenja u plazmi; **e** - pravilo petice po Lipinskom; **f** - potencijalni metabolički problemi (citohrom P450 enzimi); **g** - potencijalna toksičnost jedinjenja; **h** - kvalitativna procena verovatnoće da je jedinjenje inhibitor kalijumovih hERG kanala kod ljudi.

ADMET predviđanja su izvršena za odabrana jedinjenja iz 3D-QSAR seta (jedinjenja **11**, **12**, **13** i **16**) i za potencijalno najaktivnija novodizajnirana jedinjenja (**1j**, **1g** i **1l**). ADMET\_Risk identifikuje i ukazuje na potencijalne slabosti jedinjenja. Novodizajnirana jedinjenja su imala ADMET\_Risk score manji od 7 (90 % referentnog seta koga čini 2270 komercijalnih lekova iz WDI (*World Drug Index*) ima skor manji od 7). Jedinjenje **1j** je imalo bolju intrinzičnu rastvorljivost (8,704) u poređenju sa *dataset* jedinjenjima (0,411-7,946). CYP\_Risk score ukazuje na potencijalne probleme vezane za metabolizam jedinjenja. Sva testirana jedinjenja su imala CYP\_Risk score niži od 2,5 (prema WDI smernicama prag tolerancije je 2,5). Program ADMET ima upotrebu u proceni toksičnosti *lead* jedinjenja. Parametar TOX\_Risk ukazuje na potencijalnu toksičnost jedinjenja. Jedinjenje **1l** i jedinjenja iz odabranog seta su imala TOX\_Risk vrednost 0. Jedinjenja **1j**, **1g** i **1l** nisu procenjena kao hERG inhibitori. Pravilo petice po Lipinskom je ispoštovano u svim slučajevima (**Tabela 5**).

## 4.4. Sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija jedinjenja 1 - 19

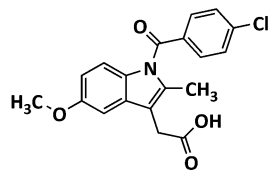
### 4.4.1. Sinteza jedinjenja 1 - 19

Smatra se da zamena karboksilne grupe nesteroidnog antiinflamatornog leka (NSAIL) *N*-hidroksiureom (NHU) dovodi do ispoljavanja 5-LOX inhibitorne aktivnosti, dok bi COX-2 inhibitorna aktivnost mogla biti izgubljena ili zadržana <sup>40</sup>. Odabrana su tri NSAIL-a: (a) indometacin, (b) flurbiprofen i (c) diklofenak (**Šema 1**) kao polazna jedinjenja u sintezi derivata *N*-hidroksiuree (1, 2 i 3, **Šema 1**). Ovi NSAIL su odabrani kao polazna jedinjenja zato što poseduju različiti COX inhibitorni potencijal. Jedan od razloga ovakvog odabira polaznih jedinjenja je ispitivanje uticaja uvedene 5-LOX farmakofore na već postojeći COX inhibitorni potencijal <sup>13</sup>. NSAIL izocijanat (*N*-hidroksiurea derivat NSAIL-a) nastao kao posledica *Curtius*-ovog premeštanja, u reakciji odgovarajućeg NSAIL-a sa difenilfosforazidatom (DPPA), dalje reaguje sa hidrosilaminom, pri čemu se kao krajnji proizvod formira NSAIL-NHU.

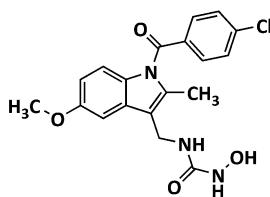


**NSAIL:**

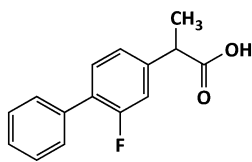
**NSAIL-NHU:**



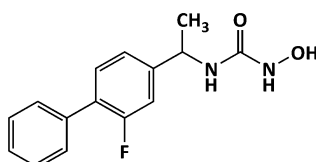
**indometacin**



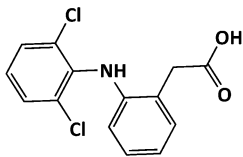
**1**



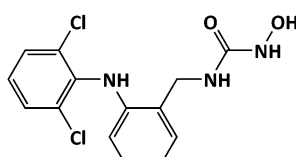
**flurbiprofen**



**2**



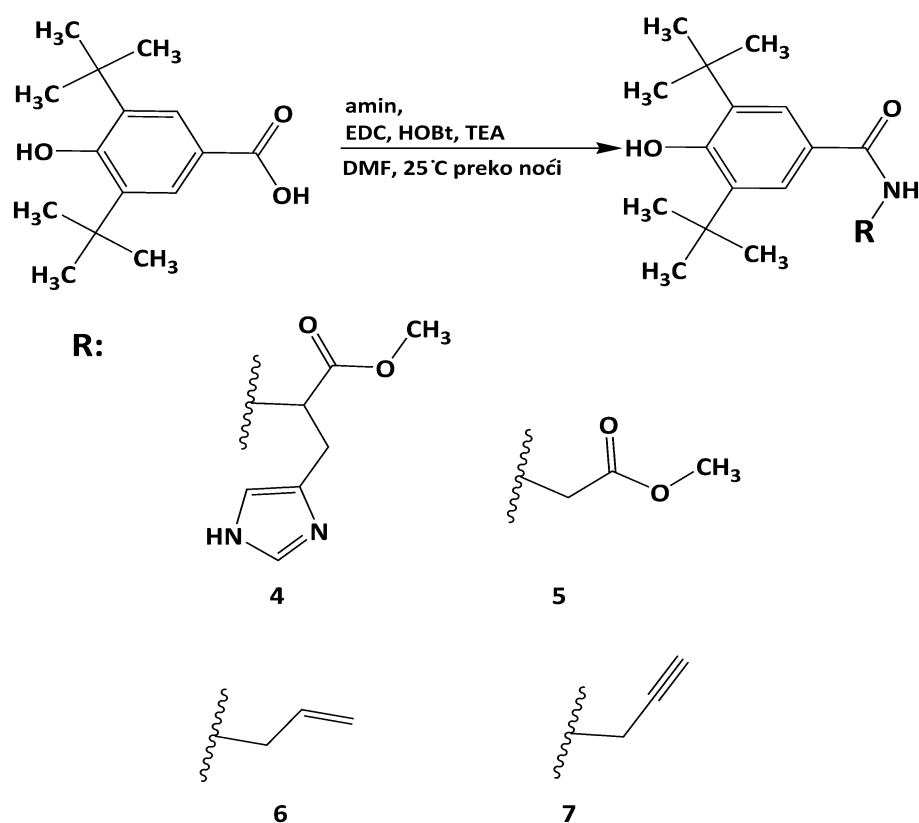
**diklofenak**



**3**

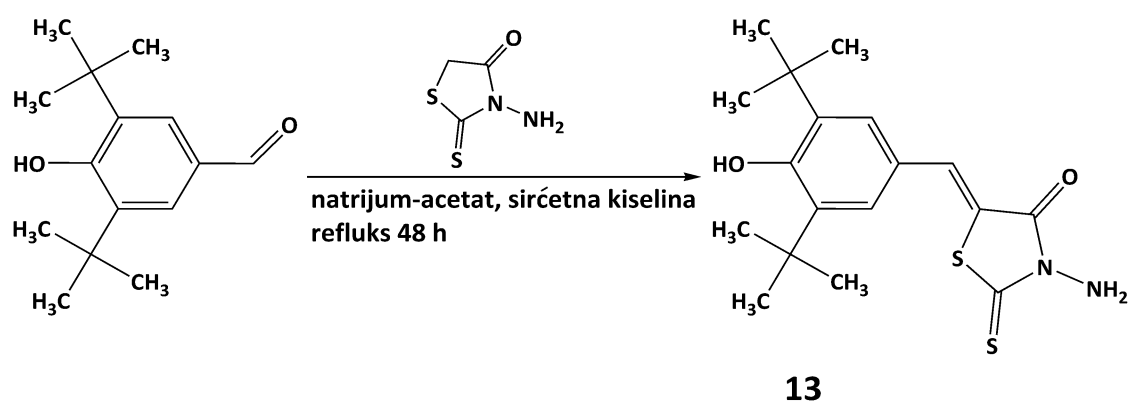
**Šema 1.** Sinteza *N*-hidroksiurea derivata **1**, **2** i **3**

Prethodno sprovedene SAR studije su pokazale da 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksi-benzen supstutuisan na položaju C1 predstavlja osnovni skelet bitan za ispoljavanje COX-2 i 5-LOX inhibitorne aktivnosti. Prisutna fenolna grupa je odgovorna za antioksidativna svojstva i antiinflamatornu aktivnost <sup>168, 169</sup>. Sintetisani su i ispitani brojni derivati 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzojeve kiseline, pri čemu su promene u strukturi pretežno bazirane na derivatizaciji karboksilne grupe, a pojedini derivati su istaknuti kao dobri antiinflamatorni agensi <sup>168</sup>. Cilj ove disertacije je bio da istraži efekat uvođenja aminokiselina u bočni lanac (derivati **4** i **5**) na COX-2 i 5-LOX inhibitornu aktivnost. Sinteza jedinjenja **5** (*N*-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzoil)glicin metil estar) je prethodno publikovana. Ovo jedinjenje je bilo polazno jedinjenje za sintezu metil-5-(3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksifenil)-1-tetrazolacetata (inhibitora enzima aldoza reduktaze) <sup>170</sup>. Jedinjenja **6** i **7** su dizajnirana i sintetisana kako bi se ispitalo da li uvođenje nezasićene dvostruke i trostruke veze u bočni lanac ima uticaja na ispoljavanje COX-2 i 5-LOX inhibitorne aktivnosti. Jedinjenje slične strukture, tebufelon, ispoljava odličnu COX-2 i 5-LOX inhibitornu aktivnost i trenutno je u fazi kliničkih ispitivanja <sup>168</sup>. Jedinjenja **4**, **5**, **6** i **7** (Šema 2) su sintetisana u reakcijama 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzojeve kiseline sa L-histidin metil estrom, glicin metil estrom, alilaminom i propargilaminom. Sinteze su vršene u prisustvu 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC), hidroksibenzotriazola (HOBt) i trietilamina (TEA) prema literaturnim procedurama <sup>171</sup>.



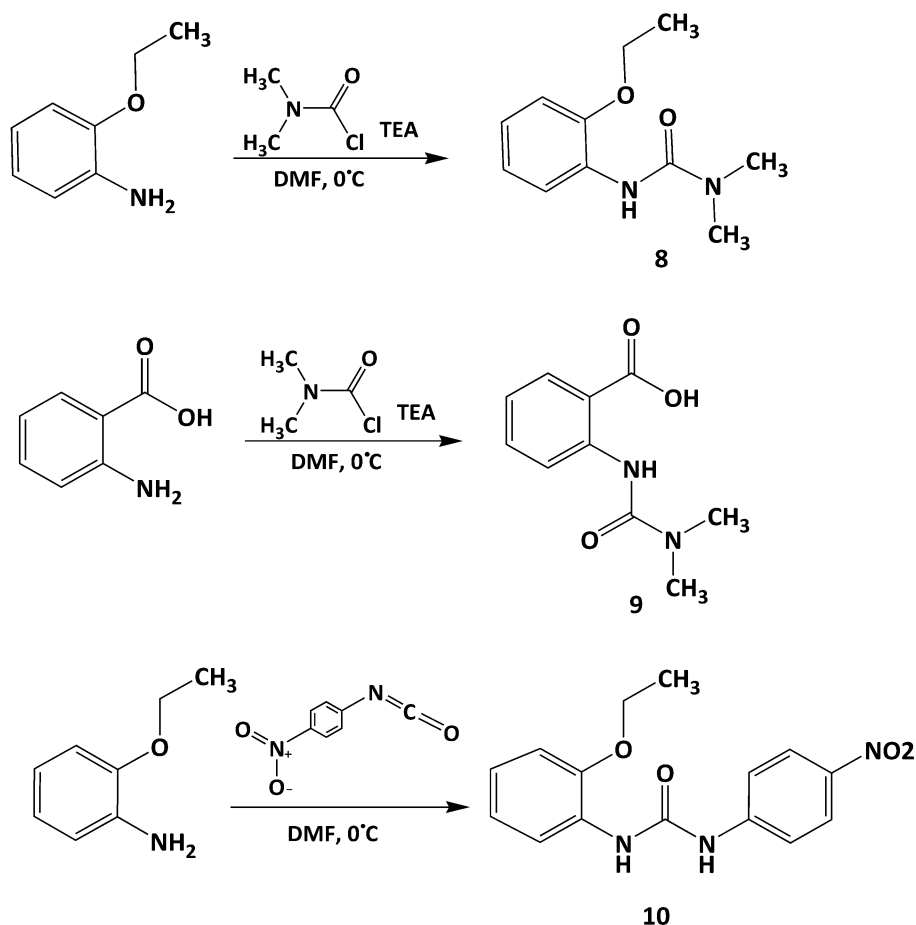
Šema 2. Sinteza amida 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzojeve kiseline

Derivati 2,6-di-*tert*-butilfenola vezani za različite heterocikluse, direktno ili ugljovodoničnim lancem, su u velikoj meri proučavani kao potencijalni COX-2 i 5-LOX inhibitori <sup>45</sup>. Nažalost, biciklični derivati 2,6-di-*tert*-butilfenola su ispoljili nisku bioraspoloživost i slabu rastvorljivost u vodi koja je posledica visoke lipofilnosti. Uvođenjem heterociklusa koji sadrže jonizujuće grupe postignuta je znatno bolja bioraspoloživost. Sintetisani su derivati benzilidenoksazola, -tiazola i -imidazola i mnogi od njih su bili dobri inhibitori oba enzima, dok su neki pokazali aktivnost na životinjskim zapaljenskim modelima nakon oralne primene. Jedinjenje **13** pripada grupi derivata 2,6-di-*tert*-butilfenola sa tiazolidinskim prstenom u bočnom lancu <sup>172</sup>. Ovo jedinjenje je sintetisano *Knoevenagel*-ovom kondenzacijom 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroksibenzaldehida sa 3-aminorodaninom (**Šema 3**).



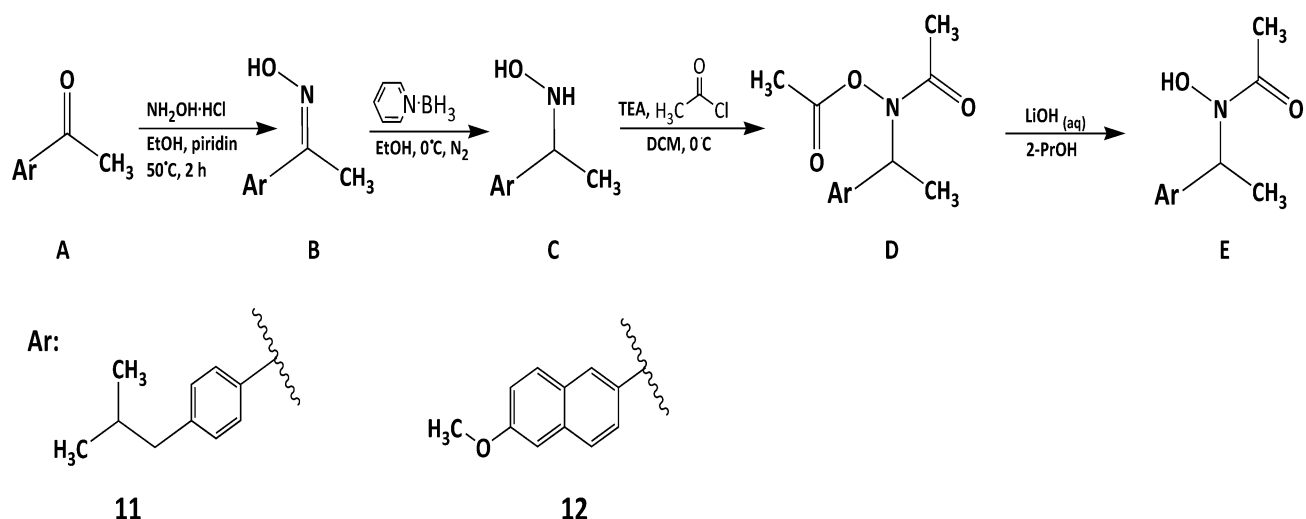
**Šema 3.** Sinteza jedinjenja **13**

Jedan od pristupa u razvoju 5-LOX inhibitora može biti i uvođenje karbamida (uree) <sup>173</sup>, grupe koja je često prisutna u strukturi jedinjenja sa dualnom inhibitornom aktivnošću prema enzimu COX-2 i epoksidnoj hidrolazi (*sEH* – *soluble epoxide hydrolase*) <sup>174</sup>. Derivati uree **8**, **9** i **10** (**Šema 4**) su sintetisani prema literaturnom postupku <sup>175</sup>. Jedinjenja **8** i **9** su sintetisana u reakciji dimetilkarbamoil-hlorida sa 2-etoksianilinom i antranilnom kiselinom <sup>175</sup>. Jedinjenje **8** je prethodno sintetisano od strane *Socha* i saradnika u cilju testiranja herbicidne aktivnosti <sup>176</sup>. Jedinjenje **9** je prethodno sintetisano na sličan način od strane *Goldhamer* i saradnika u reakciji antranilne kiseline sa *N,N*-dimetilkarbamoil-hloridom u prisustvu trietilamina, kako bi se ispitaio uticaj prisustva baze na formiranje krajnjeg proizvoda <sup>177</sup>. Jedinjenje **9** je prethodno sintetisano i drugačijim postupkom, u reakciji anhidrida antranilne kiseline i dimetilamina <sup>178</sup>. Jedinjenje **10** je sintetisano u reakciji 2-etoksianilina sa 4-nitrofenilizocijanatom.



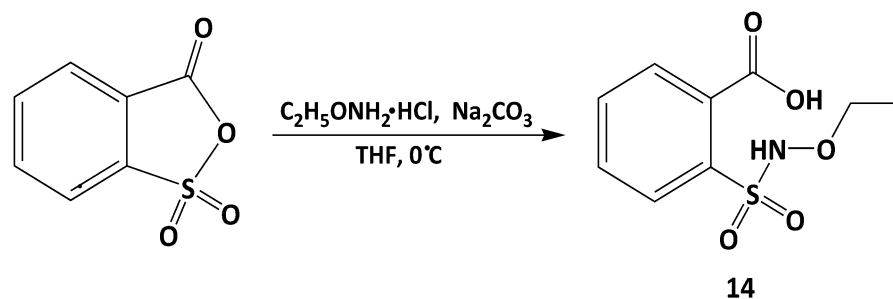
**Šema 4.** Sinteza jedinjenja **8**, **9** i **10**

Jedan od puteva razvoja 5-LOX inhibitora je i uvođenje hidroksamske kiseline u strukturu različitih jedinjenja. Rezultati studija su ukazali na to da jedinjenja koja poseduju relativno male supstituente (metil grupa) vezane za karbonilni deo hidroksamske kiseline i značajno veće grupe vezane za azot (u literaturi poznate kao hidroksamske kiseline tipa B) poseduju bolji farmakokinetički profil od klasičnih hidroksamskih kiselina. Jedinjenja **11** i **12** su sintetisana prema literaturnom postupku (Šema 5) <sup>179</sup>. Modifikovani NSAIL ketoni (analozi ibuprofena i naproksena) odabrani su kao polazna jedinjenja u sintezi i dalje su prevedeni u odgovarajuće oksime. Na taj način konačni proizvod zadržava NSAIL skelet, što mu daje potencijal da inhibira COX-2 enzim. Dobijeni oksim je redukovano upotrebom boran-piridin kompleksa, a nastali hidroksilamin je dalje tretiran acetil-hloridom da bi se dobio *N,O*-diacetat. Krajnji proizvod je dobijen nakon selektivne eliminacije *O*-acetata sa litijum-hidroksidom (LiOH). Derivati hidroksamske kiseline tipa B su prethodno sintetisani kao inhibitori 5-LOX enzima <sup>179</sup>.



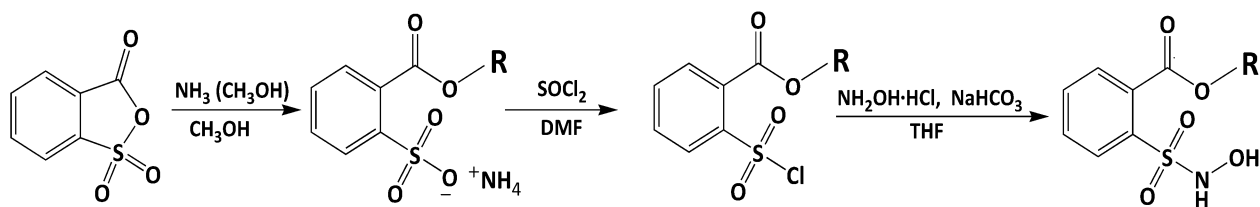
### Šema 5. Sinteza jedinjenja 11 i 12

Na primeru aspirina je pokazano da se zamenom acetoksi grupe (OAc) sulfhidroksamskom grupom (SO<sub>2</sub>NHOR; R = H, CH<sub>3</sub>, benzil) dobijaju jedinjenja sa dualnom COX-2 i 5-LOX inhibitorskom aktivnošću. Smatra se da je SO<sub>2</sub>NHOR supstituent COX-2 farmakofora (slično kao SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> kod celekoksiba), a ovaj supstituent ima i ulogu u heliranju gvožđa aktivnog centra 5-LOX enzima zbog prisustva *N*-hidroksiuree u zileutonu. Analog aspirina, jedinjenje **14** je sintetisano prema literaturnom postupku iz cikličnog anhidrida 2-sulfobenzoeve kiseline (Šema 6) <sup>142</sup>.



### Šema 6. Sinteza jedinjenja 14

Derivati sulfhidroksamske kiseline, jedinjenja **15** i **16** (Šema 7), su sintetisani prema postupku iz literature <sup>180</sup>.

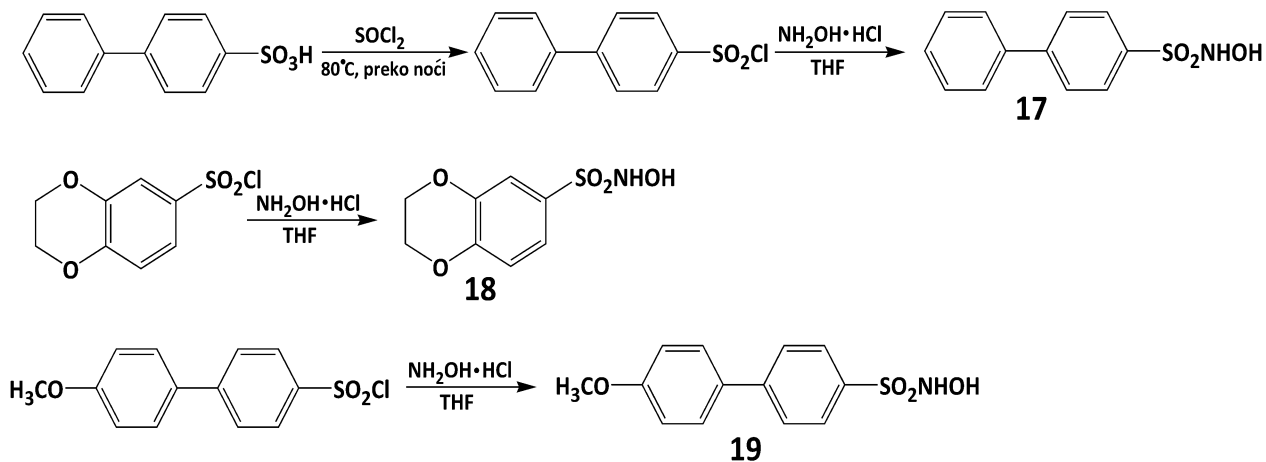


R : —CH<sub>3</sub>                    **15**

—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>        **16**

Šema 7. Sinteza jedinjenja **15** i **16**

Prethodno dizajnirana jedinjenja **17**, **18** i **19** su sintetisana prema proceduri iz literature <sup>180</sup> iz odgovarajućeg hloriga kiseline do sulfhidroksamske kiseline (jedinjenja **18** i **19**), dok je jedinjenje **17** nastalo kao proizvod dvostepene reakcije u kojoj se najpre iz odgovarajuće sulfonske kiseline dobija hloriga kiseline <sup>181</sup>, a u drugoj fazi reakcije se dobija proizvod - sulfhidroksamska kiselina (Šema 8).



Šema 8. Sinteza jedinjenja **17**, **18** i **19**

#### 4.4.2. Strukturna karakterizacija novosintetisanih jedinjenja 1 – 19

Fizičko-hemijska karakterizacija novosintetisanih jedinjenja 1 – 19 izvršena je određivanjem temperature topljenja, IR spektroskopijom, tandem masenom spektrometrijom (MS/MS), NMR spektroskopijom ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) (Slike P9 – P27, Prilozi) i određivanjem tačnih masa masenom spektrometrijom visoke rezolucije.

*N'*-hidroksi-*N*-[(1-(4-hlorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-3-indolil)metil]urea (1). Svetlo žuti kristalan prašak. **Prinos:** 21%. **Temperatura topljenja:** 97–99 °C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 2,42 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3,82 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,55 (2H, d,  $J = 5,6$ ,  $\text{CH}_2$ ), 5,99 (1H, s, R-NH-C(=O)NHOH), 6,14 (1H, s, R-NH-C(=O)NHOH), 6,66–7,67 (7H, m, Ar-H), 6,80–6,84 (1H, m, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 13,08, 33,67, 55,84, 101,50, 111,87, 114,98, 115,84, 129,21, 130,00, 131,00, 131,24, 133,69, 136,34, 139,56, 156,12, 161,07, 168,43.  $m/z = 388,3$  ( $M^{+1}$ ), 312,17, 139,07, 111,12, 129,16, 355,17, 93,22. IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 752,46, 1114,01, 1220,50, 1361,33, 1477,36, 1548,26, 1654,49, 2937,15, 3207,02, 3387,09. HRMS-HESI:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato = 388,10586; pronađeno = 388,10549.

*N'*-hidroksi-*N*-(2-etil-(2-fluorobifenil-4-il))urea (2). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 36,5%. **Temperatura topljenja:** 121,5–123 °C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1,43 (3H, d,  $J = 6,8$ ,  $\text{CH}_3$ ), 4,89 (1H, t,  $J = 7,2$ , CH), 7,12 (1H, d,  $J = 8,4$ , R-NH-C(=O)-NHOH), 7,25–7,54 (8H, m, Ar-H), 8,40 (1H, s, R-NH-C(=O)-NHOH), 8,65 (1H, s, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 21,69, 47,06, 112,85–113,09, 121,97–122,00, 127,06, 127,96–128,12, 129,77–129,81, 134,50, 125,58–125,71, 147,24–147,31, 157,13, 159,57, 159,9.  $m/z = 275,3$  ( $M^{+1}$ ), 199,19, 178,19, 183,18, 152,19, 77,28, 176,14. IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 690,67, 764,75, 826,45, 1076,97, 1411,28, 1548,56, 2161,77, 3250,36, 3407,48. HRMS-HESI:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato = 275,11903; pronađeno = 275,11883.

*N'*-hidroksi-*N*-[(2-(2,6-dihloroanilino)fenil)metil]urea (3). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 24%. **Temperatura topljenja:** 163–165 °C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 4,34 (2H, d,  $J = 6,4$ ,  $\text{CH}_2$ ), 6,11 (1H, d,  $J = 8$ , H-f), 6,77 (1H, t,  $J = 7,2$ , H-d), 7,01 (1H, t,  $J = 7,6$ , H-f'), 7,25 (2H, m, H-c, H-e), 7,42 (1H, t,  $J = 6$ , R-NH-C(=O)-NHOH), 7,54 (2H, d,  $J=8$ , H-a', H-e'), 7,90 (1H, s, NH), 8,57 (1H, s, R-NH-C(=O)-NHOH), 8,68 (1H, s, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 40,00, 114,27, 119,60, 126,94, 128,15, 129,57, 130,89, 127,29, 132,64, 137,55, 143,19, 162,49.  $m/z = 326,2$  ( $M^{+1}$ ), 214,06, 250,04, 179,09, 238,07, 178,07, 151,22. IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 748,44, 1150,93, 1268,44, 1446,45, 1552,85, 1622,11, 2162,30, 3293,12, 3389,55. HRMS-HESI:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  izračunato = 326,04576; pronađeno = 326,04542.

Metil estar 2-(3,5-di-terc-butil-4-hidroksi-benzoilamino)-3-(1H-imidazol-4-il)-propionske kiseline (4). Svetlo sivi kristalni prašak. **Prinos:** 28%. **Temperatura topljenja:** 117–119 °C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1,47 (18H, s, 2x ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ )), 3,20 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3,70 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 4,92 (1H, m, R-CH), 5,55 (1H, s, NH(imidazol)), 6,84 (1H, s, H-d'), 7,56 (1H, s, H-b'), 7,76 (2H, s, H-c, H-e), 8,19 (1H, s,  $\text{C}(=\text{O})\text{NH}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 29,14, 30,16, 34,45, 52,34, 52,91, 115,23, 124,62–124,79, 134,92, 135,75, 157,03, 167,76, 172,35.  $m/z = 402,2$  ( $M^{+1}$ ),

233,02, 170,02, 217,04, 110,11, 149,07, 370,15. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 657,57, 1103,317, 1236,34, 1433,29, 1532,94, 1740,73, 2161,86, 2955,52, 3213,79. **HRMS-HESI: [M+H]<sup>+</sup> izračunato** = 402,23873; **pronađeno** = 402,23797.

*Metil estar (3,5-di-terc-butil-4-hidroksi-benzoilamino)-sirćetne kiseline (5)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 71%. **Temperatura topljenja:** 130–132 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 1,46 (18H, s, 2x (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,80 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 4,24 (2H, d, J = 5,2, CH<sub>2</sub>), 5,57 (1H, s, OH), 6,52 (1H, s, NH), 7,64 (2H, s, H-c, H-e). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 30,15, 34,42, 41,74, 52,40, 124,32, 124,90, 135,98, 157,12, 158,20, 170,85. **m/z** = 320,3 (M<sup>+1</sup>), 260,13, 204,11, 288,13, 244,12, 232,12, 233,16. **m/z** = 322,5 (M<sup>+1</sup>), 232,45, 216,30, 233,50, 321,73, 147,86, 145,95. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 770,60, 888,59, 1203,90, 1433,65, 1639,49, 1745,67, 2161,37, 2954,27, 3298,14, 3619,53. **HRMS-HESI: [M+H]<sup>+</sup> izračunato** = 322,20128; **pronađeno** = 322,20088.

*N-alil-3,5-di-terc-butil-4-hidroksi-benzamid (6)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 80%. **Temperatura topljenja:** 182–183,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 1,46 (18H, s, 2x (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4,08 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5,16–5,28 (2H, m, R-CH=CH<sub>2</sub>), 5,55 (1H, s, NH), 5,95 (1H, m, R-CH=CH<sub>2</sub>), 6,08 (1H, s, OH), 7,61 (2H, s, Ar-H). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 30,18, 34,43, 42,42, 116,34, 124,10, 125,72, 134,66, 135,95, 156,82, 168,05. **m/z** = 290,1 (M<sup>+1</sup>), 232,98, 176,95, 234,03, 216,95, 160,95, 149,02. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 720,05, 923,43, 1143,47, 1233,10, 1433,61, 1539,74, 1630,31, 2952,27, 3243,78, 3624,47. **HRMS-HESI: [M+H]<sup>+</sup> izračunato** = 290,21146; **pronađeno** = 290,21111.

*3,5-di-terc-butil-4-hidroksi-N-prop-2-inil-benzamid (7)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 86,5%. **Temperatura topljenja:** 178,5–180 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 1,46 (18H, s, 2x (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2,27 (1H, s, CH), 4,24–4,26 (2H, m, NHCH<sub>2</sub>), 5,57 (1H, s, OH), 6,14 (1H, s, NH), 7,60 (2H, s, Ar-H). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 29,69, 30,16, 34,43, 71,58, 79,93, 124,23, 124,95, 135,99, 157,08, 167,80. **m/z** = 288,2 (M<sup>+1</sup>), 232,19, 177,17, 203,16, 217,15, 161,16, 176,15. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 683,44, 899,31, 1117,05, 1232,59, 1308,20, 1545,80, 1632,64, 2956,82, 3239,49, 3615,87. **HRMS-HESI: [M+Na]<sup>+</sup> izračunato** = 310, 17775; **pronađeno** = 310,17805.

*N-(2-etoksifenil)-N',N'-dimetilurea (8)*. Svetlobraon kristalan prašak. **Prinos:** 7%. **Temperatura topljenja:** 71,5–72,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 1,44 (3H, t, J = 6,8, CH<sub>3</sub>), 3,04 (6H, s, R-N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,09 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 6,84–6,93 (3H, m, Ar-H), 7,17 (1H, s, NH), 8,19 (1H, m, Ar-H). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm** 14,97, 36,26, 64,12, 110,73, 118,67, 121,17, 121,72, 129,27, 146,83, 155,51. **m/z** = 209,1 (M<sup>+1</sup>), 72,28, 164,12, 46,44, 56,26, 136,16, 44,45. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 737,72, 1043,13, 1245,73, 1449,80, 1531,35, 1666,80, 2931,29, 2978,69, 3447,16. **HRMS-HESI: [M+Na]<sup>+</sup> izračunato** = 231,11040; **pronađeno** = 231,11028.

*2-(3,3-dimetilureido)benzoeva kiselina (9)*. Svetlobraon kristalan prašak. **Prinos:** 12%. **Temperatura topljenja:** 158–159,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 2,98 (6H, s, R-N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6,97–8,48 (4H, m, Ar-H), 10,83 (1H, s, NH), 13,49 (1H, s, R-COOH). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 35,20, 113,78, 117,94, 119,75, 130,37, 133,42, 142,78,

154,13, 169,74.  $m/z$  = 209,1 ( $M^{+1}$ ), 120,11, 72,31, 191,07, 92,16, 146,05, 90,16. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 696,62, 747,54, 1030,68, 1233,39, 1448,61, 1532,39, 1601,52, 2606,81, 2922,45. **HRMS-HESI:  $[M+Na]^+$**  izračunato = 231,07401; pronađeno = 231,07413.

*N*-(2-etoksifenil)-*N'*-(4-nitrofenil)urea (**10**). Žut kristalan prašak. **Prinos:** 23,5%. **Temperatura topljenja:** 178–181 °C.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 1,42 (3H, t,  $J$  = 8,  $\text{CH}_3$ ), 4,16 (2H, q,  $J$  = 4,  $\text{CH}_2$ ), 6,89–8,22 (8H, m, Ar-H), 8,31 (1H, s, R-NHC(=O)NH-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-NO<sub>2</sub>), 10,13 (1H, s, R-NHC(=O)NH-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-NO<sub>2</sub>).  **$^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 15,17, 64,53, 112,40, 117,77, 119,32, 120,98, 123,10, 125,70, 128,58, 141,44, 146,90, 147,53.  $m/z$  = 302,6 ( $M^{+1}$ ), 137,29, 301,63, 111,86, 97,04, 73,38, 86,51. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 741,66, 1110,03, 1321,61, 1499,36, 1530,14, 1706,16, 2920,36, 3357,46. **HRMS-HESI:  $[M+Na]^+$**  izračunato = 302,11353; pronađeno = 302,11415.

*N*-hidroksi-*N*-[1-(4-(2-metilpropil)fenil)etil]acetamid (**11**). Žut kristalan prašak. **Prinos:** 33%. **Temperatura topljenja:** 96,5–98 °C.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 0,85 (6H, d,  $J$  = 6,4,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH-R}$ ), 1,43 (3H, d,  $J$  = 7,2,  $\text{CH}_3$ ), 1,77–1,84 (1H, m,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH-R}$ ), 2,00 (3H, s,  $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ ), 2,41 (2H, d,  $J$  = 7,2,  $\text{CH}_2$ ), 5,58 (1H, s,  $(\text{OH})\text{N-CH-R}$ ), 7,09–7,22 (4H, m, Ar-H), 9,51 (1H, s, OH).  **$^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 17,62, 21,19, 22,64, 30,06, 44,71, 52,75, 127,26, 129,14, 139,06, 140,22, 170,74.  $m/z$  = 236,2 ( $M^{+1}$ ), 161,28, 119,31, 117,30, 91,32, 105,31, 115,30. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 739,74, 845,13, 985,65, 1122,97, 1201,08, 1419,62, 1458,62, 1592,93, 2161,77, 2867,72, 2954,32, 3152,59. **HRMS-HESI:  $[M+Na]^+$**  izračunato = 258,14645; pronađeno = 258,14605.

*N*-hidroksi-*N*-[1-(6-metoksinaftalen-2-il)etil]acetamid (**12**). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 16%. **Temperatura topljenja:** 168–170 °C.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 1,52 (3H, d,  $J$  = 6,8, R-CH( $\text{CH}_3$ )-R1), 2,02 (3H, s,  $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ ), 3,85 (3H, s,  $\text{ROCH}_3$ ), 5,74 (1H, d,  $J$  = 4, R-CH( $\text{CH}_3$ )-R1), 7,12–7,81 (6H, m, Ar-H), 9,59 (1H, s, OH).  **$^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 17,44, 21,22, 52,99, 55,60, 106,10, 119,01, 125,69, 126,70, 127,04, 128,62, 129,78, 133,89, 136,85, 157,62, 170,83.  $m/z$  = 260,2 ( $M^{+1}$ ), 185,20, 170,20, 141,25, 153,22, 152,21, 169,20. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 693,29, 756,36, 820,06, 853,42, 948,01, 1027,56, 1163,47, 1181,92, 1452,17, 1605,90, 2788,64, 2985,80. **HRMS-HESI:  $[M+Na]^+$**  izračunato = 282,11006; pronađeno = 282,10977.

3-amino-5-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroksibenziliden)-2-tiokso-tiazolidin-4-on (**13**) Narandžast kristalan prašak. **Prinos:** 25%. **Temperatura topljenja:** 244,5–246,5 °C.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 1,42 (18H, s, 2x ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 5,96 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 7,42 (2H, s, Ar-H), 7,84 (1H, s, R=CH-Ar), 7,97 (1H, s, OH).  **$^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm** 30,39, 35,07, 115,97, 124,87, 128,95, 135,78, 140,03, 157,95, 164,14, 187,39.  $m/z$  = 364,9 ( $M^{+1}$ ), 308,97, 252,91, 176,95, 150,00, 57,32, 233,00. **IR (ATR)  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 723,28, 898,91, 1112,15, 1417,54, 1580,24, 1709,09, 2949,73, 3321,78, 3607,02. **HRMS-HESI:  $[M+H]^+$**  izračunato = 365,13520; pronađeno = 365,13559.

*2-etoksisulfamoil-benzoeva kiselina (14)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 75 %. **Temperatura topljenja:** >300 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 1,20 (3H, m, CH<sub>3</sub>), 3,93 (2H, q, J=7,2, CH<sub>2</sub>), 7,45-7,82 (4H, m, Ar-H), 11,77 (1H, s, NH). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm** 14,13, 70,55, 126,92, 129,79, 130,21, 130,63, 132,07, 144,77, 167,27. **m/z =** 244 (M<sup>+</sup>-1), 197,98, 134,13, 156,05, 80,19, 214,99, 182,02. **IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 660,30, 737,16, 1021,84, 1142,82, 1189,99, 1651,88, 2161,58, 2978,28, 3179,57.

*Metil ester 2-hidroksisulfamoil-benzoeve kiseline (15)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 56 %. **Temperatura topljenja:** 146-147,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 3,84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 7,70-7,99 (4H, m, Ar-H), 9,38 (1H, s, OH), 9,83 (1H, s, NH). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm** 53,45, 129,53, 130,24, 131,43, 133,21, 133,70, 135,50, 168,05. **m/z =** 230,0 (M<sup>+</sup> -1), 197,95, 134,18, 168,07, 124,30, 80,49, 96,44. **IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 698,11, 749,22, 963,77, 1116,88, 1327,39, 1715,01, 2959,42, 3097,96, 3206,91, 3398,22.

*Propil ester 2-hidroksisulfamoilbenzoeve kiseline (16)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 50,2 %. **Temperatura topljenja:** 138,5-139,6 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 0,95 (3H, t, J=7,6, CH<sub>3</sub>), 1,71 (2H, q, J=7,2, CH<sub>2</sub>), 4,23 (2H, t, J=6,8, OCH<sub>2</sub>), 7,70-8,00 (4H, m, Ar-H), 9,38 (1H, s, OH), 9,82 (1H, s, NH). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm** 10,73, 21,71, 67,86, 129,61, 130,10, 131,41, 133,39, 133,68, 135,59, 167,68. **m/z =** 258,9 (M<sup>+</sup> -1), 96,10, 195,14, 108,77, 199,03, 152,82, 172,90. **IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 691,54, 750,58, 958,09, 1118,28, 1170,25, 1365,10, 1712,28, 2977,18, 3224,17, 3385,01.

*Bifenil-4-sulfonska kiselina hidrokisamid (17)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 26 %. **Temperatura topljenja:** 173,4-174,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 7,44-7,92 (9H, m, Ar-H), 9,64 (1H, s, OH), 9,66 (1H, s, NH). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm** 127,60, 127,62, 129,04, 129,24, 129,61, 136,56, 139,01, 145,16. **m/z =** 248,1 (M<sup>+</sup> -1), 217,11, 169,24, 153,24, 166,06, 200,06, 115,51. **IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 689,26, 766,12, 840,65, 995,21, 1160,84, 1323,80, 1478,93, 1593,55, 1993,94, 3246,75, 3434,93.

*2,3-dihidro-benzof[1,4]dioksin-6-sulfonska kiselina hidrokisamid (18)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 53 %. **Temperatura topljenja:** 169,5-171 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 4,32 (4H, q, J=9,6, Ar-H), 7,05-7,31 (3H, m, Ar-H), 9,41 (1H, s, OH), 9,51 (1H, s, NH). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm** 63,47, 63,86, 116,50, 116,70, 121,18, 128,99, 142,49, 146,88. **m/z =** 230,0 (M<sup>+</sup> -1), 199,05, 135,14, 107,17, 64,36, 123,16, 79,27. **IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 675,18, 726,74, 871,62, 1133,76, 1161,92, 1293,89, 1346,50, 1503,45, 1584,71, 2899,56, 3102,26, 3239,30, 3326,79.

*4'-metoksibifenil-4-sulfonska kiselina hidrokisamid (19)*. Beo kristalan prašak. **Prinos:** 56 %. **Temperatura topljenja:** 168,5-170 °C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ ppm** 3,81 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 7,05-7,86 (8H, m, Ar-H), 9,57 (1H, s, OH), 9,60 (1H, s, NH). **<sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm** 55,74, 115,06, 126,89, 128,80, 129,21, 131,19, 135,72, 144,78, 160,26. **m/z =** 278,0 (M<sup>+</sup> -1), 247,03, 183,08, 168,06, 199,05, 184,11, 167,04. **IR (ATR) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 686,72, 817,65, 1025,16, 1154,55, 1208,76, 1487,09, 1592,19, 2955,57, 3199,05, 3300,61.

#### 4.5. *In vitro* COX-1, COX-2 i 5-LOX inhibitorni testovi

Sposobnost novostetisanih jedinjenja **1–19** da inhibiraju enzime COX-1, COX-2 i 5-LOX testirana je korišćenjem fluorimetrijskih skrining eseja. Rezultati testiranja su predstavljeni kao  $IC_{50} \pm$  standardna greška ( $\mu M$ ) i upoređeni sa komercijalno dostupnim COX-2 inhibitorom celekoksibom i 5-LOX inhibitorom zileutonom (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Rezultati *in vitro* inhibicije enzima COX-1, COX-2 i 5-LOX za jedinjenja **1–19**, celekoksib i zileuton

Jedinjenja	COX-2 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	5-LOX $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	COX-1 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )
<b>1</b>	18,28 $\pm$ 2,17	5,71 $\pm$ 0,15	>100
<b>2</b>	6,72 $\pm$ 0,79	1,62 $\pm$ 0,67	>100
<b>3</b>	5,26 $\pm$ 0,34	1,73 $\pm$ 0,64	>100
<b>4</b>	>100	8,10 $\pm$ 2,12	nije testirano
<b>5</b>	10,64 $\pm$ 0,80	9,30 $\pm$ 1,87	>100
<b>6</b>	6,89 $\pm$ 0,83	53,84 $\pm$ 11,87	>100
<b>7</b>	>100	12,55 $\pm$ 3,36	nije testirano
<b>8</b>	>100	14,52 $\pm$ 3,62	nije testirano
<b>9</b>	>100	>100	nije testirano
<b>10</b>	>100	13,01 $\pm$ 2,67	nije testirano
<b>11</b>	36,18 $\pm$ 3,08	1,04 $\pm$ 0,22	>100
<b>12</b>	83,42 $\pm$ 4,37	1,29 $\pm$ 0,10	>100
<b>13</b>	>100	13,58 $\pm$ 3,54	nije testirano
<b>14</b>	>100	>100	nije testirano
<b>15</b>	>100	>100	nije testirano
<b>16</b>	>100	>100	nije testirano
<b>17</b>	>100	>100	nije testirano
<b>18</b>	>100	>100	nije testirano
<b>19</b>	>100	>100	nije testirano
<b>celekoksib</b>	0,07 $\pm$ 0,01	nije testirano	nije testirano
<b>zileuton</b>	nije testirano	0,36 $\pm$ 0,10	nije testirano

Svi testirani derivati *N*-hidroksiuree (jedinjenja **1**, **2** i **3**) su ispoljili dualnu inhibiciju COX-2 i 5-LOX enzima. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su derivati potentnijih NSAIL flurbiprofena (jedinjenje **2**) i diklofenaka (jedinjenje **3**) ispoljili snažniju dualnu COX-2 i 5-LOX inhibitornu aktivnost u odnosu na derivat indometacina (jedinjenje **1**). Jedinjenja **2** i **3** su se izdvojila kao najpotentniji dualni inhibitori COX-2 i 5-LOX enzima među svim sintetisanim jedinjenjima.

Iz klase derivata 3,5-di-*terc*-butil fenola (jedinjenja **4–7** i **13**), jedinjenja **5** i **6** su se istakla kao relativno dobri dualni COX-2 i 5-LOX inhibitori. Jedinjenje **6** je ispoljilo najbolju COX-2 inhibitornu aktivnost, dok su jedinjenja **4** i **5** ispoljila najbolju 5-LOX inhibitornu aktivnost.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da supstituent u položaju C1 derivata 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksibenzena ima značajan uticaj na ispoljavanje COX-2 i 5-LOX inhibitorne aktivnosti.

Jedinjenja **11** i **12** iz grupe derivata hidroksamske kiseline tipa B su ispoljila dualnu COX-2 i 5-LOX inhibitornu aktivnost sa sličnom 5-LOX inhibitornom aktivnošću (jedinjenje **11**:  $IC_{50} = 1,04 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ; jedinjenje **12**:  $IC_{50} = 1,29 \pm 0,10 \mu\text{M}$ ), dok je jedinjenje **11** ispoljilo značajno bolju COX-2 inhibitornu aktivnost od jedinjenja **12** ( $36,18 \pm 3,08 \mu\text{M}$  naspram  $83,42 \pm 4,37 \mu\text{M}$ ).

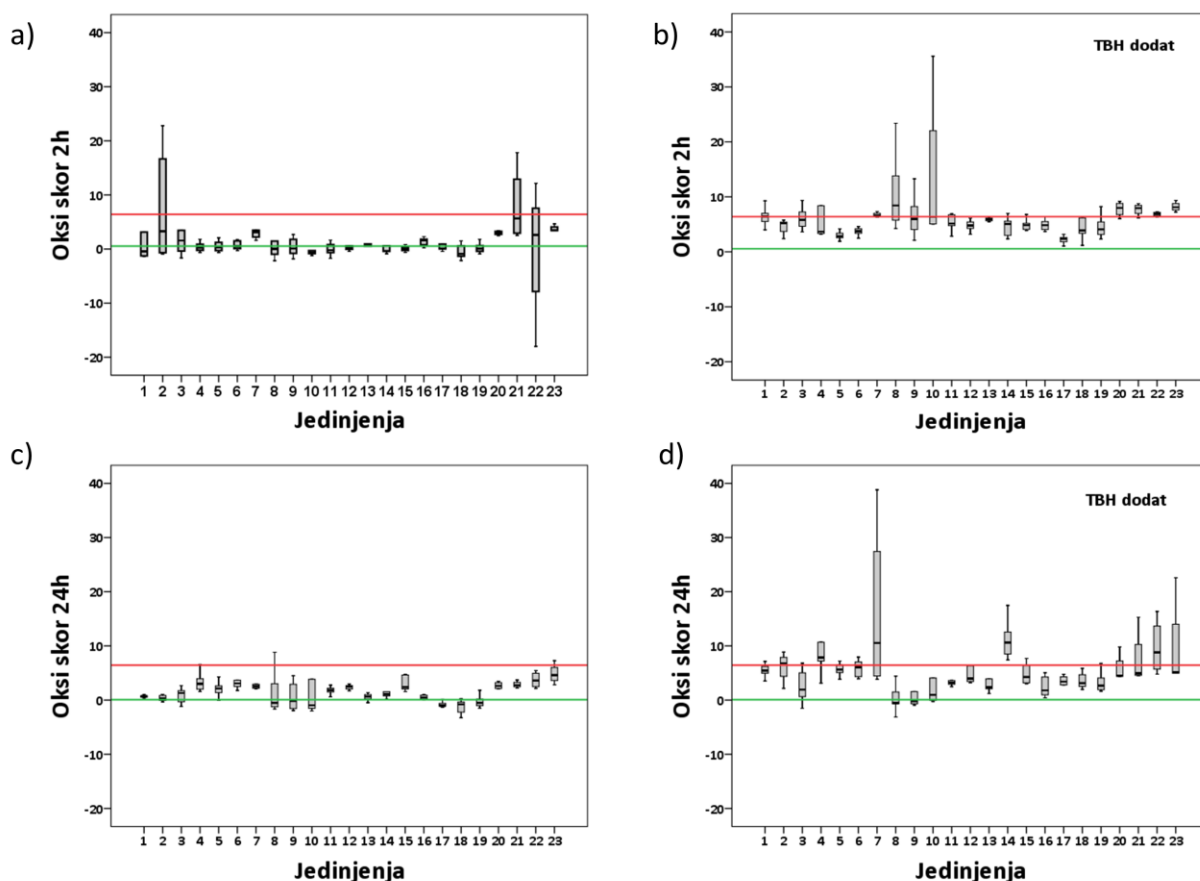
Na osnovu dobijenih rezultata *in vitro* testova nijedan od derivata uree (**8**, **9** i **10**) se ne može smatrati dualnim COX-2 i 5-LOX inhibitorom. Pokazano je da jedinjenja **8** i **10** poseduju značajnu inhibitornu 5-LOX aktivnost (sa  $IC_{50}$  vrednostima  $14,52 \pm 3,62 \mu\text{M}$  i  $13,01 \pm 2,67 \mu\text{M}$ ).

Nijedan od derivata sulfhidroksamske kiseline (jedinjenja **14**, **15**, **16**, **17**, **18** i **19**) nije pokazao jaku COX-2 i 5-LOX inhibitornu aktivnost. Dobijene su  $IC_{50}$  vrednosti veće od  $100 \mu\text{M}$ . Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da, iako bi sulfhidroksamska kiselina mogla biti obećavajuća farmakofora za postizanje dualne COX-2 i 5-LOX inhibitorne aktivnosti, prisustvo supstituenata u ovoj grupi ili u njenoj blizini, kao i struktura centralnog jezgra molekula mogu značajno umanjiti njen inhibitorni potencijal.

Sva jedinjenja koja su ispoljila dualnu COX-2 i 5-LOX aktivnost (**1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **11** i **12**) su testirana na COX-1 inhibitornu aktivnost. Nijedno od testiranih jedinjenja nije dostiglo 50 % inhibicije enzima pri koncentraciji od  $100 \mu\text{M}$ , te se može zaključiti da su slabi COX-1 inhibitori i da imaju zadovoljavajuću selektivnost prema COX-2 enzimu.

#### 4.6. Procena redoks aktivnosti novosintetisanih jedinjenja

Procena redoks aktivnosti novosintetisanih jedinjenja **1–19** obavljena je *in vitro* u humanom serumskom pulu određivanjem redoks parametara u prisustvu i bez prisustva egzogenog oksidansa - *tert*-butil hidroperoksida (TBH). Testirano je pet različitih razblaženja svakog jedinjenja i, s obzirom na to da nije utvrđena dozna zavisnost, rezultati su prikazani kao prosečne vrednosti pet koncentracija. BHT, urea, celekoksib i zileuton su testirani kao standardne supstance, kako bi se izvršilo poređenje sa ispitivanim jedinjenjima. Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 25** (OS vrednosti nakon inkubacije u trajanju od 2 h i 24 h, pre i posle dodavanja TBH). *Wilcoxon*-ov test je korišćen da bi se uporedile statistički značajne razlike pre i posle dodavanja TBH ( $p < 0,05$ ) i statistički značajne razlike između inkubacije u trajanju od 2 h i 24 h za iste uzorke. Ovi rezultati, kao i OS vrednosti dobijene za troloks (standardni antioksidans) i TBH (prooksidans), prikazani su u **Tabeli 7**.



**Slika 25.** Oksi skorovi (Y osa) testiranih jedinjenja: (a) posle 2 h inkubacije, (b) posle 2 h inkubacije, uz dodatak TBH, (c) posle 24 h inkubacije, (d) posle 24 h inkubacije, uz dodatak TBH. Jedinjenja (X osa): **1–19** novosintetisana jedinjenja, 20 BHT (butilhidroksitoluen), 21 celekoksib, 22 zileuton i 23 urea; OS troloksa je označen zelenom linijom; OS TBH je označen crvenom linijom.

**Tabela 7.** Izračunati oksidativni skorovi (OS) za testirana jedinjenja **1–19**, BHT, ureu, celekoksib i zileuton nakon 2 h i 24 h inkubacije, pre i posle dodavanja TBH

	2 h inkubacija			24 h inkubacija		
		TBH dodat	<i>p</i>		TBH dodat	<i>p</i>
<b>1</b>	-0,43(-1,27-3,13)	6,44(5,51-7,02)	0,023	0,71(0,51-0,80)	5,46(4,96-6,20)	<0,001
<b>2</b>	3,28(-0,68-16,66)	5,20(3,70-5,42)	0,597	0,33(-0,07-0,85)	6,79(4,37-7,90)	<0,001
<b>3</b>	1,58(-0,38-3,45)	5,81(4,64-7,25)	0,023	1,31(-0,31-1,75)	1,93(0,65-5,02)#	0,226
<b>4</b>	0,24(-0,24-0,89)	3,68(3,36-8,40)	0,001	3,00(1,99-3,93)**	7,86(7,20-10,68)	0,016
<b>5</b>	0,29(-0,30-1,23)	2,83(2,55-3,39)	<0,001	2,14(1,37-2,62)**	5,64(5,07-6,47)	<0,001
<b>6</b>	0,52(0,08-1,52)	3,77(3,37-4,20)	0,002	3,09(2,50-3,67)	6,07(4,34-7,02)	0,016
<b>7</b>	3,12(2,21-3,47)	6,62(6,42-6,98)	0,021	2,55(2,18-2,92)	10,54(4,45-27,42)	0,021
<b>8</b>	0,03(-0,96-1,46)	8,43(5,76-13,81)	0,010	-0,52(-1,24-3,03)	-0,55(-0,67-1,48)##	0,762
<b>9</b>	0,09(-0,79-1,80)	5,97(4,06-8,25)	0,003	-0,18(-1,55-2,91)	-0,19(-0,68-1,56)	0,450
<b>10</b>	-0,64(-0,84-0,30)	6,34(5,07-22,02)	<0,001	-0,97(-1,53-3,85)	0,97(-0,04-4,08)	0,199
<b>11</b>	-0,22(-0,65-0,82)	5,15(4,76-6,74)	<0,001	1,83(1,49-2,18)*	3,18(2,92-3,60)##	<0,001
<b>12</b>	0,24(-0,06-0,58)	4,79(4,25-5,43)	<0,001	2,49(2,03-2,66)**	3,97(3,44-6,33)	<0,001
<b>13</b>	0,75(0,56-0,94)	5,89(5,63-6,14)	<0,001	0,64(0,19-1,01)	2,35(2,10-3,92)#	<0,001
<b>14</b>	-0,36(-0,43-0,60)	5,07(2,99-5,58)	0,002	1,09(0,79-1,54)	10,63(8,50-12,55)##	0,013
<b>15</b>	-0,01(-0,27-0,29)	4,85(4,09-5,19)	<0,001	2,39(2,06-4,62)**	4,27(3,18-6,39)	0,023
<b>16</b>	1,61(0,77-1,81)	4,84(4,05-5,50)	<0,001	0,46(0,14-0,91)**	1,79(0,95-4,26)	0,002
<b>17</b>	0,10(0,02-0,89)	2,33(1,82-2,61)	0,002	-1,02(-1,11--0,62)	3,41(2,80-4,29)	<0,001
<b>18</b>	-0,89(-1,33-0,58)	3,88(3,38-6,17)	0,002	-0,78(-2,23--0,35)	3,13(2,51-4,69)	<0,001
<b>19</b>	0,08(-0,44-0,64)	4,10(3,15-5,44)	<0,001	-0,51(-1,02-0,18)	2,65(1,94-4,07)	<0,001
<b>BHT</b>	3,08(2,73-3,26)	7,98(6,77-8,81)	0,021	2,62(2,14-3,22)	4,51(4,38-7,22)	0,021
<b>celekoksib</b>	5,66(2,92-12,90)	7,94(6,97-8,45)	0,564	2,77(2,46-3,27)	4,95(4,57-10,25)	0,021
<b>zileuton</b>	2,60(-7,86-7,54)	6,87(6,52-7,18)	0,248	3,61(2,47-4,93)	8,80(5,71-13,66)	0,043
<b>urea</b>	3,48(3,44-4,08)	8,11(7,61-8,79)	0,021	4,60(3,62-6,02)	5,19(4,96-14,00)	0,149
<b>troloks</b>	0,54(-0,66-2,43)	/	/	0,07(-0,59-0,59)*	/	/
<b>TBH</b>	6,40(4,66-11,59)	/	/	6,43(4,73-12,00)	/	/

Rezultati *Wilcoxon*-ovog testa (*Wilcoxon's paired tests*); statistički značajne razlike između 2 h i 24 h inkubacije su označene na sledeći način: 24 h naspram 2 h: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; 24 h TBH naspram 2 h TBH: #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ .

Fenolni antioksidansi spadaju u grupu najvažnijih antioksidanasa. BHA (butilhidroksianizol) i BHT (butilhidroksitoluen) sadrže fenol sa *terc*-butil grupama odgovornim za antioksidativni potencijal. BHA je smeša dva izomera: 3-*terc*-butil-4-metoksi fenola i 2-*terc*-butil-4-metoksi fenola, i kao takav ispoljava bolji antioksidativni efekat. BHT je po strukturi di-*terc*-butil fenol koji ima primenu kao antioksidans u farmaceutskoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji. Brojne studije su se bavile ispitivanjem uticaja supstituenata uvedenih u strukturu fenolnih antioksidanasa na ispoljavanje antioksidativnog efekta. Izveden je zaključak da *p*-supstituenti koji doniraju elektrone stabilizuju fenoksi radikal i poboljšavaju antioksidativna svojstva jedinjenja<sup>182</sup>. Testirano je pet jedinjenja koja sadrže di-*terc*-butil fenol farmakoforu (jedinjenja **4**, **5**, **6**, **7** i **13**). Za četiri jedinjenja (**4**, **5**, **6** i **13**) dobijene su niže vrednosti oksidativnog skora od BHT nakon 2 h inkubacije, što ukazuje na to da su testirana jedinjenja potencijalno bolji antioksidansi od BHT. Nakon 24 h inkubacije, za jedinjenja **5**, **7** i **13** su takođe dobijene niže vrednosti oksidativnog skora od BHT. Postoji statistički značajna razlika između rezultata dobijenih nakon

2 h inkubacije i onih dobijenih nakon 24 h inkubacije u slučaju jedinjenja **4** i **5** (bez dodatka TBH), što ukazuje na to da se antioksidativna aktivnost ovih jedinjenja blago smanjuje tokom vremena. U slučaju jedinjenja **13** (sa dodatkom TBH) dobijena je statistički značajna razlika između rezultata nakon 2 h inkubacije i nakon 24 h inkubacije (5,89 (5,63–6,14) naspram 2,35 (2,10–3,92),  $p < 0,037$ ), pri čemu se može izvesti zaključak da, kako se vreme inkubacije povećava, testirano jedinjenje se efikasnije suprotstavlja efektima prooksidansa TBH. Dobijeni rezultati za uzorke pre i posle dodatka TBH su se statistički značajno razlikovali (u slučaju skoro svih testiranih jedinjenja OS vrednosti se značajno povećavaju po dodatku TBH), čak i u slučaju BHT, te se može zaključiti da testirana jedinjenja pokazuju slično ponašanje kao BHT u prisustvu TBH (u oba slučaja, nakon 2 h i 24 h inkubacije). Jedinjenja se bolje suprotstavljaju dejstvu egzogenog prooksidansa (TBH) u slučajevima kada nema statistički značajnih razlika između OS vrednosti pre i posle dodatka TBH. Sva testirana jedinjenja koja se mogu kategorisati u različite grupe (bez TBH, sa dodatkom TBH, 2 h inkubacije, 24 h inkubacije) su rangirana prema dobijenim srednjim OS vrednostima i kao potencijalno najaktivniji antioksidansi se izdvajaju jedinjenja **5** i **13**.

Prethodno sprovedene studije su ukazale na to da urea poseduje antioksidativnu aktivnost. Urea ispoljava potentniju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa drugim prirodnim ili sintetskim antioksidansima zahvaljujući maloj molekulskoj masi i sposobnosti da lako prolazi kroz membrane. Spada u grupu neproteinskih azotnih jedinjenja, ima dijagnostički značaj za bubrežne bolesti i ispoljava kardioprotektivne efekte zbog sposobnosti da se odupre oksidativnom stresu. Derivati uree, hidroksiurea i dimetilurea takođe ispoljavaju antioksidativne efekte <sup>183</sup>. U ovoj studiji je vršeno ispitivanje antioksidativnog efekta uree, a dobijeni rezultati (OS) ukazuju da nije bilo statistički značajne razlike između uzoraka inkubiranih 2 h i 24 h. Statistički značajna razlika postoji između uzoraka uree sa i bez TBH nakon 2 h inkubacije (povećana vrednost OS), dok nakon 24 h inkubacije nije bilo statistički značajne razlike ( $p = 0,149$ ). Zaključeno je da se sa porastom vremena inkubacije urea efikasnije suprotstavlja dejstvu prooksidansa (TBH). Testirani derivati uree (**8**, **9** i **10**) su ispoljili slično ponašanje kao urea. Za ova jedinjenja su dobijene niže OS vrednosti od OS vrednosti uree, te se može zaključiti da su potentni antioksidansi. Za jedinjenje **8** je primećeno da vreme inkubacije ima značajan uticaj na njegovu sposobnost da se suprotstavi dejstvu prooksidansa. Derivati *N*-hidroksiuree (jedinjenja **1**, **2** i **3**) su ispoljili sličan antioksidativni efekat kao urea. Za jedinjenje **1** je dobijena negativna OS vrednost nakon inkubacije u trajanju od 2 h, a statistički značajne razlike nije bilo ni nakon inkubacije u trajanju od 24 h. Za jedinjenje **3** su dobijene niže OS vrednosti od uree, a nakon inkubacije u trajanju od 24 h više nije bilo statistički značajne razlike između rezultata dobijenih za uzorke sa i bez TBH ( $p = 0,226$ ; sa povećanjem vremena inkubacije postiže se veća otpornost na dejstvo prooksidansa).

Za jedinjenja **11** i **12** su dobijene niže OS vrednosti od uree. OS vrednosti su se povećavale sa porastom vremena inkubacije, a između rezultata dobijenih nakon 2 h i 24 h inkubacije postojala je statistički značajna razlika. Antioksidativna aktivnost se blago smanjivala sa porastom trajanja inkubacije. U slučaju jedinjenja **11** se sa povećanjem trajanja inkubacije povećavala sposobnost jedinjenja da se suprotstavi dejstvu prooksidansa.

Za derivate sulfhidroksamske kiseline (jedinjenja **14**, **15**, **16**, **17**, **18** i **19**) su dobijene relativno niske OS vrednosti. Naročito se ističu jedinjenja **17**, **18** i **19** kada se izvrši sveobuhvatno rangiranje prema dobijenim srednjim OS vrednostima, te se može izvesti zaključak da su jedinjenja iz ove grupe obećavajući antioksidativni agensi. U slučaju jedinjenja **14** postojala je statistički značajna razlika između dobijenih OS vrednosti za uzorke bez i uzorke sa dodatim TBH (nakon inkubacije od 2 h i 24 h). Kako se OS vrednost povećava dodatkom TBH, može se zaključiti da se testirano jedinjenje slabije odupire efektu prooksidansa. U slučaju uzorka sa jedinjenjem **14** u koji nije dodat TBH, vreme trajanja inkubacije nije statistički značajno uticalo na ispoljavanje antioksidativnog efekta. U slučaju uzorka sa dodatim TBH, sa povećanjem vremena inkubacije dolazi do statistički značajnog povećanja OS vrednosti, te se može zaključiti da se jedinjenje **14** slabije odupire efektu prooksidansa sa povećanjem vremena inkubacije. Kod jedinjenja **15** i **16** se javlja statistički značajna razlika između OS vrednosti dobijenih nakon inkubacije u trajanju od 2 h i inkubacije u trajanju od 24 h (uzorci bez dodatog TBH). U slučaju jedinjenja **15** sa povećanjem vremena inkubacije dolazi do statistički značajnog povećanja OS vrednosti ( $OS_{2h} = -0,01$ ;  $OS_{24h} = 2,39$ ), te se može zaključiti da antioksidativni potencijal testiranog jedinjenja opada tokom vremena. U slučaju jedinjenja **16** sa povećanjem vremena inkubacije dolazi do statistički značajnog smanjenja OS vrednosti ( $OS_{2h} = 1,61$ ;  $OS_{24h} = 0,46$ ), te se može zaključiti da antioksidativni potencijal testiranog jedinjenja raste sa povećanjem vremena inkubacije. Kod jedinjenja **15** i **16** u slučaju inkubacije u trajanju od 2 h, kao i u slučaju inkubacije u trajanju od 24 h, javlja se statistički značajna razlika između OS vrednosti dobijenih za uzorke bez i uzorke sa TBH, pri čemu su OS vrednosti dobijene za uzorke sa TBH bile statistički značajno veće od OS vrednosti dobijenih za uzorke bez TBH. Može se zaključiti da se testirana jedinjenja **15** i **16** slabije odupiru efektu dodatog prooksidansa, a statistički značajna razlika u OS vrednostima dobijenim nakon inkubacije uzoraka sa dodatim prooksidansom u trajanju od 2 h i 24 h nije zapažena. Za uzorke jedinjenja **17**, **18** i **19** u koje nije dodat TBH, dobijene su OS vrednosti koje su se statistički značajno razlikovale od dobijenih OS vrednosti za uzorke sa dodatim TBH (2 h i 24 h inkubacija). Dodat TBH je uticao na dobijanje značajno većih OS vrednosti, te se može zaključiti da se testirana jedinjenja slabije opiru efektu prooksidansa. Vreme trajanja inkubacije nije statistički značajno uticalo na ispoljavanje antioksidativnog efekta.

Dobijeni rezultati za jedinjenja **3**, **8**, **9** i **10** (24 h inkubacija) nisu se statistički značajno razlikovali za uzorke sa i bez TBH (nije došlo do statistički značajnog povećanja OS nakon dodavanja TBH), što ukazuje na to da se tokom vremena postiže ravnoteža kako bi se jedinjenja bolje suprotstavila dejstvu prooksidansa.

Selektivni inhibitori enzima COX-2 (celekoksib) i 5-LOX (zileuton) su se pokazali kao slabiji antioksidansi od testiranih novosintetisanih jedinjenja. Testirana jedinjenja se mogu rangirati prema njihovom antioksidativnom potencijalu (srednje vrednosti OS) sledećim redosledom: **18** > **17** > **10** > **19** > **8** > **9** > **16** > **11** > **15** > **1** / **5** > **13** / **14** > **3** / **12** > **4** > **6** > **2** > **7**.

*Wilcoxon*-ov test je korišćen kako bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika između dobijenih rezultata za sva testirana jedinjenja. Statistički značajne razlike prikazane su u **Tabelama P7-P10** (Prilozi).

#### 4.7. Ispitivanje lipofilnosti

Za ispitivanje lipofilnosti novosintetisanih jedinjenja <sup>184</sup> odabrana je RP-HPLC metoda, jer među ispitivanim jedinjenjima ima više lipofilnih jedinjenja sa predviđenim logD vrednostima većim od 3, a prednost RP-HPLC metode je širi opseg logP vrednosti koji se može odrediti <sup>110</sup>. U ovim eksperimentima je ispitivan uticaj različitih kolona i mobilnih faza na retenciono ponašanje novosintetisanih jedinjenja. Svi eksperimenti su izvedeni sa mobilnim fazama čiji je pH podešen na 5,5 ili 7,4. Ove dve pH vrednosti su odabrane iz razloga što pH 7,4 odgovara fiziološkom pH, odnosno pH krvi, koji varira u rasponu od 7,35 do 7,45 i važan je sa stanovišta preraspodele leka u krvi <sup>185</sup>, dok je pH 5,5 izabran zbog simulacije uslova u gastrointestinalnom traktu. Pretpostavlja se da je pH 5,5 najoptimalniji pH gastrointestinalnog trakta u kom se apsorbuje lek u organizmu <sup>186, 187</sup>. Za procenu lipofilnosti je izabran najpouzdaniji RP-HPLC sistem na osnovu korelacije između hromatografskih parametara i izračunatih logD vrednosti.

Lipofilnost (logD vrednosti) testiranih **19** jedinjenja na pH vrednostima 7,4 i 5,5 izračunata je korišćenjem programa MarvinSketch 4.1.13. (**Tabela 8**).

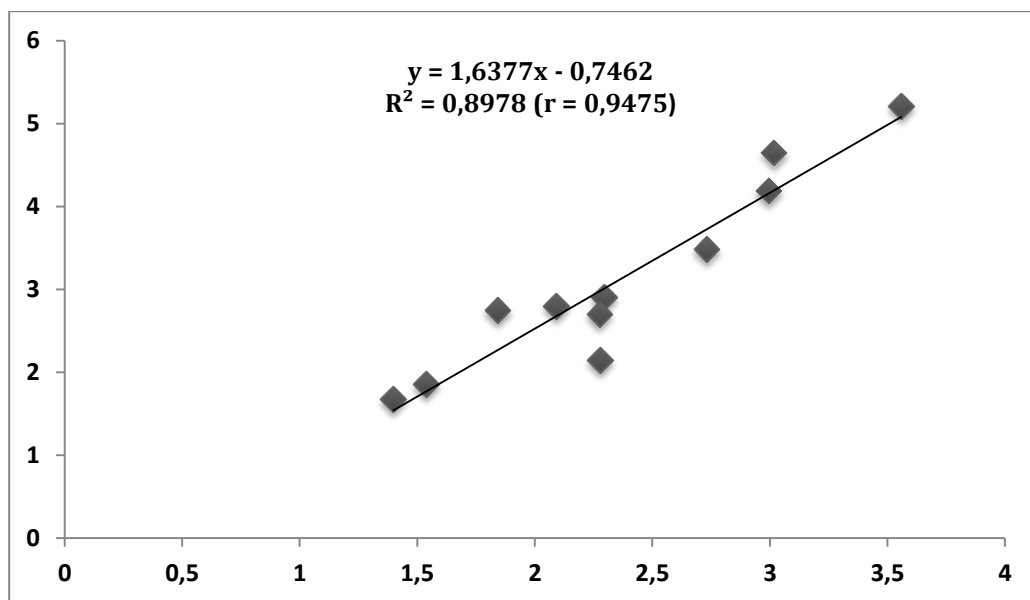
**Tabela 8.** Predviđene logD vrednosti ispitivanih jedinjenja (pH 7,4 i 5,5)

Jedinjenja	logD <sub>7,4</sub>	logD <sub>5,5</sub>
1	2,15	2,15
2	2,75	2,75
3	2,80	2,80
4	2,91	2,25
5	3,49	3,49
6	4,65	4,65
7	4,19	4,19
8	1,68	1,68
9	-1,70	-0,21
10	3,55	3,55
11	2,70	2,78
12	1,86	1,94
13	5,21	5,21
14	-2,62	-2,15
15	0,61	0,62
16	1,42	1,43
17	2,15	2,15
18	-0,22	-0,21
19	1,90	1,90

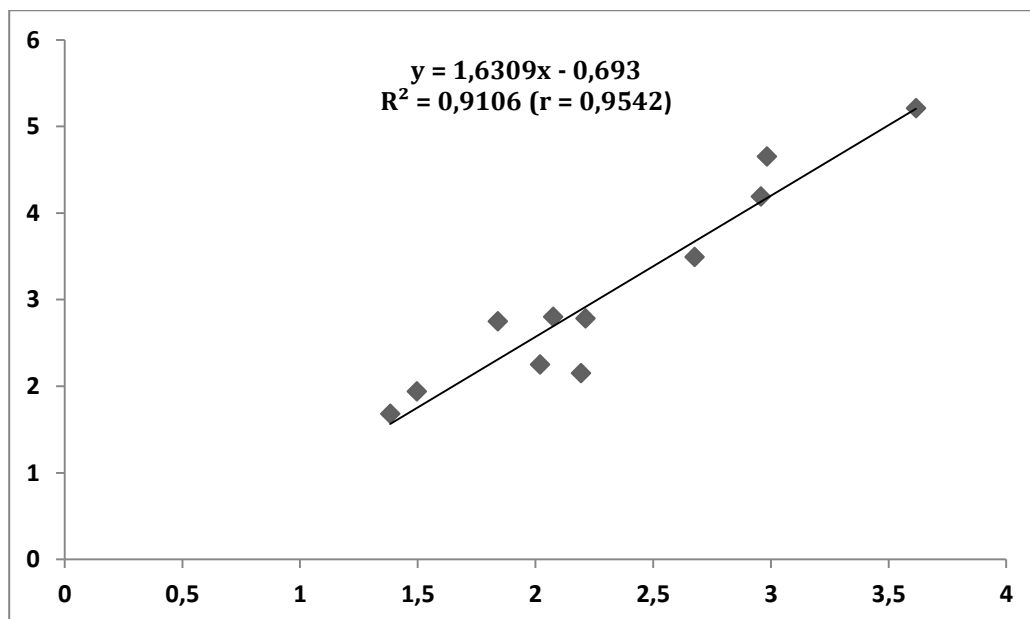
Najpre je odabran reprezentativni, manji set jedinjenja na kome su ispitani različiti hromatografski uslovi u cilju odabira najpouzdanijeg sistema. Amino kolona se nije pokazala odgovarajućom, jer se na njoj nisu zadržavala testirana jedinjenja. Takođe, prema preliminarnim rezultatima, zaključeno je da metanol nije pogodan u mobilnoj fazi, jer je vreme zadržavanja jedinjenja povećano nekoliko puta u poređenju sa acetonitrilom, te je acetonitril izabran kao organska komponenta mobilne faze. Nakon utvrđivanja optimalnih hromatografskih uslova na manjem setu jedinjenja, sva preostala jedinjenja su ispitana pod tim uslovima.

Na C18 i cijano hromatografskim kolonama, pet jedinjenja (**9, 14, 15, 16, 18**) nisu imala sposobnost retencije, što je u skladu sa njihovim veoma niskim logD vrednostima, dok su tri jedinjenja (**10, 17 i 19**) nisu pokazala slaganje sa izračunatim logD vrednostima. Za sisteme koji su se sastojali od C18 i cijano kolone (pH 5,5 i pH 7,4) dobijeni su dobri koeficijenti korelacije između hromatografskih parametara **log<sub>w</sub>k**, **a** i **φ<sub>0</sub>** i logD vrednosti izračunatih upotrebom programa MarvinSketch.

Kao najpogodniji RP-HPLC sistem se izdvojio sistem koji se sastojao od C18 hromatografske kolone (stacionarna faza), acetonitrila i fosfatnog pufera pH 7,4 i pH 5,5 u različitim odnosima (mobilna faza), pošto je u tom slučaju dobijen najveći koeficijent korelacije između hromatografskog parametra **log<sub>w</sub>k** i logD vrednosti (tri *outlayer* jedinjenja su odbačena). Linearna zavisnost između logk vrednosti i koncentracija organskog modifikatora u mobilnoj fazi (acetonitril) uočena je za jedinjenja **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 i 13** na C18 koloni (i na pH 5,5 i na pH 7,4), a visoke vrednosti R<sup>2</sup> (koeficijent determinacije) su dobijene za sva jedinjenja na oba pH: pH 5,5 (R<sup>2</sup> = 0,9758 - 0,9925) i pH 7,4 (R<sup>2</sup> = 0,9755-0,9920). Koeficijent korelacije između hromatografskog parametra **log<sub>w</sub>k** i logD vrednosti na pH 7,4 bio je r = 0,9475 (R<sup>2</sup> = 0,8978) (**Slika 26**) i r = 0,9542 (R<sup>2</sup> = 0,9106) na pH 5,5 (**Slika 27**).



**Slika 26.** Korelacija između dobijenih  $\log k_w$  vrednosti i predviđenih  $\log D$  vrednosti na pH 7,4 (za 11 jedinjenja)



**Slika 27.** Korelacija između dobijenih  $\log k_w$  vrednosti i predviđenih  $\log D$  vrednosti na pH 5,5 (za 11 jedinjenja)

Izračunati hromatografski parametri lipofilnosti za četrnaest jedinjenja ispitanih korišćenjem C18 kolone i mobilne faze koja je predstavljala smešu acetonitrila i fosfatnog pufera pH 7,4/5,5 prikazani su u **Tabeli 9**.

**Tabela 9.** Eksperimentalno određeni hromatografski parametri lipofilnosti (**log<sub>k<sub>w</sub></sub>**, **a**, **φ0**) za 14 testiranih jedinjenja na pH 7,4 i 5,5

Jedinjenja	pH 7,4			pH 5,5		
	Parametri lipofilnosti			Parametri lipofilnosti		
	log <sub>k<sub>w</sub></sub>	a	φ0	log <sub>k<sub>w</sub></sub>	a	φ0
<b>1</b>	2,28	-0,04	61,22	2,19	-0,04	62,15
<b>2</b>	1,84	-0,03	54,99	1,84	-0,03	54,92
<b>3</b>	2,09	-0,03	60,22	2,08	-0,03	60,15
<b>4</b>	2,29	-0,04	59,40	2,02	-0,03	59,05
<b>5</b>	2,73	-0,04	68,76	2,68	-0,04	69,52
<b>6</b>	3,02	-0,04	72,87	2,98	-0,04	73,29
<b>7</b>	2,99	-0,04	70,78	2,96	-0,04	71,11
<b>8</b>	1,40	-0,02	59,74	1,38	-0,02	59,36
<b>10<sup>#</sup></b>	3,21	-0,04	73,97	5,81	-0,10	58,53
<b>11</b>	2,27	-0,03	66,89	2,21	-0,03	67,06
<b>12</b>	1,54	-0,03	54,12	1,50	-0,03	53,43
<b>17<sup>#</sup></b>	2,73	-0,10	27,90	2,63	-0,09	29,58
<b>19<sup>#</sup></b>	2,71	-0,10	27,72	2,65	-0,09	29,38
<b>13</b>	3,56	-0,04	82,75	3,62	-0,04	90,64

<sup>#</sup>outlayer

U slučaju derivata 2,6-di-*terc*-butilfenola (jedinjenja **4**, **5**, **6**, **7** i **13**), dobijene su veće **log<sub>k<sub>w</sub></sub>** vrednosti u odnosu na druga testirana jedinjenja. Jedinjenje **13** se izdvojilo kao najlipofilnije, jer sadrži 3-aminorodanin vezan za 2,6-di-*terc*-butilfenol nezasićenom dvostrukom vezom, dok su ostala jedinjenja iz ove klase amidi. Jedinjenja **4** i **5** (amidi sa histidin metil estrom i glicin metil estrom) pokazala su se manje lipofilnim od jedinjenja **6** i **7** (amidi sa propargilaminom i alilaminom), što je u skladu sa strukturnim karakteristikama uvedenog bočnog lanca (aminokiselina/amin). Jedinjenje koje sadrži histidin metil estar u bočnom lancu se pokazalo manje lipofilnim od jedinjenja sa glicin metil estrom, što je u skladu sa lipofilnim svojstvima uvedenih aminokiselina u strukturu. Jedinjenje **6** se pokazalo lipofilnijim od jedinjenja **7**, što se može objasniti prisustvom nezasićene dvostruke veze alilamina koja je lipofilnija od nezasićene trostruke veze propargilamina.

Jedinjenje **1**, derivat indometacina, izdvojilo se kao najlipofilniji derivat *N*-hidroksiuree na osnovu dobijene **log<sub>k<sub>w</sub></sub>** vrednosti. Na osnovu dobijenih **log<sub>k<sub>w</sub></sub>** vrednosti (na obe pH vrednosti) jedinjenje **2** se izdvojilo kao najmanje lipofilno iz ove grupe.

U slučaju derivata hidroksamske kiseline tipa B (-N(OH)COCH<sub>3</sub>), rezultati ukazuju na to da je jedinjenje **12** hidrofilinije od jedinjenja **11**, što je povezano sa prisustvom lipofilne izobutil grupe u strukturi jedinjenja **11**.

Za jedinjenje **8** je dobijena niska log<sub>K<sub>w</sub></sub> vrednost, što je u skladu sa strukturnim karakteristikama (prisustvo urea funkcionalne grupe je važno za rastvorljivost u vodi, pošto je ona donor i akceptor vodonične veze) <sup>188</sup>.

#### 4.8. Procena pasivne gastrointestinalne apsorpcije primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i PAMPA testa

Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC) je hromatografski sistem za simulaciju preraspodele lekova u organizmu koji ima karakteristike slične biološkim barijerama. Pokazalo se da Brij 35 kao micelarna mobilna faza i C18 hromatografska kolona predstavljaju optimalnu *in vitro* alternativu za procenu biološkog ponašanja ispitivanih lekova. Stacionarna faza modifikovana adsorbovanim monomerima Brij 35 surfaktanta strukturno oponaša ugljovodonične lance ćelijske membrane, dok njena hidrofilna svojstva simuliraju polarne delove membrane<sup>117, 189</sup>. Faktori retencije (**k**) za sva testirana jedinjenja su izračunati prema izrazu  $k = (t_R - t_0)/t_0$ , gde  $t_0$  predstavlja retenciono vreme DMSO. Izračunate vrednosti su prikazane u **Tabeli 10**.

**Tabela 10.** Faktori retencije (**k**) testiranih jedinjenja

Jedinjenja	k
1	9,50 ± 0,01
2	5,55 ± 0,01
3	9,33 ± 0,03
4	2,63 ± 0,00
5	8,27 ± 0,02
6	12,99 ± 0,03
7	12,32 ± 0,02
8	2,17 ± 0,00
9	0,92 ± 0,00
10	19,96 ± 0,14
11	3,03 ± 0,01
12	3,02 ± 0,00
13	36,96 ± 0,02
14	0,22 ± 0,00
15	0,00 ± 0,00
16	0,00 ± 0,00
17	0,41 ± 0,00
18	0,75 ± 0,01
19	0,37 ± 0,00

Faktori retencije (**k**) su se kretali u rasponu od 0,22 do 36,96. Za jedinjenja sa dobijenim nižim faktorima retencije očekuje se niža pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Niske **k** vrednosti su dobijene za derivate sulfhidroksamske kiseline (**14-19**), uree (**8 i 9**) i hidroksamske kiseline tipa B (**11 i 12**), te se za ova jedinjenja očekuje slaba pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Prisustvo sulfhidroksamske kiseline odgovorno je za niske **k** vrednosti koje se dobijaju za jedinjenja **14-19**. Za jedinjenje **8** dobijena je viša **k** vrednost u odnosu na jedinjenje **9** (2,17 vs 0,92), što je u skladu sa strukturnim karakteristikama (prisustvo karboksilne grupe dovodi do niže **k** vrednosti). Za jedinjenja **11 i 12** su dobijene slične, relativno niže **k** vrednosti (3,03 i 3,02). Za derivat 2,6-di-*terc*-butilfenola, jedinjenje **4**, dobijena je niska **k** vrednost, što je posledica prisustva L-histidin metil estera. Visoke **k** vrednosti su dobijene za jedinjenje **10**, derivate N-hidroksiuree (**1, 2 i 3**) i 2,6-di-*terc*-butilfenola (**5, 6, 7 i 13**). Za ova jedinjenja se očekuje dobra pasivna gastrointestinalna apsorpcija.

PAMPA test predstavlja visoko isplativu *in vitro* alternativu za procenu apsorpcionog potencijala testiranih jedinjenja. U ovom testu se određuje permeabilnost kroz veštačku membranu i s obzirom da se većina lekova apsorbuje uglavnom putem pasivnog transporta, smatra se da jednostavna veštačka membrana dovoljno dobro simulira pasivni transćelijski transport <sup>132</sup>. PAMPA test je izveden u cilju procene pasivne gastrointestinalne apsorpcije nosintetisanih jedinjenja. Odabrana su dva modela, model A gde je kao veštačka membrane korišćen 1 % rastvor lecitina jajeta u dodekanu i model B gde je korišćena smeša heksadekana i heksana (5:95 v/v). Formiran je test set jedinjenja (5 standarda i 9 nosintetisanih jedinjenja) koja će se testirati u oba modela kako bi se procenilo koji je model pogodniji. Gastrointestinalni apsorpcioni parametar - procenat transporta (% T) je izračunat za sva test set jedinjenja i korišćen u cilju poređenja dva PAMPA modela (**Tabela 11**).

**Tabela 11.** Poređenje dva PAMPA modela na odabranom test setu jedinjenja na osnovu izračunatog parametra % T

Jedinjenja	% T	
	Model A	Model B
<b>3</b>	16,36 ± 0,26	19,13 ± 0,81
<b>4</b>	0,60 ± 0,21	0,80 ± 0,01
<b>5</b>	42,75 ± 2,49	29,54 ± 2,91
<b>7</b>	35,17 ± 0,93	40,32 ± 2,08
<b>8</b>	39,98 ± 10,36	25,78 ± 1,55
<b>10</b>	17,22 ± 0,97	45,56 ± 5,23
<b>11</b>	31,31 ± 4,39	22,65 ± 1,05
<b>12</b>	42,75 ± 0,71	29,06 ± 2,07
<b>17</b>	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>indometacin</b>	60,27 ± 4,72	45,40 ± 1,18
<b>flurbiprofen</b>	93,05 ± 4,10	57,61 ± 4,09
<b>diklofenak</b>	91,63 ± 1,46	52,21 ± 4,37
<b>naproksen-natrijum</b>	64,37 ± 8,07	45,11 ± 3,39
<b>zileuton</b>	2,05 ± 0,94	1,70 ± 0,25

Dobijeni rezultati za oba modela su u visokoj korelaciji, pri čemu se značajnija razlika zapaža samo kod jedinjenja **10**. Za standarde indometacin, flurbiprofen, diklofenak i naproksen-natrijum su u oba modela dobijene visoke vrednosti % T. Nakon odbacivanja jedinjenja **10** kao *outlayer*-a, dobijen je visok stepen korelacije između ova dva modela ( $R^2 = 0,9145$ ). Model B je odabran za dalja ispitivanja jer je vreme inkubacije kraće i postoji mogućnost određivanja membranske retencije, koja može uticati na koeficijent permeabilnosti. Preostala ispitivana jedinjenja su testirana pod istim uslovima kao test set jedinjenja u modelu B. Izračunati su parametri gastrointestinalne apsorpcije: **Pe** - koeficijent efektivne pasivne permeabilnosti i **R** - membranska retencija (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Izračunati PAMPA parametri za sva nosintetisana jedinjenja i standarde u modelu B

Jedinjenje	R	Pe	- logPe ± SD
1	0,03	4,29E-05 ± 7,85E-06	4,37 ± 0,08
2	0,03	1,76E-05 ± 9,61E-07	4,76 ± 0,02
3	0,00	7,73E-05 ± 4,19E-06	4,11 ± 0,02
4	0,02	2,65E-06 ± 4,61E-08	5,58 ± 0,01
5	0,06	1,58E-04 ± 2,04E-05	3,80 ± 0,05
6	0,00	2,22E-04 ± 7,59E-06	3,65 ± 0,01
7	0,00	2,66E-04 ± 3,73E-05	3,58 ± 0,06
8	0,30	2,13E-04 ± 2,42E-05	3,67 ± 0,05
9	0,02	1,24E-06 ± 1,36E-06	6,08 ± 0,47
10	0,00	3,13E-04 ± 2,04E-05	3,50 ± 0,03
11	0,24	1,46E-04 ± 1,57E-05	3,84 ± 0,05
12	0,07	1,57E-04 ± 1,34E-05	3,80 ± 0,04
13	0,63	1,47E-08 ± 6,17E-09	7,83 ± 0,17
14	0,08	1,55E-08 ± 5,87E-10	7,81 ± 0,02
15	0,02	3,07E-08 ± 2,52E-10	7,51 ± 0,00
16	0,00	4,10E-08 ± 6,15E-09	7,39 ± 0,07
17	0,02	2,53E-08 ± 8,16E-09	7,60 ± 0,16
18	0,04	5,60E-09 ± 3,65E-10	8,25 ± 0,03
19	0,04	1,20E-09 ± 5,59E-11	8,92 ± 0,02
<b>indometacin</b>	0,00	3,86E-04 ± 4,50E-05	3,41 ± 0,05
<b>flurbiprofen</b>	0,02	8,38E-04 ± 1,50E-04	<3,40
<b>diklofenak</b>	0,08	7,27E-04 ± 8,37E-05	<3,40
<b>naproksen-natrijum</b>	0,01	3,18E-04 ± 1,07E-05	3,50 ± 0,01
<b>ibuprofen</b>	0,06	>32,00E-05 ±	<3,40
<b>zileuton</b>	0,04	5,79E-06 ±	5,24 ± 0,07

Za derivate *N*-hidroksiuree (jedinjenja **1**, **2** i **3**) su dobijene **-logPe** vrednosti u opsegu od 4,11 do 4,76, što je neznatno više u odnosu na testirani standard indometacin (**-logPe** = 3,41), te se može zaključiti da ova jedinjenja imaju relativno dobru permeabilnost i da se očekuje i dobra pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Indometacin ispoljava bolju permeabilnost u odnosu na njegov derivat (jedinjenje **1**) koji sadrži *N*-hidroksiureu u strukturi. Standard zileuton takođe sadrži *N*-hidroksiureu koja utiče na slabiju permeabilnost jedinjenja, te je za ovaj standard dobijena viša **-logPe** vrednost (5,24). Svi derivati 2,6-di-*terc*-butilfenola - jedinjenja **4**, **5**, **6**, **7** (osim jedinjenja **13**) su imali relativno slične **-logPe** vrednosti (3,58 - 5,58). Niske **-logPe** vrednosti jedinjenja **5**, **6** i **7** (oko 3,5) ukazuju na dobru GIT apsorpciju, dok je za jedinjenje **4** dobijena viša vrednost, što je posledica prisutnog polarnog aminokiselinskog ostatka koji smanjuje permeabilnost jedinjenja. Za jedinjenje **13** je dobijena značajno viša **-logPe** vrednost, što se objašnjava lošom rastvorljivošću jedinjenja u puferu. Za derivate uree, jedinjenja **8** i **9**, dobijene su različite **-logPe** vrednosti, pri čemu je za jedinjenje **8** dobijena značajno niža vrednost. Jedinjenje **9** sadrži karboksilnu grupu koja je na pH 5,5 u jonizovanoj formi, dok jedinjenje **8** sadrži etarsku grupu umesto karboksilne grupe koja utiče na povećanje lipofilnosti jedinjenja, te se očekuje bolja permeabilnost i pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Za jedinjenje **10** je dobijena **-logPe** vrednost 3,50 koja je u rangu standarda indometacina i naproksen-natrijuma. Ovaj derivat uree je lipofilniji od drugih jedinjenja iz ove klase jer sad p-nitrofenil ostatak. Za derivate hidroksamske kiseline tipa B (-N(OH)COCH<sub>3</sub>), jedinjenja **11** i **12**, su dobijene slične **-logPe** vrednosti (3,84 i 3,80). Za derivate sulfhidroksamske kiseline (jedinjenja **14**, **15**, **16**, **17**, **18** i **19**) su dobijene **-logPe** vrednosti u opsegu od 7,39 do 8,92 koje ukazuju na slabu permeabilnost testiranih derivata i od njih se očekuje slaba pasivna gastrointestinalna apsorpcija.

Rezultati PAMPA testa za derivate *N*-hidroksiuree (jedinjenja **1**, **2** i **3**) bili su u skladu sa rezultatima BMC i za ove derivate se očekuje dobra pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Iz ove grupe se izdvaja jedinjenje **3** kao jedinjenje sa potencijalno najboljom pasivnom GIT apsorpcijom (**-logPe** = 4,11; **k** = 9,5). Niske **-logPe** vrednosti jedinjenja **5**, **6** i **7** bile su u skladu sa višim **k** vrednostima BMC testa i ukazuju na dobru pasivnu gastrointestinalnu apsorpciju. Za jedinjenje **10** rezultati oba testa su bili usklađeni i za ovo jedinjenje se očekuje dobra pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Za derivate sulfhidroksamske kiseline dobijene su niske **k** vrednosti i više **-logPe** vrednosti što ukazuje na nisku pasivnu gastrointestinalnu apsorpciju. Za derivate uree, jedinjenja **8** i **9**, dobijene **-logPe** vrednosti ukazuju na relativno dobru permeabilnost, dok su **k** vrednosti bile niže i ukazivale na nisku permeabilnost, te u ovom slučaju rezultati ova dva testa nisu bili usklađeni. U slučaju jedinjenja **13** dobijena je visoka **k** vrednost koja ukazuje na dobru pasivnu gastrointestinalnu apsorpciju. BMC rezultat za jedinjenje **13** nije bio u skladu sa rezultatom PAMPA testa (**-logPe** = 7,83 ukazuje na nisku pasivnu gastrointestinalnu apsorpciju) što može biti posledica slabe rastvorljivosti jedinjenja u puferu pH 5,5. Ukoliko bi se poboljšala rastvorljivost jedinjenja **13** u puferu pH 5,5 (primenom odgovarajuće formulacije ili površinski aktivnih materija), ovo jedinjenje bi imalo potencijal za dobru pasivnu gastrointestinalnu apsorpciju.

Rezultati BMC i PAMPA testa su u velikoj meri usaglašeni sa lipofilnošću, te se može očekivati da je lipofilnost jedan od faktora koji utiče na dobijene rezultate.

#### 4.9. Citotoksični efekti ispitivanih jedinjenja na kancerskim ćelijama i njihov efekat u kombinaciji sa zračenjem

Inhibicija COX-2 i 5-LOX enzima prepoznata je kao potencijalni terapijski pristup u terapiji kolorektalnog kancera i kancera pankreasa<sup>56, 190, 191</sup>. Citotoksična aktivnost jedinjenja **1 – 19** je testirana na dve ćelijske linije kancera kolona (HCT 116 i HT-29), jednoj ćelijskoj liniji kancera pankreasa (BxPC-3) i jednoj zdravoj ćelijskoj liniji normalnih humanih fibroblasta (MRC-5). Citotoksični efekat testiranih jedinjenja je predstavljen kao IC<sub>50</sub> vrednost ± SEM. Dobijeni rezultati izvršenog MTT testa su prikazani u **Tabeli 13**. Tri komercijalno dostupna COX inhibitora (indometacin, flurbiprofen i diklofenak), kao i jedan 5-LOX inhibitor (zileuton), korišćeni su kao standardi za poređenje. COX inhibitori indometacin, flurbiprofen i diklofenak su odabrani iz razloga što su nosivci jedinjenja **1, 2 i 3** njihovi derivati. Za jedinjenja **8, 9, 14, 17 i 18** dobijene su IC<sub>50</sub> vrednosti veće od 100 µM. Preostala jedinjenja su ispoljila prilično dobar citotoksični efekat, sa izvesnim varijacijama između različitih ispitivanih ćelijskih linija. Može se zapaziti da su strukturno slična jedinjenja ispoljila različit citotoksični efekat. Iz grupe derivata *N*-hidroksiuree, jedinjenje **1** je ispoljilo snažan citotoksični efekat na svim tipovima tretiranih ćelija, dok je jedinjenje **3** ispoljilo dobar citotoksični efekat prema kancerskim ćelijama, a znatno slabiji efekat je bio prema zdravim ćelijama, te se može zaključiti da ispoljava značajnu selektivnost (indeks selektivnosti: > 2,45 (HCT 116); > 2,91 (BxPC-3); > 1,55 (HT-29)). Jedinjenja **11 i 12** prema strukturnim karakteristikama pripadaju istoj grupi derivata hidroksamske kiseline tipa B, međutim, i ova jedinjenja su ispoljila različit citotoksični efekat. Jedinjenje **11** je ispoljilo sličan citotoksični efekat na svim testiranim ćelijskim linijama (uporedive IC<sub>50</sub> vrednosti), dok je jedinjenje **12** imalo znatno slabiji citotoksični efekat na HCT 116 i HT-29 ćelijskim linijama (ćelije kancera kolona). Oba testirana jedinjenja nisu ispoljila selektivnost ka kancerskim ćelijama u odnosu na zdrave ćelije. Jedinjenja **1, 10 i 13** su ispoljila prilično jak citotoksični efekat kako na kancerskim tako i na zdravoj ćelijskoj liniji (**Tabela 13**). Ova jedinjenja su isključena iz daljih eksperimenata koji uključuju zračenje, jer bi došlo do velike smrtnosti ćelija. Odabir jedinjenja koja će se koristiti u daljim eksperimentima radiosenzitizacije se zasniva na njihovim inhibitornim efektima (dualna COX-2 i 5-LOX inhibicija), kao i na selektivnoj citotoksičnosti prema ćelijama kancera. Jedinjenja **3, 5, 6** (dualni inhibitori) i **7** (5-LOX inhibitor) ispunila su ove kriterijume i stoga su odabrana za dalje eksperimente koji uključuju zračenje. Jedinjenja **1, 2 i 3** (derivati indometacina, flurbiprofena i diklofenaka), ispoljila su jači citotoksični efekat prema različitim kancerskim ćelijama od polaznih NSAIL, te se može izneti pretpostavka da bi razvoj jedinjenja u ovom smeru doveo do ispoljavanja potentnije antikancerske aktivnosti i selektivnosti. Ovi derivati *N*-hidroksiuree su ispoljili jači citotoksični efekat i od zileutona koji sadrži *N*-hidroksiureu u strukturi. Može se zaključiti da kombinovanje farmakofora NSAIL i *N*-hidroksiurea grupe zileutona predstavlja potencijalni pristup u razvoju jedinjenja sa potentnijom citotoksičnošću i selektivnošću.

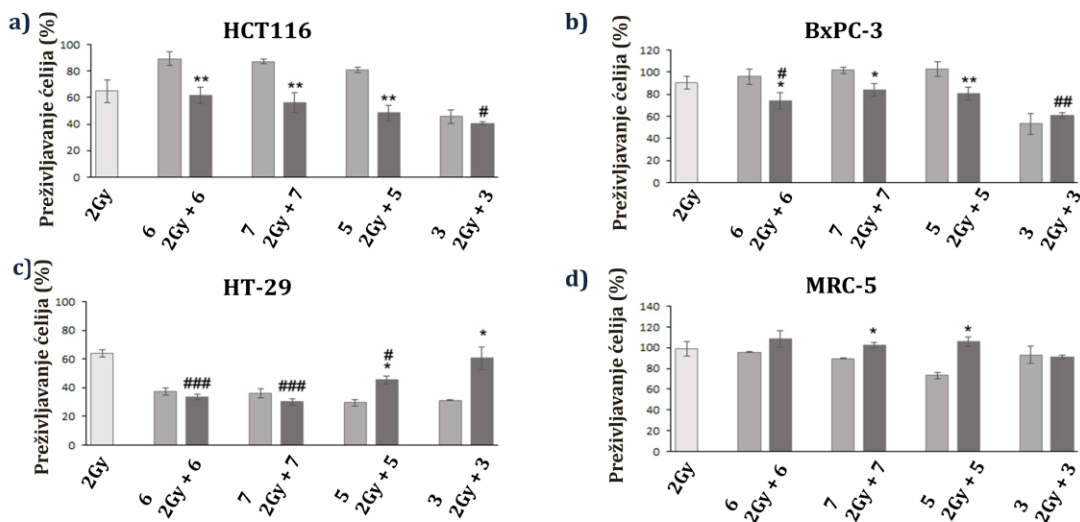
**Tabela 13.** Rezultati MTT testa - citotoksična aktivnost ispitivanih jedinjenja prema tri kancerske i jednoj zdravoj ćelijskoj liniji

Jedinjenja	IC <sub>50</sub> vrednosti (µM)			
	HCT116	BxPC-3	HT-29	MRC-5
1	4,97 ± 0,78 (1,95) <sup>a</sup>	12,78 ± 1,11 (0,76)	9,78 ± 0,68 (0,99)	9,68 ± 2,34 (1)
2	64,76 ± 2,76 (1,07)	48,70 ± 4,60 (1,42)	82,38 ± 4,25 (0,84)	69,12 ± 3,07 (1)
3	40,76 ± 1,95 (> 2,45)	34,28 ± 1,79 (> 2,91)	64,64 ± 3,41 (> 1,55)	> 100 (/)
4	29,51 ± 5,23 (1,20)	24,72 ± 2,01 (1,43)	42,28 ± 2,57 (0,84)	35,44 ± 4,14 (1)
5	51,66 ± 1,78 (> 1,94)	41,20 ± 2,88 (> 2,43)	81,60 ± 2,77 (> 1,22)	> 100 (/)
6	22,99 ± 3,27 (> 4,35)	8,63 ± 0,77 (> 11,59)	24,78 ± 5,40 (> 4,04)	> 100 (/)
7	30,23 ± 5,07 (> 3,31)	29,20 ± 1,56 (> 3,42)	> 100 (/)	> 100 (/)
8	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)
9	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)
10	9,30 ± 0,38 (2,01)	6,05 ± 1,68 (3,09)	7,08 ± 0,30 (2,64)	18,68 ± 0,98 (1)
11	82,05 ± 2,34 (0,70)	63,02 ± 3,80 (0,91)	84,14 ± 3,43 (0,68)	57,10 ± 3,80 (1)
12	> 100 (/)	76,68 ± 5,54 (0,83)	> 100 (/)	63,56 ± 9,04 (1)
13	2,21 ± 0,12 (25,84)	1,80 ± 0,10 (31,72)	12,40 ± 1,95 (4,60)	57,10 ± 3,80 (1)
14	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)
15	88,10 ± 1,05 (0,88)	82,10 ± 2,91 (0,94)	84,11 ± 1,69 (0,92)	77,35 ± 7,20 (1)
16	92,97 ± 1,90 (0,78)	57,94 ± 3,58 (1,26)	76,61 ± 4,45 (0,95)	72,97 ± 1,37 (1)
17	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)
18	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)	> 100 (/)
19	61,13 ± 4,74 (1,08)	79,88 ± 5,91 (0,83)	55,91 ± 2,69 (1,19)	66,42 ± 2,92 (1)
<b>diklofenak</b>	79,11 ± 3,68 (1,14)	57,19 ± 3,03 (1,58)	74,95 ± 3,98 (1,21)	90,62 ± 3,20 (1)
<b>indometacin</b>	60,44 ± 4,27 (1,32)	85,91 ± 2,58 (0,93)	89,48 ± 4,45 (0,89)	79,76 ± 5,90 (1)
<b>flurbiprofen</b>	>100 (/)	>100 (/)	>100 (/)	>100 (/)
<b>zileuton</b>	44,89 ± 3,48 (2,13)	74,92 ± 4,10 (1,28)	78,49 ± 2,28 (1,22)	95,74 ± 0,94 (1)

<sup>a</sup> indeks selektivnosti (IC<sub>50</sub> zdrava ćelijska linija/ IC<sub>50</sub> kancerska ćelijska linija) je u zagradama

Brojne studije su pokazale da je SRB test efikasan za *in vitro* testiranje osetljivosti ćelija kancera na zračenje, kao i za ispitivanje interakcije između radioterapije i hemoterapije, sa osetljivošću koja je uporediva sa osetljivošću standardnog klonogenog testa<sup>136, 192, 193</sup>. Na osnovu rezultata prikazanih na **Slici 28**, zračenje je u značajnoj meri uticalo samo na ćelije HCT 116 i HT-29 sa smanjenjem proliferacije ćelija za oko 40 % u poređenju sa kontrolom, dok ćelijske linije MRC-5 i BxPC-3 nisu značajno reagovala na tretmane zračenjem. Razlog niskog stepena zračenjem prouzrokovane inaktivacije ovih ćelija mogao bi biti njihova inherentna rezistencija na zračenje, ili ispoljavanje efekta zračenja tek nakon dužeg izlaganja<sup>194, 195</sup>. Sva testirana jedinjenja su ispoljila najznačajniji efekat na HT-29 ćelijskoj liniji. Kod ostalih ćelijskih linija se zapaža znatno manji uticaj testiranih jedinjenja (**Slika 28a-28d**). Ovi rezultati su se donekle razlikovali od rezultata MTT testa gde su četiri odabrana jedinjenja u primenjenim koncentracijama izazivala smanjenje proliferacije ćelija za više od 50 %. Uočene razlike između rezultata mogu se

objasniti razlikama u primenjenim MTT i SRB testovima <sup>193</sup>. Prethodno sprovedenim studijama od strane nekoliko istraživačkih grupa pokazano je da rezultati SRB testa dobro koreliraju sa rezultatima MTT testa, iako su IC<sub>50</sub> vrednosti jedinjenja testiranih korišćenjem SRB metode bile nešto veće <sup>136, 196, 197, 198</sup>. Ove razlike se mogu pripisati različitim krajnjim tačkama koje se mere ovim testovima. MTT test zahteva ćelijsku metaboličku aktivnost kako bi se bezbojni tetrazolijum preveo u ljubičasto obojeni formazan i detektuje samo žive ćelije, dok se SRB test koristi za određivanje ćelijske gustine i zasniva se na merenju sadržaja ćelijskih proteina bez razlike između mrtvih i živih ćelija. Međutim, razlika između ova dva testa ne ugrožava sposobnost SRB testa da otkrije citotoksični efekat jedinjenja i/ili zračenja <sup>136</sup>. Iako je kombinovani tretman koji je uključivao jedinjenje **6** i zračenje doveo do smanjenja proliferacije ćelija u svim ćelijskim linijama kancera, statistički značajna razlika u odnosu na zračenje je zapažena samo u BxPC-3 i HT-29 ćelijskim linijama ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ). U poređenju sa tretmanom koji je uključivao samo zračenje, jedinjenja **5** i **7** su značajno inaktivirala samo HT-29 ćelije ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ) (**slika 28c**). Stopa proliferacije HCT 116 ćelija prethodno tretiranih jedinjenjem **3** i ozračenih bila je niža u odnosu na ćelije koje su samo ozračene ( $p < 0,05$ ). Ovo jedinjenje je takođe ispoljilo efekat na ćelijskoj liniji BxPC-3, sa značajnom promenom u ćelijskoj inaktivaciji kada su oba tretmana primenjena zajedno ( $p < 0,01$ ). Na osnovu dobijenih rezultata testiranja na BxPC-3 i HT-29 ćelijskim linijama, može se zapaziti da jedinjenja **3** i **5** ispoljavaju antagonistički efekat sa zračenjem, što se može objasniti različitim efektima ovih jedinjenja na ćelijski ciklus. Rezultati SRB testa ukazuju na to da sva testirana odabrana jedinjenja imaju potencijal da povećaju osetljivost ispitivanih ćelijskih linija na zračenje. Uzimajući u obzir inherentnu osetljivost ćelija na zračenje i hemoterapeutike, sposobnost testiranih jedinjenja da povećaju osetljivost na zračenje može biti specifična za ćelijsku liniju, jer je pokazano da su HT-29 ćelije bile osetljivije od ostalih.



**Slika 28.** Efekti jedinjenja **3**, **5**, **6**, **7** i  $\gamma$ -zračenja (2 Gy) na preživljavanje ćelija: a) HCT 116, b) BxPC-3, c) HT-29 i d) MRC-5, 72 h nakon tretmana. \*, # $p < 0,05$ ; \*\*, ## $p < 0,01$ ; \*\*\*, ### $p < 0,001$  (\*- statistički značaj u poređenju sa inhibitorom; #- statistički značaj u poređenju sa zračenjem)

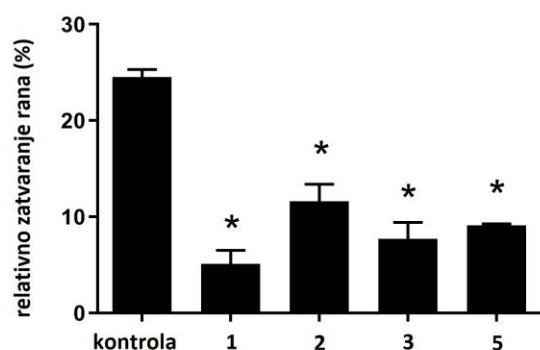
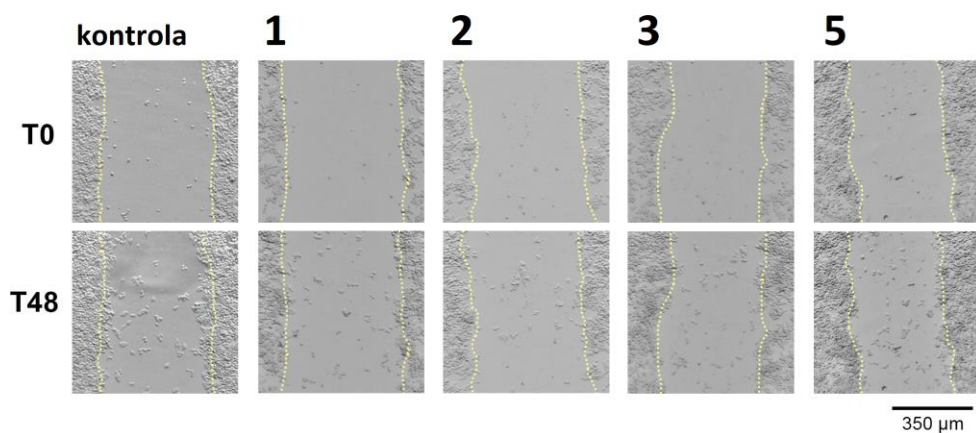
#### 4.10. Antimigratorni potencijal odabranih jedinjenja i vijabilnost SW620 ćelija nakon tretmana

Antimigratorni potencijal odabranih jedinjenja u koncentraciji od 25  $\mu$ M (jedinjenja **1**, **2**, **3** i **5**) ispitan je u testu zarastanja rana na SW620 ćelijskoj liniji. Ćelijska linija SW620 ima snažan metastatski i invazivni potencijal, te je stoga izabrana za procenu antimigratornog potencijala ispitivanih jedinjenja. Ova ćelijska linija je korišćena u različitim studijama koje su uključivale COX-2 inhibitore <sup>199, 200, 201</sup>. Analiza je vršena u tri vremenske tačke: odmah nakon tretmana, nakon 24 h i nakon 48 h. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 14**.

**Tabela 14.** Relativno zatvaranje rana nakon primenjenih tretmana u dve vremenske tačke (nakon 24 h i 48 h)

Tretman	Relativno zatvaranje rane	
	24 h	48 h
/ (kontrola)	17,87 $\pm$ 3,48	24,51 $\pm$ 1,39
jedinjenje 1	3,20 $\pm$ 0,99	5,08 $\pm$ 2,46
jedinjenje 2	7,47 $\pm$ 2,14	11,61 $\pm$ 3,06
jedinjenje 3	3,86 $\pm$ 0,19	7,68 $\pm$ 2,99
jedinjenje 5	7,12 $\pm$ 1,43	9,11 $\pm$ 0,27

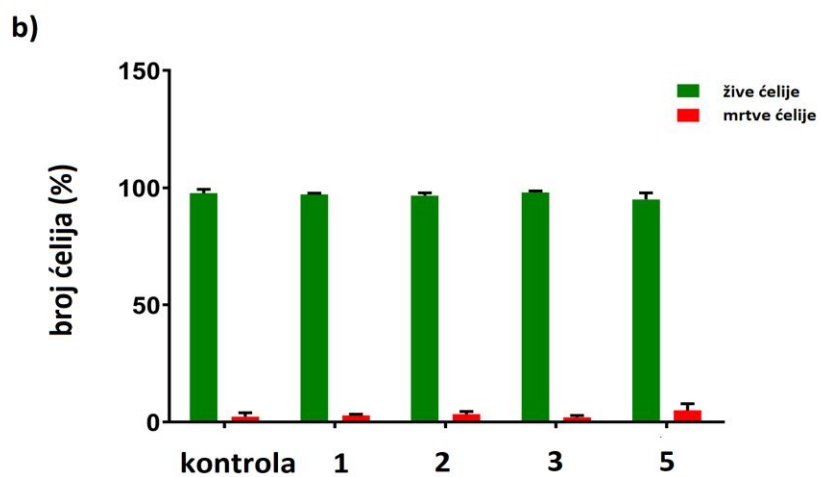
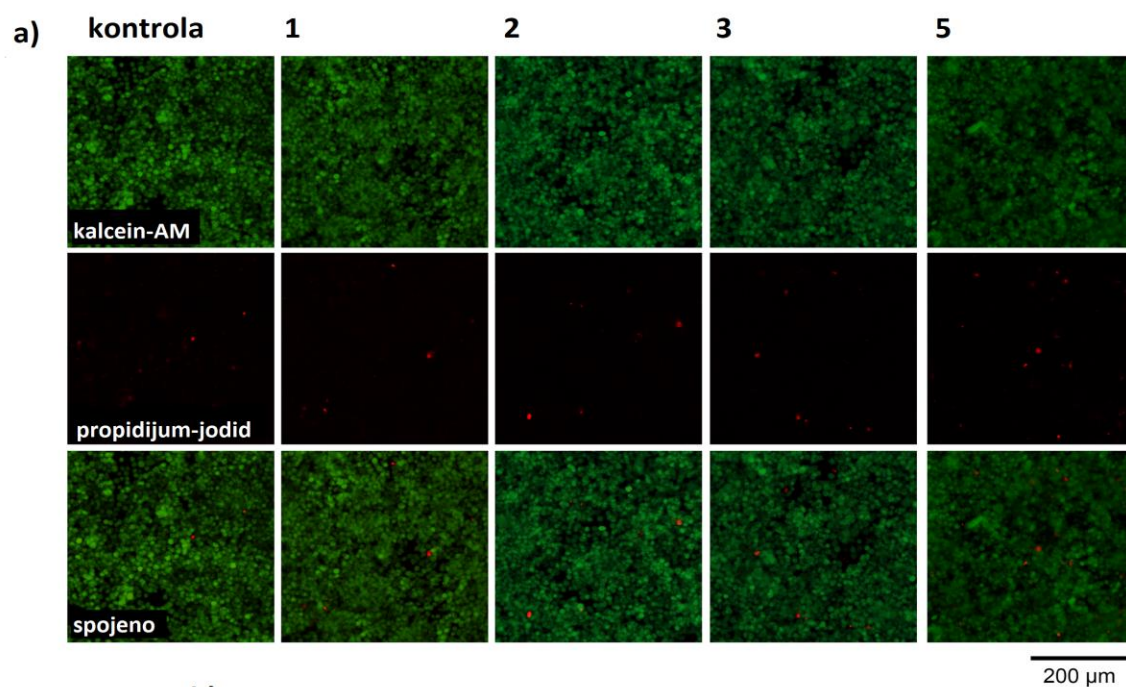
Na osnovu dobijenih rezultata (**Tabela 15**) može se zaključiti da je tretman ispitivanim jedinjenjima doveo do smanjenja migracije ćelija nakon povrede u odnosu na kontrolu (bez tretmana), tj. došlo je do manjeg relativnog zatvaranja rana. Dobijeni rezultati su prikazani i grafički gde su naglašene statistički značajne razlike u rezultatima (**Slika 29**). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM iz tri nezavisna eksperimenta (n = 3).



**Slika 29.** Migratorni potencijal SW620 ćelija procenjen testom zarastanja rana: a) reprezentativne slike svakog eksperimentalnog stanja snimljene na T0 i T48; b) histogram pokazuje relativno zatvaranje rane nakon 48 h; statistički značajna razlika između tretmana i netretirane kontrole je označena sa \* $p < 0,05$

Statistički značajne razlike u migraciji ćelija u slučaju kontrole (bez tretmana) i posle tretmana odabranim jedinjenjima nakon povrede zapažene su u slučaju svih testiranih jedinjenja posle 48 h. Na osnovu ovih rezultata može se izvesti zaključak da jedinjenja **1**, **2**, **3** i **5** ispoljavaju antimigratorni potencijal, pri čemu se izdvajaju derivati *N*-hidroksiuree: jedinjenje **1** i jedinjenje **3**. Jedinjenje **3** se izdvaja ujedno i kao najbolji dualni COX-2 i 5-LOX inhibitor, a ispoljilo je i zadovoljavajuće citotoksične efekte.

Na **Slici 30** su prikazani rezultati kalcein-AM testa vijabilnosti izvedenog sa 25 µM rastvorima jedinjenja **1**, **2**, **3** i **5**. Izvršena je kvantifikacija živih/mrtvih ćelija po polju. Ovaj test se radi u cilju potvrde da antimigratorni efekat jedinjenja nije posledica smrti ćelija. Zapaža se da je broj živih ćelija neuporedivo veći od broja mrtvih, te se može zaključiti da antimigratorni efekat nije posledica ćelijske smrti. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).



**Slika 30.** Vijabilnost SW620 ćelija nakon 48 h od tretmana sa jedinjenjima **1**, **2**, **3** i **5**; a) reprezentativne slike; (b) kvantifikacija SW620 ćelija obeleženih kalceinom-AM (žive ćelije) i propidijum-jodidom (mrtve ćelije) 48 h posle tretmana

## **5. ZAKLJUČAK**

- Na osnovu SAR analize dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora koji su preuzeti iz literature izvršeno je dizajniranje i odabir jedinjenja koja će biti sintetisana. Devetnaest odabranih jedinjenja pripadaju analogima NSAIL (derivati *N*-hidroksiuree - **1**, **2** i **3**, derivati hidroksamske kiseline tipa B - **11** i **12** i derivati sulfhidroksamske kiseline - **14**, **15** i **16**), grupi derivata di-*terc*-butilhidroksitoluena (**4**, **5**, **6**, **7** i **13**) i grupi derivata uree (**8**, **9** i **10**).
- Pregledom literature formiran je *dataset* koji je korišćen za kreiranje 3D-QSAR modela koji su se koristili za dizajniranje novih derivata sulfhidroksamske kiseline. Molekulski doking je korišćen u cilju utvrđivanja potencijalno značajnih interakcija *dataset* jedinjenja i dizajniranih jedinjenja u aktivnim centrima enzima COX-1, COX-2 i 5-LOX. Na osnovu rezultata 3D-QSAR studije i molekuskog dokinga, derivati sulfhidroksamske kiseline **17**, **18** i **19** odabrani su za sintezu.
- Sintetisano je devetnaest jedinjenja sa prinosima u opsegu 7,0-86,5 %. Jedinjenje **17** je proizvod dvostepene reakcije, dok su jedinjenja **11**, **12**, **15** i **16** sintetisana u više sintetskih koraka. Jedinjenja su okarakterisana određivanjem temperature topljenja i primenom spektroskopskih metoda: infracrvenom spektroskopijom (IR), nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), masenom spektroskopijom (MS/MS) i masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRMS).
- Jedinjenja **1-19** testirana su primenom *in vitro* inhibitornih COX-1, COX-2 i 5-LOX enzimskih eseja. Sedam jedinjenja (**1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **11** i **12**) su ispoljila dualnu COX-2 i 5-LOX inhibitornu aktivnost sa IC<sub>50</sub> vrednostima opsegu od 5,26 μM do 83,42 μM (COX-2) i od 1,04 μM do 53,84 μM (5-LOX). Ispitana je i COX-1 inhibitorna aktivnost ovih sedam jedinjenja i utvrđeno je da su slabi COX-1 inhibitori i da imaju zadovoljavajuću selektivnost prema COX-2 enzimu. Jedinjenja **4**, **7**, **8**, **10** i **13** su ispoljila samo 5-LOX inhibitornu aktivnost. Najbolji dualni inhibitori bila su jedinjenja iz grupe derivata *N*-hidroksiuree (jedinjenja **1**, **2** i **3**).
- Procena redoks aktivnosti jedinjenja **1-19** obavljena je *in vitro* određivanjem redoks parametara u prisustvu i bez prisustva egzogenog oksidansa - *terc*-butil hidroperoksida (TBH). Na osnovu vrednosti ovih parametara izračunati su prooksidativni skor, antioksidativni skor i oksi skor (OS). Procena redoks aktivnosti je pokazala da su testirana jedinjenja bolji antioksidansi od standarda celekoksiba i zileutona. Jedinjenja **1-19** se mogu rangirati prema njihovom antioksidativnom potencijalu (srednje vrednosti OS) sledećim redosledom: **18** > **17** > **10** > **19** > **8** > **9** > **16** > **11** > **15** > **1** / **5** > **13** / **14** > **3** / **12** > **4** > **6** > **2** > **7**. Dualni inhibitori iz grupe derivata *N*-hidroksiuree (**1**, **2** i **3**) i jedinjenje **5** se ističu kao dobri potencijalni antioksidansi.

- Za određivanje lipofilnosti jedinjenja **1-19** razvijena je alternativna RP-HPLC metoda. Ispitivanjem uticaja različitih kolona i mobilnih faza i optimizacijom hromatografskih uslova postavljen je najpogodniji sistem za procenu lipofilnosti: kolona C18 (stacionarna faza), acetonitril i fosfatni pufer (pH 7,4 i pH 5,5) u različitim odnosima (mobilna faza), temperatura kolone 25 °C, brzina protoka 1 mL/min, detekcija na  $\lambda$  220 nm, 240 nm, 254 nm, 270 nm i 400 nm. U ovom sistemu je dobijen najveći koeficijent korelacije između hromatografskog parametra **log<sub>w</sub>k** i logD vrednosti predviđene programom MarvinSketch je ( $r = 0,9475$  na pH 7,4, odnosno  $r = 0,9542$  na pH 5,5). Pet testiranih jedinjenja (**9, 14, 15, 16, 18**) nisu imala sposobnost retencije, što je u skladu sa njihovim veoma niskim logD vrednostima, dok tri jedinjenja (**10, 17 i 19**) od ukupno četrnaest preostalih jedinjenja, nisu pokazala slaganje sa izračunatim logD vrednostima. Jedinjenja **5, 6, 7 i 13** imala su najveće **log<sub>w</sub>k** vrednosti.
- *In vitro* procena permeabilnosti i gastrointestinalne apsorpcije jedinjenja **1-19** je izvršena primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC) i PAMPA testa. Faktori retencije (**k**), proistekli iz BMC eksperimenta, kretali su se u rasponu od 0,22 do 36,96. Niske **k** vrednosti su dobijene za jedinjenja **8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 i 19**, te se očekuje slaba pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Visoke **k** vrednosti su dobijene za derivate N-hidroksiuree (**1, 2 i 3**) i 2,6-di-*terc*-butilfenola (**5, 6, 7 i 13**). Za ova jedinjenja se očekuje dobra pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Za PAMPA test je odabran model B, gde je kao veštačka membrana korišćena smeša heksadekana i heksana (5:95 v/v). Visoke **-logPe** vrednosti, dobijene za jedinjenja **14-19**, ukazuju na slabu pasivnu gastrointestinalnu apsorpciju. Niske **-logPe** vrednosti dobijene su za jedinjenja **1, 2, 3, 5, 6 i 7** i za ove derivate se očekuje dobra pasivna gastrointestinalna apsorpcija. Rezultati BMC i PAMPA testa su u popriličnoj meri usaglašeni, a usaglašenost sa lipofilnošću ukazuje na to da je lipofilnost jedan od faktora koji utiče na dobijene rezultate.
- Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja **1-19** je izvršeno korišćenjem MTT testa, na dve ćelijske linije kancera kolona (HCT 116 i HT-29), jednoj ćelijskoj liniji kancera pankreasa (BxPC-3) i jednoj zdravoj ćelijskoj liniji normalnih humanih fibroblasta (MRC-5). Deset testiranih jedinjenja (1, 2, 4, 10, 11, 12, 13, 15, 16 i 19) su ispoljila citotoksični efekat kako na kancerskim, tako i na zdravoj ćelijskoj liniji, te su isključena iz daljih eksperimenata. Za jedinjenja 8, 9, 14, 17 i 18 dobijene su IC<sub>50</sub> vrednosti veće od 100  $\mu$ M, te su i ona isključena iz daljih eksperimenata. Na osnovu rezultata MTT testa, jedinjenja **3, 5, 6** (dualni inhibitori) i **7** (5-LOX inhibitor) su odabrana za dalje eksperimente koji uključuju zračenje. Dualni inhibitori **1, 2 i 3** su ispoljili jači citotoksični efekat i od zileutona. Kombinovanje farmakofora NSAIL i N-hidroksiurea grupe zileutona predstavlja potencijalni pristup u razvoju jedinjenja sa potentnijom citotoksičnošću i selektivnošću. SRB test je korišćen za *in vitro* testiranje osetljivosti ćelija kancera na zračenje, kao i za ispitivanje interakcije između zračenja i odabranih jedinjenja (**3, 5, 6 i 7**). Statistički značajna razlika kombinovanog tretmana u odnosu

na samo zračenje je uočena na HCT 116 i BxPC-3 (**3**), BxPC-3 i HT-29 (**6**) i HT-29 (**5** i **7**) ćelijskoj liniji. Jedinjenja **3** i **5** ispoljila su antagonistički efekat sa zračenjem na BxPC-3 i HT-29 ćelijskim linijama.

- Antimigratorni potencijal dualnih inhibitora **1**, **2**, **3** i **5** ispitan je u testu zarastanja rana na metastatskoj SW620 ćelijskoj liniji. Rezultati testa ukazuju na to da je tretman dualnim inhibitorima doveo do smanjenja migracije ćelija nakon povrede u odnosu na kontrolu (bez tretmana). Dualni inhibitori **1** i **3** su se izdvojili kao jedinjenja sa najboljim antimigratornim potencijalom.

## **6. LITERATURA**

- (1) Ritter, J.; Flower, R. J.; Henderson, G.; Loke, Y. K.; MacEwan, D. J.; Rang, H. P. *Rang and Dale's Pharmacology*, Ninth edition.; Elsevier: Edinburgh, 2020.
- (2) Parkin, J.; Cohen, B. An Overview of the Immune System. *Lancet* **2001**, 357 (9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
- (3) Ricciotti, E.; FitzGerald, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, 31 (5), 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- (4) Medzhitov, R. Origin and Physiological Roles of Inflammation. *Nature* **2008**, 454 (7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.
- (5) Soliman, A. M.; Barreda, D. R. Acute Inflammation in Tissue Healing. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24 (1), 641. <https://doi.org/10.3390/ijms24010641>.
- (6) Kuehl, F. A.; Egan, R. W. Prostaglandins, Arachidonic Acid, and Inflammation. *Science* **1980**, 210 (4473), 978–984. <https://doi.org/10.1126/science.6254151>.
- (7) Hanna, V. S.; Hafez, E. A. A. Synopsis of Arachidonic Acid Metabolism: A Review. *J Adv Res* **2018**, 11, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>.
- (8) Ortiz-Placín, C.; Castillejo-Rufo, A.; Estarás, M.; González, A. Membrane Lipid Derivatives: Roles of Arachidonic Acid and Its Metabolites in Pancreatic Physiology and Pathophysiology. *Molecules* **2023**, 28 (11), 4316. <https://doi.org/10.3390/molecules28114316>.
- (9) Shampo, M. A.; Kyle, R. A. Sune Bergström—Nobel Prize for Prostaglandin Studies. *Mayo Clinic Proceedings* **1998**, 73 (5), 462. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(11\)63731-2](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(11)63731-2).
- (10) Hamberg, M.; Samuelsson, B. Prostaglandin Endoperoxides. Novel Transformations of Arachidonic Acid in Human Platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, 71 (9), 3400–3404. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.9.3400>.
- (11) Xiao, G.; Chen, W.; Kulmacz, R. J. Comparison of Structural Stabilities of Prostaglandin H Synthase-1 and -2\*. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (12), 6801–6811. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.6801>.
- (12) Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M. The X-Ray Crystal Structure of the Membrane Protein Prostaglandin H2 Synthase-1. *Nature* **1994**, 367 (6460), 243–249. <https://doi.org/10.1038/367243a0>.
- (13) Blobaum, A. L.; Marnett, L. J. Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (7), 1425–1441. <https://doi.org/10.1021/jm0613166>.
- (14) Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu Rev Biochem* **2000**, 69, 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>.
- (15) Sinha, S.; Doble, M.; Manju, S. L. 5-Lipoxygenase as a Drug Target: A Review on Trends in Inhibitors Structural Design, SAR and Mechanism Based Approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, 27 (17), 3745–3759. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.06.040>.
- (16) Jo-Watanabe, A.; Okuno, T.; Yokomizo, T. The Role of Leukotrienes as Potential Therapeutic Targets in Allergic Disorders. *Int J Mol Sci* **2019**, 20 (14), 3580. <https://doi.org/10.3390/ijms20143580>.
- (17) Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C. Structural Basis for Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Anti-Inflammatory Agents. *Nature* **1996**, 384 (6610), 644–648. <https://doi.org/10.1038/384644a0>.
- (18) Gilbert, N. C.; Bartlett, S. G.; Waight, M. T.; Neau, D. B.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R.; Newcomer, M. E. The Structure of Human 5-Lipoxygenase. *Science* **2011**, 331 (6014), 217–219. <https://doi.org/10.1126/science.1197203>.

- (19) Pergola, C.; Werz, O. 5-Lipoxygenase Inhibitors: A Review of Recent Developments and Patents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2010**, *20* (3), 355–375. <https://doi.org/10.1517/13543771003602012>.
- (20) Stone, E. An Account of the Success of the Bark of the Willow in the Cure of Agues. In a Letter to the Right Honourable George Earl of Macclesfield, President of R. S. from the Rev. Mr. Edmund Stone, of Chipping-Norton in Oxfordshire. *Philosophical Transactions (1683-1775)* **1763**, *53*, 195–200.
- (21) A Look Back: The Wonder Drug. *Journal of Emergency Nursing* **2000**, *26* (1), 75. [https://doi.org/10.1016/S0099-1767\(00\)70022-5](https://doi.org/10.1016/S0099-1767(00)70022-5).
- (22) Vane, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nat New Biol* **1971**, *231* (25), 232–235. <https://doi.org/10.1038/newbio231232a0>.
- (23) Smith, J. B.; Willis, A. L. Aspirin Selectively Inhibits Prostaglandin Production in Human Platelets. *Nat New Biol* **1971**, *231* (25), 235–237. <https://doi.org/10.1038/newbio231235a0>.
- (24) Hamberg, M.; Samuelsson, B. Oxygenation of Unsaturated Fatty Acids by the Vesicular Gland of Sheep. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, *242* (22), 5344–5354. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99434-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99434-2).
- (25) Miyamoto, T.; Ogino, N.; Yamamoto, S.; Hayaishi, O. Purification of Prostaglandin Endoperoxide Synthetase from Bovine Vesicular Gland Microsomes. *J Biol Chem* **1976**, *251* (9), 2629–2636.
- (26) Loll, P. J.; Picot, D.; Garavito, R. M. The Structural Basis of Aspirin Activity Inferred from the Crystal Structure of Inactivated Prostaglandin H<sub>2</sub> Synthase. *Nat Struct Mol Biol* **1995**, *2* (8), 637–643. <https://doi.org/10.1038/nsb0895-637>.
- (27) Luong, C.; Miller, A.; Barnett, J.; Chow, J.; Ramesha, C.; Browner, M. F. Flexibility of the NSAID Binding Site in the Structure of Human Cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* **1996**, *3* (11), 927–933. <https://doi.org/10.1038/nsb1196-927>.
- (28) Rao, P.; Knaus, E. E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *J Pharm Pharm Sci* **2008**, *11* (2), 81s–110s. <https://doi.org/10.18433/j3t886>.
- (29) Brooks, P. M.; Day, R. O. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs--Differences and Similarities. *N Engl J Med* **1991**, *324* (24), 1716–1725. <https://doi.org/10.1056/NEJM199106133242407>.
- (30) Brooks, P. Use and Benefits of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *The American Journal of Medicine* **1998**, *104* (3, Supplement 1), 9S–13S. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)00204-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00204-0).
- (31) Warner, T. D.; Giuliano, F.; Vojnovic, I.; Bukasa, A.; Mitchell, J. A.; Vane, J. R. Nonsteroid Drug Selectivities for Cyclo-Oxygenase-1 Rather than Cyclo-Oxygenase-2 Are Associated with Human Gastrointestinal Toxicity: A Full in Vitro Analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (13), 7563–7568. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7563>.
- (32) Dogné, J.-M.; Supuran, C. T.; Pratico, D. Adverse Cardiovascular Effects of the Coxibs. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (7), 2251–2257. <https://doi.org/10.1021/jm0402059>.
- (33) Bresalier, R. S.; Sandler, R. S.; Quan, H.; Bolognese, J. A.; Oxenius, B.; Horgan, K.; Lines, C.; Riddell, R.; Morton, D.; Lanasa, A.; Konstam, M. A.; Baron, J. A. Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial. *New England Journal of Medicine* **2005**, *352* (11), 1092–1102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050493>.
- (34) Mukherjee, D.; Nissen, S. E.; Topol, E. J. Risk of Cardiovascular Events Associated With Selective COX-2 Inhibitors. *JAMA* **2001**, *286* (8), 954–959. <https://doi.org/10.1001/jama.286.8.954>.
- (35) Zarghi, A.; Arfaei, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res* **2011**, *10* (4), 655–683.

- (36) Tardif, J.-C.; L'Allier, P. L.; Ibrahim, R.; Grégoire, J. C.; Nozza, A.; Cossette, M.; Kouz, S.; Lavoie, M.-A.; Paquin, J.; Brotz, T. M.; Taub, R.; Pressacco, J. Treatment With 5-Lipoxygenase Inhibitor VIA-2291 (Atreleuton) in Patients With Recent Acute Coronary Syndrome. *Circulation: Cardiovascular Imaging* **2010**, *3* (3), 298–307. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.110.937169>.
- (37) P, J. J.; Manju, S. L.; Ethiraj, K. R.; Elias, G. Safer Anti-Inflammatory Therapy through Dual COX-2/5-LOX Inhibitors: A Structure-Based Approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *121*, 356–381. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.06.003>.
- (38) Corey, E. J.; Cashman, J. R.; Kantner, S. S.; Wright, S. W. Rationally Designed, Potent Competitive Inhibitors of Leukotriene Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (5), 1503–1504. <https://doi.org/10.1021/ja00317a064>.
- (39) Flynn, D. L.; Capiris, T.; Cetenko, W. J.; Connor, D. T.; Dyer, R. D.; Kostlan, C. R.; Nies, D. E.; Schrier, D. J.; Sircar, J. C. Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Hydroxamic Acids. Dual Inhibitors of Both Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase. *J Med Chem* **1990**, *33* (8), 2070–2072. <https://doi.org/10.1021/jm00170a004>.
- (40) Kolasa, T.; Brooks, C. D.; Rodriques, K. E.; Summers, J. B.; Dellaria, J. F.; Hulkower, K. I.; Bouska, J.; Bell, R. L.; Carter, G. W. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs as Scaffolds for the Design of 5-Lipoxygenase Inhibitors. *J Med Chem* **1997**, *40* (5), 819–824. <https://doi.org/10.1021/jm9606150>.
- (41) Argentieri, D. C.; Ritchie, D. M.; Ferro, M. P.; Kirchner, T.; Wachter, M. P.; Anderson, D. W.; Rosenthale, M. E.; Capetola, R. J. Tepoxalin: A Dual Cyclooxygenase/5-Lipoxygenase Inhibitor of Arachidonic Acid Metabolism with Potent Anti-Inflammatory Activity and a Favorable Gastrointestinal Profile. *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, *271* (3), 1399–1408.
- (42) Connolly, P. J.; Wetter, S. K.; Beers, K. N.; Hamel, S. C.; Chen, R. H.; Wachter, M. P.; Ansell, J.; Singer, M. M.; Steber, M.; Ritchie, D. M.; Argentieri, D. C. N-Hydroxyurea and Hydroxamic Acid Inhibitors of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase. *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, *9* (7), 979–984. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(99\)00117-1](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(99)00117-1).
- (43) Barbey, S.; Goossens, L.; Taverne, T.; Cornet, J.; Choemmel, V.; Rouaud, C.; Gimeno, G.; Yannic-Arnoult, S.; Michaux, C.; Charlier, C.; Houssin, R.; Hénichart, J.-P. Synthesis and Activity of a New Methoxytetrahydropyran Derivative as Dual Cyclooxygenase-2/5-Lipoxygenase Inhibitor. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* **2002**, No. 12, 779–782.
- (44) Weisman, S. M.; Doyle, M. J.; Wehmeyer, K. R.; Hynd, B. A.; Eichhold, T. H.; Clear, R. M.; Coggeshall, C. W.; Kuhlenbeck, D. L. Effects of Tebufelone (NE-11740), a New Anti-Inflammatory Drug, on Arachidonic Acid Metabolism. *Agents Actions* **1994**, *41* (3–4), 156–163. <https://doi.org/10.1007/BF02001910>.
- (45) Unangst, P. C.; Connor, D. T.; Cetenko, W. A.; Sorenson, R. J.; Kostlan, C. R.; Sircar, J. C.; Wright, C. D.; Schrier, D. J.; Dyer, R. D. Synthesis and Biological Evaluation of 5-[[3,5-Bis(1,1-Dimethylethyl)-4-Hydroxyphenyl]Methylene]Oxazoles, -Thiazoles, and -Imidazoles: Novel Dual 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase Inhibitors with Antiinflammatory Activity. *J Med Chem* **1994**, *37* (2), 322–328. <https://doi.org/10.1021/jm00028a017>.
- (46) Ye, X.; Zhou, W.; Li, Y.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Ji, H.; Lai, Y. Darbufelone, a Novel Anti-Inflammatory Drug, Induces Growth Inhibition of Lung Cancer Cells Both in Vitro and in Vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* **2010**, *66* (2), 277–285. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1161-z>.
- (47) Inagaki, M.; Tsuru, T.; Jyoyama, H.; Ono, T.; Yamada, K.; Kobayashi, M.; Hori, Y.; Arimura, A.; Yasui, K.; Ohno, K.; Kakudo, S.; Koizumi, K.; Suzuki, R.; Kawai, S.; Kato, M.; Matsumoto, S. Novel Antiarthritic Agents with 1,2-Isothiazolidine-1,1-Dioxide (Gamma-Sultam) Skeleton: Cytokine Suppressive Dual

- Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase. *J Med Chem* **2000**, *43* (10), 2040–2048. <https://doi.org/10.1021/jm9906015>.
- (48) Ghatak, S.; Vyas, A.; Misra, S.; O'Brien, P.; Zambre, A.; Fresco, V. M.; Markwald, R. R.; Swamy, K. V.; Afrasiabi, Z.; Choudhury, A.; Khetmalas, M.; Padhye, S. Novel Di-Tertiary-Butyl Phenylhydrazones as Dual Cyclooxygenase-2/5-Lipoxygenase Inhibitors: Synthesis, COX/LOX Inhibition, Molecular Modeling, and Insights into Their Cytotoxicities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (1), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.015>.
- (49) Lino, R. C.; da Silva, D. P. B.; Florentino, I. F.; da Silva, D. M.; Martins, J. L. R.; Batista, D. da C.; Leite, K. C. de S.; Villavicencio, B.; Vasconcelos, G. A.; Silva, A. L. P.; de Ávila, R. I.; Verli, H.; Valadares, M. C.; Gil, E. de S.; Vaz, B. G.; Lião, L. M.; Menegatti, R.; Costa, E. A. Pharmacological Evaluation and Molecular Docking of New Di-Tert-Butylphenol Compound, LQFM-091, a New Dual 5-LOX/COX Inhibitor. *Eur J Pharm Sci* **2017**, *106*, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.006>.
- (50) Coussens, L. M.; Werb, Z. Inflammation and Cancer. *Nature* **2002**, *420* (6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
- (51) Itzkowitz, S. H.; Yio, X. Inflammation and Cancer IV. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: The Role of Inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2004**, *287* (1), G7-17. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2004>.
- (52) Baron, J. A.; Sandler, R. S. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cancer Prevention. *Annu Rev Med* **2000**, *51*, 511–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.51.1.511>.
- (53) García-Rodríguez, L. A.; Huerta-Alvarez, C. Reduced Risk of Colorectal Cancer among Long-Term Users of Aspirin and Nonaspirin Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Epidemiology* **2001**, *12* (1), 88–93. <https://doi.org/10.1097/00001648-200101000-00015>.
- (54) Goossens, L.; Pommery, N.; Hénichart, J. P. COX-2/5-LOX Dual Acting Anti-Inflammatory Drugs in Cancer Chemotherapy. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7* (3), 283–296. <https://doi.org/10.2174/156802607779941369>.
- (55) Gautam, S.; Roy, S.; Ansari, M. N.; Saeedan, A. S.; Saraf, S. A.; Kaithwas, G. DuCLOX-2/5 Inhibition: A Promising Target for Cancer Chemoprevention. *Breast Cancer* **2017**, *24* (2), 180–190. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0723-2>.
- (56) Ding, X.; Zhu, C.; Qiang, H.; Zhou, X.; Zhou, G. Enhancing Antitumor Effects in Pancreatic Cancer Cells by Combined Use of COX-2 and 5-LOX Inhibitors. *Biomed Pharmacother* **2011**, *65* (7), 486–490. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.06.009>.
- (57) Raju, U.; Ariga, H.; Dittmann, K.; Nakata, E.; Ang, K. K.; Milas, L. Inhibition of DNA Repair as a Mechanism of Enhanced Radioresponse of Head and Neck Carcinoma Cells by a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2005**, *63* (2), 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.06.007>.
- (58) Kuipers, G. K.; Slotman, B. J.; Wedekind, L. E.; Stoter, T. R.; Berg, J. van den; Sminia, P.; Lafleur, M. V. M. Radiosensitization of Human Glioma Cells by Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibition: Independent on COX-2 Expression and Dependent on the COX-2 Inhibitor and Sequence of Administration. *Int J Radiat Biol* **2007**, *83* (10), 677–685. <https://doi.org/10.1080/09553000701558985>.
- (59) Banu, N.; Buda, A.; Chell, S.; Elder, D.; Moorghen, M.; Paraskeva, C.; Qualtrough, D.; Pignatelli, M. Inhibition of COX-2 with NS-398 Decreases Colon Cancer Cell Motility through Blocking Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Possibilities for Combination Therapy. *Cell Prolif* **2007**, *40* (5), 768–779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00459.x>.

- (60) Bhojwani, H.; Begwani, K.; Bhor, V.; Bedi, P.; Balasinor, N.; Raut, S.; Joshi, U. Synthesis and Biological Evaluation of Benzamide-Chalcone Hybrids as Potential c-Met Kinase and COX-2 Inhibitors. *Archiv der Pharmazie* **2023**, *356* (5), 2200405. <https://doi.org/10.1002/ardp.202200405>.
- (61) Mar, W.; Je, K. H.; Seo, E. K. Cytotoxic Constituents of *Psoralea Corylifolia*. *Arch Pharm Res* **2001**, *24* (3), 211–213. <https://doi.org/10.1007/BF02978259>.
- (62) Yang, H. J.; Youn, H.; Seong, K. M.; Yun, Y. J.; Kim, W.; Kim, Y. H.; Lee, J. Y.; Kim, C. S.; Jin, Y.-W.; Youn, B. Psoralidin, a Dual Inhibitor of COX-2 and 5-LOX, Regulates Ionizing Radiation (IR)-Induced Pulmonary Inflammation. *Biochem Pharmacol* **2011**, *82* (5), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.027>.
- (63) Fuchs-Tarlovsky, V. Role of Antioxidants in Cancer Therapy. *Nutrition* **2013**, *29* (1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.02.014>.
- (64) Hayes, J. D.; Dinkova-Kostova, A. T.; Tew, K. D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *38* (2), 167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>.
- (65) Canli, Ö.; Nicolas, A. M.; Gupta, J.; Finkelmeier, F.; Goncharova, O.; Pesic, M.; Neumann, T.; Horst, D.; Löwer, M.; Sahin, U.; Greten, F. R. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis. *Cancer Cell* **2017**, *32* (6), 869–883.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.004>.
- (66) DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Costs. *Journal of Health Economics* **2003**, *22* (2), 151–185. [https://doi.org/10.1016/S0167-6296\(02\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0167-6296(02)00126-1).
- (67) Song, C. M.; Lim, S. J.; Tong, J. C. Recent Advances in Computer-Aided Drug Design. *Briefings in Bioinformatics* **2009**, *10* (5), 579–591. <https://doi.org/10.1093/bib/bbp023>.
- (68) Lahana, R. How Many Leads from HTS? *Drug Discovery Today* **1999**, *4* (10), 447–448. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01393-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01393-8).
- (69) Macalino, S. J. Y.; Gosu, V.; Hong, S.; Choi, S. Role of Computer-Aided Drug Design in Modern Drug Discovery. *Arch. Pharm. Res.* **2015**, *38* (9), 1686–1701. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0640-5>.
- (70) Kapetanovic, I. M. Computer-Aided Drug Discovery and Development (CADD): *In Silico*-Chemico-Biological Approach. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *171* (2), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.006>.
- (71) Wang, Y.; Xiao, J.; Suzek, T. O.; Zhang, J.; Wang, J.; Bryant, S. H. PubChem: A Public Information System for Analyzing Bioactivities of Small Molecules. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37* (suppl\_2), W623–W633. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp456>.
- (72) Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-Lazikani, B.; Overington, J. P. ChEMBL: A Large-Scale Bioactivity Database for Drug Discovery. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (Database issue), D1100–D1107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr777>.
- (73) Sterling, T.; Irwin, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (11), 2324–2337. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>.
- (74) Goto, S.; Okuno, Y.; Hattori, M.; Nishioka, T.; Kanehisa, M. LIGAND: Database of Chemical Compounds and Reactions in Biological Pathways. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30* (1), 402–404. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.402>.
- (75) Chen, J. H.; Linstead, E.; Swamidass, S. J.; Wang, D.; Baldi, P. ChemDB Update—Full-Text Search and Virtual Chemical Space. *Bioinformatics* **2007**, *23* (17), 2348–2351. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm341>.
- (76) Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Rapp, B. A.; Wheeler, D. L. GenBank. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28* (1), 15–18. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.15>.

- (77) Tateno, Y.; Imanishi, T.; Miyazaki, S.; Fukami-Kobayashi, K.; Saitou, N.; Sugawara, H.; Gojobori, T. DNA Data Bank of Japan (DDBJ) for Genome Scale Research in Life Science. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30* (1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.27>.
- (78) Kanz, C.; Aldebert, P.; Althorpe, N.; Baker, W.; Baldwin, A.; Bates, K.; Browne, P.; van den Broek, A.; Castro, M.; Cochrane, G.; Duggan, K.; Eberhardt, R.; Faruque, N.; Gamble, J.; Diez, F. G.; Harte, N.; Kulikova, T.; Lin, Q.; Lombard, V.; Lopez, R.; Mancuso, R.; McHale, M.; Nardone, F.; Silventoinen, V.; Sobhany, S.; Stoehr, P.; Tuli, M. A.; Tzouvara, K.; Vaughan, R.; Wu, D.; Zhu, W.; Apweiler, R. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33* (suppl\_1), D29–D33. <https://doi.org/10.1093/nar/gki098>.
- (79) O'Donovan, C.; Martin, M. J.; Gattiker, A.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Apweiler, R. High-Quality Protein Knowledge Resource: SWISS-PROT and TrEMBL. *Briefings in Bioinformatics* **2002**, *3* (3), 275–284. <https://doi.org/10.1093/bib/3.3.275>.
- (80) Wu, C. H.; Huang, H.; Arminski, L.; Castro-Alvear, J.; Chen, Y.; Hu, Z.-Z.; Ledley, R. S.; Lewis, K. C.; Mewes, H.-W.; Orcutt, B. C.; Suzek, B. E.; Tsugita, A.; Vinayaka, C. R.; Yeh, L.-S. L.; Zhang, J.; Barker, W. C. The Protein Information Resource: An Integrated Public Resource of Functional Annotation of Proteins. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30* (1), 35–37. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.35>.
- (81) Westbrook, J.; Feng, Z.; Jain, S.; Bhat, T. N.; Thanki, N.; Ravichandran, V.; Gilliland, G. L.; Bluhm, W.; Weissig, H.; Greer, D. S.; Bourne, P. E.; Berman, H. M. The Protein Data Bank: Unifying the Archive. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30* (1), 245–248. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.245>.
- (82) Broach, J. R.; Thorner, J. High-Throughput Screening for Drug Discovery.
- (83) Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol Rev* **2014**, *66* (1), 334–395. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>.
- (84) Leelananda, S. P.; Lindert, S. Computational Methods in Drug Discovery. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12* (1), 2694–2718. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267>.
- (85) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **2015**, *20* (7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- (86) Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N. *A Primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Concepts*; SpringerBriefs in Molecular Science; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-17281-1>.
- (87) Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Molecular Informatics* **2010**, *29* (6–7), 476–488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>.
- (88) Verma, J.; Khedkar, V. M.; Coutinho, E. C. 3D-QSAR in Drug Design--a Review. *Curr Top Med Chem* **2010**, *10* (1), 95–115. <https://doi.org/10.2174/156802610790232260>.
- (89) Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (18), 5959–5967. <https://doi.org/10.1021/ja00226a005>.
- (90) Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (24), 4130–4146. <https://doi.org/10.1021/jm00050a010>.
- (91) Goodford, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28* (7), 849–857. <https://doi.org/10.1021/jm00145a002>.

- (92) Fontaine, F.; Pastor, M.; Sanz, F. Incorporating Molecular Shape into the Alignment-Free Grid-Independent Descriptors. *J Med Chem* **2004**, *47* (11), 2805–2815. <https://doi.org/10.1021/jm0311240>.
- (93) 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* (17), 3233–3243. <https://doi.org/10.1021/jm000941m>.
- (94) Durán, A.; Martínez, G. C.; Pastor, M. Development and Validation of AMANDA, a New Algorithm for Selecting Highly Relevant Regions in Molecular Interaction Fields. *J Chem Inf Model* **2008**, *48* (9), 1813–1823. <https://doi.org/10.1021/ci800037t>.
- (95) Durán, Á.; Zamora, I.; Pastor, M. Suitability of GRIND-Based Principal Properties for the Description of Molecular Similarity and Ligand-Based Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (9), 2129–2138. <https://doi.org/10.1021/ci900228x>.
- (96) 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. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **1993**, *12* (1), 9–20. <https://doi.org/10.1002/qsar.19930120103>.
- (97) Begum, S.; Shareef, M. Z.; Bharathi, K. Part-II- in Silico Drug Design: Application and Success. *Physical Sciences Reviews* **2023**, *8* (8), 1741–1788. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0160>.
- (98) Gramatica, P. Principles of QSAR Models Validation: Internal and External. *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26* (5), 694–701. <https://doi.org/10.1002/qsar.200610151>.
- (99) 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 & Combinatorial Science* **2003**, *22* (1), 69–77. <https://doi.org/10.1002/qsar.200390007>.
- (100) Alexander, D. L. J.; Tropsha, A.; Winkler, D. A. Beware of R2: Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (7), 1316–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00206>.
- (101) Ojha, P.; Roy, K. Comparative QSARs for Antimalarial Endochins: Importance of Descriptor-Thinning and Noise Reduction Prior to Feature Selection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2011**, *109*, 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.08.007>.
- (102) Veerasamy, R.; Rajak, H.; Jain, A.; Sivadasan, S.; Christopher, P. V.; Agrawal, R. Validation of QSAR Models - Strategies and Importance. *Int J Drug Design and Discov* **2011**, *2*, 511–519.
- (103) Blundell, T. L. Structure-Based Drug Design. *Nature* **1996**, *384* (6604 Suppl), 23–26. <https://doi.org/10.1038/384023a0>.
- (104) Greer, J.; Erickson, J. W.; Baldwin, J. J.; Varney, M. D. Application of the Three-Dimensional Structures of Protein Target Molecules in Structure-Based Drug Design. *J Med Chem* **1994**, *37* (8), 1035–1054. <https://doi.org/10.1021/jm00034a001>.
- (105) Wang, R.; Lu, Y.; Wang, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (12), 2287–2303. <https://doi.org/10.1021/jm0203783>.
- (106) Huang, S.-Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. Scoring Functions and Their Evaluation Methods for Protein-Ligand Docking: Recent Advances and Future Directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (40), 12899–12908. <https://doi.org/10.1039/C0CP00151A>.
- (107) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2003**, *52* (4), 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.

- (108) Arnott, J. A.; Planey, S. L. The Influence of Lipophilicity in Drug Discovery and Design. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2012**, *7* (10), 863–875. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>.
- (109) Kosmalski, T.; Studzińska, R.; Redka, M.; Pluskota, R.; Modzelewska-Banachiewicz, B. Lipophilicity Study of 1-(Benzofuran-2-Yl)Ethan-1-One Oxime and Its Substituted O-Benzyl Ethers. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 2100–2105. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170055>.
- (110) Kempnińska, D.; Chmiel, T.; Kot-Wasik, A.; Mróz, A.; Mazerska, Z.; Namieśnik, J. State of the Art and Prospects of Methods for Determination of Lipophilicity of Chemical Compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *113*, 54–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.011>.
- (111) Sima, I. A.; Kot-Wasik, A.; Wasik, A.; Namieśnik, J.; Sârbu, C. Assessment of Lipophilicity Indices Derived from Retention Behavior of Antioxidant Compounds in RP-HPLC. *Molecules* **2017**, *22* (4), 550. <https://doi.org/10.3390/molecules22040550>.
- (112) Valkó, K.; Snyder, L. R.; Glajch, J. L. Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography as a Function of Mobile-Phase Composition. *Journal of Chromatography A* **1993**, *656* (1), 501–520. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80816-Q](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80816-Q).
- (113) Hilgers, A. R.; Conradi, R. A.; Burton, P. S. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport across the Intestinal Mucosa. *Pharm Res* **1990**, *7* (9), 902–910. <https://doi.org/10.1023/a:1015937605100>.
- (114) Tsopelas, F.; Danias, P.; Pappa, A.; Tsantili-Kakoulidou, A. Biopartitioning Micellar Chromatography under Different Conditions: Insight into the Retention Mechanism and the Potential to Model Biological Processes. *Journal of Chromatography A* **2020**, *1621*, 461027. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461027>.
- (115) Stępnik, K. E.; Malinowska, I. The Use of Biopartitioning Micellar Chromatography and Immobilized Artificial Membrane Column for *in Silico* and *in Vitro* Determination of Blood–Brain Barrier Penetration of Phenols. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1286*, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.071>.
- (116) Escuder-Gilabert, L.; Martínez-Pla, J. J.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernández, M. J. Biopartitioning Micellar Separation Methods: Modelling Drug Absorption. *Journal of Chromatography B* **2003**, *797* (1), 21–35. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00606-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00606-8).
- (117) Molero-Monfort, M.; Escuder-Gilabert, L.; Villanueva-Camañas, R. M.; Sagrado, S.; Medina-Hernández, M. J. Biopartitioning Micellar Chromatography: An *in Vitro* Technique for Predicting Human Drug Absorption. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *753* (2), 225–236. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00546-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00546-6).
- (118) Armstrong, D. W.; Nome, Faruk. Partitioning Behavior of Solutes Eluted with Micellar Mobile Phases in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1981**, *53* (11), 1662–1666. <https://doi.org/10.1021/ac00234a026>.
- (119) Arunyanart, Manop.; Love, L. J. Cline. Model for Micellar Effects on Liquid Chromatography Capacity Factors and for Determination of Micelle-Solute Equilibrium Constants. *Anal. Chem.* **1984**, *56* (9), 1557–1561. <https://doi.org/10.1021/ac00273a005>.
- (120) Ruiz-Ángel, M. J.; Carda-Broch, S.; Torres-Lapasió, J. R.; García-Álvarez-Coque, M. C. Retention Mechanisms in Micellar Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (10), 1798–1814. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.053>.
- (121) Dobričić, V.; Nikolic, K.; Vladimirov, S.; Čudina, O. Biopartitioning Micellar Chromatography as a Predictive Tool for Skin and Corneal Permeability of Newly Synthesized 17 $\beta$ -Carboxamide Steroids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, *56*, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.02.007>.

- (122) Martínez-Pla, J. J.; Martín-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernández, M. J. Biopartitioning Micellar Chromatography to Predict Skin Permeability. *Biomed Chromatogr* **2003**, *17* (8), 530–537. <https://doi.org/10.1002/bmc.281>.
- (123) Shokry, D. S.; Waters, L. J.; Parkes, G. M. B.; Mitchell, J. C. Prediction of Human Intestinal Absorption Using Micellar Liquid Chromatography with an Aminopropyl Stationary Phase. *Biomedical Chromatography* **2019**, *33* (7), e4515. <https://doi.org/10.1002/bmc.4515>.
- (124) Lázaro, E.; Ràfols, C.; Rosés, M. Characterization of Immobilized Artificial Membrane (IAM) and XTerra Columns by Means of Chromatographic Models. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1081* (2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.048>.
- (125) Avdeef, A. The Rise of PAMPA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2005**, *1* (2), 325–342. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.325>.
- (126) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1007–1010. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>.
- (127) Bujard, A.; Voirol, H.; Carrupt, P.-A.; Schappler, J. Modification of a PAMPA Model to Predict Passive Gastrointestinal Absorption and Plasma Protein Binding. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *77*, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.023>.
- (128) Di, L.; Kerns, E. H.; Bezar, I. F.; Petusky, S. L.; Huang, Y. Comparison of Blood–Brain Barrier Permeability Assays: *In Situ* Brain Perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *98* (6), 1980–1991. <https://doi.org/10.1002/jps.21580>.
- (129) Ottaviani, G.; Martel, S.; Carrupt, P.-A. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (13), 3948–3954. <https://doi.org/10.1021/jm060230+>.
- (130) Vincze, A.; Dékány, G.; Bicsak, R.; Formanek, A.; Moreau, Y.; Koplányi, G.; Takács, G.; Katona, G.; Balogh-Weiser, D.; Arany, Á.; Balogh, G. T. Natural Lipid Extracts as an Artificial Membrane for Drug Permeability Assay: In Vitro and In Silico Characterization. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (3), 899. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030899>.
- (131) Sugano, K.; Hamada, H.; Machida, M.; Ushio, H. High Throughput Prediction of Oral Absorption: Improvement of the Composition of the Lipid Solution Used in Parallel Artificial Membrane Permeation Assay. *SLAS Discovery* **2001**, *6* (3), 189–196. <https://doi.org/10.1177/108705710100600309>.
- (132) Zhu, C.; Jiang, L.; Chen, T.-M.; Hwang, K.-K. A Comparative Study of Artificial Membrane Permeability Assay for High Throughput Profiling of Drug Absorption Potential. *Eur J Med Chem* **2002**, *37* (5), 399–407. [https://doi.org/10.1016/s0223-5234\(02\)01360-0](https://doi.org/10.1016/s0223-5234(02)01360-0).
- (133) Liu, H.; Sabus, C.; Carter, G. T.; Du, C.; Avdeef, A.; Tischler, M. In Vitro Permeability of Poorly Aqueous Soluble Compounds Using Different Solubilizers in the PAMPA Assay with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Detection. *Pharm Res* **2003**, *20* (11), 1820–1826. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000003380.44755.5a>.
- (134) Sinkó, B.; Kökösi, J.; Avdeef, A.; Takács-Novák, K. A PAMPA Study of the Permeability-Enhancing Effect of New Ceramide Analogues. *Chemistry & Biodiversity* **2009**, *6* (11), 1867–1874. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900149>.
- (135) Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>.

- (136) Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nat Protoc* **2006**, *1* (3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- (137) Rodriguez, L. G.; Wu, X.; Guan, J.-L. Wound-Healing Assay. In *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*; Guan, J.-L., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp 23–29. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>.
- (138) Jonkman, J. E. N.; Cathcart, J. A.; Xu, F.; Bartolini, M. E.; Amon, J. E.; Stevens, K. M.; Colarusso, P. An Introduction to the Wound Healing Assay Using Live-Cell Microscopy. *Cell Adhesion & Migration* **2014**, *8* (5), 440–451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>.
- (139) Wang, X. M.; Terasaki, P. I.; Rankin, G. W.; Chia, D.; Zhong, H. P.; Hardy, S. A New Microcellular Cytotoxicity Test Based on Calcein AM Release. *Hum Immunol* **1993**, *37* (4), 264–270. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(93\)90510-8](https://doi.org/10.1016/0198-8859(93)90510-8).
- (140) Bharti, A. C.; Takada, Y.; Shishodia, S.; Aggarwal, B. B. Evidence That Receptor Activator of Nuclear Factor (NF)-KB Ligand Can Suppress Cell Proliferation and Induce Apoptosis through Activation of a NF-KB-Independent and TRAF6-Dependent Mechanism \*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (7), 6065–6076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308062200>.
- (141) Crowley, L. C.; Scott, A. P.; Marfell, B. J.; Boughaba, J. A.; Chojnowski, G.; Waterhouse, N. J. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**, *2016* (7). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163>.
- (142) Kaur, J.; Bhardwaj, A.; Huang, Z.; Knaus, E. E. Aspirin Analogues as Dual Cyclooxygenase-2/5-Lipoxygenase Inhibitors: Synthesis, Nitric Oxide Release, Molecular Modeling, and Biological Evaluation as Anti-Inflammatory Agents. *ChemMedChem* **2012**, *7* (1), 144–150. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100460>.
- (143) Chowdhury, M. A.; Abdellatif, K. R. A.; Dong, Y.; Rahman, M.; Das, D.; Suresh, M. R.; Knaus, E. E. Synthesis of 1-(Methanesulfonyl- and Aminosulfonylphenyl)Acetylenes That Possess a 2-(N-Difluoromethyl-1,2-Dihydropyridin-2-One) Pharmacophore: Evaluation as Dual Inhibitors of Cyclooxygenases and 5-Lipoxygenase with Anti-Inflammatory Activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (3), 584–588. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.066>.
- (144) Chowdhury, M. A.; Abdellatif, K. R. A.; Dong, Y.; Das, D.; Yu, G.; Velázquez, C. A.; Suresh, M. R.; Knaus, E. E. Synthesis and Biological Evaluation of Salicylic Acid and N-Acetyl-2-Carboxybenzenesulfonamide Regioisomers Possessing a N-Difluoromethyl-1,2-Dihydropyrid-2-One Pharmacophore: Dual Inhibitors of Cyclooxygenases and 5-Lipoxygenase with Anti-Inflammatory Activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (24), 6855–6861. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.083>.
- (145) Chowdhury, M. A.; Abdellatif, K. R. A.; Dong, Y.; Das, D.; Suresh, M. R.; Knaus, E. E. Synthesis of Celecoxib Analogues Possessing a N-Difluoromethyl-1,2-Dihydropyrid-2-One 5-Lipoxygenase Pharmacophore: Biological Evaluation as Dual Inhibitors of Cyclooxygenases and 5-Lipoxygenase with Anti-Inflammatory Activity. *J Med Chem* **2009**, *52* (6), 1525–1529. <https://doi.org/10.1021/jm8015188>.
- (146) Özadalı, K.; Özkanlı, F.; Jain, S.; Rao, P. P. N.; Velázquez-Martínez, C. A. Synthesis and Biological Evaluation of Isoxazolo[4,5-*d*]Pyridazin-4-(5*H*)-One Analogues as Potent Anti-Inflammatory Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (9), 2912–2922. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.021>.
- (147) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods I. Method. *J Comput Chem* **1989**, *10* (2), 209–220. <https://doi.org/10.1002/jcc.540100208>.
- (148) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods II. Applications. *J Comput Chem* **1989**, *10* (2), 221–264. <https://doi.org/10.1002/jcc.540100209>.

- (149) Roothaan, C. C. J. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, *23* (2), 69–89. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.23.69>.
- (150) Cousins, K. ChemDraw 6.0 Ultra CambridgeSoft Corporation, 100 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140. <http://www.camsoft.com>. Commercial Price: \$1395. Academic Price: \$699. *Journal of The American Chemical Society - J AM CHEM SOC* **2000**, *122*. <https://doi.org/10.1021/ja0047572>.
- (151) Puzyn, T.; Mostrag-Szlichtyng, A.; Gajewicz, A.; Skrzyński, M.; Worth, A. P. Investigating the Influence of Data Splitting on the Predictive Ability of QSAR/QSPR Models. *Struct Chem* **2011**, *22* (4), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s11224-011-9757-4>.
- (152) *Pentacle 1.0.7 – Advanced Alignment-Independent 3D QSAR – My Biosoftware – Bioinformatics Softwares Blog*. <https://mybiosoftware.com/pentacle-advanced-alignment-independent-3d-qsar.html> (accessed 2024-03-12).
- (153) Roy, K.; Chakraborty, P.; Mitra, I.; Ojha, P. K.; Kar, S.; Das, R. N. Some Case Studies on Application of “Rm2” Metrics for Judging Quality of Quantitative Structure–Activity Relationship Predictions: Emphasis on Scaling of Response Data. *Journal of Computational Chemistry* **2013**, *34* (12), 1071–1082. <https://doi.org/10.1002/jcc.23231>.
- (154) Roy, K.; Kar, S.; Ambure, P. On a Simple Approach for Determining Applicability Domain of QSAR Models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2015**, *145*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.04.013>.
- (155) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J Mol Biol* **1997**, *267* (3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.
- (156) Mooij, W. T. M.; Verdonk, M. L. General and Targeted Statistical Potentials for Protein-Ligand Interactions. *Proteins* **2005**, *61* (2), 272–287. <https://doi.org/10.1002/prot.20588>.
- (157) Vitale, P.; Tacconelli, S.; Perrone, M. G.; Malerba, P.; Simone, L.; Scilimati, A.; Lavecchia, A.; Dovizio, M.; Marcantoni, E.; Bruno, A.; Patrignani, P. Synthesis, Pharmacological Characterization, and Docking Analysis of a Novel Family of Diarylisoxazoles as Highly Selective Cyclooxygenase-1 (COX-1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (11), 4277–4299. <https://doi.org/10.1021/jm301905a>.
- (158) Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin Biochem* **2004**, *37* (4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>.
- (159) Kotur-Stevuljevic, J.; Bogavac-Stanojevic, N.; Jelic-Ivanovic, Z.; Stefanovic, A.; Gojkovic, T.; Joksic, J.; Sopic, M.; Gulan, B.; Janac, J.; Milosevic, S. Oxidative Stress and Paraoxonase 1 Status in Acute Ischemic Stroke Patients. *Atherosclerosis* **2015**, *241* (1), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.016>.
- (160) Erel, O. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clin Biochem* **2005**, *38* (12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>.
- (161) Alamdari, D. H.; Paletas, K.; Pegiou, T.; Sarigianni, M.; Befani, C.; Koliakos, G. A Novel Assay for the Evaluation of the Prooxidant-Antioxidant Balance, before and after Antioxidant Vitamin Administration in Type II Diabetes Patients. *Clin Biochem* **2007**, *40* (3–4), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.017>.
- (162) Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch Biochem Biophys* **1959**, *82* (1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- (163) Savić, J.; Dobričić, V.; Nikolic, K.; Vladimirov, S.; Dilber, S.; Brborić, J. *In Vitro* Prediction of Gastrointestinal Absorption of Novel  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Arylalkanoic Acids Using PAMPA Technique.

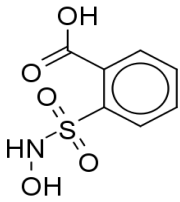
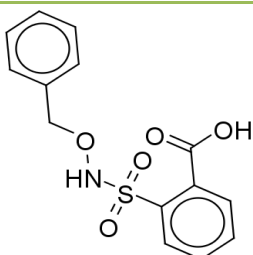
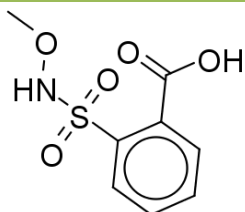
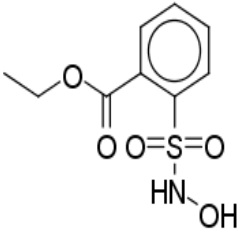
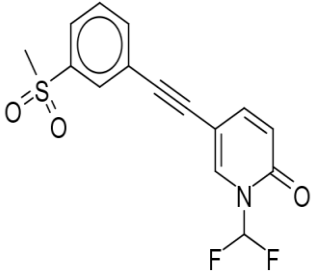
- (164) Petit, C.; Bujard, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Cretton, S.; Houriet, J.; Christen, P.; Carrupt, P.-A.; Wolfender, J.-L. Prediction of the Passive Intestinal Absorption of Medicinal Plant Extract Constituents with the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA). *Planta Med* **2016**, *82* (05), 424–431. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101247>.
- (165) Moskot, M.; Jakóbkiewicz-Banecka, J.; Kloska, A.; Piotrowska, E.; Narajczyk, M.; Gabig-Cimińska, M. The Role of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) in Gene Expression Modulation and Glycosaminoglycan Metabolism in Lysosomal Storage Disorders on an Example of Mucopolysaccharidosis. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (2), 304. <https://doi.org/10.3390/ijms20020304>.
- (166) Charlier, C.; Michaux, C. Dual Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-Lipoxygenase (5-LOX) as a New Strategy to Provide Safer Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Eur J Med Chem* **2003**, *38* (7–8), 645–659. [https://doi.org/10.1016/s0223-5234\(03\)00115-6](https://doi.org/10.1016/s0223-5234(03)00115-6).
- (167) Tsolaki, E.; Eleftheriou, P.; Kartsev, V.; Geronikaki, A.; Saxena, A. K. Application of Docking Analysis in the Prediction and Biological Evaluation of the Lipoxygenase Inhibitory Action of Thiazolyl Derivatives of Mycophenolic Acid. *Molecules* **2018**, *23* (7), 1621. <https://doi.org/10.3390/molecules23071621>.
- (168) Hwang, S. H.; Weckler, A. T.; Wagner, K.; Hammock, B. D. Rationally Designed Multitarget Agents against Inflammation and Pain. *Curr Med Chem* **2013**, *20* (13), 1783–1799. <https://doi.org/10.2174/0929867311320130013>.
- (169) Janusz, J. M.; Young, P. A.; Ridgeway, J. M.; Scherz, M. W.; Enzweiler, K.; Wu, L. I.; Gan, L.; Darolia, R.; Matthews, R. S.; Hennes, D.; Kellstein, D. E.; Green, S. A.; Tulich, J. L.; Rosario-Jansen, T.; Magrisso, I. J.; Wehmeyer, K. R.; Kuhlenbeck, D. L.; Eichhold, T. H.; Dobson, R. L. M.; Sirko, S. P.; Farmer, R. W. New Cyclooxygenase-2/5-Lipoxygenase Inhibitors. 1. 7-Tert-Butyl-2,3-Dihydro-3,3-Dimethylbenzofuran Derivatives as Gastrointestinal Safe Antiinflammatory and Analgesic Agents: Discovery and Variation of the 5-Keto Substituent. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1112–1123. <https://doi.org/10.1021/jm970679q>.
- (170) Inukai, S.; Agata, M.; Akiba, K.; Ohmura, T.; Horio, Y.; Ootake, Y.; Sawaki, S.; Goto, M. Inhibiteur de la réductase d'aldose. EP0388967A1, September 26, 1990. <https://patents.google.com/patent/EP0388967A1/fr> (accessed 2024-03-12).
- (171) Dobričić, V.; Marković, B.; Nikolic, K.; Savić, V.; Vladimirov, S.; Čudina, O. 17 $\beta$ -Carboxamide Steroids--in Vitro Prediction of Human Skin Permeability and Retention Using PAMPA Technique. *Eur J Pharm Sci* **2014**, *52*, 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.10.017>.
- (172) Chojkier, M. Treatment and Prevention of Hepatic Disorders. US5922757A, July 13, 1999. <https://patents.google.com/patent/US5922757A/en?inventor=Mario+Chojkier> (accessed 2024-03-12).
- (173) M K, P.; Revanasiddappa, H. Synthesis and Antioxidant Activity of Novel Quinazolinones Functionalized with Urea/Thiourea/Thiazole Derivatives as 5-Lipoxygenase Inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery* **2014**, *11*. <https://doi.org/10.2174/1570180811666131230235157>.
- (174) Hwang, S. H.; Wagner, K. M.; Morisseau, C.; Liu, J.-Y.; Dong, H.; Weckler, A. T.; Hammock, B. D. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Urea-Containing Pyrazoles as Dual Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and Soluble Epoxide Hydrolase. *J Med Chem* **2011**, *54* (8), 3037–3050. <https://doi.org/10.1021/jm2001376>.
- (175) Kuhn, B.; Mohr, P.; Stahl, M. Intramolecular Hydrogen Bonding in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (6), 2601–2611. <https://doi.org/10.1021/jm100087s>.

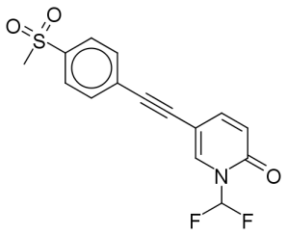
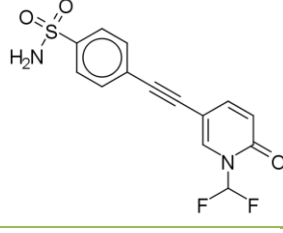
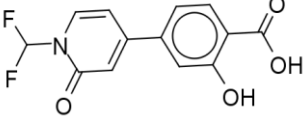
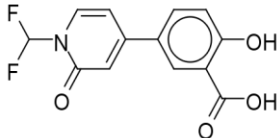
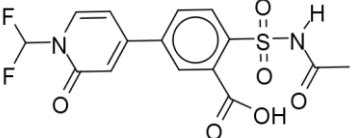
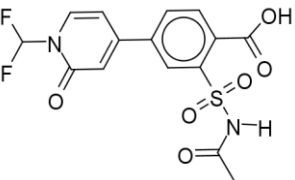
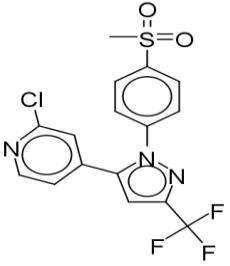
- (176) Socha, J.; Kohout, V. Herbicide Means on the Basis of the Urea and Method of Preparation of the Active Substance. CS189171B1, April 30, 1979. <https://patents.google.com/patent/CS189171B1/en?q=cs189171B1> (accessed 2024-03-12).
- (177) Goldhamer, D. L.; Onyszkewycz, M.; Wilson, A. Base Dependence in the Selective Nucleophilic Attack of Anthranilic Acid on N, N-Dimethylcarbonyl Chloride. *Tetrahedron Letters* **1968**, 9 (38), 4077–4080. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(68\)72867-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(68)72867-7).
- (178) Staiger, R. P.; Miller, E. B. Isatoic Anhydride. IV. Reactions with Various Nucleophiles. *J. Org. Chem.* **1959**, 24 (9), 1214–1219. <https://doi.org/10.1021/jo01091a013>.
- (179) Summers, J. B.; Gunn, B. P.; Martin, J. G.; Martin, M. B.; Mazdiyasi, H.; Stewart, A. O.; Young, P. R.; Bouska, J. B.; Goetze, A. M.; Dyer, R. D. Structure-Activity Analysis of a Class of Orally Active Hydroxamic Acid Inhibitors of Leukotriene Biosynthesis. *J Med Chem* **1988**, 31 (10), 1960–1964. <https://doi.org/10.1021/jm00118a016>.
- (180) Nagasawa, H. T.; Kawle, S. P.; Elberling, J. A.; DeMaster, E. G.; Fukuto, J. M. Prodrugs of Nitroxyl as Potential Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors Vis-a-Vis Vascular Smooth Muscle Relaxants. *J. Med. Chem.* **1995**, 38 (11), 1865–1871. <https://doi.org/10.1021/jm00011a005>.
- (181) Wang, Z.; Xu, W.; Song, T.; Guo, Z.; Liu, L.; Fan, Y.; Wang, A.; Zhang, Z. Fragment-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 1-Substituted-Indole-2-Carboxylic Acids as Selective Mcl-1 Inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* **2017**, 350 (1). <https://doi.org/10.1002/ardp.201600251>.
- (182) Yehye, W. A.; Rahman, N. A.; Ariffin, A.; Abd Hamid, S. B.; Alhadi, A. A.; Kadir, F. A.; Yaeghoobi, M. Understanding the Chemistry behind the Antioxidant Activities of Butylated Hydroxytoluene (BHT): A Review. *Eur J Med Chem* **2015**, 101, 295–312. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026>.
- (183) Wang, X.; Wu, L.; Aouffen, M.; Mateescu, M. A.; Nadeau, R.; Wang, R. Novel Cardiac Protective Effects of Urea: From Shark to Rat. *Br J Pharmacol* **1999**, 128 (7), 1477–1484. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702944>.
- (184) Bošković, J.; Dobričić, V.; Mihajlović, M.; Kotur-Stevuljević, J.; Čudina, O. Synthesis, Evaluation of Enzyme Inhibition and Redox Properties of Potential Dual COX-2 and 5-LOX Inhibitors. *Pharmaceuticals* **2023**, 16 (4), 549. <https://doi.org/10.3390/ph16040549>.
- (185) Hopkins, E.; Sanvictores, T.; Sharma, S. Physiology, Acid Base Balance. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
- (186) Fallingborg, J. Intraluminal PH of the Human Gastrointestinal Tract. *Dan Med Bull* **1999**, 46 (3), 183–196.
- (187) Evans, D. F.; Pye, G.; Bramley, R.; Clark, A. G.; Dyson, T. J.; Hardcastle, J. D. Measurement of Gastrointestinal PH Profiles in Normal Ambulant Human Subjects. *Gut* **1988**, 29 (8), 1035–1041. <https://doi.org/10.1136/gut.29.8.1035>.
- (188) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry. *J Med Chem* **2020**, 63 (6), 2751–2788. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01541>.
- (189) Wu, L.-P.; Cui, Y.; Xiong, M.-J.; Wang, S.-R.; Chen, C.; Ye, L.-M. Mixed Micellar Liquid Chromatography Methods: Modelling Quantitative Retention-Activity Relationships of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. *Biomed Chromatogr* **2008**, 22 (11), 1243–1251. <https://doi.org/10.1002/bmc.1053>.
- (190) Zhou, G.-X.; Ding, X.-L.; Wu, S.-B.; Zhang, H.-F.; Cao, W.; Qu, L.-S.; Zhang, H. Inhibition of 5-Lipoxygenase Triggers Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *Oncol Rep* **2015**, 33 (2), 661–668. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3650>.
- (191) Che, X.-H.; Chen, C.-L.; Ye, X.-L.; Weng, G.-B.; Guo, X.-Z.; Yu, W.-Y.; Tao, J.; Chen, Y.-C.; Chen, X. Dual Inhibition of COX-2/5-LOX Blocks Colon Cancer Proliferation, Migration and Invasion in Vitro. *Oncology Reports* **2016**, 35 (3), 1680–1688. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4506>.

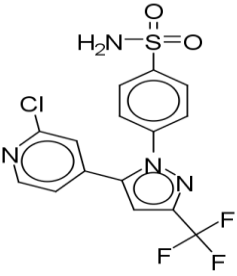
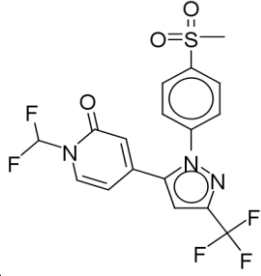
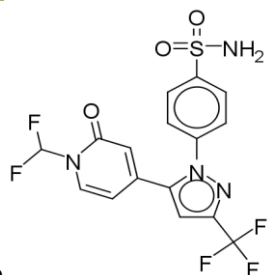
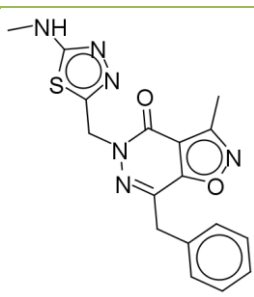
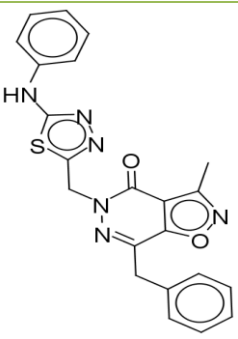
- (192) Griffon, G.; Merlin, J. L.; Marchal, C. Comparison of Sulforhodamine B, Tetrazolium and Clonogenic Assays for in Vitro Radiosensitivity Testing in Human Ovarian Cell Lines. *Anticancer Drugs* **1995**, *6* (1), 115–123. <https://doi.org/10.1097/00001813-199502000-00014>.
- (193) Pauwels, B.; Korst, A. E. C.; de Pooter, C. M. J.; Pattyn, G. G. O.; Lambrechts, H. A. J.; Baay, M. F. D.; Lardon, F.; Vermorken, J. B. Comparison of the Sulforhodamine B Assay and the Clonogenic Assay for in Vitro Chemoradiation Studies. *Cancer Chemother Pharmacol* **2003**, *51* (3), 221–226. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0557-9>.
- (194) Zhou, T.; Zhang, L.-Y.; He, J.-Z.; Miao, Z.-M.; Li, Y.-Y.; Zhang, Y.-M.; Liu, Z.-W.; Zhang, S.-Z.; Chen, Y.; Zhou, G.-C.; Liu, Y.-Q. Review: Mechanisms and Perspective Treatment of Radioresistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1133899. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1133899>.
- (195) Galeaz, C.; Totis, C.; Bisio, A. Radiation Resistance: A Matter of Transcription Factors. *Front Oncol* **2021**, *11*, 662840. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.662840>.
- (196) Rubinstein, L. V.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Simon, R. M.; Tosini, S.; Skehan, P.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Boyd, M. R. Comparison of in Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated with a Tetrazolium Assay versus a Protein Assay against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. *J Natl Cancer Inst* **1990**, *82* (13), 1113–1118. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1113>.
- (197) Haselsberger, K.; Peterson, D. C.; Thomas, D. G.; Darling, J. L. Assay of Anticancer Drugs in Tissue Culture: Comparison of a Tetrazolium-Based Assay and a Protein Binding Dye Assay in Short-Term Cultures Derived from Human Malignant Glioma. *Anticancer Drugs* **1996**, *7* (3), 331–338.
- (198) Perez, R. P.; Godwin, A. K.; Handel, L. M.; Hamilton, T. C. A Comparison of Clonogenic, Microtetrazolium and Sulforhodamine B Assays for Determination of Cisplatin Cytotoxicity in Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Eur J Cancer* **1993**, *29A* (3), 395–399. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)90394-u](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90394-u).
- (199) Hewitt, R. E.; McMarlin, A.; Kleiner, D.; Wersto, R.; Martin, P.; Tsokos, M.; Stamp, G. W.; Stetler-Stevenson, W. G. Validation of a Model of Colon Cancer Progression. *J Pathol* **2000**, *192* (4), 446–454. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999<:AID-PATH775>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<:AID-PATH775>3.0.CO;2-K).
- (200) Buecher, B.; Bouancheau, D.; Broquet, A.; Bezieau, S.; Denis, M. G.; Bonnet, C.; Heymann, M.-F.; Jarry, A.; Galmiche, J.-P.; Blottière, H. M. Growth Inhibitory Effect of Celecoxib and Rofecoxib on Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Anticancer Res* **2005**, *25* (1A), 225–233.
- (201) Chen, W. S.; Wei, S. J.; Liu, J. M.; Hsiao, M.; Kou-Lin, J.; Yang, W. K. Tumor Invasiveness and Liver Metastasis of Colon Cancer Cells Correlated with Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression and Inhibited by a COX-2-Selective Inhibitor, Etodolac. *Int J Cancer* **2001**, *91* (6), 894–899. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200102\)9999:9999<894::aid-ijc1146>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200102)9999:9999<894::aid-ijc1146>3.0.co;2-#).

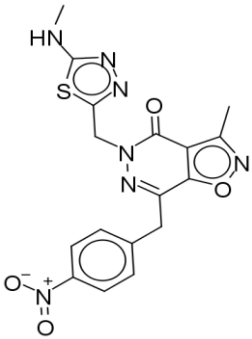
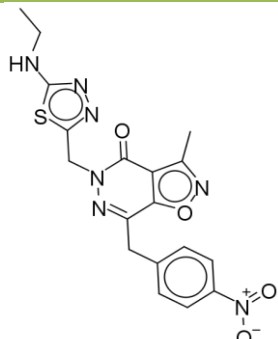
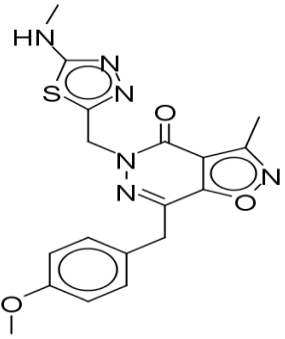
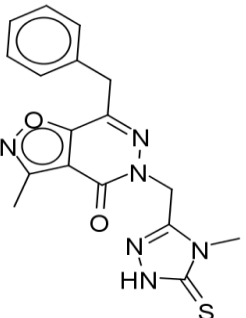
## **7. PRILOZI**

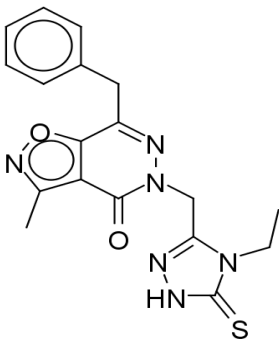
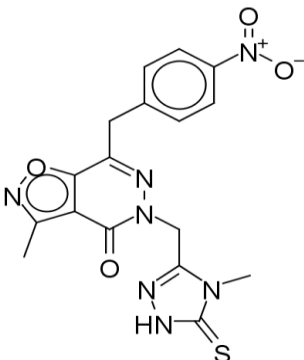
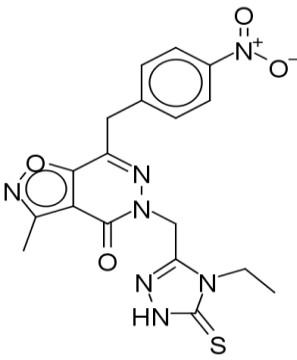
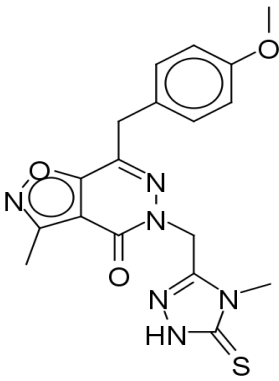
**Tabela P1.** Odabrani set jedinjenja iz literature za 3D-QSAR studiju sa eksperimentalnim IC<sub>50</sub> [μM] / pIC<sub>50</sub> vrednostima, kao i 3D-QSAR modelom predviđenim pIC<sub>50</sub> vrednostima za COX-2 i 5-LOX enzime

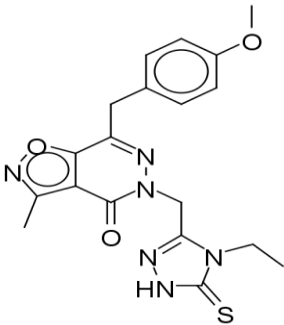
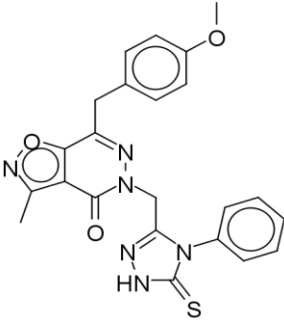
Jedinjenje	COX-2		5-LOX	
	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviđen pIC <sub>50</sub>	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviđen pIC <sub>50</sub>
<p><b>11*</b></p> 	0,73 / 6,137	5,957	0,20 / 6,699	6,520
<p><b>12*</b></p> 	0,07 / 7,155	6,278	1,40 / 5,854	5,867
<p><b>13*</b></p> 	35,20 / 4,453	4,968	0,80 / 6,097	6,623
<p><b>16*</b></p> 	0,09 / 7,046	6,799	0,40 / 6,398	6,253
<p><b>9b</b></p> 	3,70 / 5,432	5,192	3,20 / 5,495	5,735

Jedinjenje	COX-2		5-LOX	
	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>
<b>9c</b> 	5,10 / 5,292	5,262	3,30 / 5,481	5,758
<b>9d</b> 	6,00 / 5,222	5,069	3,50 / 5,456	5,377
<b>14a</b> 	4,40 / 5,357	5,670	4,70 / 5,328	6,009
<b>14b</b> 	0,98 / 6,009	5,984	0,37 / 6,432	6,115
<b>22a</b> 	17,60 / 4,754	5,072	0,32 / 6,495	5,849
<b>22b</b> 	2,60 / 5,585	4,971	0,28 / 6,553	6,315
<b>10a</b> 	0,19 / 6,721	6,316	0,47 / 6,328	6,305

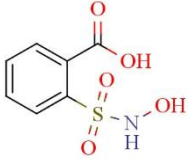
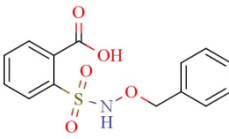
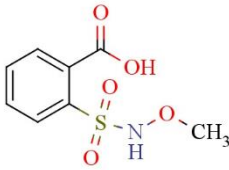
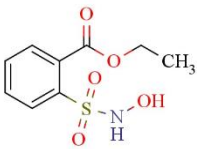
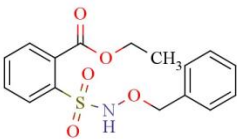
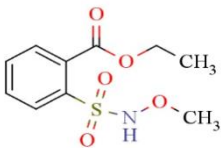
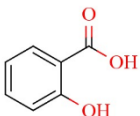
Jedinjenje	COX-2		5-LOX	
	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>
<b>10b</b> 	0,73 / 6,137	6,484	0,39 / 6,409	6,121
<b>11a</b> 	1,82 / 5,740	5,973	4,40 / 5,357	5,700
<b>11b</b> 	0,69 / 6,161	6,404	5,00 / 5,301	5,212
<b>13</b> 	21,30 / 4,672	4,550	79,20 / 4,101	4,200
<b>15</b> 	10,90 / 4,963	4,920	63,50 / 4,197	4,186

Jedinjenje	COX-2		5-LOX	
	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>
<p><b>16</b></p> 	6,00 / 5,222	5,327	41,20 / 4,385	4,565
<p><b>17</b></p> 	39,60 / 4,402	4,110	52,80 / 4,277	4,422
<p><b>19</b></p> 	14,70 / 4,833	4,708	48,70 / 4,312	4,062
<p><b>22</b></p> 	5,50 / 5,260	5,321	34,70 / 4,460	4,709

Jedinjenje	COX-2		5-LOX	
	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>
<p>23</p> 	6,10 / 5,215	5,461	40,30 / 4,395	4,527
<p>25</p> 	4,60 / 5,337	5,558	13,50 / 4,870	4,640
<p>26</p> 	9,20 / 5,036	4,935	14,80 / 4,830	4,650
<p>28</p> 	2,10 / 5,678	5,726	6,30 / 5,201	5,096

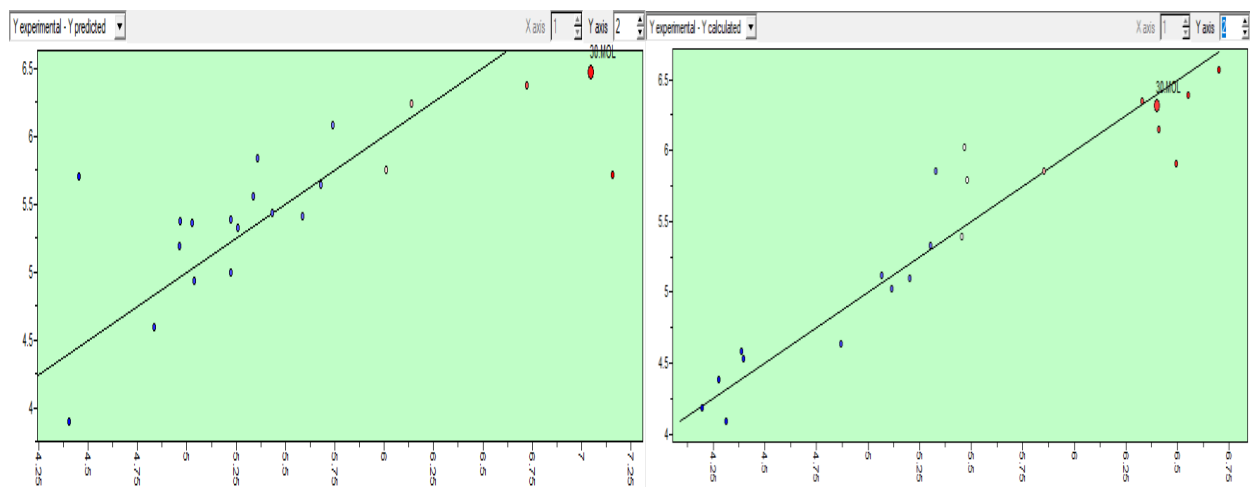
Jedinjenje	COX-2		5-LOX	
	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>	Eksperimentalni IC <sub>50</sub> [μM] / pIC <sub>50</sub>	Predviden pIC <sub>50</sub>
<p><b>29</b></p> 	2,20 / 5,658	5,381	8,60 / 5,066	5,120
<p><b>30</b></p> 	10,80 / 4,967	5,246	7,70 / 5,114	5,008

**Tabela P2.** Strukture dualnih COX-2 i 5-LOX inhibitora i aspirina, kao i inhibitorne vrednosti na COX-1, COX-2 i 5-LOX enzimima (literaturni podaci)

Jedinjenja	IC <sub>50</sub> [μM] COX-1	IC <sub>50</sub> [μM] COX-2	IC <sub>50</sub> [μM] 5-LOX
 <p><b>11*</b></p>	86,9	0,73	0,2
 <p><b>12*</b></p>	>100	0,07	1,4
 <p><b>13*</b></p>	91,6	35,2	0,8
 <p><b>16*</b></p>	>100	0,09	0,4
 <p><b>17*</b></p>	>100	20,1	2,21
 <p><b>18*</b></p>	96,6	46,6	0,98
 <p><b>aspirin</b></p>	0,35	2,4	/

a)

b)



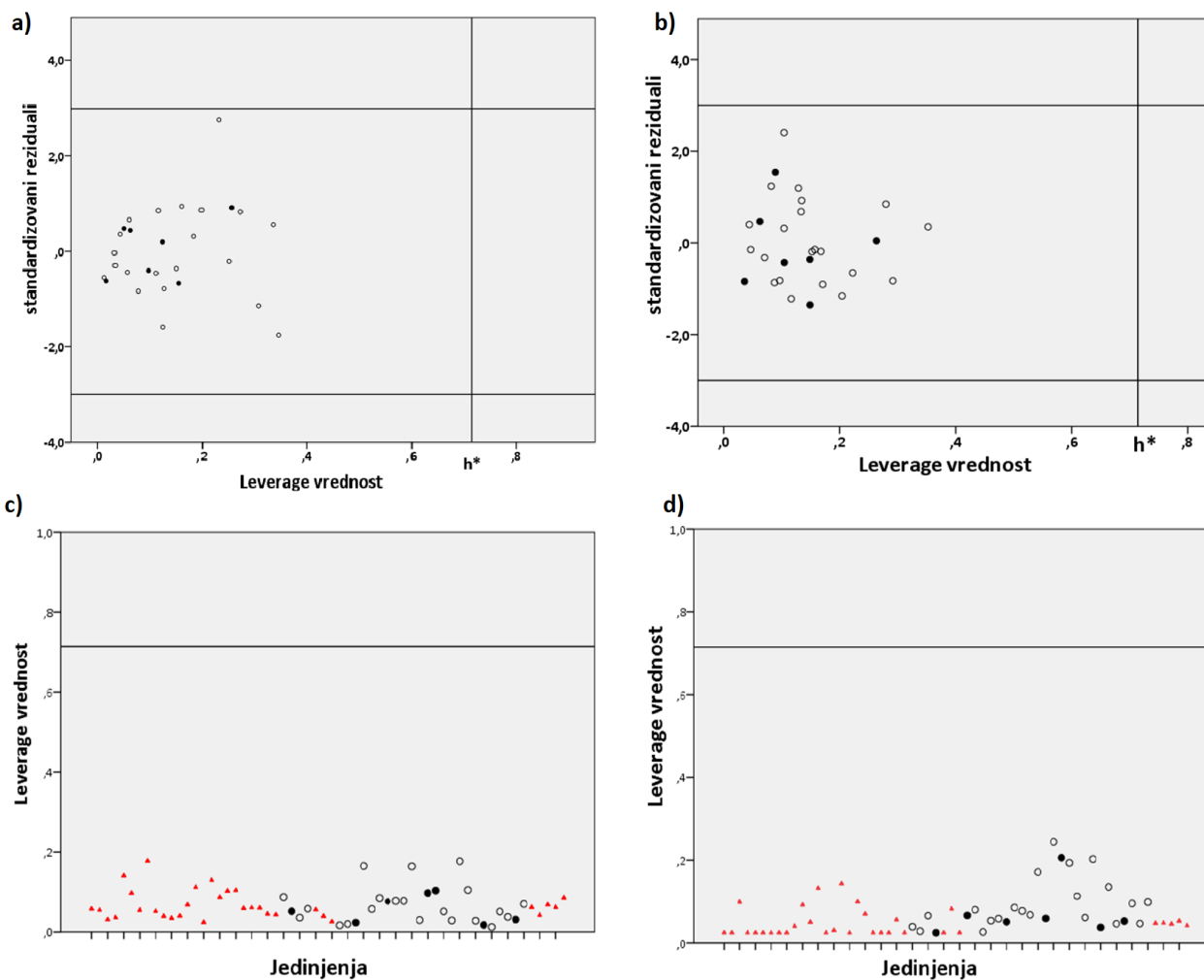
**Slika P1.** Eksperimentalne/predvidene  $pIC_{50}$  vrednosti za a) COX-2 i b) 5-LOX 3D QSAR modele

**Tabela P3.** Najznačajnije GRIND varijable (3D-QSAR COX-2 model)

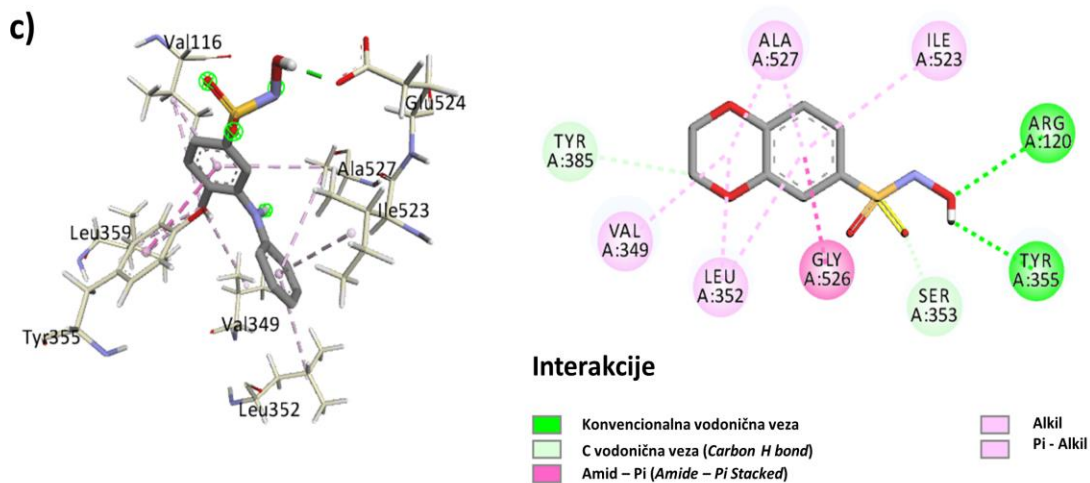
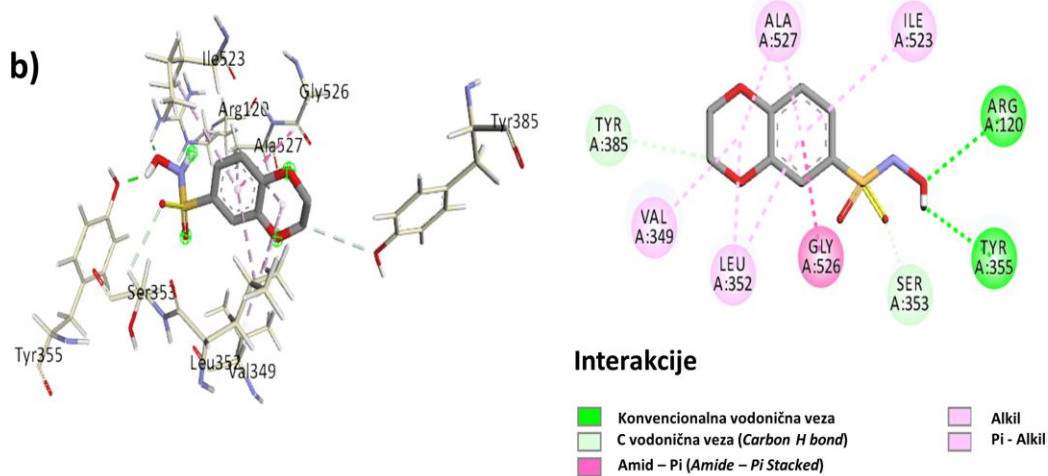
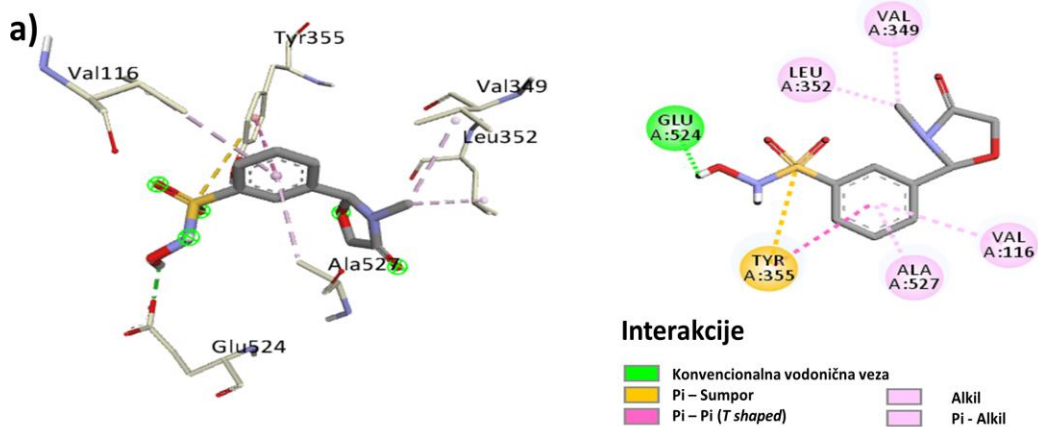
<b>COX-2 GRIND varijabla</b>	<b>Distanca [Å]</b>	<b>Komentari</b>
<b>v233 (DRY-O) +</b>	6,8-7,2	Definiše rastojanje između hidrofobne probe (benzenov prsten) i probe koja identifikuje donore vodonične veze iz ostatka sulfhidroksamske kiseline
<b>v292 (DRY-N1) +</b>	8,8-9,2	Povoljna interakcija između hidrofobne probe i probe koja identifikuje akceptore vodonične veze (karboksilna grupa iz jedinjenja <b>12</b> )
<b>v456 (O-TIP) +</b>	9,6-10	Povoljna interakcija između probe koja identifikuje donore vodonične veze iz ostatka sulfhidroksamske kiseline i sterne probe (benzenov prsten – jedinjenja <b>12</b> , <b>13</b> ili etil estarska grupa – jedinjenje <b>16</b> )
<b>v519 (N1-TIP) +</b>	13,2-13,6	Najznačajnija pozitivna varijabla, definiše povoljnu interakciju između sternih centara i akceptora vodonične veze u jedinjenjima <b>12</b> i <b>16</b>
<b>v279 (DRY-N1) -</b>	3,6-4	Predstavlja nepovoljnu interakciju između hidrofobne regije i akceptora vodonične veze unutar jedinjenja na manjem rastojanju (prisutna u manje aktivnom COX-2 inhibitoru, jedinjenje <b>13</b> )
<b>v352 (DRY-TIP) -</b>	11,2-11,6	Definiše rastojanje između hidrofobnog i sternog centra koje ima loš uticaj na aktivnost
<b>v470 (O-TIP) -</b>	15,2-15,6	Opisuje nepovoljnu interakciju između donora vodonične veze i sternog centra jedinjenja
<b>v526 (N1-TIP) -</b>	16-16,4	Definiše nepovoljno rastojanje između vodonično-donorske probe (proba koja identifikuje akceptore vodonične veze u jedinjenju) i sterne probe

**Tabela P4.** Najznačajnije GRIND varijable (3D-QSAR 5-LOX model)

<b>5-LOX GRIND varijabla</b>	<b>Distanca [Å]</b>	<b>Komentari</b>
<b>v72 (O-O) +</b>	7,2-7,6	Prisustvo dve probe koje identifikuju donore vodonične veze na optimalnoj udaljenosti je važno za dobru 5-LOX aktivnost
<b>v139 (N1-N1) +</b>	12,4-12,8	Definiše povoljnu interakciju između dve probe koje identifikuju akceptore vodonične veze
<b>v236 (DRY-O) +</b>	8-8,4	Predstavlja optimalno rastojanje između hidrofobnog regiona i probe koja identifikuje donore vodonične veze (oko sulfhidroksamske grupe)
<b>v458 (O-TIP) +</b>	10,4-10,8	Značajna pozitivna varijabla koja definiše rastojanje između sterne probe i probe koja identifikuje donore vodonične veze
<b>v26 (DRY-DRY) -</b>	10,4-10,8	Predstavlja nepovoljnu interakciju između dva hidrofobna centra
<b>v244 (DRY-O) -</b>	11,2-11,6	Opisuje udaljenost između hidrofobnog centra i donora vodonične veze u jedinjenju koja ima loš uticaj na aktivnost
<b>v524 (N1-TIP) -</b>	15,2-15,6	Predstavlja nepovoljnu interakciju između probe koja identifikuje akceptore vodonične veze i sterne probe



**Slika P2.** Williams-ovi grafici za: a) COX-2 3D-QSAR model, b) 5-LOX 3D-QSAR model, c) procenjen domen primenljivosti (AD) za COX-2 3D-QSAR model i d) procenjen domen primenljivosti (AD) za 5-LOX 3D-QSAR model; jedinjenja trening seta su obeležena belim krugovima, jedinjenja test seta crnim krugovima, a novodizajnirana jedinjenja su obeležena crvenim trouglovima



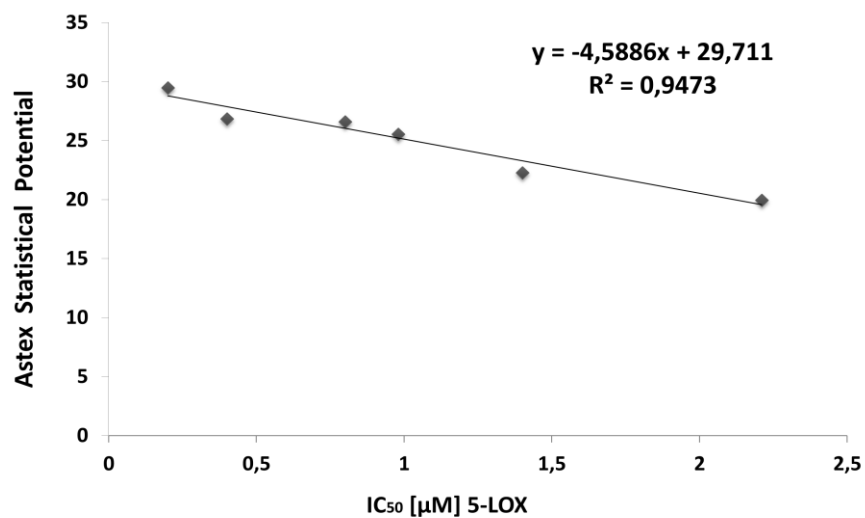
**Slika P3.** Položaji i interakcije između novodizajniranih jedinjenja: a) **1j**, b) **1g** i c) **1l** i aminokiselinskih ostataka unutar aktivnog mesta COX-1 enzima; 3D prikaz (levo), 2D prikaz (desno)

**Tabela P5.** Doking skorovi za odabrani set jedinjenja (preuzet iz literature) i novodizajnirana jedinjenja (analози sulfhidroksamske kiseline)

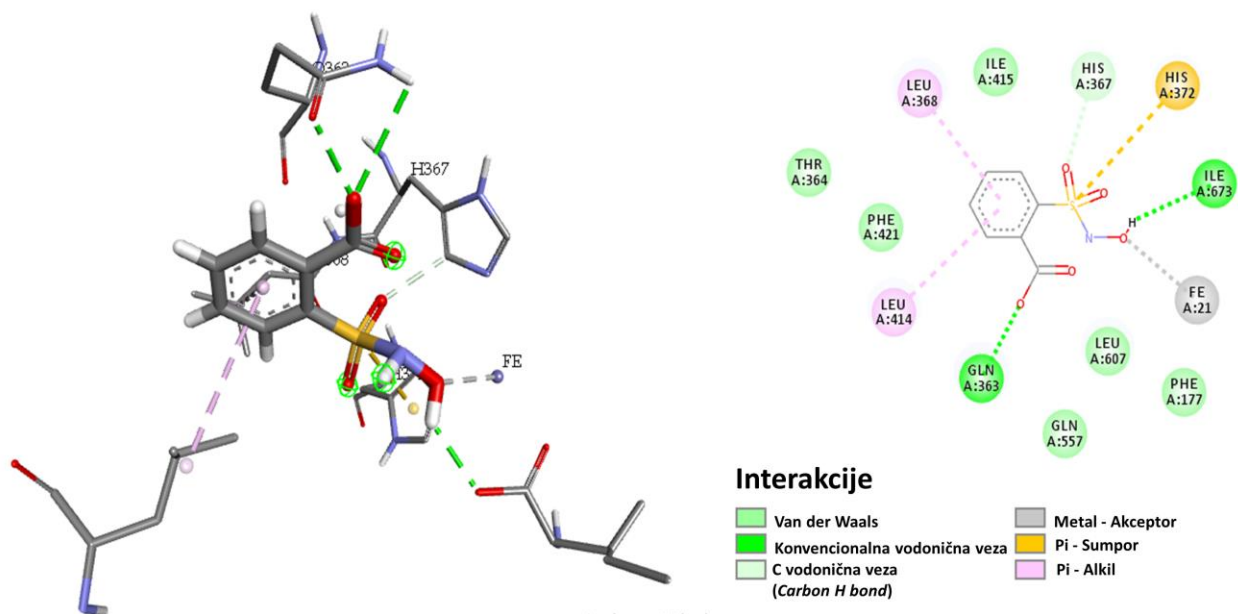
<b>Jedinjenja</b>	<b>ASPPF (5-LOX)</b>	<b>CHEMPLP (COX-1)</b>	<b>CHEMPLP (COX-2)</b>
<b>Preuzeta iz literature:</b>			
<b>11*</b>	29,4927	41,1352	47,3477
<b>12*</b>	22,2823	55,9461	66,9511
<b>13*</b>	26,6070	40,6641	48,8203
<b>16*</b>	26,8658	46,4113	54,4973
<b>Novodizajnirana:</b>			
<b>1f (17)</b>	28,6562	55,8413	63,5121
<b>1g (18)</b>	25,5514	49,7679	52,4620
<b>1h (19)</b>	31,6181	50,3990	60,3733
<b>1i</b>	31,7543	70,0375	69,7370
<b>1j</b>	32,3541	51,2149	57,2976
<b>1k</b>	26,6023	52,2952	68,2455
<b>1l</b>	29,8814	62,5332	69,8413
<b>1m</b>	22,9091	71,7396	79,8842
<b>1n</b>	29,1281	76,0249	96,4194

**Tabela P6.** Eksperimentalno određene 5-LOX inhibitorne IC<sub>50</sub> vrednosti, ASPFF vrednosti i način vezivanja unutar 5-LOX enzima za literaturna jedinjenja

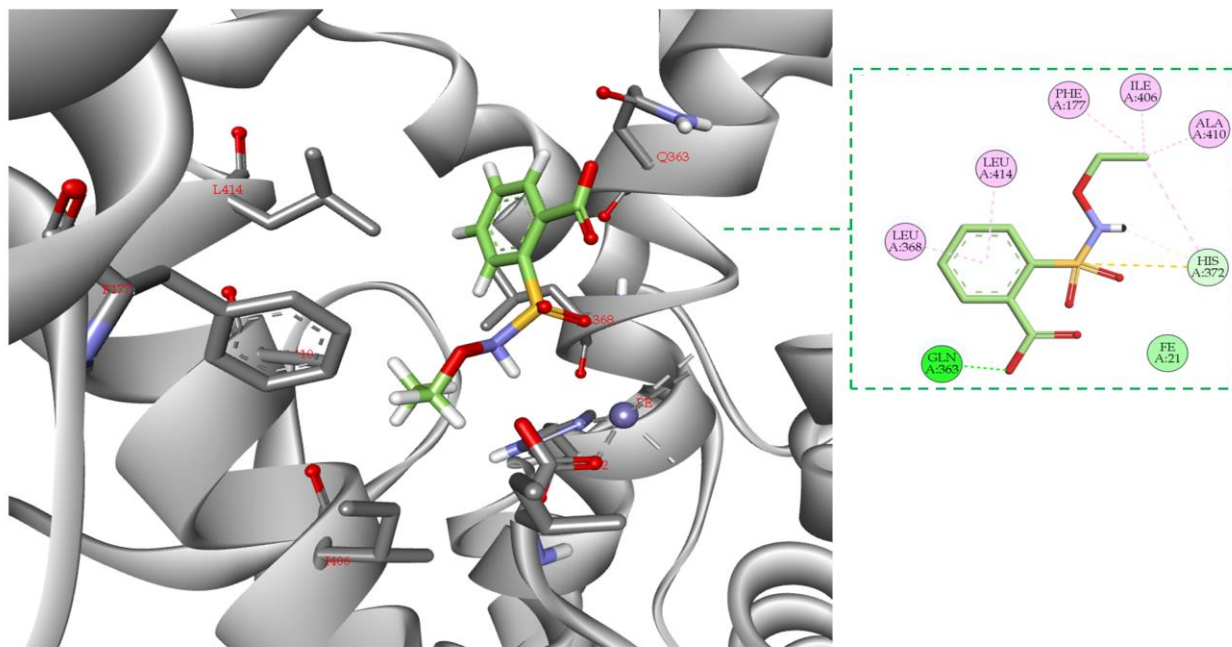
Literaturna jedinjenja	5-LOX		
	IC <sub>50</sub> [μM]	ASPFF	Način vezivanja
11*	0,2	29,493	monodentatni
12*	1,4	22,282	invertovana poza (bez koordinacije)
13*	0,8	26,607	bez koordinacije
16*	0,4	26,866	monodentatni
17*	2,21	19,964	invertovana poza (bez koordinacije)
18*	0,98	25,566	bez koordinacije
aspirin	/	21,188	udaljen, distalno od Fe <sup>2+</sup> jona



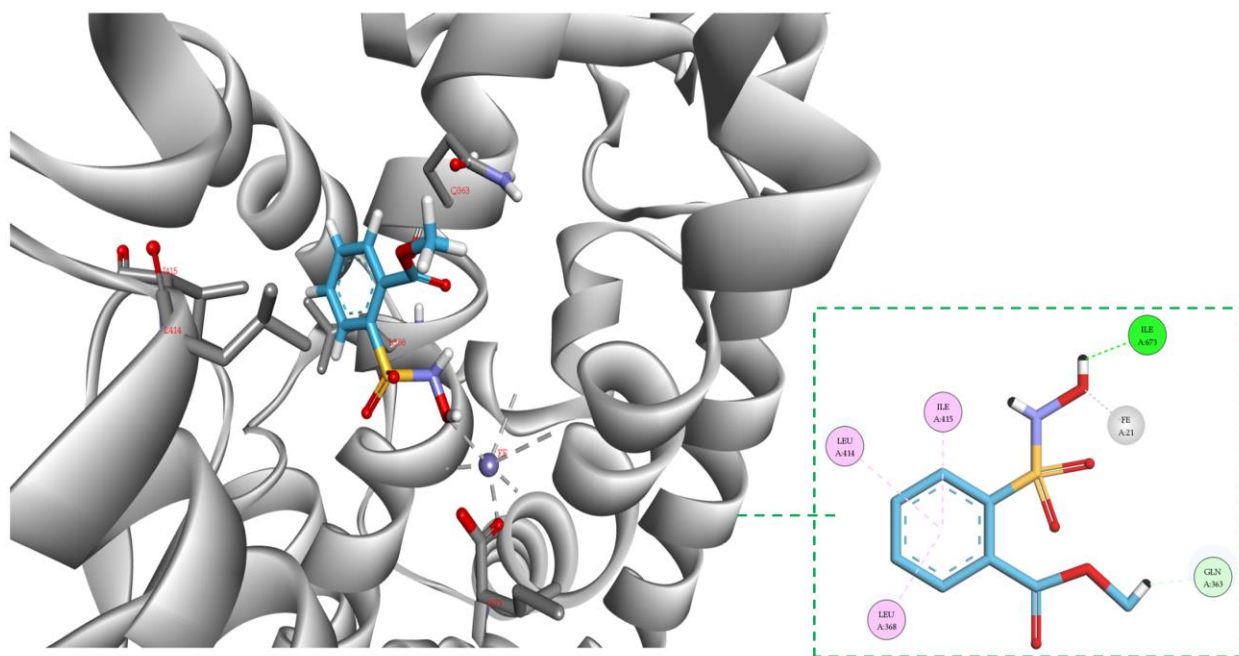
**Slika P4.** Korelacija između ASPFF i 5-LOX inhibitornih IC<sub>50</sub> vrednosti



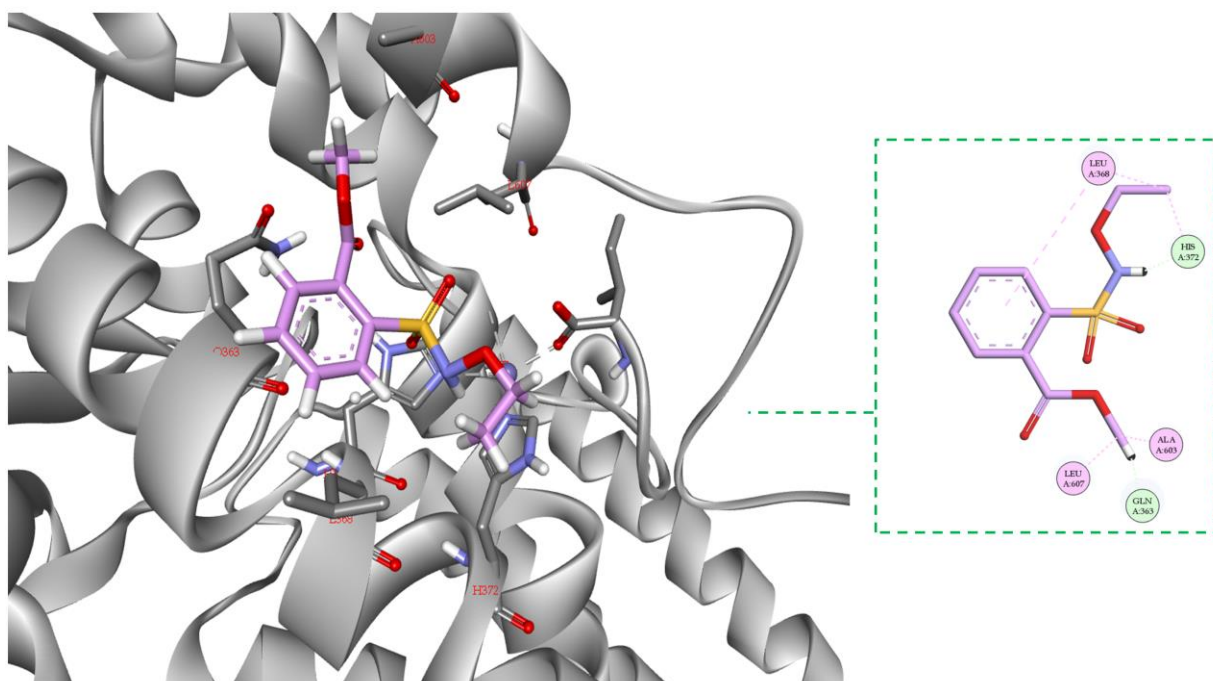
**Slika P5.** Položaj jedinjenja **11** unutar aktivnog mesta 5-LOX enzima; 3D prikaz (levo), 2D prikaz interakcija ligand - protein (desno)



**Slika P6.** Položaj liganda **1a** unutar vezivnog mesta 5-LOX enzima gledano sa vanćelijske (ekstracelularne) strane (levo); 2D prikaz 5-LOX – ligand interakcija (desno)

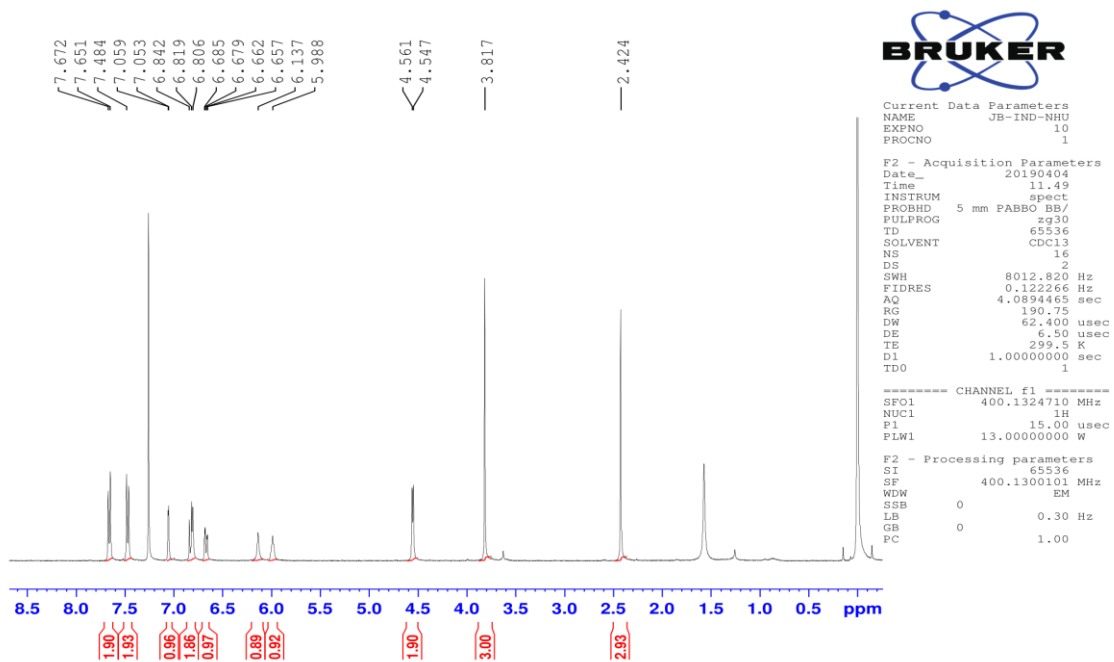


**Slika P7.** Položaj liganda **1b** unutar vezivnog mesta 5-LOX enzima gledano sa vančelijske (ekstracelularne) strane (levo); 2D prikaz 5-LOX – ligand interakcija (desno)

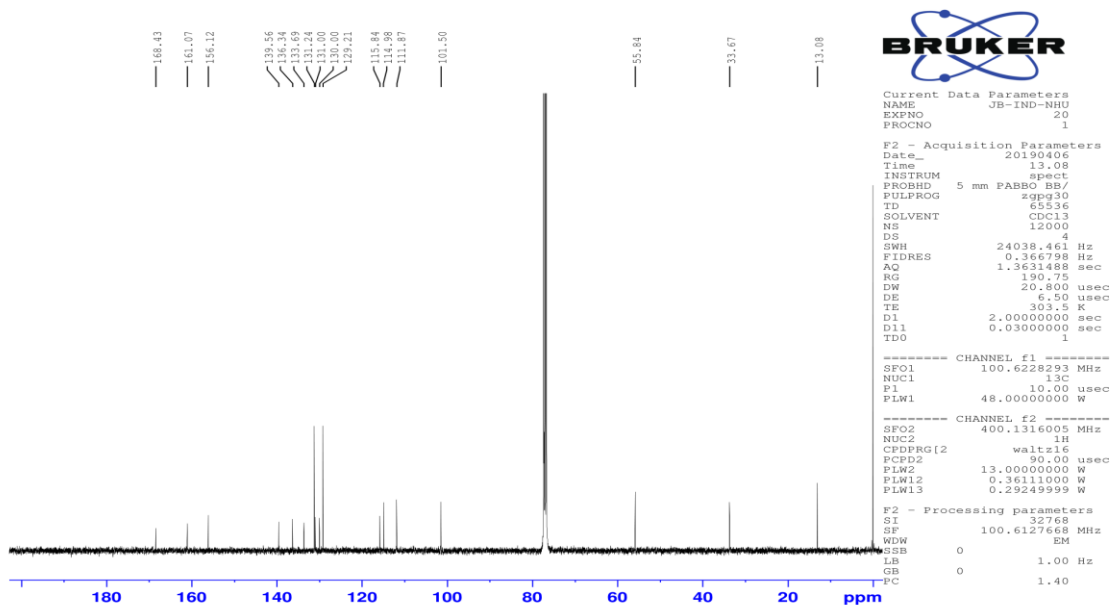


**Slika P8.** Položaj liganda **1c** unutar vezivnog mesta 5-LOX enzima gledano sa vančelijske (ekstracelularne) strane (levo); 2D prikaz 5-LOX – ligand interakcija (desno)

a)

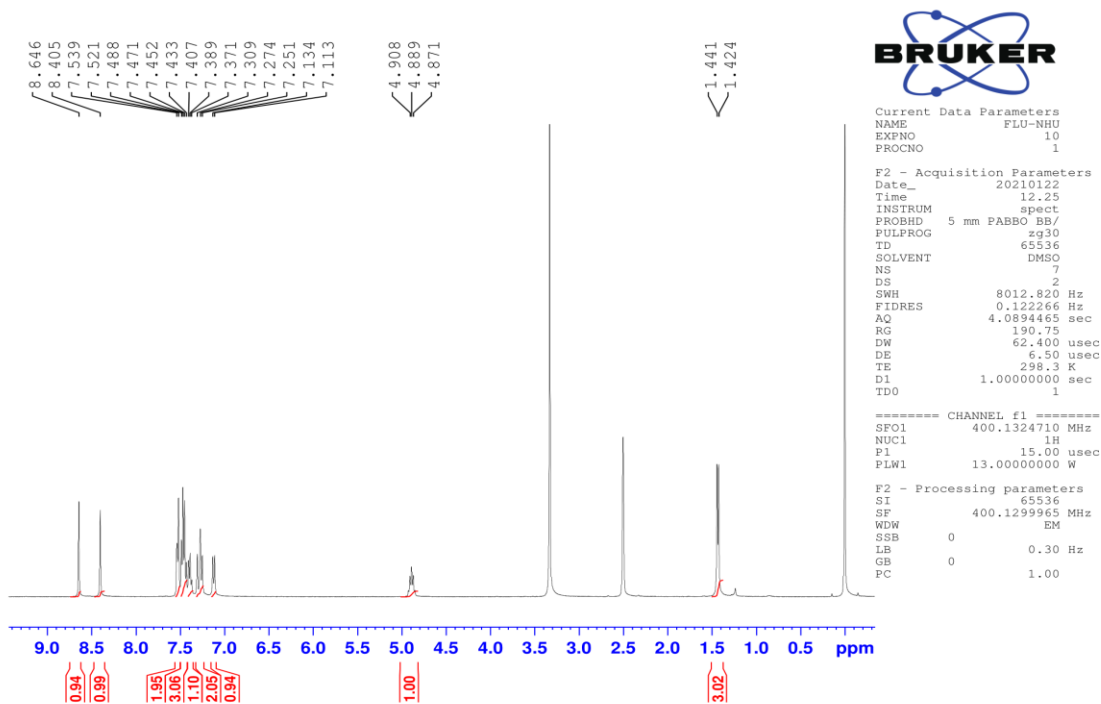


b)

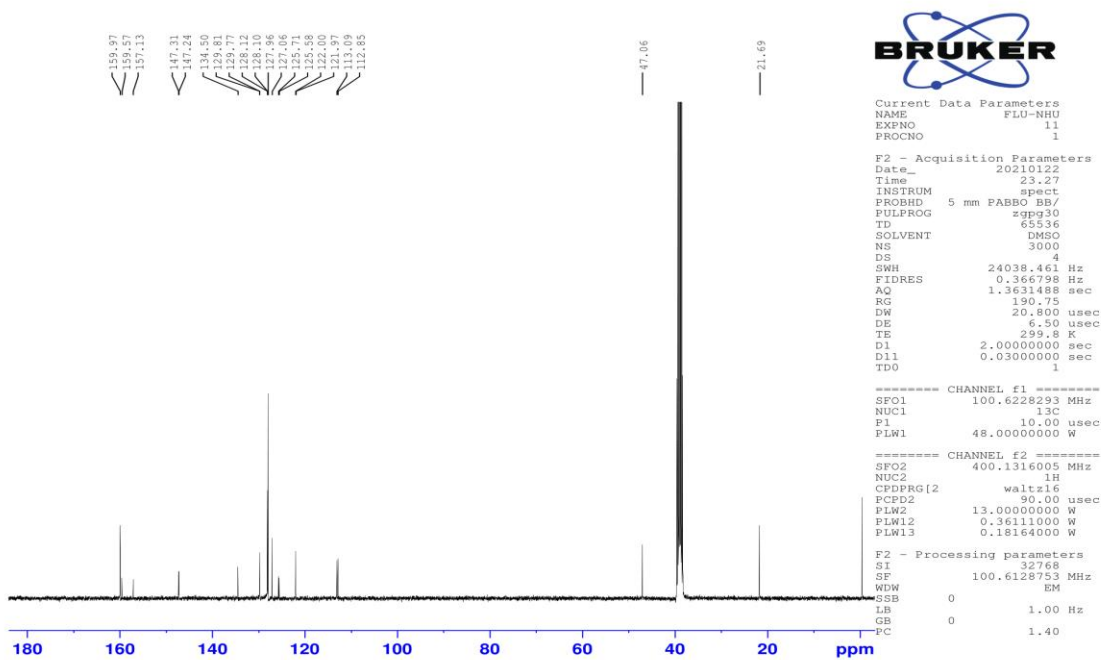


Slika P9. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 1

a)

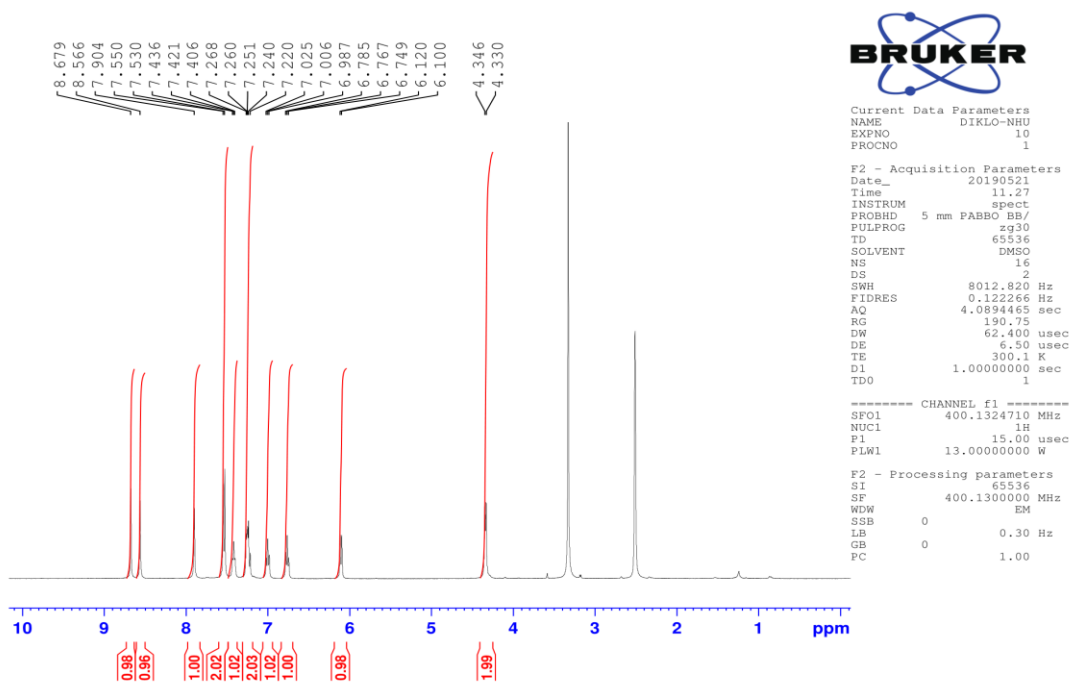


b)

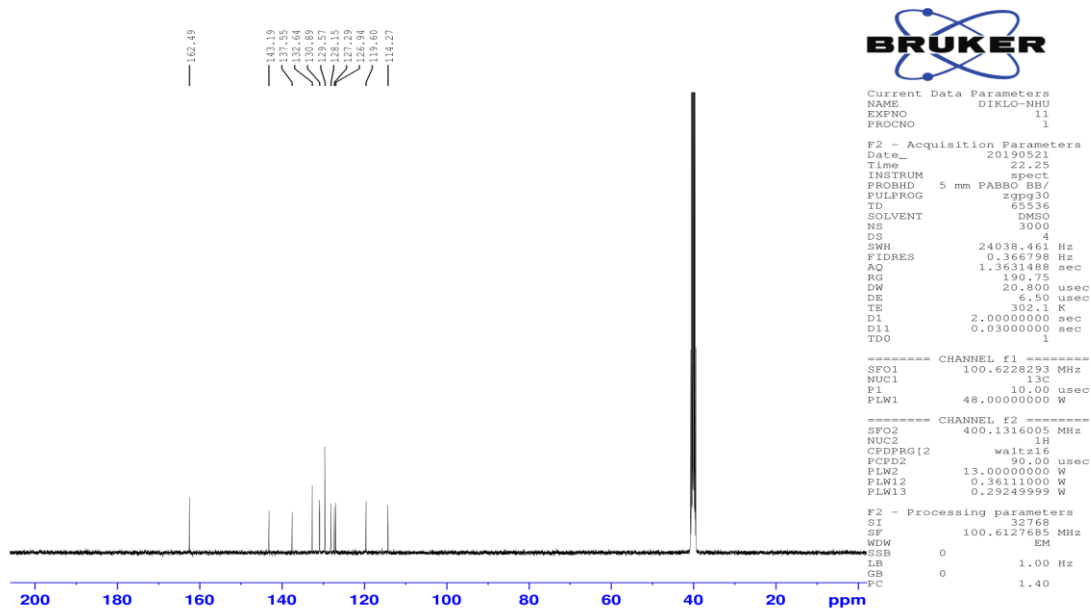


Slika P10. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 2

a)

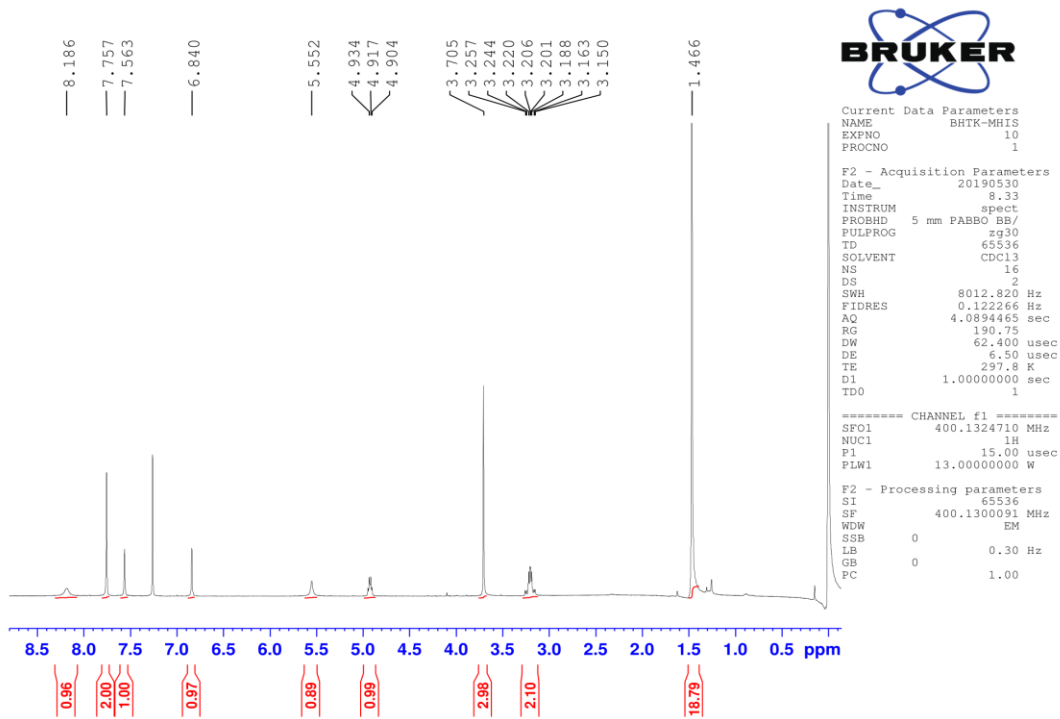


b)

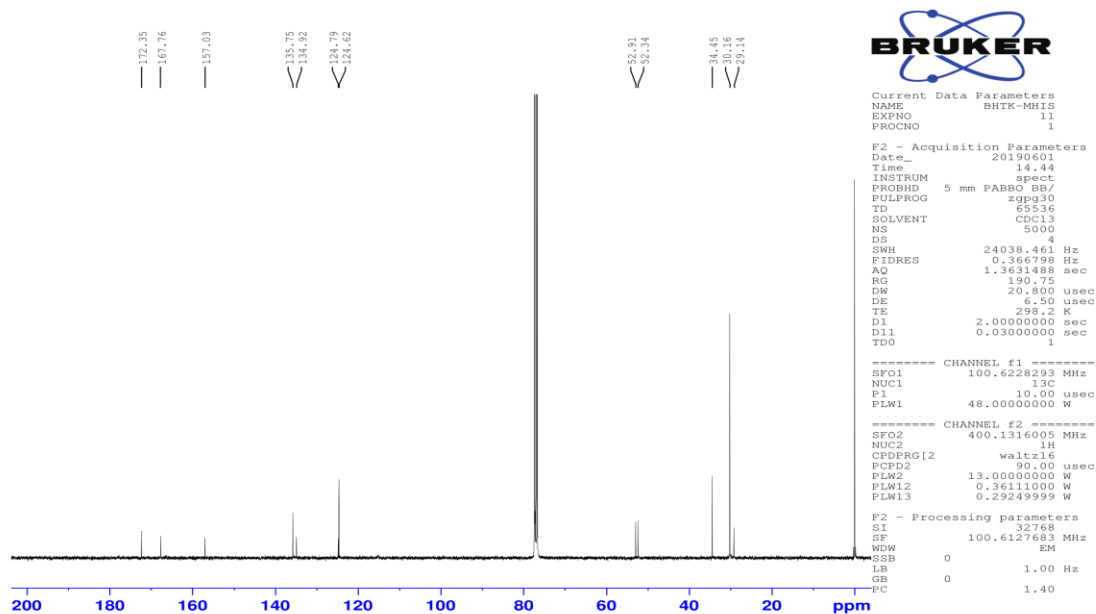


Slika P11.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 3

a)

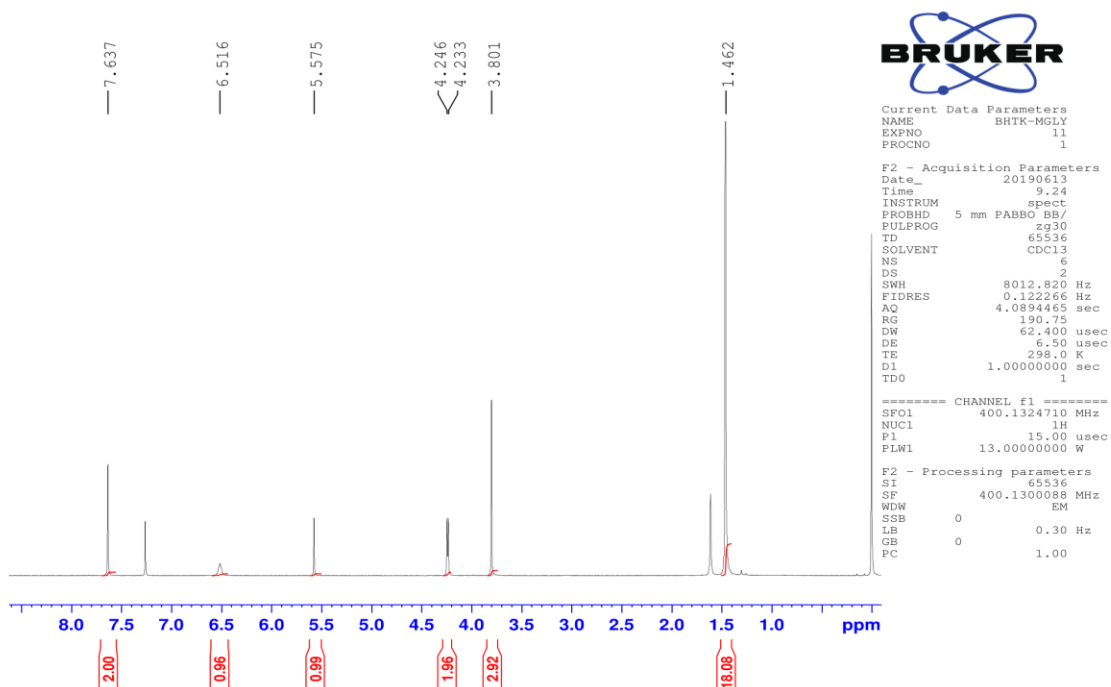


b)

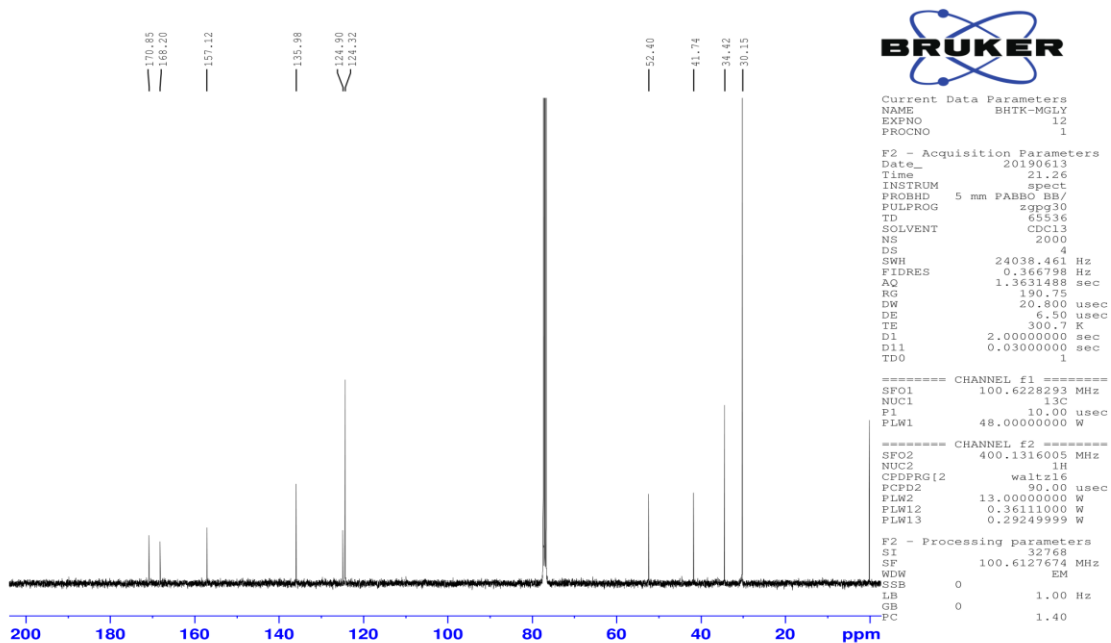


Slika P12. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 4

a)

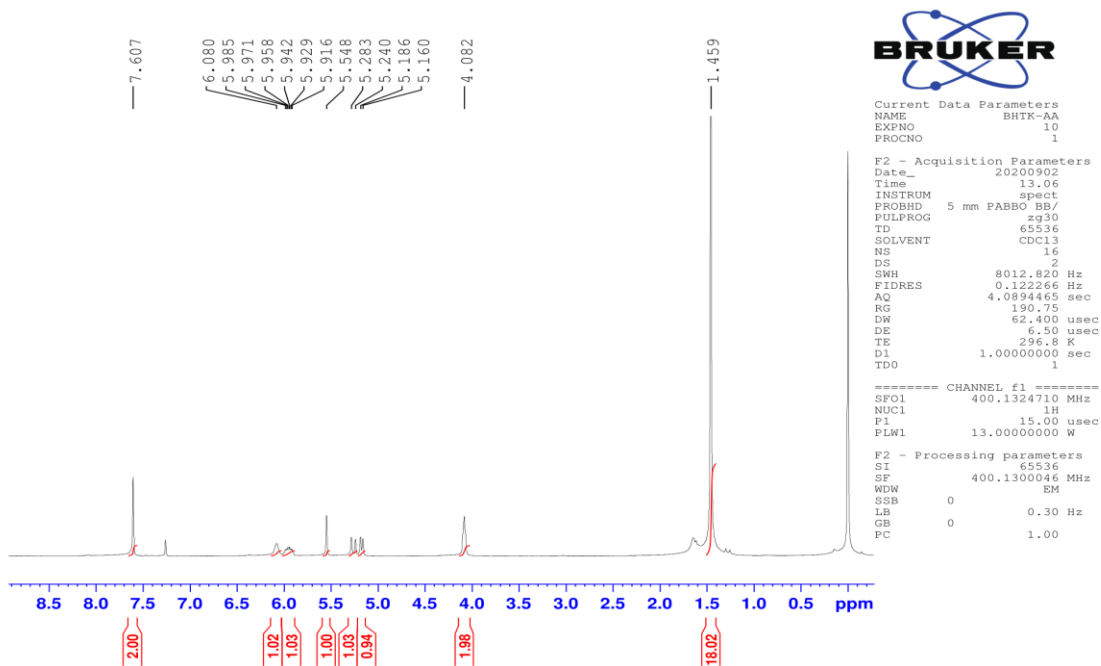


b)

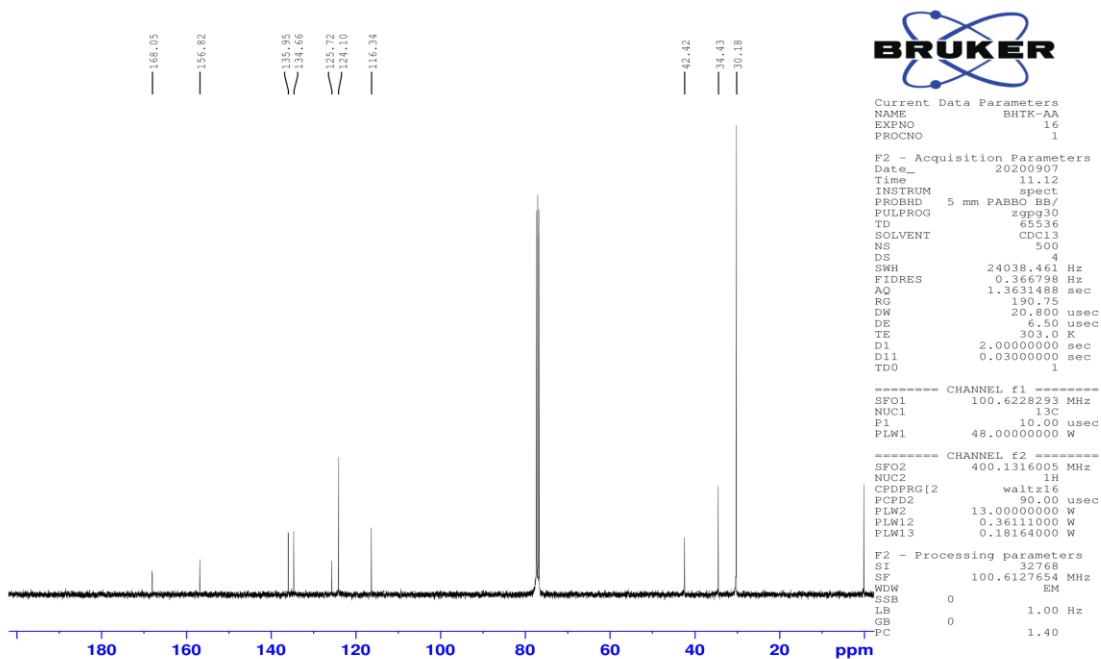


Slika P13.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 5

a)

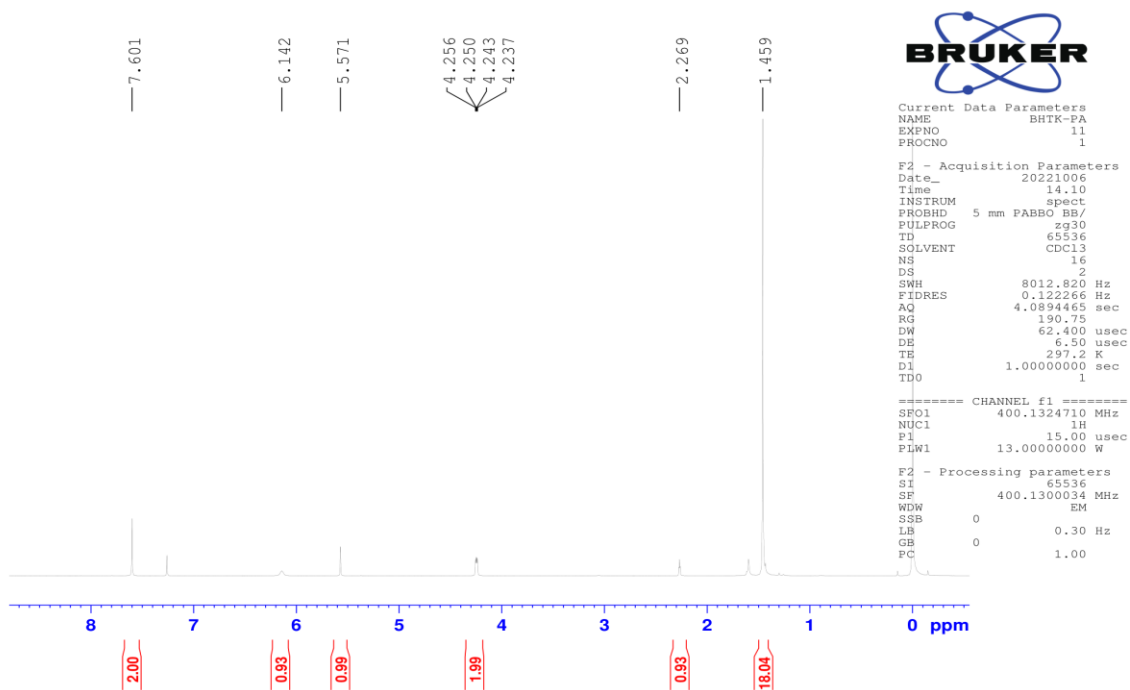


b)

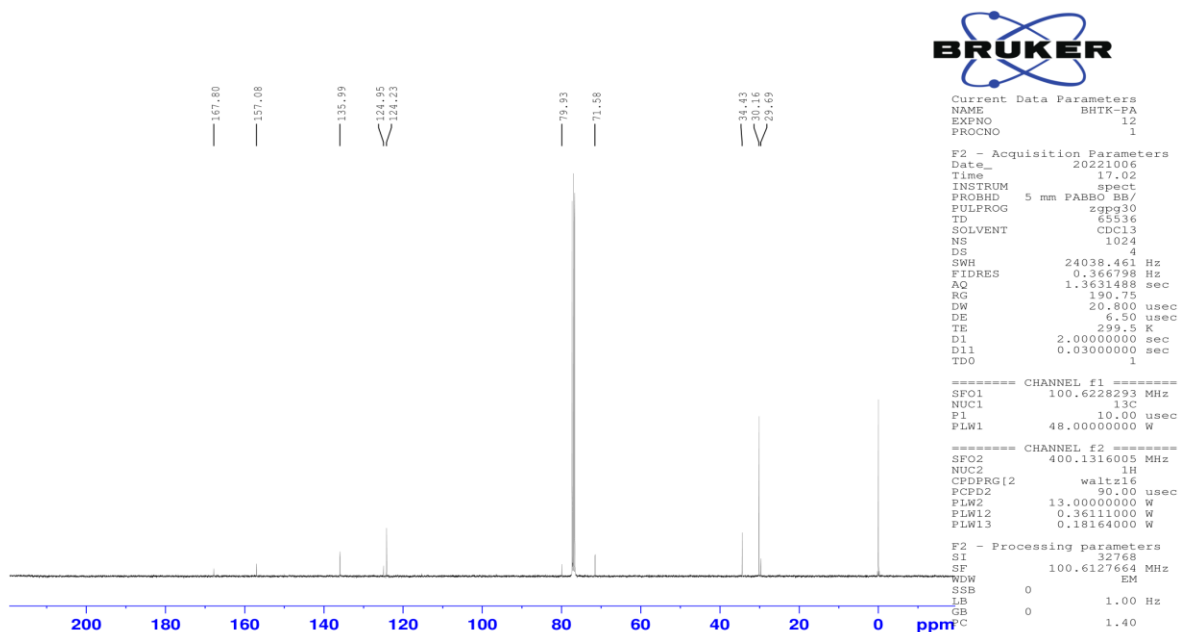


Slika P14. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 6

a)

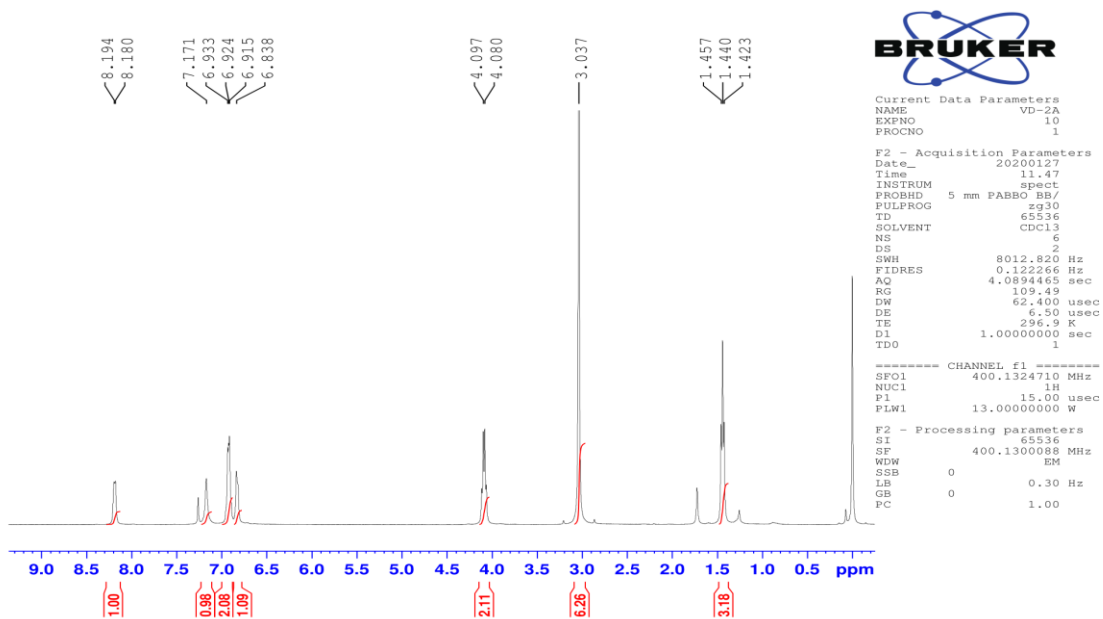


b)

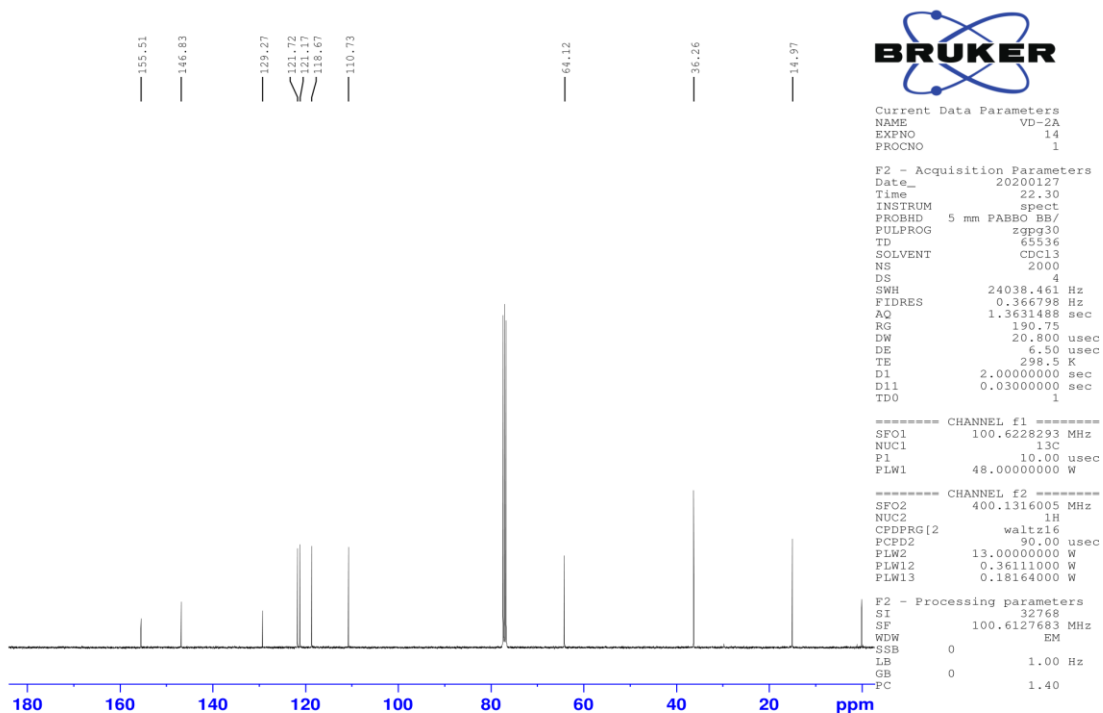


Slika P15. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 7

a)

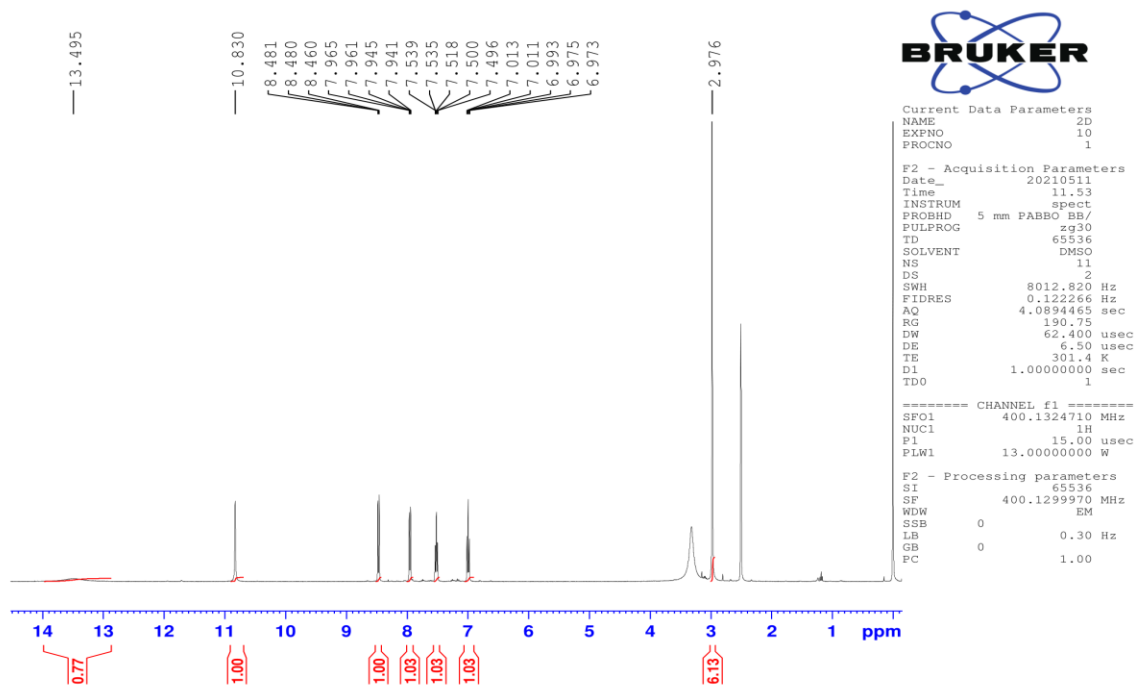


b)

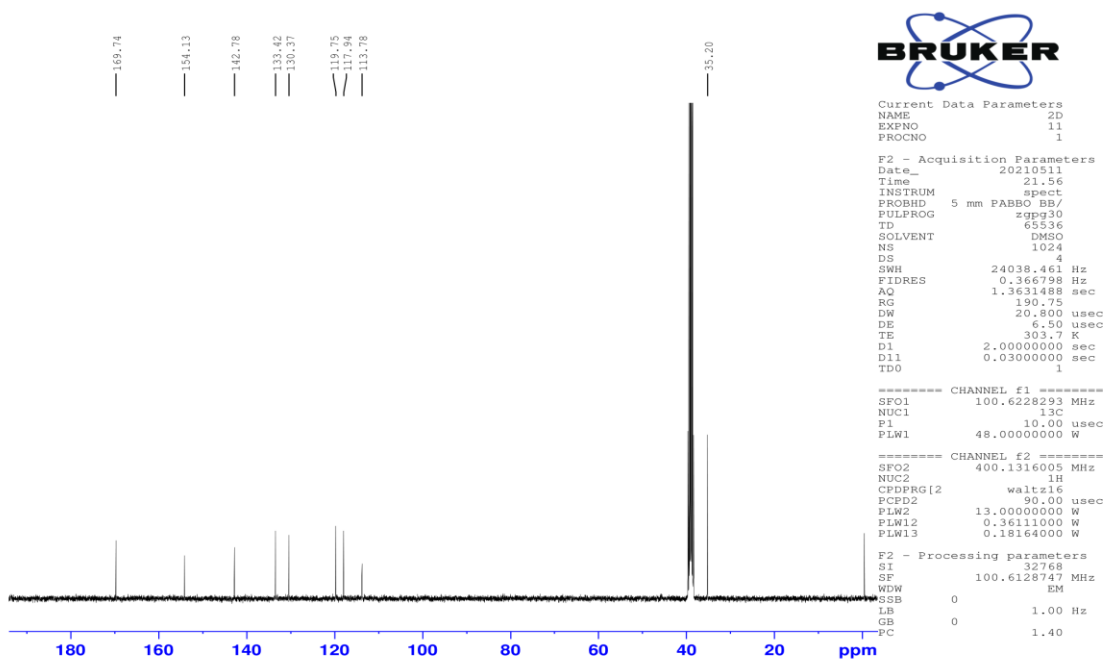


Slika P16.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 8

a)

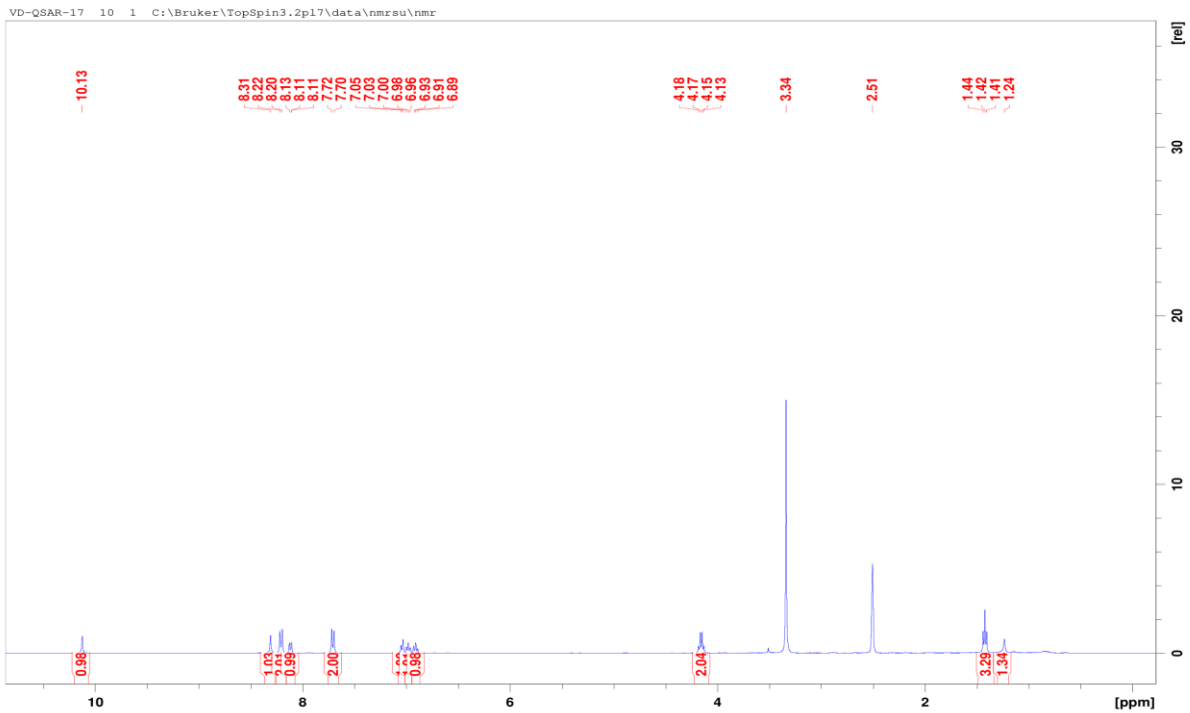


b)

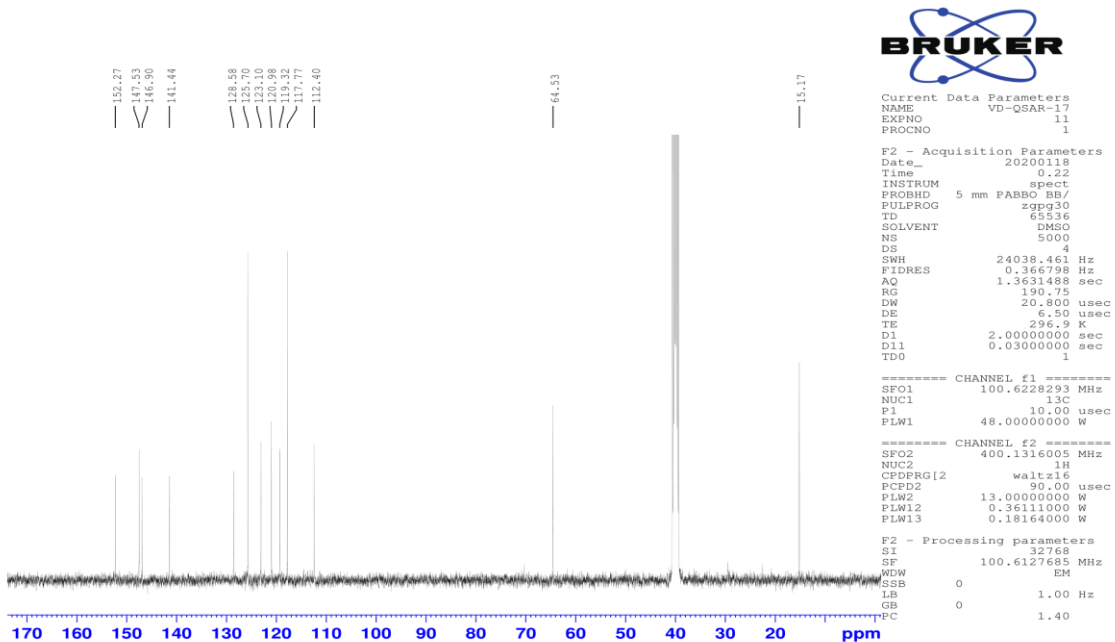


Slika P17.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 9

a)

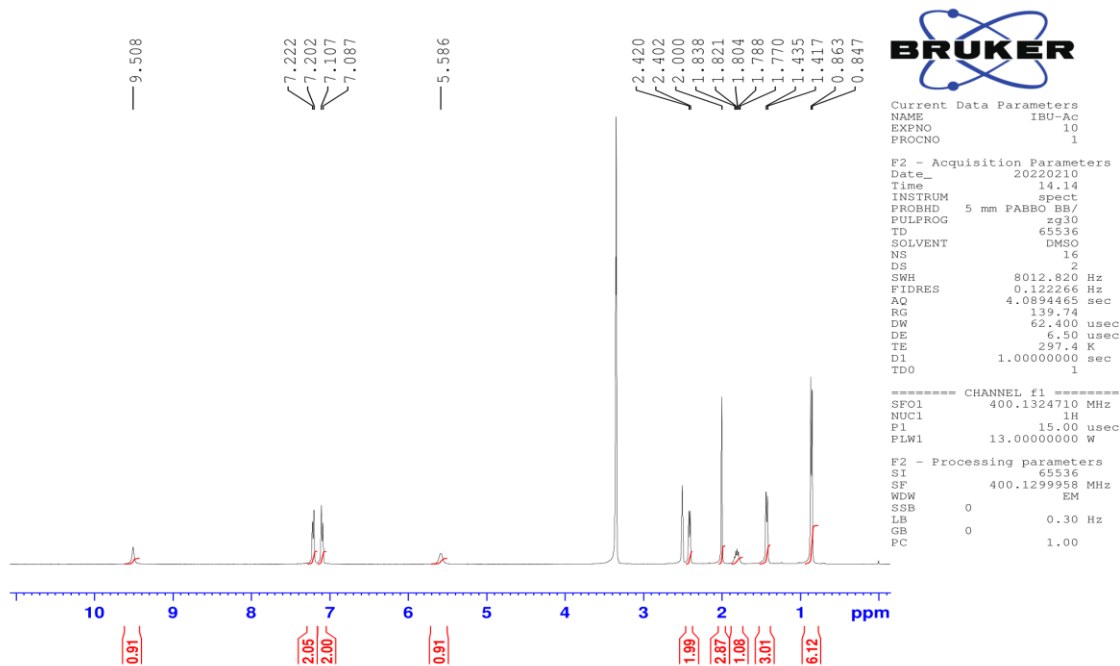


b)

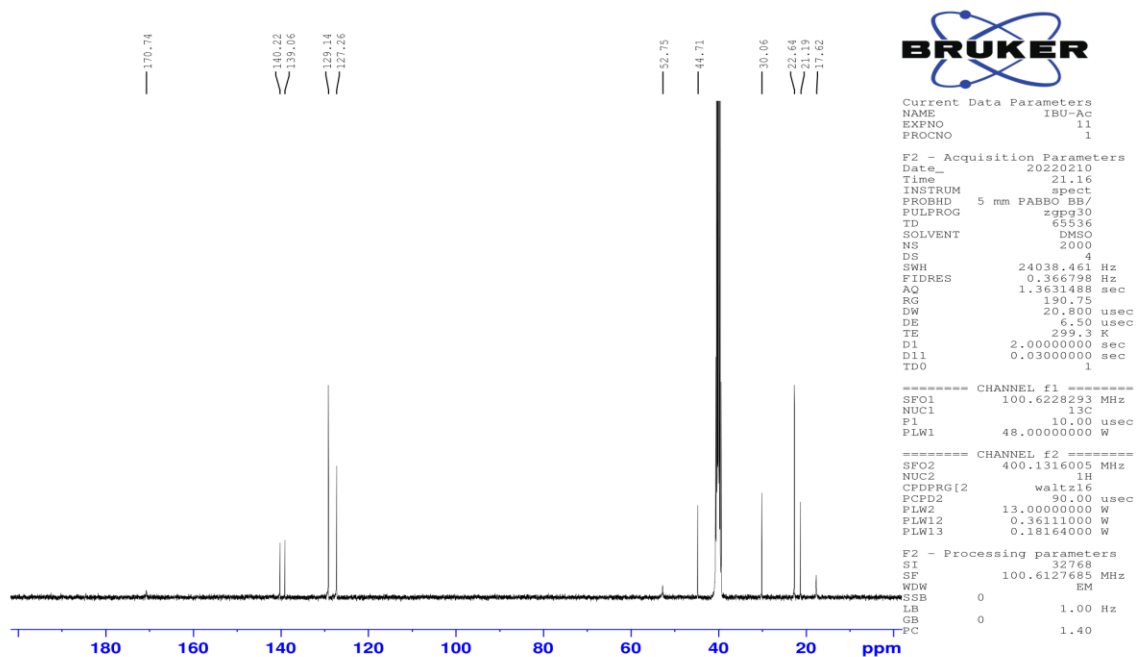


Slika P18.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 10

a)

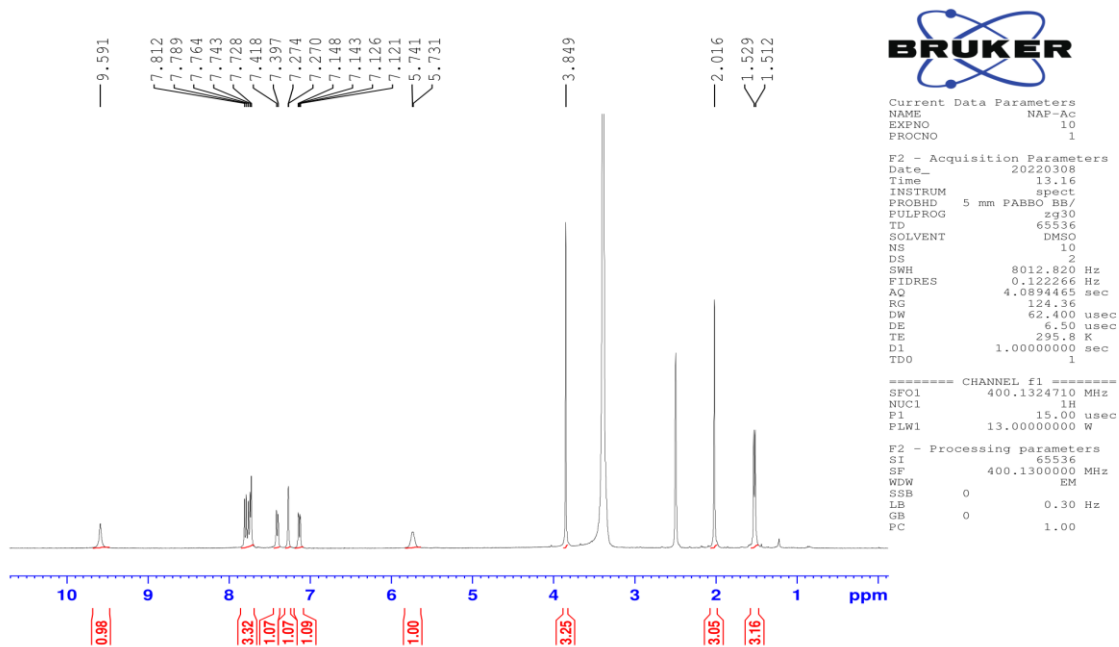


b)

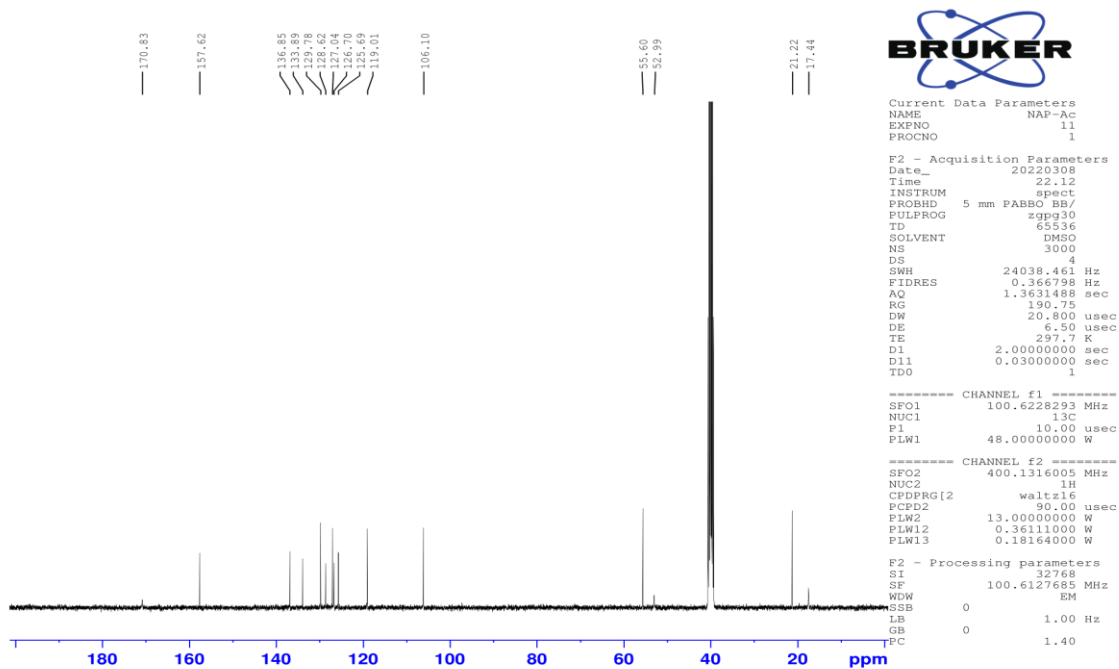


Slika P19. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 11

a)

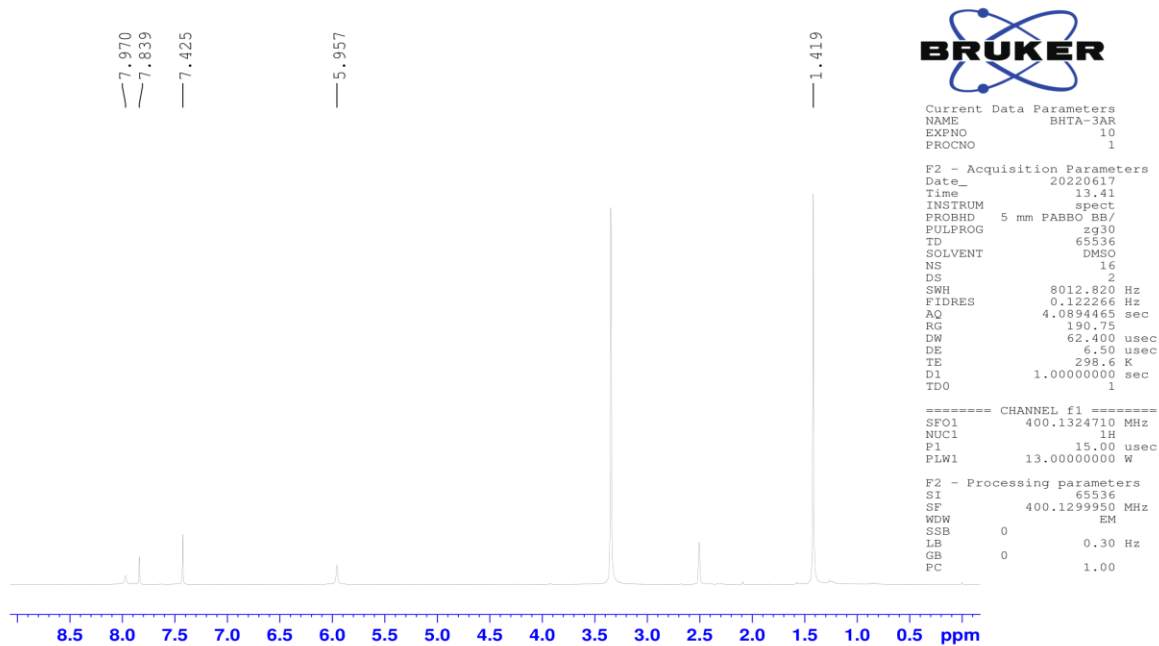


b)

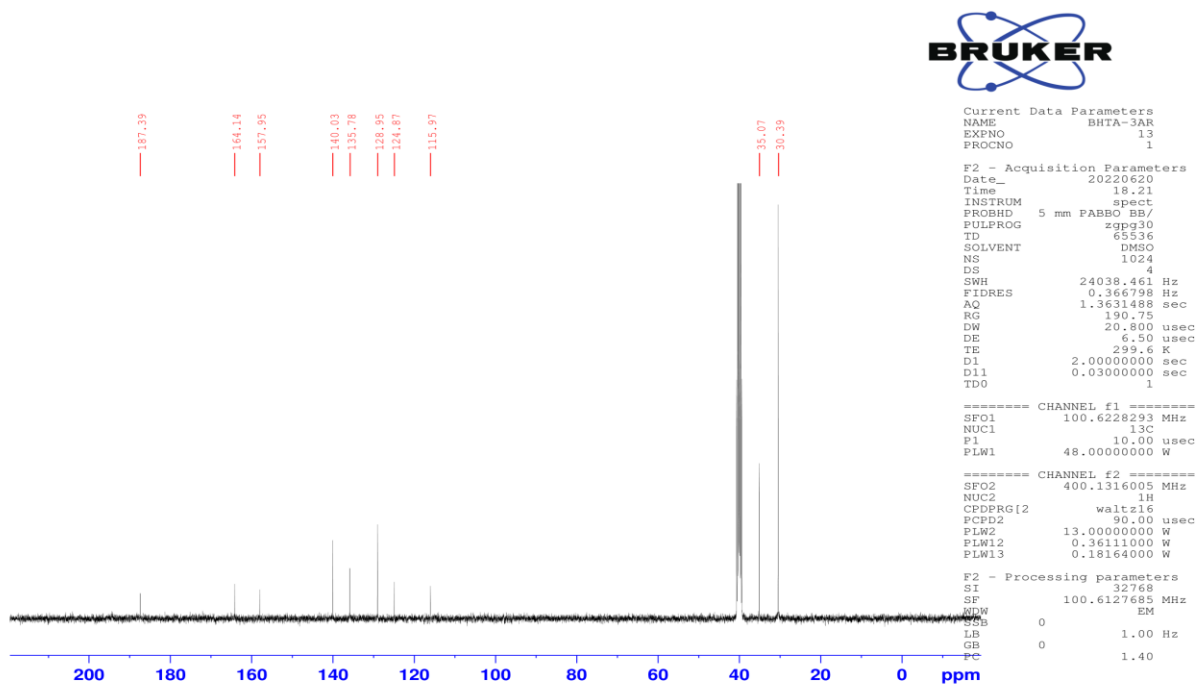


Slika P20.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 12

a)

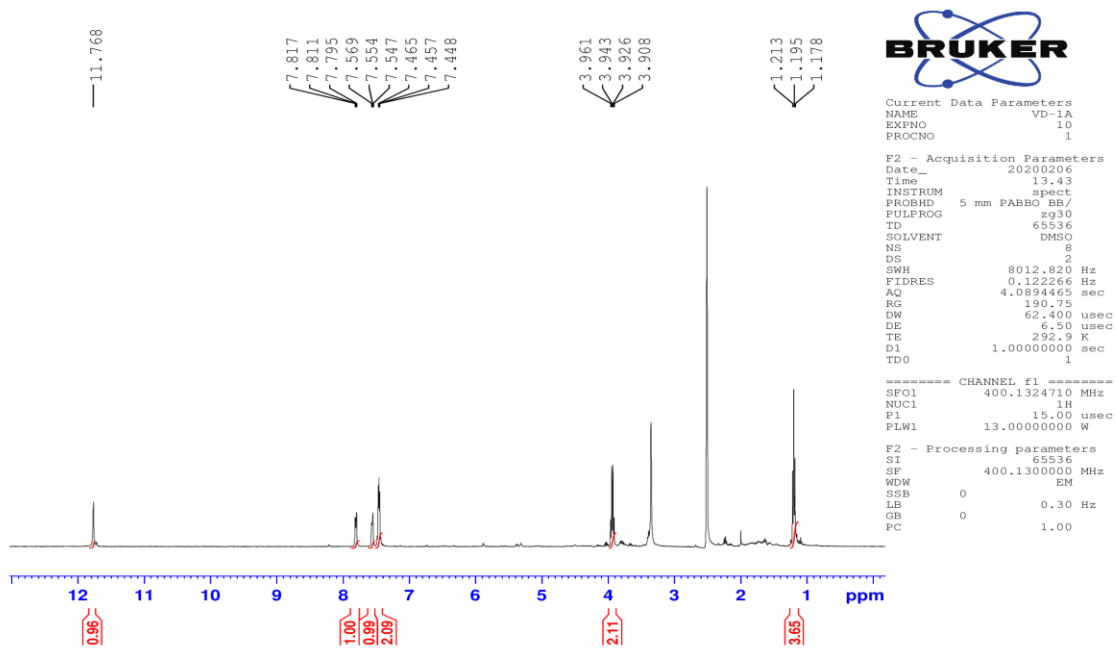


b)

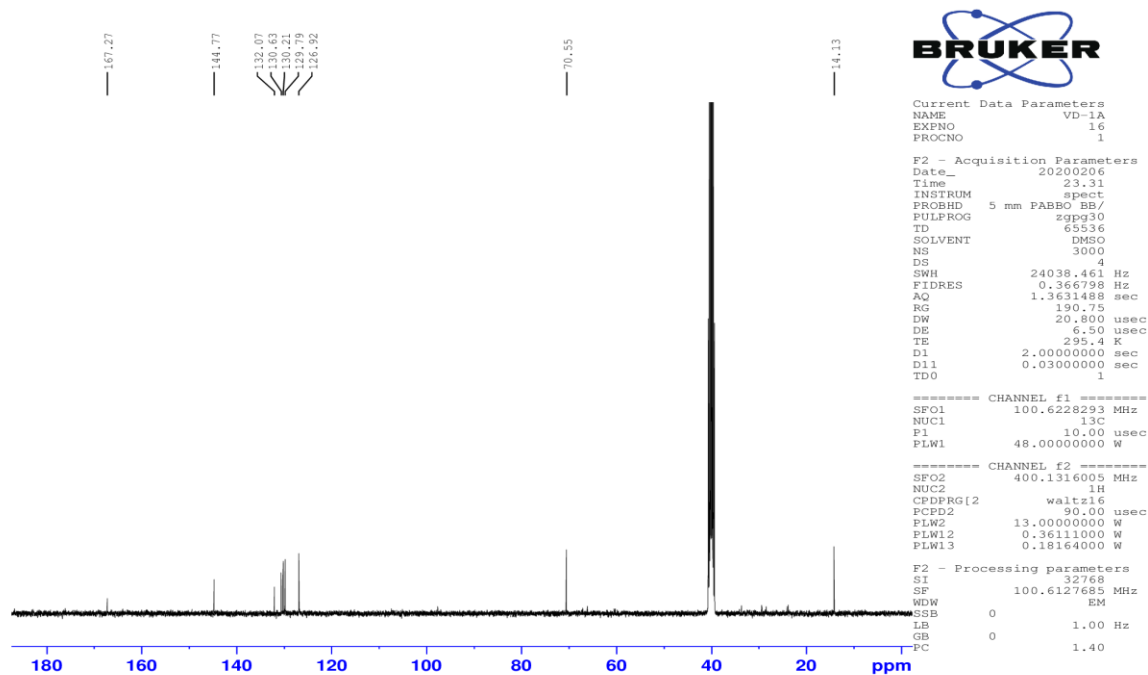


Slika P21.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 13

a)

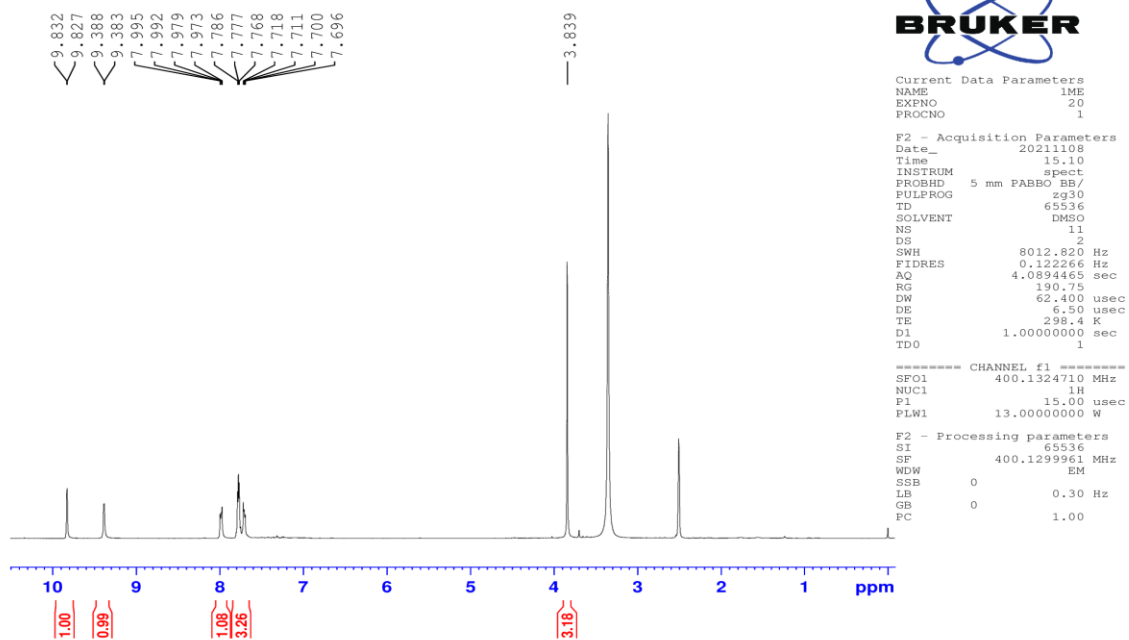


b)

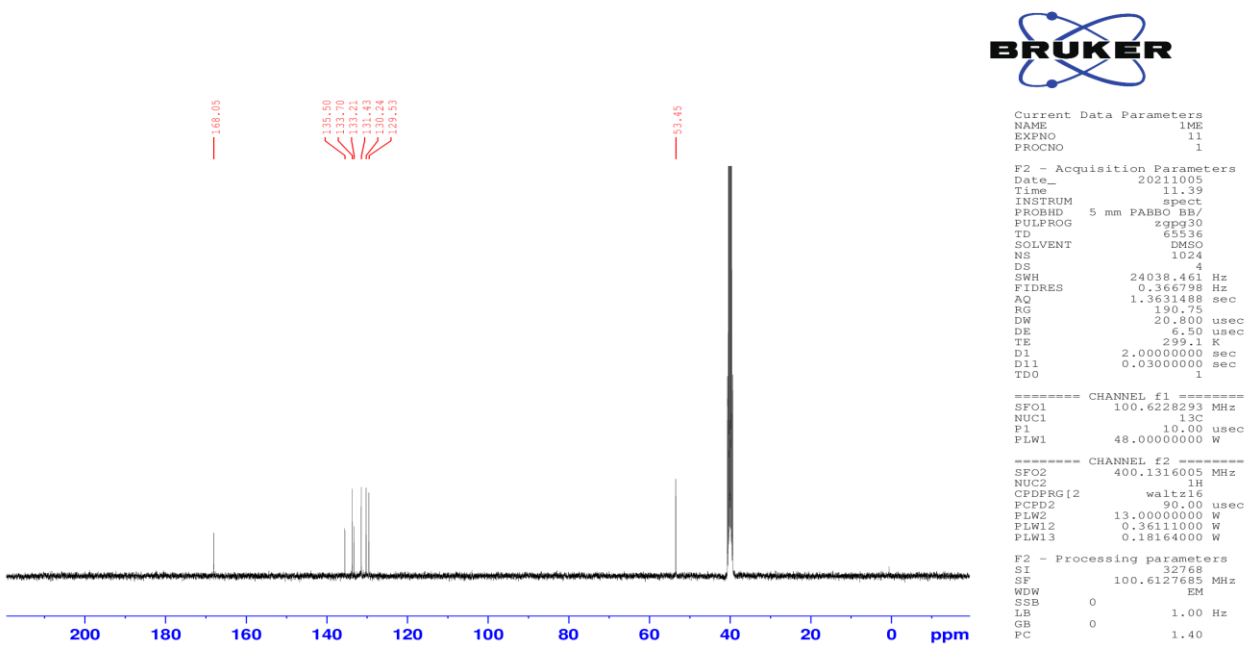


Slika P22. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 14

a)

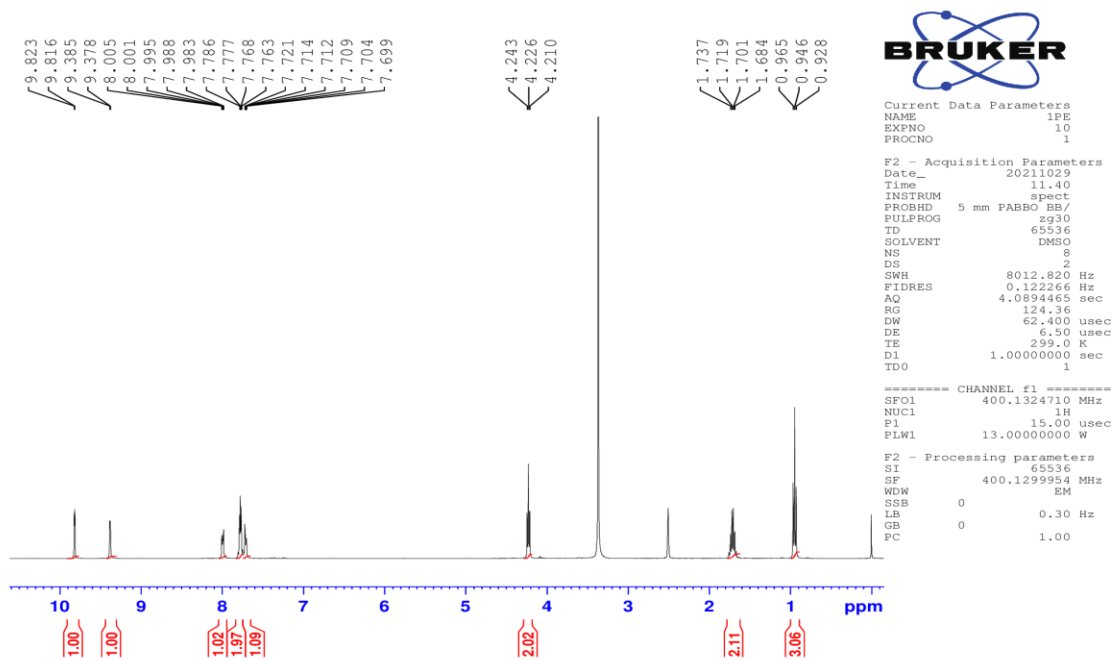


b)

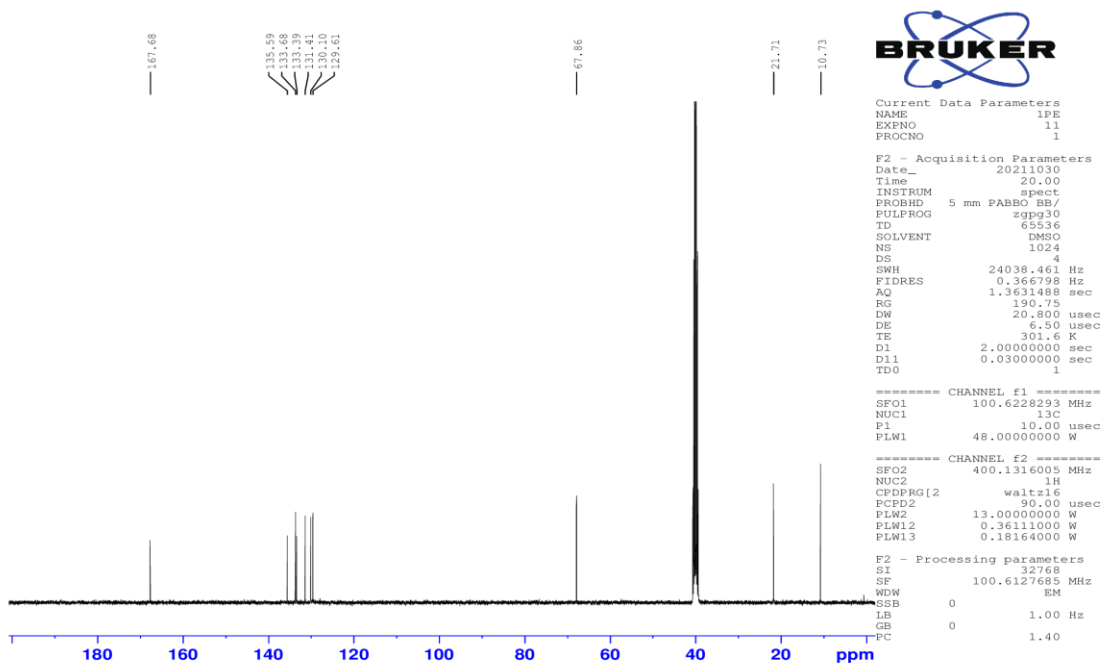


Slika P23.  $^1\text{H}$  NMR (a) i  $^{13}\text{C}$  NMR (b) spektri jedinjenja 15

a)

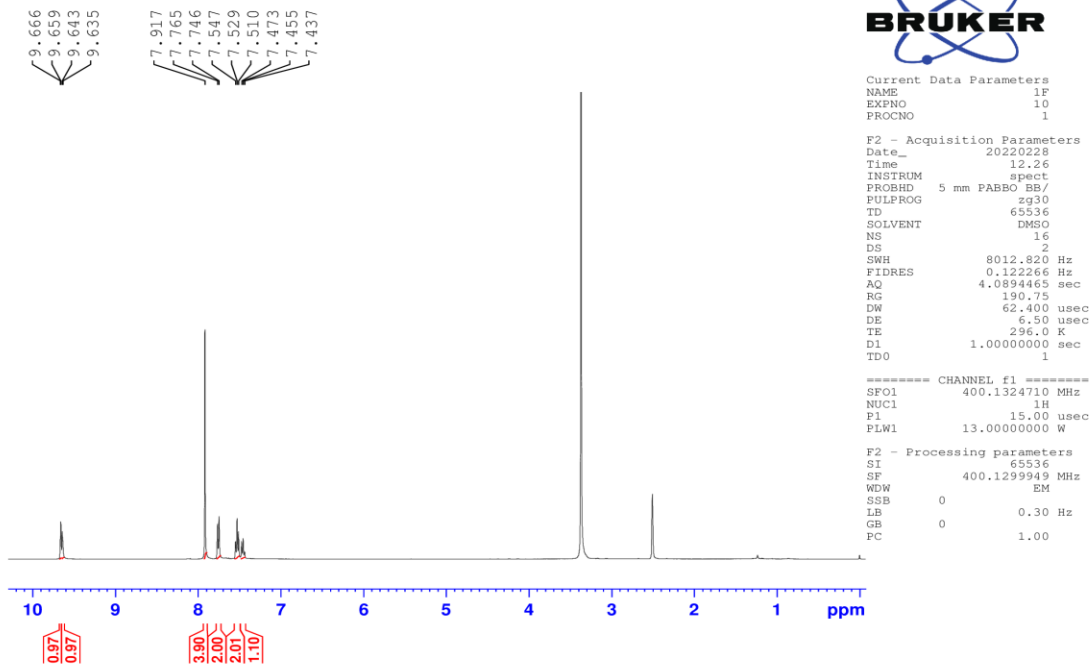


b)

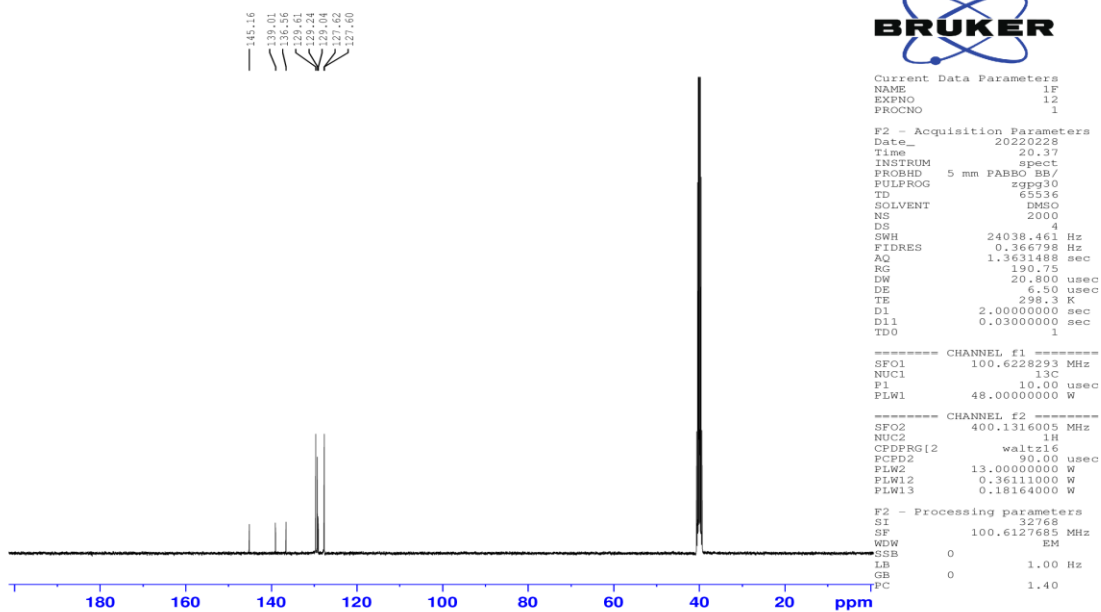


Slika P24. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 16

a)

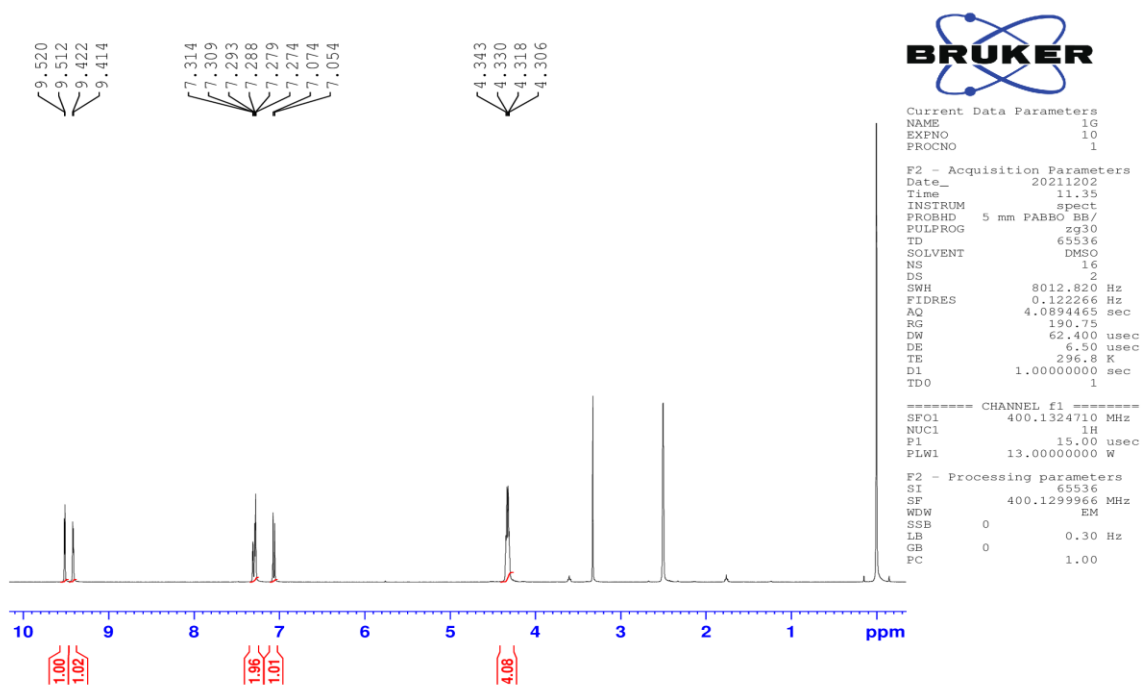


b)

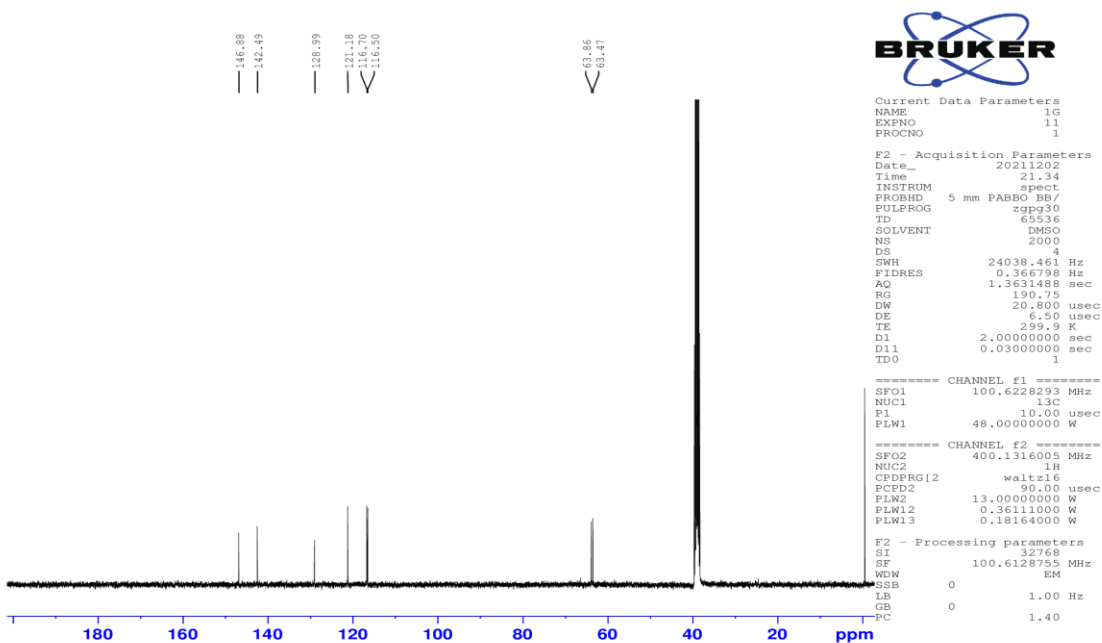


Slika P25. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 17

a)

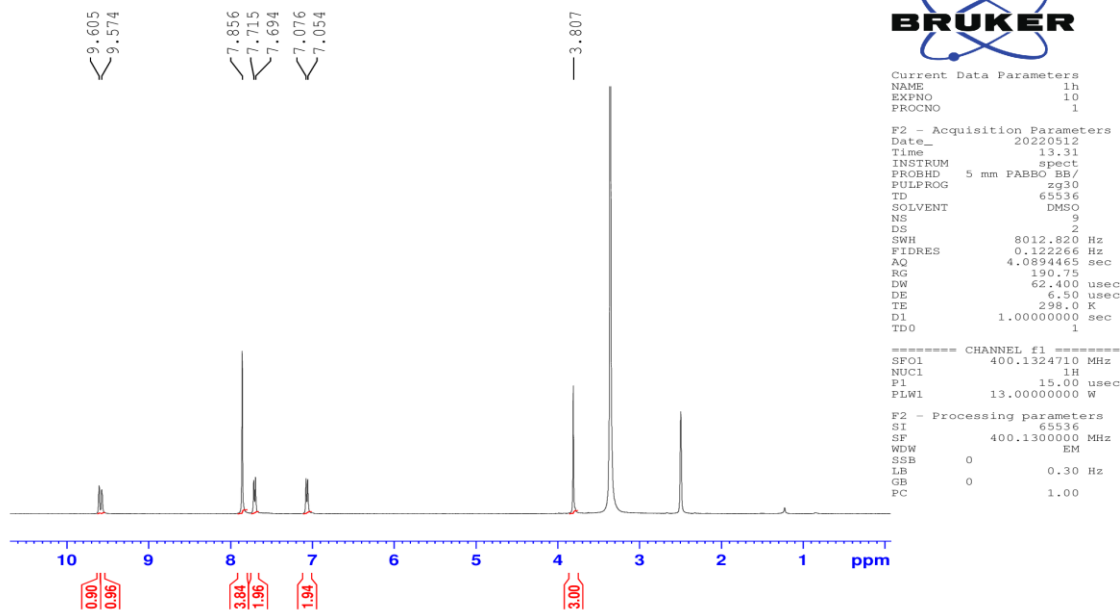


b)

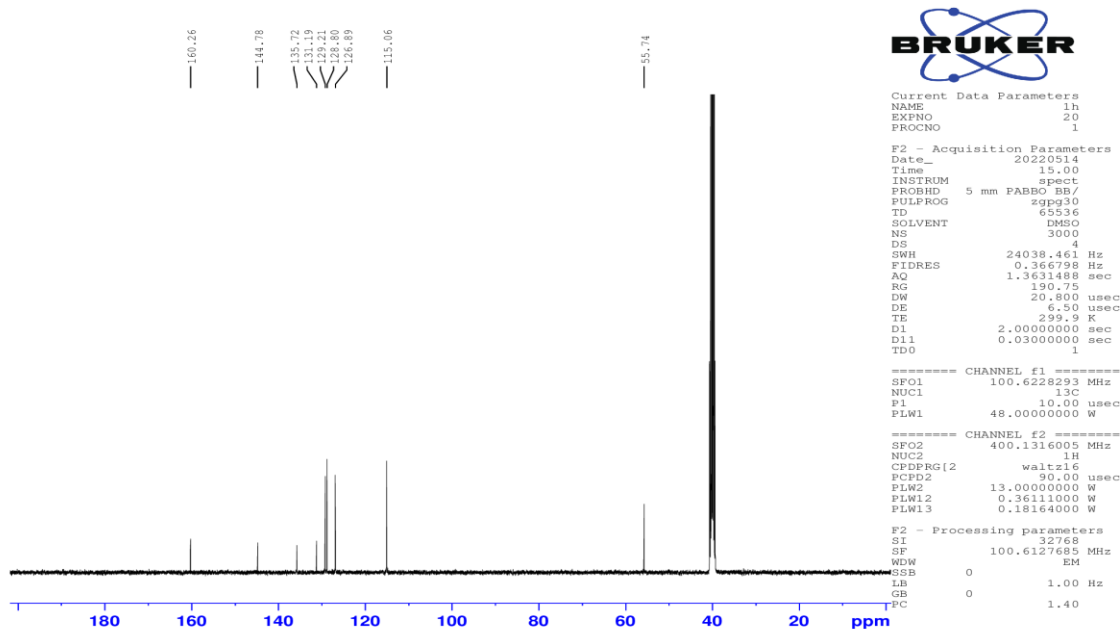


Slika P26. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 18

a)



b)



Slika P27. <sup>1</sup>H NMR (a) i <sup>13</sup>C NMR (b) spektri jedinjenja 19

**Tabela P7-P10.** Statistički značajne razlike (*Wilcoxon-ov test*) između dobijenih rezultata antioksidativnog testa za sva ispitivana jedinjenja

**P7)**

		2 h inkubacija																BHT	celekoksib	zileuton	urea	troloks	TBH		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	18	19	15	16						
1 /	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2 ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022	0,017	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3 ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4 ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,47	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
5 ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
6 ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	0,012	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7 ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
9 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,017
10 ns	0,022	ns	0,047	ns	0,012	ns	ns	ns	/	ns	ns	0,007	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
11 ns	0,017	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
12 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns
13 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007	ns	0,005 /	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
14 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
17 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007
18 ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,037
19 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	ns	ns	ns	/	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
15 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,017	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
16 ns	ns	ns	ns	0,47	0,009	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	0,022	0,017 /	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
BHT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns
celekoksib	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns
zileuton	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns
urea	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns
troloks	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	0,006
TBH	ns	ns	ns	0,005	0,005	ns	ns	ns	0,017	0,005	0,005	ns	0,005	ns	0,007	0,037	0,005	0,005	0,005	ns	ns	ns	ns	0,006 /	ns

**P8)**

		24 h inkubacija																BHT	celekoksib	zileuton	urea	troloks	TBH		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	18	19	15	16						
1 /	ns	ns	0,005	0,012	0,005	ns	ns	ns	ns	0,007	0,005	ns	ns	0,005	0,005	0,022	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,005
2 ns	/	ns	0,005	0,009	0,005	ns	ns	ns	ns	0,007	0,005	ns	ns	0,005	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	0,005
3 ns	ns	/	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	0,009	ns	ns	0,005	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	0,005
4 0,005	0,005	0,005 /	ns	ns	ns	ns	ns	0,022	ns	0,022	ns	0,005	ns	0,005	0,005	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
5 0,012	0,009	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007	ns	0,005	0,005	0,009	ns	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,007
6 0,005	0,005	0,005	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	0,009	ns	0,005	ns	0,005	0,005	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
7 ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
9 ns	ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022
10 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
11 0,007	0,007	ns	0,022	ns	0,009	ns	ns	ns	ns	/	0,022	0,007	ns	0,005	0,005	0,009	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,012
12 0,005	0,005	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022 /	0,005	ns	0,005	0,005	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,012
13 ns	ns	ns	ns	0,005	0,007	0,005	ns	ns	ns	0,007	0,005 /	ns	0,005	0,005	ns	0,005	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
14 ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	0,005	0,007	0,013	ns	0,028	ns	ns	ns	ns	ns	0,013	ns
17 0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	ns	ns	ns	ns	0,005	0,005	0,005	0,005 /	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
18 0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	ns	0,037	ns	ns	0,005	0,005	0,005	0,007	ns	/	ns	0,005	0,037	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
19 0,022	ns	ns	0,005	0,009	0,005	ns	ns	ns	ns	0,009	0,005	ns	0,013	ns	ns	/	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
15 0,005	0,005	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	0,005	0,005 /	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,013
16 ns	ns	ns	ns	0,005	0,009	0,005	ns	ns	ns	0,005	0,005	ns	0,028	ns	0,037	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005
BHT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns
celekoksib	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns
zileuton	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns
urea	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns
troloks	0,005	0,047	0,028	0,005	0,005	0,005	ns	ns	ns	0,005	0,005	ns	0,013	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	0
TBH	0,005	0,005	0,005	ns	0,007	ns	ns	0,005	0,022	ns	0,012	0,012	0,005	ns	0,005	0,005	0,005	0,013	0,005	ns	ns	ns	ns	0 /	ns

P9)

		2 h inkubacija, dodat TBH																celekoksib	zileuton	urea	troloks TBH						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	18	19	15	16 BHT							
1 /		0,012	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022	ns	ns	0,005	ns	0,022	0,022	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	0,009	ns
2	0,012 /	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007	0,028	0,012	ns	ns	0,022	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,05
3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns
4	ns	ns	ns	/	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
5	ns	ns	ns	0,007 /	ns	ns	ns	0,047	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
6	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8	ns	0,007	0,028	ns	0,047	ns	ns	/	ns	ns	0,017	0,007	0,028	0,005	0,005	ns	0,017	0,028	0,013	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022	ns
9	ns	0,028	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	0,047	ns	ns	0,047	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,037	ns
10	ns	0,012	ns	ns	0,037	0,047	ns	ns	ns	/	ns	0,007	ns	0,009	0,005	ns	0,028	0,047	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns
11	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,017	ns	ns	/	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,037	ns
12	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007	0,047	0,007	ns	/	0,009	ns	0,013	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028
13	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	ns	ns	0,009 /	0,022	0,005	ns	ns	ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	0,009	ns	ns	0,022 /	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028
17	0,005	0,005	0,007	0,028	ns	0,022	ns	0,005	0,005	0,005	0,005	0,013	0,005	0,005 /	0,037	0,037	0,009	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007
18	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,037 /	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,009
19	0,022	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	0,017	ns	0,028	ns	ns	ns	ns	0,037	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
15	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	0,009	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047
16	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,013	ns	0,007	ns	ns	0,022	ns	0,005	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BHT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
celekoksib	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns
zileuton	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns
urea	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns
troloks	0,009	ns	0,028	0,005	ns	ns	ns	0,022	0,037	0,028	0,037	ns	ns	ns	ns	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	0,006
TBH	ns	0,05	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	0,028	0,007	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,006 /	

P10)

		24 h inkubacija, dodat TBH																celekoksib	zileuton	urea	troloks TBH						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	18	19	15	16 BHT							
1 /		ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	0,005	ns	ns	0,005	ns	0,022	0,017	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
2	ns	/	0,022	ns	ns	ns	ns	0,007	ns	ns	0,012	ns	ns	ns	ns	0,047	0,028	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
3	ns	0,022 /	0,005	0,017	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	0,037	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,037
4	ns	ns	0,005 /	0,047	ns	ns	ns	0,007	ns	ns	0,005	ns	0,028	ns	ns	0,013	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
5	ns	ns	0,017	0,047 /	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	0,005	ns	ns	0,005	ns	0,013	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
6	ns	ns	0,022	ns	ns	/	ns	0,005	ns	ns	0,005	ns	0,028	0,022	ns	0,017	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8	0,005	0,007	ns	0,007	0,005	0,005	ns	/	ns	0,028	0,009	0,007	0,005	0,005	0,017	0,007	0,009	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,012
9	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,022
10	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,028	ns	/	ns	ns	ns	0,013	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
11	0,005	0,012	ns	0,005	0,005	0,005	ns	0,009	ns	ns	/	0,007	ns	0,005	ns	ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,028
12	ns	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	0,007	ns	ns	0,007 /	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
13	ns	ns	ns	0,028	ns	0,028	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	/	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,047
14	0,005	ns	0,005	ns	0,005	0,022	ns	0,005	ns	0,013	0,005	0,047	0,005 /	ns	0,005	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,017	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,009	ns
18	0,022	0,047	ns	0,013	0,013	0,017	ns	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,047
19	0,017	0,028	ns	0,009	0,007	0,007	ns	0,009	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	0,022
15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007	ns	ns	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns
16															ns	ns	ns	ns	/								
BHT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
celekoksib	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns
zileuton	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns	ns
urea	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/	ns	ns
troloks	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	ns	ns	ns	ns	0,005	0,005	0,005	0,005	0,009	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	ns	ns	ns	ns	/	0	
TBH	ns	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	0,012	0,022	ns	0,028	ns	0,047	ns	ns	0,047	0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0 /	

## Biografija kandidata

Jelena D. Bošković je rođena 17. februara 1993. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu kao nosilac diploma „Vuk Karadžić“. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/2013. godine. Diplomirala je 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,11/10. Zvanje magistar farmacije je stekla odbranom završnog rada: „Sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija novih derivata kortijske kiseline metilprednizolona kao potencijalnih *soft* glukokortikoida za primenu na kožu“, pod mentorstvom doc dr. Vladimira Dobričića na Univerzitetu u Beogradu - Farmaceutskom fakultetu. Doktorske akademske studije upisala je na Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta 2017. godine pod mentorstvom prof. dr Olivere Čudine. Zvanje istraživač pripravnik stekla je aprila 2018. godine. Od tada radi na Katedri za farmaceutsku hemiju, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta. Zvanje istraživač saradnik stekla je juna 2021. godine. Učesnik je projekta Fonda za nauku Republike Srbije iz programa IDEJE: „Utilization of interplay between inflammation and cancer in the development of compounds with anticancer activity“ (InfCanPlay) 2022-2024. Učestvovala je na radionici kompjuterske medicinske hemije pod nazivom „DesignIT-to-LEAD2019“ održanoj u Kragujevcu, Srbija (10.07-11.07.2019), a tema skupa je bila primena QSAR modelovanja u dizajnu novih jedinjenja. U okviru naučno-istraživačkog rada, prvi autor je dva rada objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i jednog rada objavljenog u međunarodnom časopisu (M23), koji čine deo disertacije. Koautor je tri rada objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jednog rada objavljenog u međunarodnom časopisu (M23) i jednog rada objavljenog u vrhunskom nacionalnom časopisu (M51).

Istraživački interes je usmeren ka dizajnu, sintezi i proceni farmakokinetičkih i bioloških osobina jedinjenja sa antiinflamatornom i antiproliferativnom aktivnošću (glukokortikoidi i dualni COX-2 i 5-LOX inhibitori).

## Spisak naučnih radova i saopštenja koji čine deo disertacije

### *Naučni radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima*

1. **Bošković, J.**; Dobričić, V.; Mihajlović, M.; Kotur-Stevuljević, J.; Čudina, O. Synthesis, Evaluation of Enzyme Inhibition and Redox Properties of Potential Dual COX-2 and 5-LOX Inhibitors. *Pharmaceuticals* **2023**, 16 (4), 549.

**IF (2021) = 5,21; Pharmacology & Pharmacy (69/279) M21**

2. **Bošković, J.**; Dobričić, V.; Keta, O.; Korićanac, L.; Žakula, J.; Dinić, J.; Jovanović Stojanov, S.; Pavić, A.; Čudina, O. Unveiling Anticancer Potential of COX-2 and 5-LOX Inhibitors: Cytotoxicity, Radiosensitization Potential and Antimigratory Activity against Colorectal and Pancreatic Carcinoma. *Pharmaceutics* **2024**, 16 (6), 826.

**IF (2022) = 5,4; Pharmacology & Pharmacy (50/278) M21**

### *Naučni rad objavljen u međunarodnom časopisu*

1. **Bošković, J.**; Ružić, D.; Čudina, O.; Nikolic, K.; Dobričić, V. Design of Dual COX-2 and 5-LOX Inhibitors with Iron-Chelating Properties Using Structure-Based and Ligand-Based Methods. *Letters in Drug Design & Discovery* **2022**, 19 (4), 279–292.

**IF (2020) = 1,15; Chemistry, Medicinal (57/63) M23**

### *Saopštenja:*

1. **Bošković, J.**; Ružić, D.; Čudina, O.; Nikolić, K.; Dobričić, V. Design of dual cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors with iron-chelating properties-molecular docking. MedChem 2021 (Paul Ehrlich Virtual Meeting), Catanzaro, July 26th-28th 2021. **M34**

2. **Bošković, J.**; Dobričić, V.; Ružić, D.; Nikolić, K.; Čudina, O. Design of novel dual COX-2 and 5-LOX inhibitors using quantitative structure-activity relationships analysis. MedChem 2022 (XI Meeting of the Paul Ehrlich Euro-PhD Network), Institut Químic de Sarrià – Universitat Ramon Llull (IQS-URL), Barcelona, July 14th -16th 2022. **M34**

3. **Bošković, J.**; Čudina, O.; Dobričić, V. Synthesis and physicochemical characterization of three newly synthesized sulfhydroxamic acid derivatives as potential dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase enzymes. VIII Serbian Congress of Pharmacy with international participation. Belgrade, October 12th-15th 2022. **M64**

4. **Bošković, J.**; Dobričić, V.; Mihajlović, M.; Kotur-Stevuljević, J.; Čudina, O. Synthesis, evaluation of enzyme inhibition and redox properties of potential dual COX-2 and 5-LOX inhibitors. 8th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, Section: Small molecules as drug candidates. MDPI, published: 01 November 2022. <https://doi.org/10.3390/ECMC2022-13287>. **M34**
5. **Bošković, J.**; Crevar, M.; Čudina, O.; Dobričić, V. Estimation of lipophilicity of newly synthesized potential COX-2 and 5-LOX inhibitors using RP-HPLC analysis. MedChem2023 (XII Meeting of the Paul Ehrlich Euro-PhD Network), Department of Pharmaceutical Chemistry of Aristotle University, Thessaloniki, Greece, July 16th-18th 2023. **M34**
6. **Bošković, J.**; Dobričić, V.; Nedeljković, N.; Nikolić, M.; Vujić, Z.; Čudina, O. Synthesis and investigation of enzyme inhibition of potential dual COX-2 and 5-LOX inhibitors. in EFMC-ASMC, IX EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, September 3 - 7. 2023, Zagreb, Croatia **M34**
7. **Bošković, J.**; Dobričić, V.; Čudina, O. Estimation of passive gastrointestinal absorption of selected dual COX-2 and 5-LOX inhibitors using biopartitioning micellar chromatography, in Proceedings of the 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1-30 November 2023, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/ECMC2023-15600 **M34**
8. Savić, J.; **Bošković, J.**; Čudina, O.; Dobričić, V. Estimation of human serum albumin binding of N-hydroxyurea derivatives of flurbiprofen and diclofenac using a high-performance liquid chromatography method. MedChem 2024 (XIII Meeting Paul Ehrlich Euro-PhD Network), Department of Chemistry and Technology for Drugs – Sapienza University of Rome, June 17 - 19 2024. **M34**

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Jelena Bošković  
Broj indeksa 9/2017

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Dizajniranje, sinteza i ispitivanje bioloških osobina dualnih inhibitora

ciklooksigenaze-2 (COX-2) i 5-lipoksigenaze (5-LOX)

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 5.7.2024.



Jelena Bošković

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelena Bošković

Broj indeksa 9/2017

Studijski program Doktorske akademske studije - farmaceutska hemija

Naslov rada Dizajniranje, sinteza i ispitivanje bioloških osobina dualnih inhibitora ciklooksigenaze-2 (COX-2) i 5-lipoksigenaze (5-LOX)

Mentori Dr sc. Olivera Čudina, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet  
Dr sc. Vladimir Dobričić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 5. 7. 2024.

Podpis autora  
Jelena Bošković

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dizajniranje, sinteza i ispitivanje bioloških osobina dualnih inhibitora

ciklooksigenaze-2 (COX-2) i 5-lipoksigenaze (5-LOX)

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

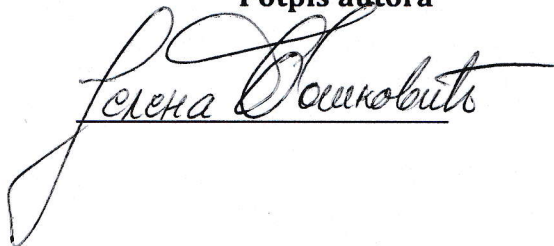
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, 5. 7. 2024.

Potpis autora

  
Jelena Đurković

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo - nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.