



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Никола В. Недељковић

**РАЗВОЈ НОВИХ ТИОУРЕИДНИХ
ДЕРИВАТА НАПРОКСЕНА: СИНТЕЗА,
ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКА И БИОЛОШКА
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Nikola V. Nedeljkovic

**DEVELOPMENT OF NEW THIOUREA
DERIVATIVES OF NAPROXEN:
SYNTHESIS,
PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL
CHARACTERIZATION**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Никола В. Недељковић
Датум и место рођења: 27.02.1995. године, Крагујевац
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Фармацеутска хемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација
Број страница: 127
Број слика: 33 слика, 20 табела и 3 схеме
Број библиографских података: 261
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду
Научна област (УДК): Медицина
Коментори: проф. др Милош В. Николић , ванредни професор за ужу научну област Фармацеутска хемија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу проф. др Владимир Д. Добричић , ванредни професор за ужу научну област Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа Фармацеутског факултета Универзитета у Београду
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 10.11.2021. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-273/10 12.04.2022. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Владимир Јаковљевић , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник 2. Доц. др Марина Мијајловић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан 3. Проф. др Зорица Вујић , редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Владимир Јаковљевић , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник 2. Проф. др Зорица Вујић , редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан 3. Проф. др Јована Брадић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан
Датум одбране дисертације:

Identification page of doctoral dissertation

Author
Name and surname: Nikola V. Nedeljkovic
Date and place of birth: February 27th, 1995, Kragujevac
Current employment: Teaching assistant of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Development of new thiourea derivatives of naproxen: synthesis, physico-chemical and biological characterization
No. of pages: 127
No. of images: 33 figures, 20 tables and 3 schemes
No. of bibliographic data: 261
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Faculty of Pharmacy, University of Belgrade
Scientific area (UDK): Medicine
Co-mentors: Assoc. Prof. Milos V. Nikolic , Associate Professor of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Assoc. Prof. Vladimir D. Dobricic , Associate Professor of Pharmaceutical-medical chemistry and structural analysis at the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: November 10th, 2021
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-273/10, April 12th, 2022
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Prof. Vladimir Jakovljevic , Full Professor of Physiology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Head 2. Asst. Prof. Marina Mijajlovic , Assistant Professor of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Member 3. Prof. Zorica Vujic , Full Professor of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Member
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:: 1. Prof. Vladimir Jakovljevic , Full Professor of Physiology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Head 2. Prof. Zorica Vujic , Full Professor of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Member 3. Assoc. Prof. Jovana Bradic , Associate Professor of Pharmaceutical Technology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Member
Date of Dissertation Defense:

Велико хвала,

Родитељима, брату, супрузи и Јакову на пруженој љубави, подршци и стрпљењу.

Менторима, проф. др Милошу Николићу и проф. др Владимиру Добричићу на посвећеном времену, разумевању, стрпљењу, увек несебичној подршци и помоћи, као и на уживању у овом заједничком научном путовању.

Колегама из Центра за претклиничка и функционална истраживања, колегама са Катедре за Биохемију и Катедре за Фармацеутску хемију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као и колегама са Катедре за Фармацеутску хемију Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за реализацију експерименталног дела докторске дисертације.

Члановима комисије проф. др Владимиру Јаковљевићу, проф. др Зорици Вујић и проф. др Јовани Брадић на саветима и предлозима којима су допринели квалитету ове докторске дисертације.

Свим мојим пријатељима, колегама и професорима са Катедре за Фармацеутску хемију на бодрењу, помоћи и разумевању.

Ваши Никола

Апстракт

Увод: Функционализацијом карбоксилне групе напроксена у тиоуреидну групу применом стерно волуминозних и липофилних ароматичних амина и естара ароматичних аминокиселина могу се синтетисати нови молекули који потенцијално имају исту или снажнију антиинфламацијску и цитотоксичну активност у односу на полазни напроксен.

Материјал и методе: Реакцијом напроксена, калијум-тиоцијаната и једињења са аминок групом синтетисани су одговарајући тиоуреидни деривати напроксена. Структурна анализа је извршена одређивањем температуре топљења и спектроскопским методама. Липофилност је испитана применом *shake-flask* методе, реверзно-фазне хроматографије на танком слоју (RP-TLC) и реверзно-фазне високоефикасне течне хроматографије (RP-HPLC). Процена гастроинтестиналне апсорпције је спроведена применом ПАМРА теста и биопартиционе мицеларне хроматографије (ВМС). Веза између параметара апсорпције и хемијске структуре испитиваних једињења утврђена је анализом квантитативних односа структуре и пермеабилности (QSPR) и квантитативних односа структуре и ретенције (QSRR). Испитиваним једињењима је процењена антиинфламацијска и цитотоксична активност, као и потенцијал инхибиције COX-2 и 5-LOX ензима.

Резултати: Синтетисано је 14 тиоуреидних деривата напроксена. Међу испитаним једињењима највеће вредности RP-TLC и RP-HPLC хроматографских параметара поседују деривати **6** и **7**. Само је дериват **7** показао већи степен пасивне гастроинтестиналне апсорпције у односу на напроксен. Једињења **2**, **4** и **7** показала су најснажнији антиинфламацијски потенцијал. Сва синтетисана једињења поседују слабију COX-2 инхибиторну активност у односу на напроксен, док је значајна инхибиција 5-LOX ензима забележена за једињења **1-5**. Најизраженији цитотоксични ефекат остварили су деривати **3** и **8** на HeLa туморску ћелијску линију.

Кључне речи: Тиоуреидни деривати напроксена, липофилност, пасивна гастроинтестинална апсорпција, хеометријска анализа, антиинфламацијска активност, COX-2 и 5-LOX инхибиција, цитотоксична активност.

Abstract

Introduction: By functionalizing the carboxyl group of naproxen into a thiourea group using sterically voluminous and lipophilic aromatic amines and esters of aromatic amino acids, novel molecules can be synthesized that potentially have the same or stronger anti-inflammatory and cytotoxic activity compared to the parent naproxen.

Material and methods: Corresponding thiourea derivatives of naproxen were synthesized by the reaction of naproxen, potassium thiocyanate and compounds with an amino group. Structural analysis was performed by determining the melting point and spectroscopic methods. Lipophilicity was tested using the *shake-flask*, RP-TLC and RP-HPLC methods. Assessment of gastrointestinal absorption was carried out using the PAMPA and BMC tests. The relationship between the absorption parameters and the chemical structure of the tested compounds was determined by analyzing quantitative structure-permeability ratios (QSPR) and quantitative structure-retention ratios (QSRR). Anti-inflammatory and cytotoxic activity, as well as the inhibition potential of COX-2 and 5-LOX enzymes, were evaluated with the investigated compounds.

Results: Fourteen thiourea derivatives of naproxen were synthesized. Among the tested compounds, derivatives **6** and **7** have the highest values of RP-TLC and RP-HPLC chromatographic parameters. Only derivative **7** showed a higher degree of passive gastrointestinal absorption compared to naproxen. Compounds **2**, **4**, and **7** showed the strongest anti-inflammatory potential. All synthesized compounds have weaker COX-2 inhibitory activity compared to naproxen, while significant inhibition of 5-LOX enzyme was observed for compounds **1-5**. Derivatives **3** and **8** had the most pronounced cytotoxic effect on the HeLa tumor cell line.

Keywords: Thiourea derivatives of naproxen, lipophilicity, passive gastrointestinal absorption, chemometric analysis, anti-inflammatory activity, COX-2 and 5-LOX inhibition, cytotoxic activity.

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. Нестероидни антиинфламацијски лекови (НСАИЛ).....	2
1.1.1. Класификација НСАИЛ.....	2
1.1.2. Терапијска примена НСАИЛ.....	4
1.1.3. Механизам дејства НСАИЛ.....	5
1.1.4. Нежељена дејства НСАИЛ.....	6
1.2. Напроксен.....	8
1.2.1. Историјат примене напроксена.....	8
1.2.2. Фармакодинамика и фармакокинетика напроксена.....	8
1.2.3. Метаболизам напроксена.....	9
1.2.4. Нежељена дејства напроксена.....	9
1.2.5. Деривати напроксена са фармаколошком активношћу.....	10
1.3. Тиоуреидни деривати као фармаколошки активна једињења.....	13
1.4. Ензими циклооксигеназе и липоксигеназе.....	16
1.4.1. Биолошка улога и типови циклооксигеназа.....	16
1.4.2. Протеинска структура ензима циклооксигеназа.....	17
1.4.3. Биолошка улога и типови липоксигеназа (LOX).....	19
1.4.4. Протеинска структура ензима 5-LOX.....	20
1.5. Инфламација и тумор.....	21
1.5.1. Улога инфламације у процесу туморигенезе.....	21
1.6. Значај дуалне COX/LOX инхибиције.....	23
1.7. Испитивање физичко-хемијских и фармакокинетичких особина фармаколошки активних једињења.....	25
1.7.1. Партициони коефицијент и одређивање $\log P$ вредности.....	25
1.7.2. Процена гастроинтестиналне апсорпције.....	27
1.7.2.1. Испитивање пермеабилности применом теста пермеабилности на паралелним вештачким мембранама (PAMPA).....	28
1.7.2.2. Испитивање пермеабилности применом биопартиционе мицеларне хроматографије (BMC).....	29
1.8. Формирање, процена квалитета и валидација QSPR и QSRR модела.....	30
1.8.1. Избор молекулског сета података.....	30
1.8.2. Молекулски дескриптори.....	30
1.8.3. Статистичке методе за формирање QSPR и QSRR модела.....	31
1.8.4. Валидација QSPR и QSRR модела.....	32
1.9. Начини испитивања биолошке активности потенцијално фармаколошки активних једињења.....	33
1.9.1. <i>In vivo</i> испитивање антиинфламацијске активности.....	33

1.9.2. <i>In vitro</i> испитивање ензимске инхибиције	34
1.9.3. <i>In vitro</i> испитивање цитотоксичне активности.....	34
1.10. Студије молекулског уклапања (докинга)	35
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	38
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	40
3.1. Синтеза и структурна карактеризација тиюреидних деривата напроксена	41
3.2. Испитивање липофилности новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена	43
3.2.1. <i>In silico</i> предвиђање липофилности.....	43
3.2.2. Одређивање партиционог коефицијента у систему n-октанол/вода применом <i>shake-flask</i> методе	44
3.2.2.1. Одређивање партиционог коефицијента напроксена	44
3.2.2.2. Одређивање партиционог коефицијента испитиваних једињења	45
3.2.3. Испитивање липофилности применом RP-TLC методе	46
3.2.4. Испитивање липофилности применом RP-HPLC методе	47
3.3. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена	48
3.3.1. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције применом PAMPA теста	48
3.3.1.1. Припрема раствора.....	48
3.3.1.2. Извођење PAMPA теста (први PAMPA модел).....	48
3.3.1.3. Извођење PAMPA теста (други PAMPA модел)	49
3.3.1.4. HPLC-DAD метода одређивања концентрације испитиваних једињења.	49
3.3.1.5. HPLC-MS/MS метода одређивања концентрације испитиваних једињења	49
3.3.1.6. Израчунавање PAMPA параметара.....	49
3.3.2. Избор дескриптора и QSPR анализа.....	51
3.3.2.1. Израчунавање дескриптора применом <i>alvaDesc</i> софтвера, избор дескриптора и прављење QSPR модела применом <i>alvaModel</i> софтвера	51
3.3.2.2. Избор дескриптора и прављење QSPR модела применом софтвера <i>STATISTICA</i>	52
3.3.2.3. Процена поузданости формираних QSPR модела.....	52
3.3.3. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције применом BMC теста	53
3.3.3.1. Припрема раствора.....	53
3.3.3.2. Извођење BMC теста.....	53
3.3.4. QSRR анализа, одабир дескриптора и формирање QSRR модела.....	54
3.4. <i>In vivo</i> испитивање акутне токсичности и антиинфламацијске активности новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена на <i>Wistar Albino</i> пацовима	54
3.4.1. Испитивање акутне оралне токсичности	54
3.4.2. <i>In vivo</i> испитивање антиинфламацијске активности.....	55

3.5. Испитивање COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности.....	56
3.6. Студија молекулског докинга	56
3.7. Испитивање цитотоксичне активности.....	57
3.7.1. Варијабле истраживања	57
3.7.2. МТТ тест	57
3.7.3. Одређивање релативног односа ћелија које се налазе у апоптози и некрози	58
3.7.4. Анализа ћелијског циклуса	59
3.7.5. Анализа протеина апоптозе.....	59
4. РЕЗУЛТАТИ.....	61
4.1. Синтеза и структурна карактеризација тиоуреидних деривата напроксена	62
4.2. Испитивање липофилности новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена	67
4.2.1. <i>In silico</i> предвиђање липофилности.....	67
4.2.2. Одређивање партиционог коефицијента у систему <i>n</i> -октанол/вода применом <i>shake-flask</i> методе	67
4.2.3. Испитивање липофилности применом RP-TLC методе	69
4.2.4. Испитивање липофилности применом RP-HPLC методе	71
4.3. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена	74
4.3.1. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције применом PAMPA теста	74
4.3.2. Статистичка анализа QSPR модела	76
4.3.3. Ретенционо понашање испитиваних једињења у ВМС систему	78
4.3.4. Статистичка анализа QSRR модела.....	78
4.4. <i>In vivo</i> испитивање акутне токсичности и антиинфламацијске активности на <i>Wistar Albino</i> пацовима.....	78
4.4.1. Испитивање акутне оралне токсичности	78
4.4.2. <i>In vivo</i> испитивање антиинфламацијске активности.....	80
4.5. Испитивање COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности.....	85
4.6. Студија молекулског докинга	85
4.7. Испитивање цитотоксичне активности.....	91
4.7.1. Цитотоксични ефекат тиоуреидних деривата напроксена на ћелије карцинома дојке MDA-MB-231	92
4.7.2. Цитотоксични ефекат тиоуреидних деривата напроксена на ћелије карцинома грлића материце HeLa.....	92
4.7.3. Цитотоксични ефекат тиоуреидних деривата напроксена на ћелије колоректалног карцинома HCT 116	93
4.7.4. Антипролиферативни ефекат тиоуреидних деривата напроксена на малигно неизмењене ћелије фибробласта MRC-5.....	93

4.7.5. Ефекат тиоуреидних деривата напроксена на процес апоптозе ћелија карцинома грлића материце HeLa	94
4.7.6. Ефекат тиоуреидних деривата напроксена на ћелијски циклус HeLa ћелија	95
4.7.7. Механизам активације процеса програмиране ћелијске смрти	97
5. ДИСКУСИЈА	99
6. ЗАКЉУЧАК	109
7. ЛИТЕРАТУРА	113
8. ПРИЛОЗИ	128
Прилог 1	129
Прилог 2	130
БИОГРАФИЈА	131
БИБЛИОГРАФИЈА	133

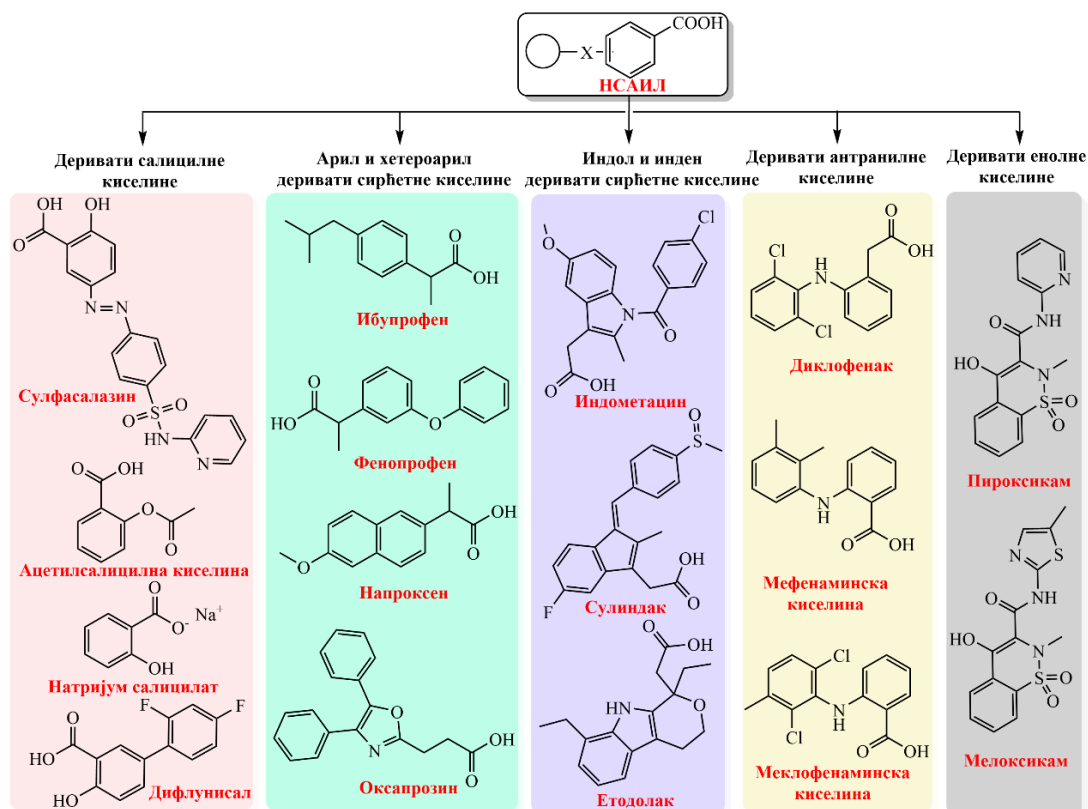
1. УВОД

1.1. Нестероидни антиинфламацијски лекови (НСАИЛ)

НСАИЛ су међу најчешће прописиваним лековима намањеним за терапију бола и инфламације. Код популације старије од 65 година преваленца употребе НСАИЛ је скоро 96%. Поред антиинфламацијског ефекта, ови лекови показују атипиретичка и аналгетичка својства. Своје дејство првенствено остварују инхибицијом ензима циклооксигеназе (енгл. *Cyclooxygenase* - COX) који су одговорни за синтезу простагландина и осталих простаноида (1).

1.1.1. Класификација НСАИЛ

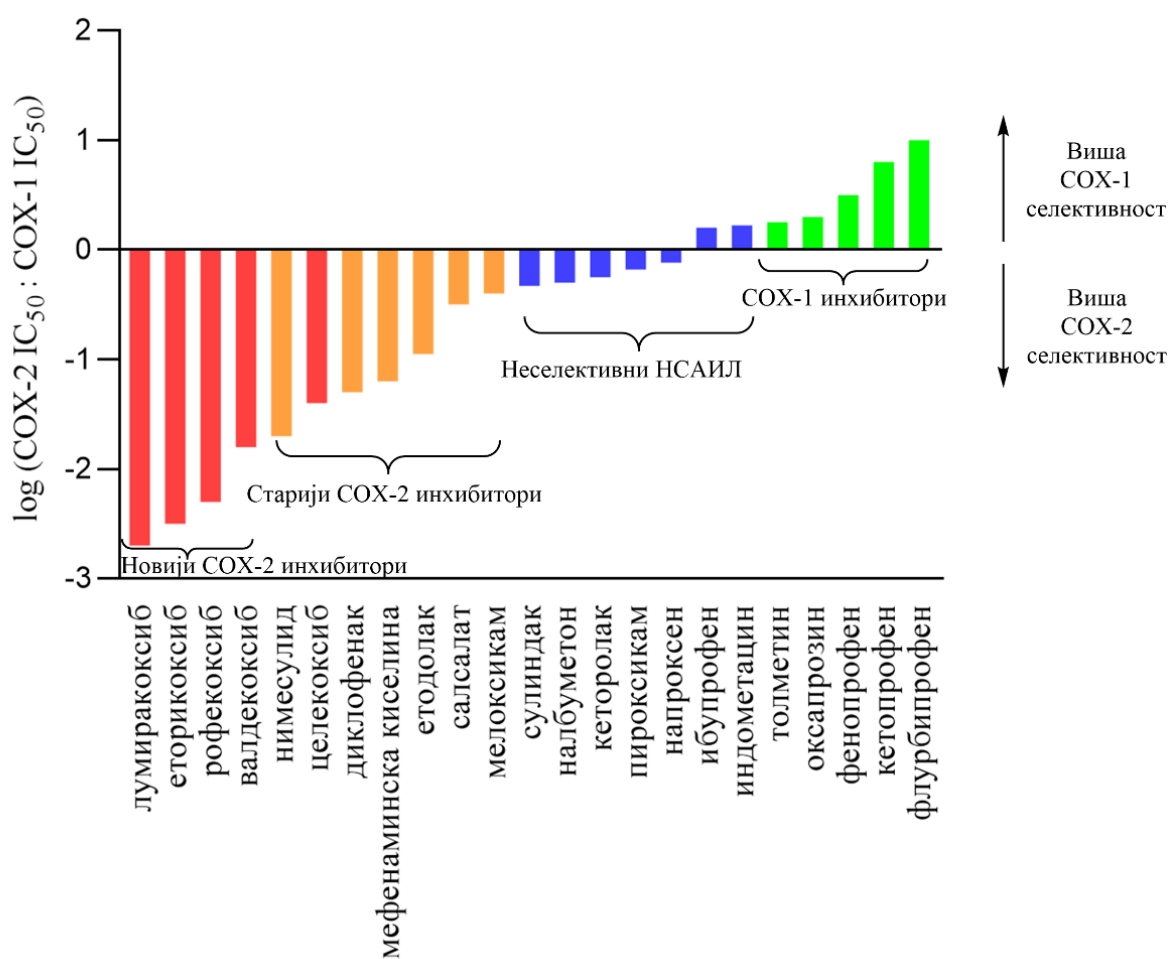
НСАИЛ се најчешће класификују на основу хемијских карактеристика на деривате салицилне киселине, арил и хетероарил деривате сирћетне киселине, оксикаме (деривате енолне киселине), деривате антранилне киселине и деривате пропионске киселине (Слика 1). Општа структура типичног НСАИЛ сачињена је од киселе функционалне групе (карбоксилне киселине, еноли) везане за планарну ароматичну функционалну групу. Салицилати су први идентификовани лекови ове групе изоловани из екстракта коре врбе (*Salix alba*, *Salicaceae*). Терапијска ефикасност салицилне киселине побољшана је естерификацијом фенолне групе (ацетилсалицилна киселина) или супституцијом хидрофобне групе на положају С5 (дифлунисал). Важну класу НСАИЛ чине арил и хетероарил деривати сирћетне киселине. Ту спадају ибупрофен, фенопрофен, напроксен и оксапрозин. Најчешће коришћен дериват антранилне киселине – диклофенак, налази се у различитим формулацијама као што су таблете, масти и спрејеви против болова. Пироксикам и мелоксикам чине групу оксикама коју карактерише присуство 4-хидроксибензотиазинског хетероцикла (2).



Слика 1. Класификација нестероидних антиинфламацијских лекова на основу хемијске структуре

Метаболизам арахидонске киселине до проинфламацијских простаноида (простагландина и простаглицлина) омогућен је активношћу COX ензима, који се још називају и простагландин ендопероксид-Н синтазе (енгл. *Prostaglandin endoperoxide-H synthase* - PGHS). Готово сви наведени НСАИЛ инхибирају обе изоформе COX ензима у терапијским дозама. Претпоставља се да су нежељени ефекти, као што је гастроинтестинална токсичност, повезани са инхибицијом COX-1, док је инхибиција COX-2 одговорна за терапијски ефекат, при чему је често потребан висок ниво инхибиције синтезе простагландина да би се остварио терапијски ефекат (3). Међутим, већина НСАИЛ се користи у дозама које остварују нешто више од 50% инхибиције синтезе простагландина. Тако, на пример, доза лека која би остварила инхибицију 80% активности COX-2 би у исто време инхибирала 70% активности COX-1 што би узроковало изразиту гастроинтестиналну токсичност. Самим тим, ефикасност неког НСАИЛ варира зависно од његове дозе, концентрације у крви, као и од полувремена елиминације. На основу способности да остваре инхибицију одређене изоформе COX ензима, НСАИЛ се могу поделити на:

- неселективне потпуне инхибиторе COX-1 и COX-2,
- потпуне инхибиторе COX-1 и COX-2,
- снажне инхибиторе COX-2 и
- слабе инхибиторе COX-1 и COX-2 (Слика 2) (4).



Слика 2. Категоризација не-аспиринских НСАИЛ на основу селективности према циклооксигеназама (5)

У зависности од начина интеракције са циљним ензимом, НСАИЛ се могу поделити на:

- слободно реверзибилне инхибиторе (ибупрофен),
- споро реверзибилне инхибиторе (индометацин, диклофенак, целекоксиб) и
- ирреверзибилне инхибиторе (ацетилсалицилна киселина) (6).

Још један начин класификације НСАИЛ је на основу дужине дејства. Према том критеријуму се могу поделити на:

- краткоделујуће (полувреме елиминације мање од 6 сати) – ацетилсалицилна киселина, диклофенак и ибупрофен и
- дугоделујуће (полувреме елиминације дуже од 10 сати) – напроксен и целекоксиб.

НСАИЛ са кратким полувременом елиминације имају брз почетак деловања и погодни су за лечење акутног бола, док су они са дужим полуживотом ефикаснији у терапији хроничних стања (7).

1.1.2. Терапијска примена НСАИЛ

Након открића механизма дејства ацетилсалицилне киселине, за шта је Џон Вејн 1982. године добио Нобелову награду, омогућен је даљи развој нових антиинфламацијских лекова. Због свог аналгетичког, антипиретичког и антиинфламацијског дејства НСАИЛ се углавном користе у терапији бола, повишене телесне температуре, запаљења, остеоартритиса и реуматских поремећаја (8,9). С обзиром на то да ови лекови имају вишеструке корисне ефекте, све чешће се њихова примена проширује на поједина озбиљна здравствена стања. Употреба ацетилсалицилне киселине као кардиопротективног агенса за превенцију настанка атеросклерозе сматра се најстаријим примером употребе НСАИЛ код кардиоваскуларних болести. С обзиром на то да ови лекови остварују своје дејство инхибицијом синтезе простагландина, све је јаснији њихов значај као нових лекова против канцера (10). Њихов хемопревентивни и хемотерапијски ефекат објашњава се тиме да осим инхибиције СОХ ензима могу индуковати апоптозу туморских ћелија, нисходну регулацију рецептора епидермалног фактора раста, успоравање неоангиогенезе и заштиту ДНК (дезоксирибонуклеинске киселине) од даљег оштећења (11). На превентивну и терапијску способност НСАИЛ указују студије у којима је показано да ови лекови редукују ризик од развоја карцинома, као и то да изазивају регресију туморске масе. Самим тим што је инфламацијско микроокружење погодно за преживљавање и пролиферацију малигнућ ћелија, НСАИЛ представљају део основне стратегије лечења зато што исцрпљују инфламацијско окружење и тиме уништавају туморске ћелије (12). Неколико студија је несумњиво показало ефикасност примене НСАИЛ самостално или у комбинацији са хемиотерапијом захваљујући њиховом вишеструком дејству које обухвата спречавање пролиферације туморских ћелија, спречавање ангиогенезе туморског ткива, као и индукцију апоптозе (13). НСАИЛ спречавају агрегацију тромбоцита и њихово приањање на туморске ћелије што помаже у инвазији малигнућ ћелија и олакшава развој метастазе. Поједини лекови из ове групе, као што су напроксен, сулиндак и ацетилсалицилна киселина, супримирају одређене епигенетске процесе повезане са малигнитетима, као и експресију микроРНК (14).

Иако селективна инхибиција СОХ-2 представља потенцијалну стратегију за превенцију аденоматозних полипа, кардиоваскуларни ризици повезани са дуготрајном употребом коксиба онемогућили су њихову ширу употребу. Повећање

кардиоваскуларног ризика 2-3 пута код пацијената који су користили рофекоксиб, узроковало је превремени прекид студије и повлачење лека са тржишта. Иако је висок кардиоваскуларни ризик потиснуо хемопреентивну ефикасност COX-2 селективних инхибитора, овај ензим је остао потенцијална мета за дејство антинеопластика. Са друге стране, ацетилсалицилна киселина се показала као поприлично безбедан лек који неселективном инхибицијом COX ензима спречава агрегацију тромбоцита и приањање на туморске ћелије (14,15).

Претпоставља се да је индукција COX-2 повезана са појавом епилептичних напада, па су самим тим инхибитори COX-2 ензима предложени као потенцијална терапија за неуроинфламацију која се јавља током епилепсије (16). Примена мефенаминске киселине повезана је са неуропротекцијом и превенцијом когнитивних поремећаја спречавањем активације инфлазома зависне од амилоида β и неуроинфламације, што би могло да укаже на корисне ефекте НСАИЛ против Алцхајмерове болести (17). Поред тога, постоје докази да индометацин има корисне ефекте код пацијената оболелих од COVID-19 због способности да спречава синтезу РНК (рибонуклеинске киселине) коронавируса (18).

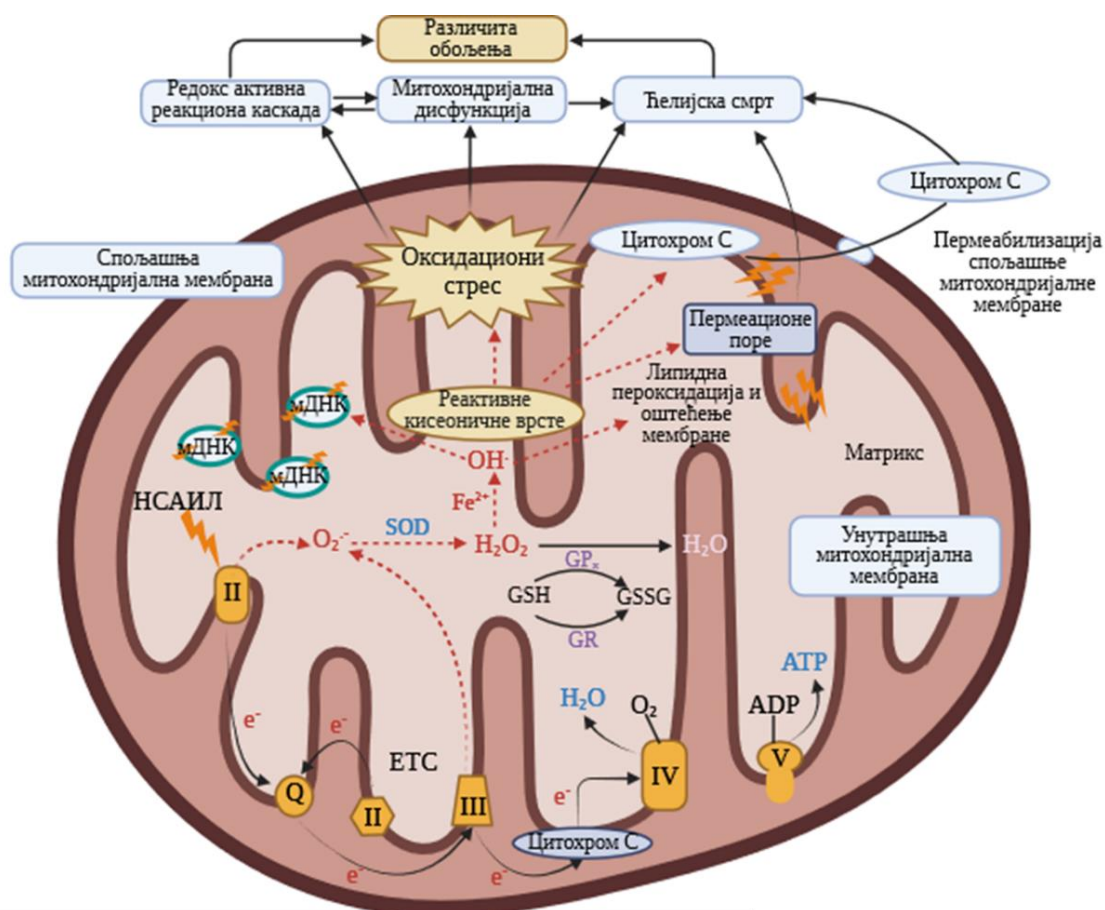
1.1.3. Механизам дејства НСАИЛ

Постоји неколико теорија којима се објашњава дејство НСАИЛ, а обично се класификују на основу субћелијских циљних места дејства лека. COX-зависни и COX-независни пут су два најчешће коришћена механизма којима се описује начин деловања НСАИЛ. COX-зависни пут односи се на механизам којим ови лекови утичу на продукцију простагландина и тиме регулишу процес упале ткива. Други начин деловања заснован је на токсичном дејству лека на ћелије ометањем нормалних биоенергетских процеса који се одвијају у митохондријама (4).

Иако су се НСАИЛ користили вековима уназад, 1971. година била је кључна за описивање механизма њиховог деловања када је идентификован ензим COX-1 (19). Тада је утврђено да ови лекови инхибирајући наведени ензим, заправо, смањују продукцију простагландина (19,20). Двадесетак година касније је ово откриће употпуњено идентификацијом друге изоформе овог ензима (COX-2). Поред две наведене изоформе, описана је и трећа (COX-3) која је доминантно заступљена у мозданом ткиву и која показује значајну осетљивост на дејство ацетаминофена (парацетамола) (21). Ипак, два главна ензима преко којих НСАИЛ остварују своје деловање су COX-1 и COX-2. Обе изоформе су доминантно заступљене у ендоплазматичном ретикулуму и бифункционалне су у каталитичкој активности зато што имају функцију циклооксигеназе и пероксидазе. НСАИЛ своје дејство остварују тако што ометају приступ арахидонској киселини активном месту циклооксигеназе (22).

Као што је претходно наведено, НСАИЛ показују и одређен степен цитотоксичности. Овакво дејство остварују активацијом митохондријалног оксидационог стреса, цитопатолошког стања које се карактерише значајним оштећењем митохондрија услед активације ланчаних реакција којима се стварају штетни редокс производи. Главно место дејства НСАИЛ на овом нивоу је комплекс митохондријалног транспортног ланца електрона I, што доводи до губитка електрона из респираторног ланца (23). Отпуштени електрони врше редукцију молекулског кисеоника, при чему настаје супероксидни анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) који не може проћи кроз мембрану (24). Међутим, он се одмах претвара у водоник-пероксид (H_2O_2) посредством митохондријалне супероксид дисмутазе (енгл. *Superoxide Dismutase* - SOD). Настали водоник-пероксид може да прође кроз мембрану, излази из митохондрија и изазива оксидационо оштећење макромолекула (ДНК, протеина, липида, угљених хидрата) чиме

их чини функционално неактивним. Сви наведени догађаји ометају нормалну ћелијску хомеостазу и доводе до активације унутрашњег пута апоптозе. Наиме, оштећени протеини митохондријалне мембране ослобађају цитохром-С који формира апоптозомски комплекс неопходан за активацију каспаза, што узрокује оштећење ДНК и смрт ћелије. Током наведеног процеса, оштећена митохондријална ДНК се може ослободити из некротичних ћелија због чега долази до привлачења ћелија имунолошког система које су одговорне за фагоцитно чишћење (Слика 3) (25).



Слика 3. Механизам настанка митохондријалних реактивних кисеоничних врста изазван применом НСАИЛ

1.1.4. Нежељена дејства НСАИЛ

Приликом хроничне примене лекова из групе НСАИЛ најчешће се развија оштећење слузнице желуца, што представља највеће ограничење њихове употребе. Гастроинтестиналне компликације јављају се код око 30% пацијената, док се пептички улкус повезан са употребом НСАИЛ испољава код готово 15% пацијената на терапији неким леком из ове групе. Са друге стране, чир на дванаестопалачном цреву јавља се са значајно већом инциденцом (65%) (26). Доза примењеног лека и дужина његове примене су главни параметри који утичу на тежину испољених компликација. У почетку се сматрало да традиционално коришћени НСАИЛ инхибирају синтезу гастропротективних простагландина (E_2 и I_2) и тако доводе до оштећења слузнице желуца, што је поспешило даљи развој селективних COX-2 инхибитора (27). Главна хипотеза заснивала се на томе да НСАИЛ селективни за COX-2 смањују инфламацију и бол, а да притом не ометају активност COX-1 и синтезу протективних простагландина.

Ипак, временом се дошло до доказа да СОХ-2, такође, има веома важну улогу у синтези простагландина који спречавају запаљење слузнице и омогућавају зарастање чирева (4).

Све већи број истраживања показује значајну повезаност између појаве нежељених кардиоваскуларних ефеката и примене НСАИЛ. Иако се ацетилсалицилна киселина традиционално користи за превенцију инфаркта миокарда и možданог удара, овај лек не осликава јасну везу између примене НСАИЛ и нежељених кардиоваскуларних догађаја. Без обзира на то што су селективни СОХ-2 инхибитори дизајнирани са циљем спречавања појаве нежељених ефеката на нивоу гастроинтестиналне слузнице, које су изазивали неселективни СОХ инхибитори, временом је њихова примена јасно повезана са појавом кардиоваскуларних обољења (28). Из наведеног разлога је рофекоксиб, као селективни СОХ-2 инхибитор, повучен са тржишта 2004. године. Студије су показале да је дуготрајна примена рофекоксиба у корелацији са двоструко већим ризиком од појаве срчаног или možданог удара (29,30). Са друге стране, примена целекоксиба не представља већи ризик за појаву кардиоваскуларних поремећаја у односу на напроксен и ибупрофен (31).

Поред гастроинтестиналних и кардиоваскуларних нежељених ефеката, примена НСАИЛ са собом носи ризик и од оштећења бубрега, које обухвата многобројне нефролошке компликације као што су акутно оштећење бубрега и хронична бубрежна инсуфицијенција (32). Главне карактеристике ових обољења су поремећај равнотеже електролита, гломерулонефритис, бубрежна некроза, хипертензија, ренална ацидоза, хипонатремија и хиперкалемија. Након аминокликозида, НСАИЛ су најчешћи узрочници нефротоксичности и акутне бубрежне инсуфицијенције изазване лековима (33). Процењује се да је више од 15% случајева акутне бубрежне инсуфицијенције повезано са прекомерном применом НСАИЛ. Оно што представља посебан проблем јесте то да је наведени ризик исти чак и када се ови лекови користе у терапијским дозама (34). Претпоставља се да инхибиција синтезе простагландина има кључну улогу у развоју нефротоксичности. СОХ-1 је конститутивно експримирана у сабирним каналићима и Боумановој капсули бубрега. Насупрот томе, медуларне интерстицијалне ћелије бубрежних папила и епителне ћелије Хенлеове петље експримирају СОХ-2. СОХ-1 контролише брзину гломеруларне филтрације, док је СОХ-2 одговорна за ретенцију воде и натријума (34). Инхибиција СОХ ензима спречава производњу простагландина, међу којима су најбитнији простагландин Е₂ (тубуларни) и простагландин I₂ (васкуларни) (4). Простагландини својим вазодилатацијским ефектом контролишу гломеруларну филтрацију и одржавају бубрежни проток крви што је посебно важно у стањима која су праћена дефицитом течности (32,33). Уколико дође до инхибиције производње простагландина угрожена је нормална гломеруларна филтрација, што може довести до исхемијског оштећења и акутне тубуларне некрозе (34).

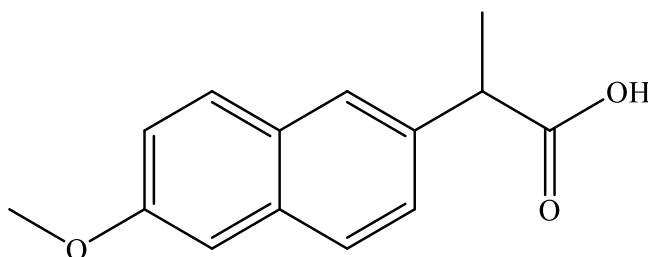
Хепатотоксичност представља још једну озбиљну компликацију која је повезана са употребом НСАИЛ. Ипак, инциденца појаве оштећења јетре изазване овим лековима је много нижа у односу на претходно описане. Многи лекови из групе НСАИЛ су повучени са тржишта због изразите хепатотоксичности, као што су бромфенак (повучен 1999. године) и лумиракоксиб (повучен 2008. године) (35,36). Хепатотоксичност НСАИЛ углавном се испољава код генетски предиспонираних особа. Иако су сулиндак и диклофенак најчешће повезани са хепатотоксичношћу, практично сви НСАИЛ који су у клиничкој примени могу, бар у ретким случајевима, да изазову оштећење јетре (4,35,36). Јасно је да селективни СОХ-2 инхибитори ређе изазивају хепатотоксичност у односу на неселективне НСАИЛ (37). Значајно је нагласити да НСАИЛ могу довести до два главна клиничка облика хепатотоксичности. Први је акутни хепатитис, који се карактерише појавом жутице, мучнине и грознице, док је други хронични хепатитис, који се карактерише хистопатолошким и серолошким поремећајима. Уколико се код

пацијента развила хепатотоксичност на један НСАИЛ, врло често се иста реакција јавља и уколико се употреби лек сличне хемијске структуре (4).

Преостала нежељена дејства до којих могу довести НСАИЛ јесу интрацеребрална хеморагија и други облици крварења који настају услед антиагрегационог дејства ових лекова (38). Повећан ризик од појаве инфекција и упала респираторног тракта услед бронхоспазма може бити један од проблема код пацијената на дуготрајној терапији НСАИЛ. Бронхоспазам се развија услед преусмеравања метаболизма арахидонске киселине према липоксигеназном путу и појачаног стварања леукотриена (39).

1.2. Напроксен

Напроксен (2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропионска киселина) је лек из групе НСАИЛ који према хемијској структури представља бициклични дериват пропионске киселине (Слика 4) (40). Један је од најчешће коришћених лекова ове групе у терапији бола, отока и инфламације. Своје дејство остварује неселективном инхибицијом обе изоформе ензима циклооксигеназе (СОХ-1 и СОХ-2) чиме узрокује смањену синтезу простагландина, простациклина и тромбосана (41).



Слика 4. Хемијска структура молекула напроксена

1.2.1. Историјат примене напроксена

Напроксен се у употреби налази од 1976. године на територији Сједињених Америчких Држава, док је данас широм света одобрен као ОТС (енгл. *Over-the-counter*) препарат у форми напроксен-натријума. Максимална дневна доза напроксена креће се у интервалу од 440 до 660 mg подељено у две или три дневне дозе уколико се лек издаје без рецепта. Са друге стране, од лекара прописани лек може се користити три пута дневно у дози од 500 mg (42). Лек је на тржиште увела компанија *Syntex* и то у облику (*S*)-напроксена. Патент за (*S*)-напроксен истекао је у децембру 1993. године, а у том тренутку је био четврти по продаји оптички чистих лекова након еналаприла, каптоприла и ловастатина. Данас је један од ретких НСАИЛ који се користи у оптички чистом облику (43).

1.2.2. Фармакодинамика и фармакокинетика напроксена

Механизам дејства напроксена обухвата инхибицију синтезе простааноида путем инхибиције СОХ ензима (простагландин синтазе). Ензими циклооксигеназе катализују полазни корак у метаболизму ослобођене арахидонске киселине до простагландина. Настали простагландини имају улогу у инфламацији, хемостази, регулацији телесне температуре, ноцицепцији, као и у функцији кардиоваскуларног система (44). Напроксен делује као реверзибилни неселективни инхибитор СОХ-1 и СОХ-2. Новија

истраживања су показала да овај лек остварује пет пута већу селективност инхибиције COX-1 у односу на COX-2 (45). Напроксен представља високо ефикасан аналгетски лек са дугим полувременом елиминације (12-17 сати), а које му омогућава мању вероватноћу флукуације концентрације у крви и већу ефикасност. Максималну концентрацију у плазми овај лек остварује након 2 до 4 сата од апликације (када се користи у облику чистог напроксена), односно, након 1 до 2 сата када се примењује у форми напроксен-натријума (46).

1.2.3. Метаболизам напроксена

Напроксен се у организму метаболише до два главна метаболита: *O*-десметилнапроксена и напроксен-глукуронида (47). У највећој мери се метаболише у јетри где подлеже првој и другој фази метаболизма. Први корак обухвата реакције деметилације посредоване ензимима цитохрома 1A2, 2C8 и 2C9. Настали десметилнапроксен и напроксен подлежу другој фази метаболизма у којој десметилнапроксен може да формира и ацил и фенол глукурониде. Напроксен се у овој фази метаболише само до ацил глукуронида. Такође, десметилнапроксен може даље да се метаболише и реакцијом сулфокоњугације (Схема 1) (48,49).

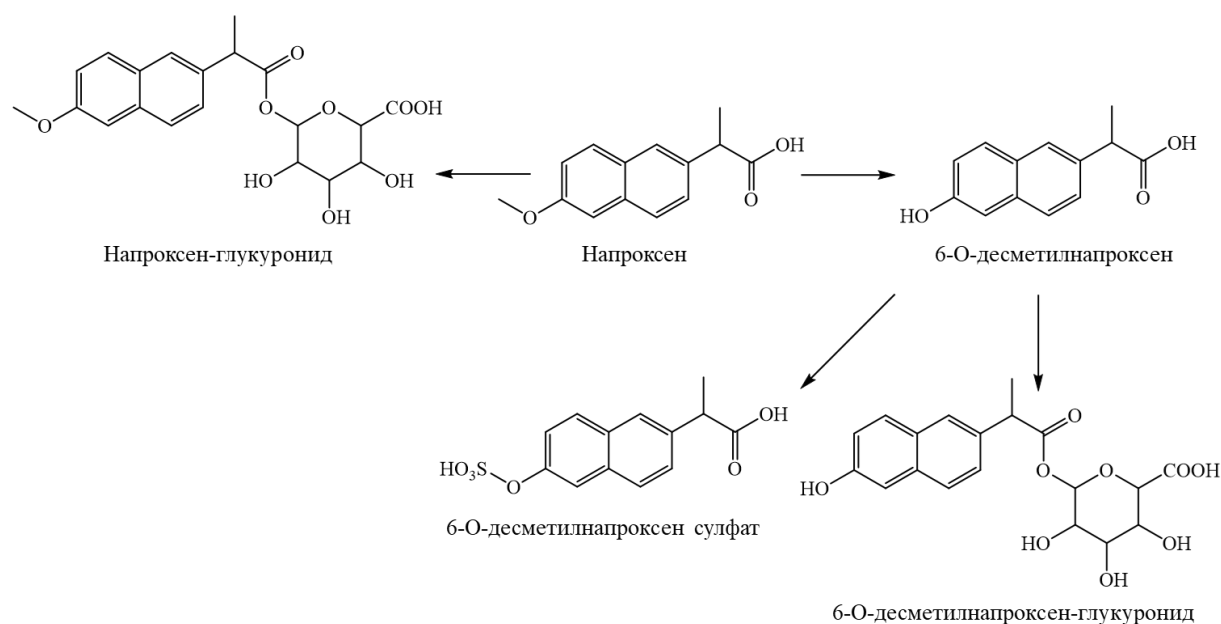


Схема 1. Метаболизам напроксена

Након оралне примене, око 95% напроксена и његових метаболита се елиминише путем урина (мање од 1% у форми напроксена или десметилнапроксена), док се свега 5% лека елиминише путем фецеса (46).

1.2.4. Нежељена дејства напроксена

Гастроинтестинална нежељена дејства изазвана напроксеном узрокована су делимичним недостатком простагландина у гастродуоденалној мукози. Овакве промене слабе функцију епителијалне мембране и омогућавају настанак улцерација узрокованих желудачном киселином. Неселективна инхибиција циклооксигеназе, коју остварује и напроксен, узрокује поремећај функционисања заштитног слоја слузи, инхибицију секреције бикарбоната као заштитног фактора, као и вазоконстрикцију која доводи до

локалне хипоксије ткива. Локална нежељена дејства већ на нивоу гастроинтестиналног тракта настају услед „заробљавања“ лека унутар ћелијске мембране. Хипотеза о селективној СОХ-2 инхибицији као потенцијалном начину да се избегну гастроинтестинална нежељена дејства доведена је у питање *in vivo* студијама које су показале да обе изоформе СОХ ензима морају бити инхибиране да би дошло до настанка улкуса желуца. Самим тим, смањена гастроинтестинална токсичност појединих НСАИЛ није последица само недостатка инхибиције СОХ-1, већ изостанка истовремене инхибиције обе изоформе (50,51). Озбиљна гастроинтестинална нежељена дејства изазвана напроксеном обухватају чир желуца и дванаестопалачног црева, који даље могу узроковати перфорацију и крварење. Овакве последице могу се јавити приликом хроничне, али и акутне примене лека. Дакле, компликације услед снажније инхибиције СОХ-1 укључују не само настанак улцерација, већ и појаву крварења због антиагрегационог дејства овог лека (52). Процењује се да код између 20% и 30% пацијената, који редовно користе неки од НСАИЛ, долази до развоја чира на желуцу и/или дванаестопалачном цреву, а да се диспептички симптоми јављају код 60% ових пацијената (53).

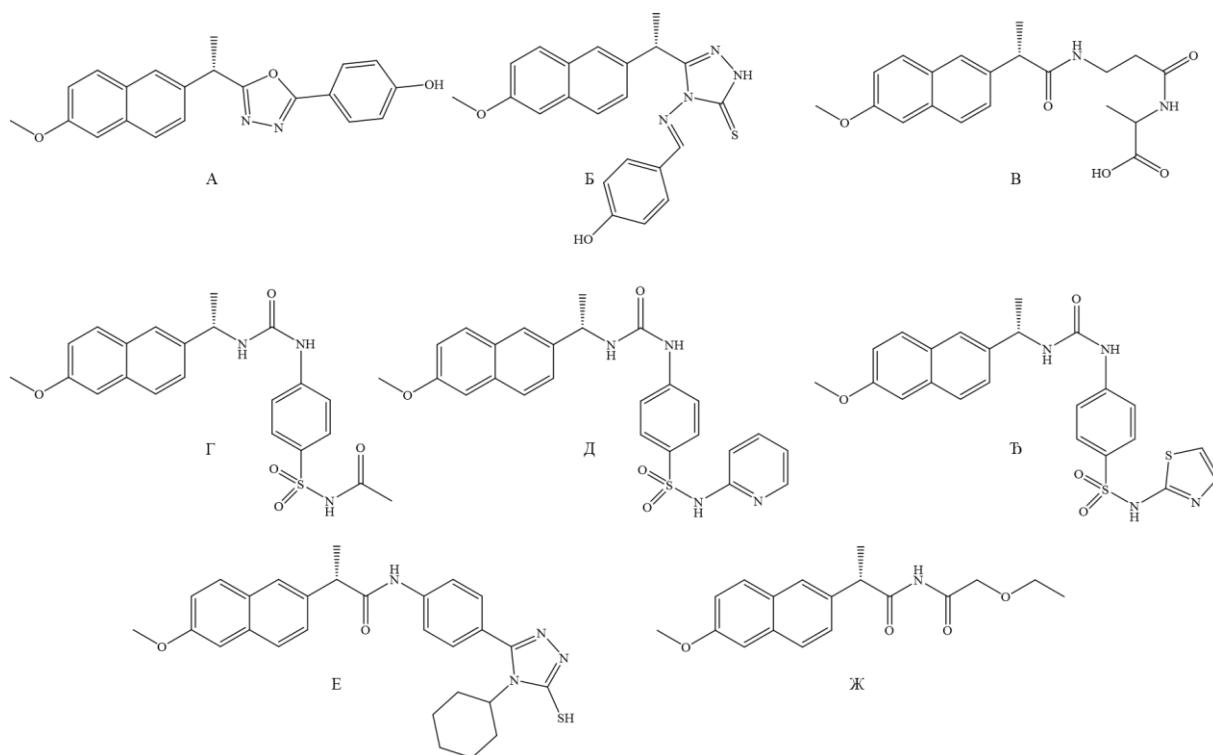
Примена неселективних, као и селективних СОХ-2 инхибитора показује значајну повезаност са већом учесталашћу појаве конгестивне срчане инсуфицијенције и повишеног крвног притиска. Селективна СОХ-2 инхибиција доводи до протромботичног ефекта услед смањеног стварања простаглицина, који делују као вазодилатори, што представља јасан узрок кардиоваскуларних нежељених ефеката. Међутим, неселективна инхибиција изазива истовремено ометање продукције тромбоксана А₂ из тромбоцита, па веза између примене неселективних инхибитора и кардиоваскуларних нежељених ефеката остаје непотпуно објашњена (53). Истраживања којима је испитиван потенцијал напроксена да изазове кардиоваскуларна нежељена дејства показала су да овај лек не поништава антиагрегациони ефекат ацетилсалицилне киселине приликом истовремене примене. Уочено је да примена напроксена није била повезана са већом учесталашћу штетних кардиоваскуларних ефеката, али да има сличне гастроинтестиналне нежељене ефекте као и други неселективни СОХ инхибитори (54,55).

1.2.5. Деривати напроксена са фармаколошком активношћу

Напроксен је један од најчешће коришћених лекова из групе деривата пропионске киселине који се користи у терапији болова, отока зглобова, као и других симптома артритиса. Инхибицијом ензима циклооксигеназе смањује се синтеза простаглицина укључених у одговор организма на поједина стања и болести које изазивају бол и запаљење. Ипак, примена напроксена праћена је појавом озбиљних гастроинтестиналних нежељених ефеката. Претпоставља се да је за њихову појаву одговорно присуство слободне карбоксилне групе. Самим тим би хемијска модификација ове функционалне групе могла бити потенцијално обећавајућа стратегија за превазилажење наведеног проблема. Велики број истраживања у последњој деценији показао је да се дизајн и синтеза деривата напроксена користе у развоју нових вискоефикасних фармацеутских производа за терапију бола (56,57).

Резултати претходно спроведених истраживања су показали да поједини 1,3,4-оксадиазолски (Слика 5а) и 1,2,4-триазолски (Слика 5б) деривати напроксена имају високи антитуморски потенцијал према MCF-7, MDA-231, HeLa и HCT 116 канцерским ћелијским линијама (58). Амидни дериват напроксена са дипептидом β-аланилаланином (Слика 5в) показао је снажнију антиинфламацијску и антитуморску активност у поређењу са напроксеном изазивајући значајну апоптозу ћелија карцинома дојке, као и

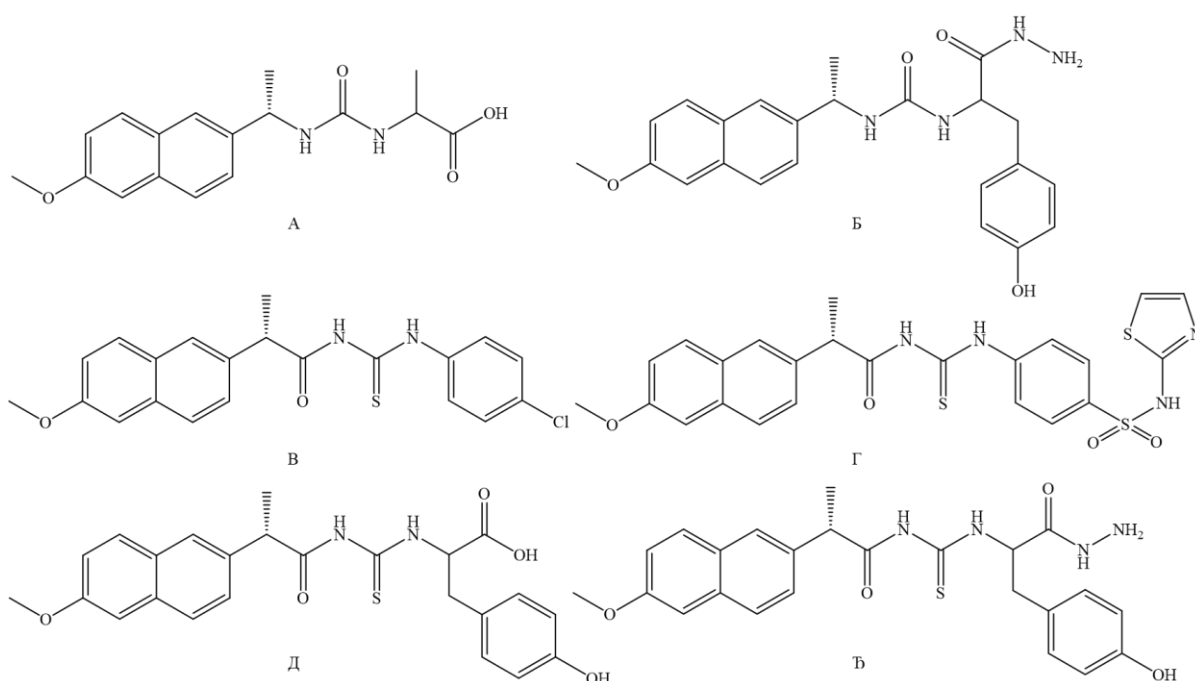
немогућност миграције MDA-MB-231 ћелија, што за последицу има смањење инвазије туморских ћелија и формирања секундарних тумора код пацијенткиња са примарним тумором дојке (59). Новосинтетисани уреидни (Слика 5г-ђ) и пропанамидни (Слика 5е) деривати напроксена остварили су значајну цитотоксичну активност према НСТ 116 ћелијској линији карцинома дебелог црева. Њихова инхибиторна активност кретала се у интервалу од 35,4% до 48,9%, при чему су ове вредности биле упоредиве и више у односу на стандардни лек доксорубин (60). Претпоставља се да поједини деривати напроксена (Слика 5а и 5б) свој анти туморски ефекат остварују посредством сузбијања инфламацијског процеса, односно, идентификовани су као снажни инхибитори ензима СОХ-2 (58). β-аланилаланински дериват напроксена (Слика 5в) изазива апоптозу MDA-MB-231 ћелија посредством активације каспаза 3 и 9. Уочено је да наведено једињење показује снажнију инхибицију миграције канцерских ћелија и ензима СОХ-2 у односу на напроксен, чиме последично снижава ниво PGE₂ (енгл. *Prostaglandin E₂*) и значајно смањује ризик од прогресије карцинома (42). Са друге стране, етоксиацетил-пропанамидни дериват напроксена (Слика 5ж) изазвао је дозно-зависну апоптозу НСТ-116 ћелија хуманог карцинома дебелог црева посредством каспаза 3 и 7. Доказано је да овакав ефекат није завистан од активности ензима циклооксигеназе, јер једињење није остварило значајну инхибицију нити једне изоформе ензима (61).



Слика 5. Хемијске структуре деривата напроксена са значајном цитотоксичном активношћу

Elhenawy и сарадници синтетисали су серију деривата напроксена у циљу процене њихове антиинфламацијске активности. Уочено је да уреидни деривати напроксена са аланином и карбохидразидом фенилаланина поседују снажније антиинфламацијско дејство у поређењу са напроксеном. Наведена једињења су остварила снажнију инхибицију СОХ-2 у односу на напроксен, као и већу биорасположивост, чиме се објашњава и њихов бољи антиинфламацијски ефекат. Такође, сва испитивана једињења су показала безначајан улцерогени потенцијал што их

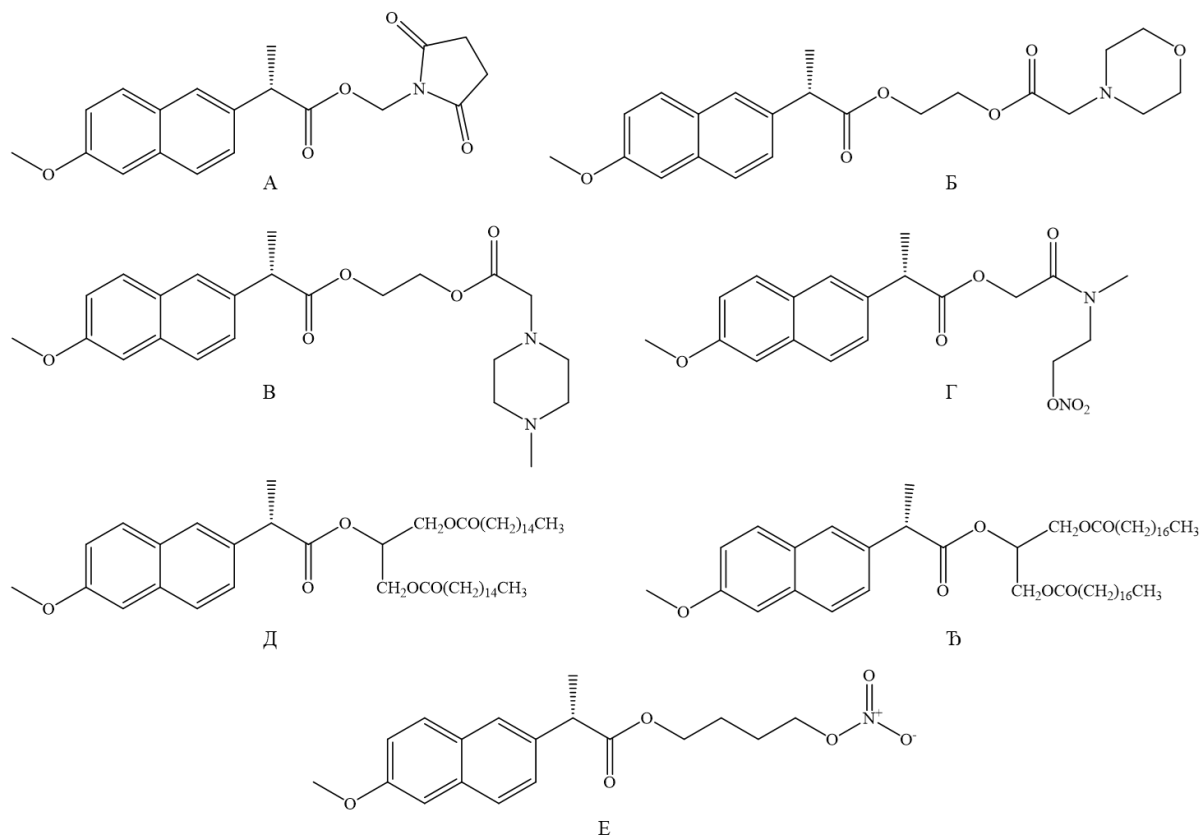
чини безбедним за оралну примену (Слика 6а и 6б) (62). Значајно интересовање истраживача последњих година усмерено је према синтези тиоуреидних деривата напроксена и испитивању њиховог антиинфламацијског потенцијала. На моделу карагенаном индукованог едема шапе пацова показано је да поједини тиоуреидни деривати поседују снажнију антиинфламацијску активност у односу на напроксен са процентом инхибиције од око 90% (Слика 6в-ђ). За наведена једињења није испитиван потенцијални механизам антиинфламацијског дејства. Међутим, SAR (енгл. *Structure-Activity Relationship*) студије су показале да је за испољавање антиинфламацијске активности од круцијалног значаја број хетероатома који могу остварити водоничне интеракције било као протон-донори или као акцептори водоничне везе. Са друге стране, продужавање бочног низа молекула арил-тиоуреидним остатком боље потенцира антиинфламацијску активност у односу на алифатичне остатке. Посебно су се показали ефикасним молекули код којих је ароматични прстен супституисан електрон-привлачном групом у односу на оне са електрон-донорским групама (63-65).



Слика 6. Хемијске структуре уреидних и тиоуреидних деривата напроксена са значајном антиинфламацијском активношћу

У циљу побољшања биорасположивости и смањења гастроинтестиналне токсичности синтетисана је серија пролек деривата напроксена. Најпре је синтетисана серија естара пиридинских деривата (Слика 7а) за које је показано да поседују побољшане терапијске особине и бољу оралну биоискористљивост (66). Након тога су синтетисани морфолински (Слика 7б) и пиперазински (Слика 7в) естри напроксена као његови потенцијални пролек облици за које је *in vitro* доказано да имају бољу топијалну апсорпцију у односу на полазни лек (67). *Ranatunge* и сарадници су 2006. године синтетисали напроксен-гликоламид нитрат (Слика 7г) и доказали да ово једињење поседује антиинфламацијску активност еквивалентну конвенционалним лековима из групе НСАИЛ уз мање изражену гастричну токсичност (68). Такође, истраживања су показала да естри напроксена са глицеридима (Слика 7д и 7ђ) имају супериорнији антиинфламацијски ефекат у односу на напроксен уз мањи ризик од улцерогених ефеката (69).

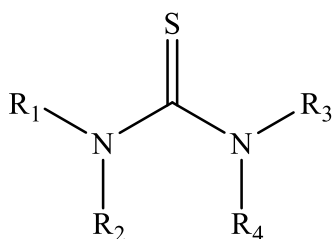
Француска фармацеутска компанија *Nicox SA* је 2003. године развила пролек супстанцу напроксена познату под називом напроксцинод (нитронапроксен) (Слика 7е) (70). Као нитроксибутил естар, молекул напроксцинода се понаша као COX инхибитор и азот-оксид (NO) донор и припада групи COX-инхибирајућих донора азот оксида (енгл. *Cyclooxygenase-Inhibiting Nitric Oxide Donors – CINODs*). Пролек супстанца напроксена је синтетисана са циљем да се смање гастроинтестинална и кардиоваскуларна нежељена дејства напроксена као традиционалног НСАИЛ, при чему ослобођени NO доприноси жељеном ефекту. Међутим у јулу 2010. године Америчка агенција за храну и лекове (енгл. FDA - *Food and Drug Administration*) је одлучила да напроксцинод не одобри за клиничку примену.



Слика 7. Хемијске структуре пролек једињења напроксена са значајном антиинфламацијском активношћу

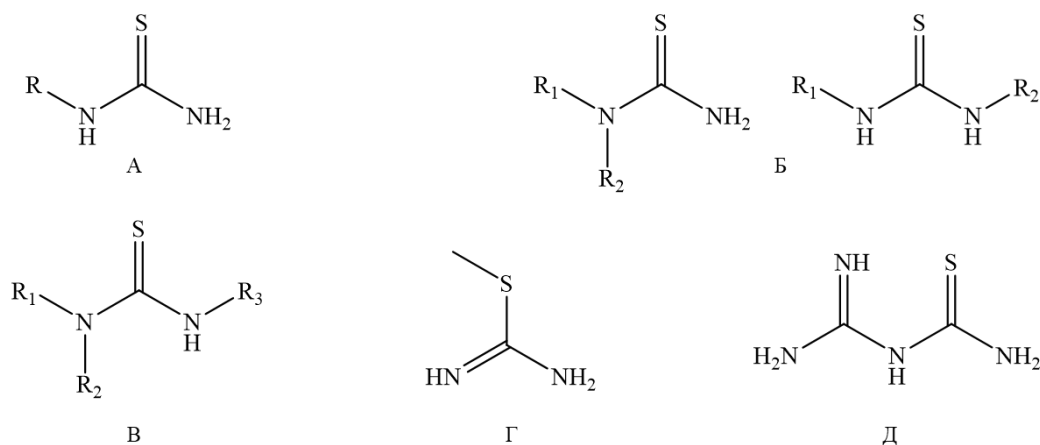
1.3. Тиоуреидни деривати као фармаколошки активна једињења

Тиоурее престављају класу органских једињења која је добијена заменом атома кисеоника сумпором у структури урее. Међутим, хемијско понашање уреа и тиоуреа се међусобно значајно разликује. Општа формула тиоуреа приказана је на Слици 8.



Слика 8. Општа формула тиоуреа

Тиоуреа се класификују на моно *N*-супституисане тиоуреа, дисупституисане тиоуреа, трисупституисане тиоуреа, псевдоћиоуреа (моно *S*-супституисане тиоуреа) и гуанил тиоуреа (71). Опште структуре наведених класа једињења приказане су на Слици 9.

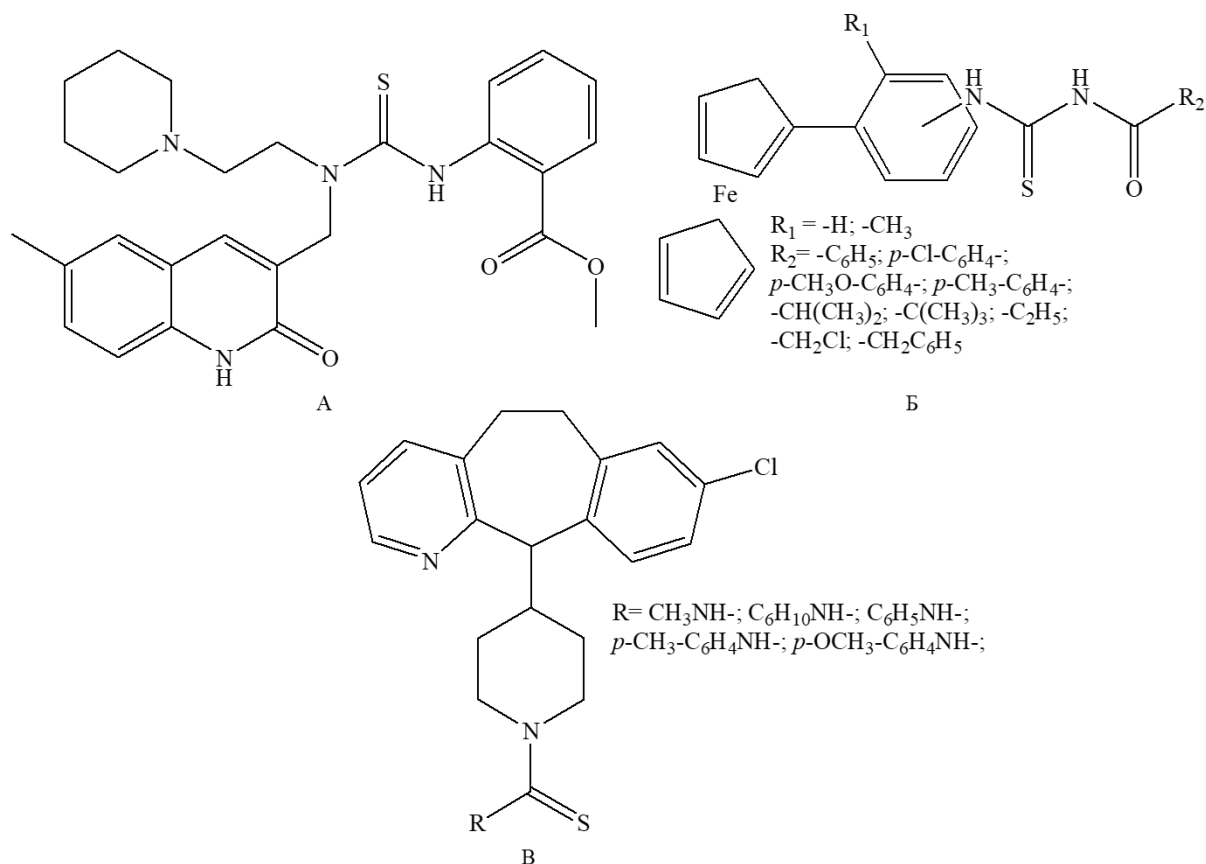


Слика 9. Хемијске структуре супституисаних тиоуреа

Због високог степена генотоксичности и цитотоксичности конвенционалних цитостатика на здраве ћелије, истраживачи су у константној потрази за безбеднијим антитуморским лековима. Највећи број цитостатика према својој хемијској структури представља деривате уреа, тиоуреа и бензотиазола. Комбиновањем уреа и тиоуреа са бензотиазолима добијени су снажни инхибитори ДНК топоизомеразе и реверзне транскриптазе, који су показали цитотоксични потенцијал према HeLa и MCF-7 ћелијским линијама (72).

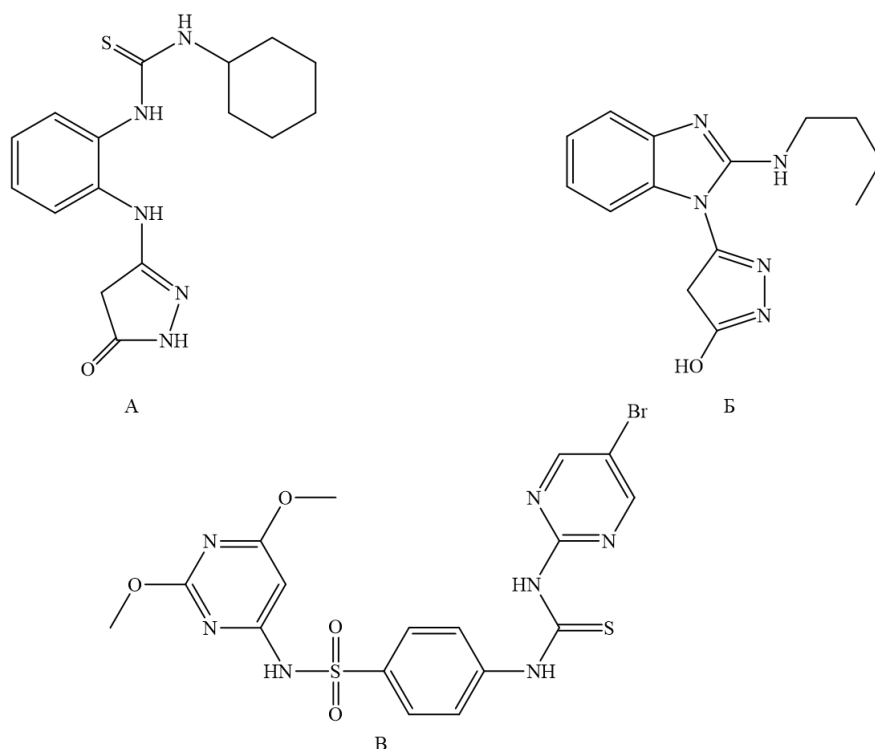
Деривати тиоуреа представљају једну од најперспективнијих класа антитуморских лекова са широком применом против различитих облика леукемије и солидних тумора. Њихов висок антитуморски потенцијал објашњава се способношћу да инхибирају протеинску тирозин киназу, сиртуински тип протеина (SIRT1 и SIRT2), топоизомеразу II, као и могућношћу да потпомажу репарацију молекула ДНК (73-76). Истраживања су показала да серија *N*-супституисаних деривата тиоуреа (Слика 10а) ефикасно инхибира рецептор за епидермални фактор раста, као значајне групе протеинских тирозин киназа које су укључене у процесе туморске ангиогенезе (77). Нови фероценил деривати са тиоуреидном групом (Слика 10б) остварили су значајну цитотоксичност према туморским ћелијама јајника. Испитивања интеракција са ДНК молекулом показала су да се ова једињења не везују ковалентно и не доводе до конформационих промена хумане ДНК (71). *Wukun* и сарадници су синтетисали и испитали тиоуреидне деривате бензоциклохептапиридина (Слика 10в), при чему је

доказано да ова једињења поседују значајну антитуморску активност према MCF-7 и MDA-MB-231 ћелијским линијама, као и према ћелијама карцинома дебелог црева (78).



Слика 10. Тиоуреидни деривати са значајном антитуморском активношћу

Као што је напоменуто у одељку 1.2.5., све веће интересовање влада за дизајнирање тиоуреидних деривата као потенцијалних антиинфламацијских лекова. Претходно наведени бензоциклохептапиридински деривати тиоурее испољили су антиинфламацијски ефекат, али без значајне инхибиције ензима циклооксигеназе. На основу тога може се закључити да ови молекули неким другим механизмом ометају метаболизам арахидонске киселине (78). Са друге стране, пиразолонски деривати тиоурее (Слика 11а и 11б) неселективно инхибирају обе изоформе циклооксигеназе чиме остварују антиинфламацијски ефекат упоредив са диклофенаком уз нижи улцерогени потенцијал у односу на индометацин (79). У поређењу са појединим карботиоамидним, пиримидинским и бензодиоксолским дериватима, тиоуреидни деривати (Слика 11в) су на моделу едема шапе пацова показали најјачи антиинфламацијски ефекат који је снажнији од индометацина, а сличан целекоксибу. Такође, потврђена је корелација између инхибиције ензима COX-2 и њиховог антитуморског потенцијала (80).



Слика 11. Тиоуреидни деривати са значајном антиинфламацијском активношћу

1.4. Ензими циклооксигеназе и липоксигеназе

1.4.1. Биолошка улога и типови циклооксигеназа

Циклооксигеназа је хомодимерни мембрански протеин који врши конверзију арахидонске киселине ((*5Z,8Z,11Z,14Z*)-5,8,11,14-еикосатетраеноинске киселине) до простааноида (81). Ензим циклооксигеназа позната је и као простагландин G/H синтаза или простагландин ендопероксидаза H синтаза. Овај ензим катализује реакцију циклизације арахидонске киселине до простагландина G₂, као и хидропероксидацију наведеног простагландина до простагландина H₂ (82). Биоактивни липидни медијатори су главни регулатори инфламацијског одговора. Открића на пољу липидних медијатора добијених из арахидонске киселине издвојила су простагландине, као есецијалне посреднике упалног одговора. Каснија идентификација циклооксигеназе као ензима одговорног за синтезу простагландина, отворила је нове могућности у терапији запаљенског процеса. Наведени ензим постао је примарна мета деловања НСАИЛ који блокирају формирање простагландина (83). Постоје две различите изоформе овог ензима, означене као циклооксигеназа-1 (COX-1) и циклооксигеназа-2 (COX-2), а које генеришу формирање истих продуката (простагландина). Међутим, COX-1 је конститутивни ензим експримиран у свим ћелијама, док је COX-2 ограничен на одређена ткива и индукован упалним медијаторима. Индукција COX-2 се јавља као одговор на дејство интерлеукина-1 β (IL-1 β), фактора некрозе тумора α (TNF- α), интерферона- γ (IFN- γ) и липополисахарида. Самим тим је наведена изоформа дефинисана као изоформа укључена у инфламацијски одговор. Биосинтеза сваког од еикосаноида (простагландини D, E, F и I, тромбоксан A₂) је специфична за ћелије и зависи од тога која је синтаза доминантна у одређеном типу ћелија. Према томе, различити типови ћелија су специјализовани за формирање једног од наведених еикосаноида (81,84).

Хистофлуоресцентним бојењем је показано да је ензим циклооксигеназе локализован у ендоплазматском ретикулуму и на нуклеарној мембрани. СОХ-1 изоформа се налази само на ендоплазматском ретикулуму, док СОХ-2 може бити локализована у ендоплазматском ретикулуму и на нуклеарној мембрани (два пута заступљенија). Претпоставља се да је оваква селективна локализација узрокована различитом секвенцом на С-терминусу (85).

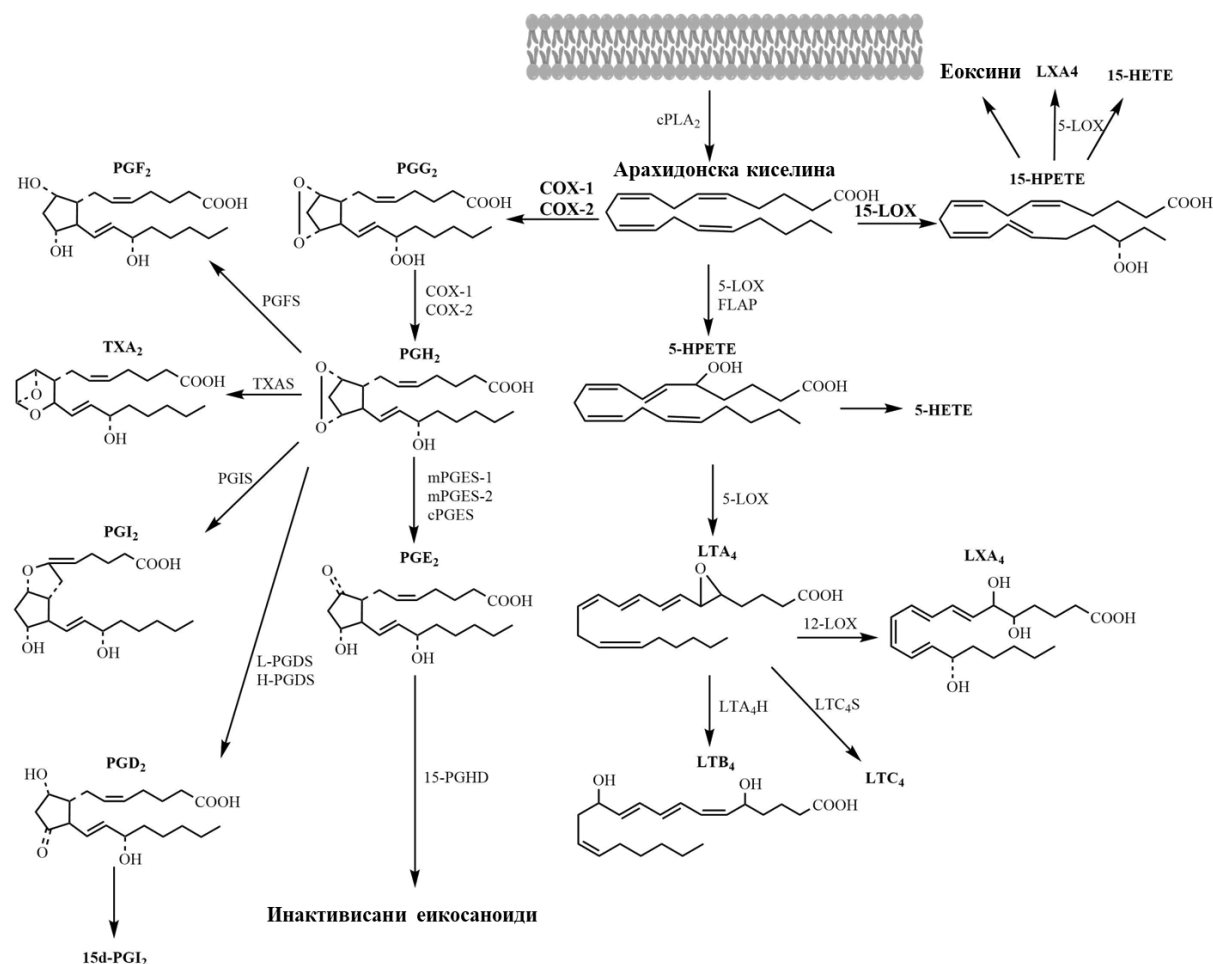
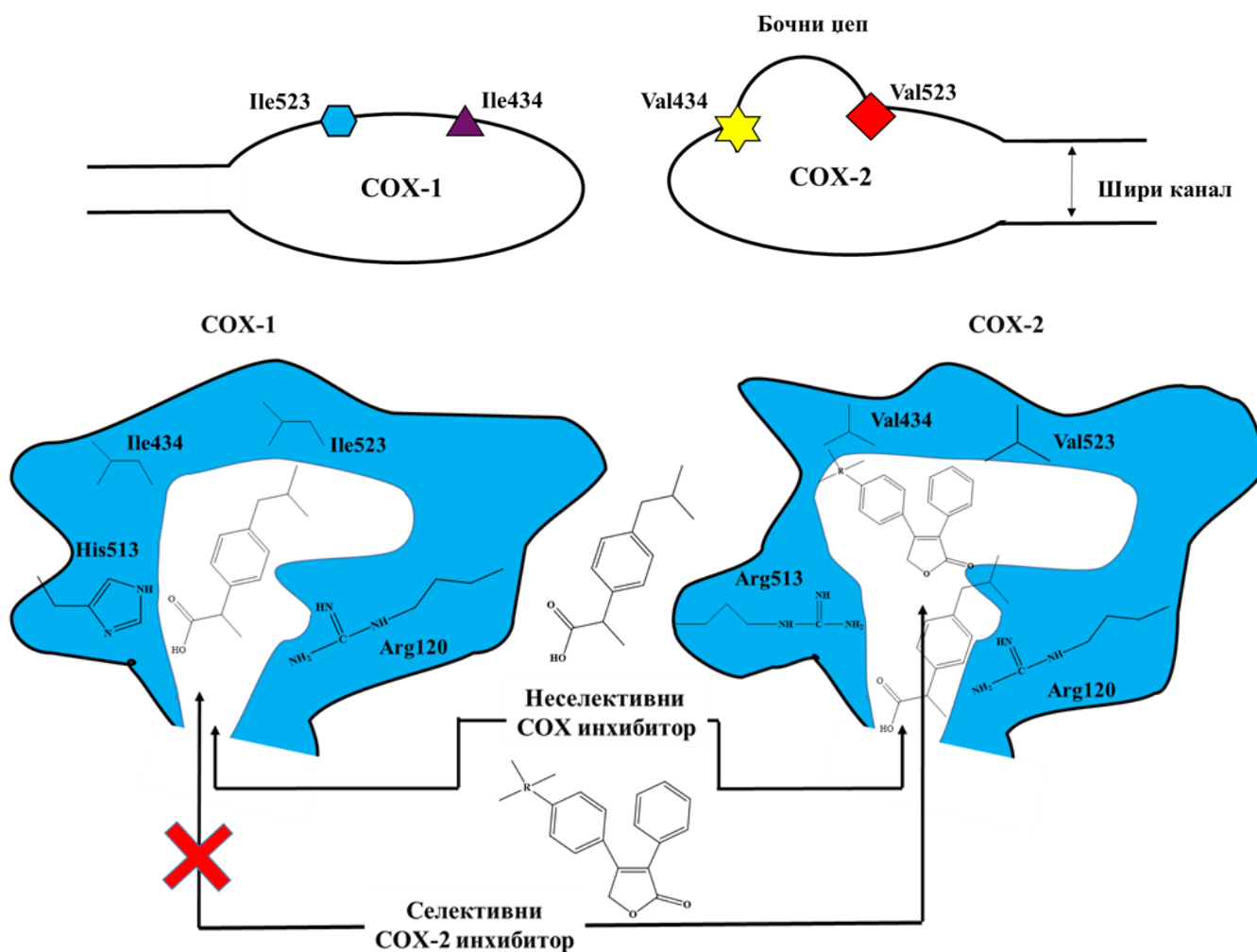


Схема 2. Метаболизам арахидонске киселине

1.4.2. Протеинска структура ензима циклооксигеназа

Циклооксигеназе 1 и 2 представљају мембрански везане протеине који деле значајан део идентичне аминокиселинске секвенце уз веома сличну топографију активног места. Упркос њиховој сличности, активни центар СОХ-2 је отприлике 20% већи у односу на место везивања СОХ-1. Наведене разлике потичу од „замене“ изолеуцина на позицији 523 у СОХ-1 мање волуминозним валином у СОХ-2 (Слика 12). Постоји укупно 24 аминокиселинских остатака који граде хидрофобни део активног места обе изоформе циклооксигеназа уз само једну разлику (Pе523 у СОХ-1 и Val509 у СОХ-2). СОХ-2 има додатни хидрофилни бочни цеп доступан за везивање лека, а који се налази у продужетку главног цепа. Величина и природа наведеног хидрофилног бочног цепа резултат је „замене“ Pе434 и His513 у СОХ-1 за мањи Val434 и више базни Arg513. Наведена аминокиселинска разлика може обезбедити додатну интеракцију при селективном везивању СОХ-2 инхибитора, као што је целекоксиб. Аргинин на позицији

120 је једини позитивно наелектрисан аминокиселински остатак у активном центру циклооксигеназа, а који је одговоран за формирање интеракција са карбоксилатним анионом супстрата (арахидонске киселине) или конвенционалних НСАИЛ. Амино остатак Туг385 налази се на супротном крају активног центра циклооксигеназа и сматра се да служи као каталитички остатак за активирање молекулског кисеоника и његову адицију на двоструку везу на позицији 11 супстрата при формирању простагландина G₂. На крају, присуство аминокиселинског остатка серина на позицији 530 је неопходно за ирверзибилну инхибицију ацетилсалицилном киселином, али нема улогу при везивању супстрата (86,87). Додатна разлика између две изоформе циклооксигеназа огледа се у структуру *N*-терминалног и *C*-терминалног краја. Наиме, COX-1 изоформа има секвенцу од 17 аминокиселина на *N*-терминусу која се не налази у COX-2. Са друге стране, COX-2 на *C*-терминалном крају поседује аминокиселинску секвенцу од 18 аминокиселина која није нађена у циклооксигенази-1 (88).



Слика 12. Структурне разлике између супстрат-везујућих места COX-1 и COX-2

Већина НСАИЛ поседује слободну карбоксилну групу којом остварује јонске интеракције са позитивно наелектрисаним остатком аргинина у активном центру циклооксигеназа. Наведена карбоксилна група углавном је везана за ароматични прстен који је одговоран за формирање хидрофобних интеракција са алкил или ароматичним остацима активног центра. Хипотетички модел везивања индометацина и сродних аналога указује на интеракцију *N*-*p*-хлорбензоил групе са регионима двоструких веза

активних места циклооксигеназа. Подручја везивања двоструких веза дефинисана су услед претпоставке да наведена оријентација омогућава правилно позиционирање амид-карбонилног кисеоника за могуће интеракције са Ser530 и 5-метокси групе са Ser355 у активном центру ензима. Потенцијална замена 5-метокси групе атомом флуора на индолном прстену додатно појачава аналгетско дејство лека. Осим тога, ограничен простор за интеракције са леуцином на позицији 384 и 523 узрокује лаку конверзију индометацина из неселективног у високоселективни COX-2 инхибитор супституцијом атома хлора у пара положају већим атомом брома или додавањем два атома хлора. Наведена чињеница објашњава зашто је код сулиндака примећен мањи ризик од појаве гастроинтестиналних нежељених ефеката у односу на индометацин. Сулиндак захтева метаболичку активацију редукцијом гломазне сулфоксидне групе у мању метил-сулфидну која је неопходна за интеракцију са Leu384 (15). Са друге стране, карбоксилна група напроксена у активном месту циклооксигеназа остварује јонску интеракцију са остатком Arg120. Уочено је да α -метил група учествује у формирању кључних интеракција, па уклањање ове групе из молекула напроксена доводи до значајног пада његовог инхибиционог потенцијала. Истраживања показују да се ова група уграђује у малу хидрофобну шупљину испод бочног остатка Val349. Кристалне структуре осталих деривата 2-арилпропионских киселина и диарил једињења у активном месту циклооксигеназа указују на то да је α -метил група везана на сличан начин. Такође је уочено да је кључна интеракција напроксена са Trp387 јединствена само за напроксен и да мутације на гену за ову аминокиселину не доводе до губитка активности осталих НСАИЛ (89).

Табела 1. IC₅₀ вредности инхибиције COX-1 и COX-2 појединих НСАИЛ (90).

Лек	IC ₅₀ вредност (μM)		COX-2 : COX-1
	COX-1	COX-2	
<i>Пироксикам</i>	0,0024	0,060	250
<i>Аспирин</i>	1,67	278	166
<i>Индометацин</i>	0,028	1,68	60
<i>Ибупрофен</i>	4,85	72,8	15
<i>Салицилат</i>	254	725	2,8
<i>Мелоксикам</i>	0,21	0,17	0,8
<i>Напроксен</i>	9,56	5,7	0,6

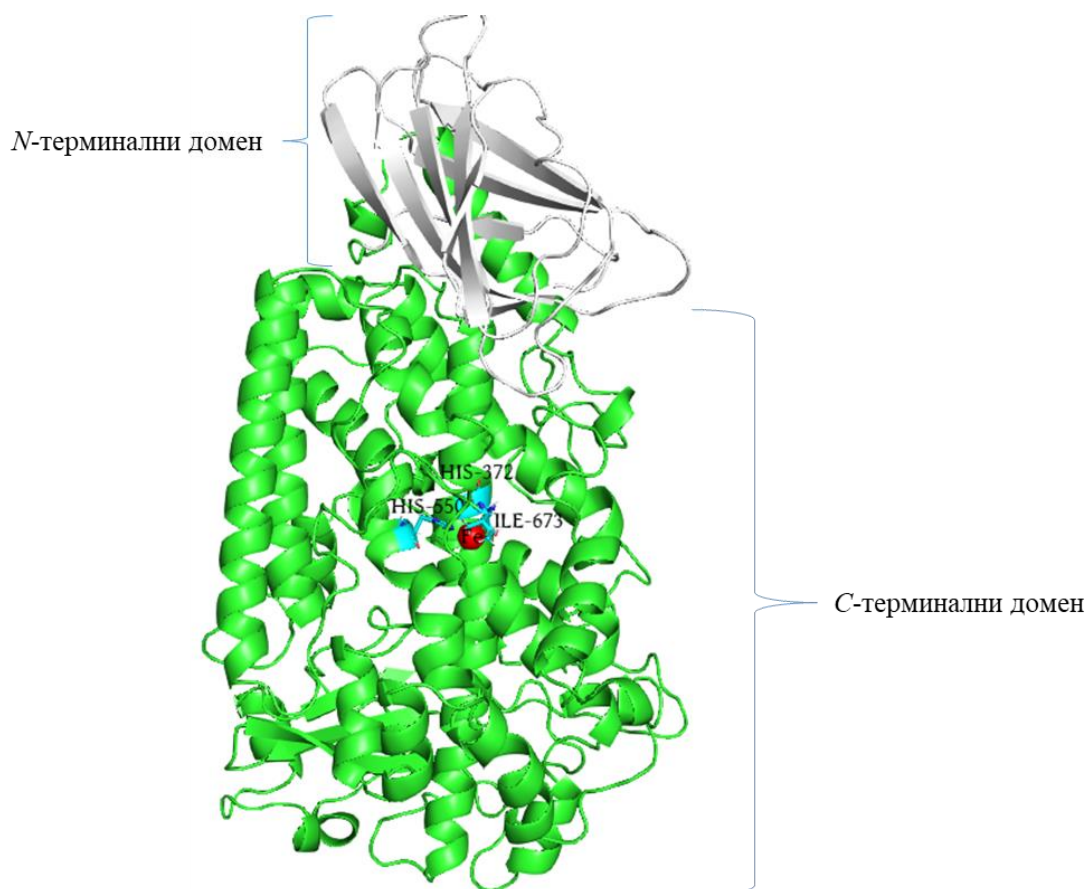
1.4.3. Биолошка улога и типови липоксигеназа (LOX)

Липоксигеназе представљају класу ензима који катализују оксидацију полинезасићених масних киселина попут линолеинске и арахидонске киселине. Овај ензим није карактеристичан само за сисаре, већ га поседују и поједине биљке. Иако је на први поглед структура свих изоформи овог ензима код сисара слична, свака од њих има јединствена својства. Главна карактеристика је специфичност супстрата за сваку изоформу. Структура активног центра зависи пре свега од супстрата за одређену изоформу ензима, али и од начина координирања јона гвожђа хистидинским остацима (91,92). Најважнији типови липоксигеназа су 5-LOX, 12-LOX, 12R-LOX, 15-LOX, 15-LOX-2 и eLOX-3. Студије показују да активност липоксигеназе може бити инхибирана фенолним антиоксидансима чиме се потврђује значај уноса полифенола исхраном. Са друге стране, синтетисани су поједини лекови који инхибирају овај ензим, попут 5-LOX инхибитора зилеутона који се користи у терапији астме (93).

5-липоксигеназа има главну улогу у синтези леукотриена. Леукотриени припадају групи проинфламацијских медијатора који стимулишу хемотаксу фагоцита и повећавају пропустљивост крвних судова. Нису само леукотриени производ активности 5-LOX ензима, већ се производ његове каталитичке активности, 5(*S*)-хидроперокси-*trans*-8,11,14-*cis*-еикосатетраеноинска киселина (5-HPETE), може даље метаболирати до других липидних медијатора попут 5-НЕТЕ, 5-оксо-ЕТЕ и липоксина (Схема 2) (94).

1.4.4. Протеинска структура ензима 5-LOX

5-LOX код сисара представља мономерни ензим са два домена и обично садржи 672 или 673 аминокиселине. *C*-терминални домен је каталитички домен који обухвата аминокиселинске остатке између положаја 121 и 673. Углавном поседује структуру хеликса и у њему је смештен јон гвожђа. Са друге стране, *N*-терминални домен је знатно мањи, сачињен од 114 аминокиселина и поседује β набрану структуру. Уочено је да остаци у овим петљама могу везати Ca^{2+} јон који омогућава активацију ензима (95). Јон гвожђа (Fe^{2+}) у активном месту липоксигеназе неопходан је за њену каталитичку активност. Претпоставља се да два аминокиселинска остатка хистидина (His372 и His550) и Ile673 на *C*-терминалном крају чине тријадну која координује јон гвожђа у каталитичком месту ензима (Слика 13). Такође, остаци хистидина у положају 367 и аспарагина на позицији 554 функционишу као изменљиви лиганди за гвожђе у одсуству супстрата и кокриснала. Током каталитичке активности липоксигеназе долази до промене оксидационог стања јона гвожђа из Fe^{2+} у Fe^{3+} (96).



Слика 13. Модел 5-LOX ензима на основу снимљене кристалне структуре (PDB ID: 7TTK)

До данас је развијено неколико инхибитора 5-LOX ензима са циљем лечења запаљенских процеса, бола и карцинома. Ови инхибитори остварују своје дејство на неколико различитих начина. Хелатори гвожђа, зилеутон и *BWA4C*, инхибирају ензимску активност хелацијом јона гвожђа и/или стабилизацијом његовог оксидационог стања. Преостала два типа инхибитора су не-редокс и редокс инхибитори (*NDGA-nordihydroguaiaretic acid*, *AA-861*, *C06*) који своје дејство остварују компетицијом са природним супстратом (арахидонском киселином) за активно место ензима (97).

1.5. Инфламација и тумор

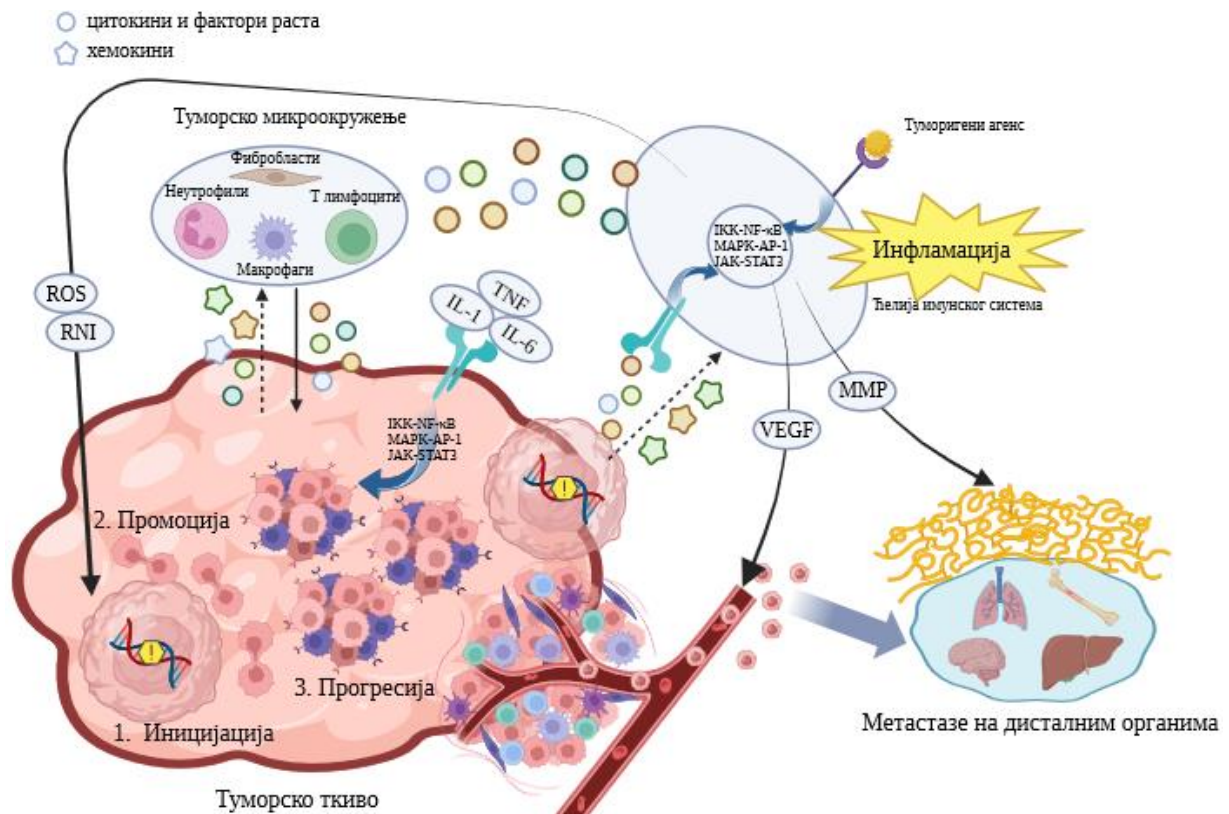
Инфламација представља имунолошку одбрамбену реакцију организма на дејство штетних стимулуса. Као резултат инфламације јавља се елиминација фактора који су до ње довели, као и обнављање оштећеног ткива (98). У почетној фази инфламације, макрофаги или мастоцити препознају молекуле карактеристичне за патогене, што узрокује секрецију проинфламацијских цитокина, хемокина, вазоактивних амина и еикосаноида, због чега имунски одговор постаје још јачи (99). Наведени медијатори повећавају васкуларну пропустљивост, при чему долази до значајног проласка плазме која садржи антитела и друге инфламацијске медијаторе (100). Такође, ослобађање хемокина, цитокина, еикосаноида и других сигналних молекула стимулише миграцију неутрофила и моноцита на место оштећења. Како се инфламацијски одговор развија, тако се моноцити и лимфоцити акумулирају на месту упале како би неутралисали штетне супстанце. Након тога, инфламацијске ћелије умиру апоптозом и чисте их макрофаги. Такође, спречава се даља инфилтрација неутрофила, смањује се лучење проинфламацијских цитокина, стимулишу се макрофаги да фагоцитују апоптотички елиминисане неутрофиле и обнавља се хомеостаза ткива. На крају, процес обнављања ткива замењује инфламацију ублажавајући инфламацијски одговор (101).

Инфламација се према дужини трајања може поделити на акутну и хроничну. Акутна инфламација је почетни одговор на штетни стимулус и може трајати неколико дана до неколико недеља. Највећи број инфилтрирајућих ћелија у овој фази су гранулоцити (102). Са друге стране, хронична инфламација се карактерише истовременом појавом оштећења и зарастања ткива. Током хроничне инфламације главне инфилтрирајуће ћелије су макрофаги и лимфоцити (103). До хроничне инфламације, фиброзе ткива и некрозе долази уколико се проинфламацијски стимулус не елиминише током акутне инфламације. Такође, познато је да трајна акутна инфламација без очигледних симптома може бити узрок хроничне инфламације (104). Хронична инфламација је директно или индиректно повезана са бројним хроничним обољењима попут атеросклерозе, инфаркта миокарда, Паркинсонове болести, Алцхајмерове болести, дијабетеса, псоријазе и тумора (105). Скоро 20% свих карцинома код људи повезано је са хроничном инфламацијом (106). Још током XIX века примећено је да постоји повезаност између хроничне инфламације и тумора на основу потврђене инфилтрације ћелија имунолошког система унутар неопластичног ткива. Анималним моделима је потврђено да вештачки изазвана хронична инфламација може довести до настанка и развој тумора (107).

1.5.1. Улога инфламације у процесу туморигенезе

Хронична инфламација има важан утицај на развој канцера почевши од развоја, преко прогресије до његовог метастазирања. Вишеструка улога инфламације у сваком стадијуму приказана је на Слици 14 (108). Дуготрајна изложеност туморогеним агенсима

активира инфламацијску каскаду која може узроковати хроничну инфламацију, а она може резултовати појавом тумора. Запаљенске ћелије представљају значајан извор проинфламацијских медијатора попут реактивних кисеоничних врста (ROS - *Reactive Oxygen Species*), TNF, интерлеукина (IL-1 и IL-6), као и појединих фактора раста који могу поспешити процес развоја тумора (108). Веза између туморигенезе и инфламације посредована је унутрашњим (интринзичким) и спољашњим (екстринзичким) путевима. Унутрашњи пут се активира генетским променама које могу узроковати инфламацију и неоплазију. Наведене промене обухватају активацију проонкогена изазвану мутацијом, хромозомско преуређење и инактивацију гена супресора тумора. Овако измењене ћелије ослобађају медијаторе запаљења и тиме стварају инфламацијско микроокружење. Са друге стране, спољашњи пут изазван је запаљењем или инфекцијом, који повећавају ризик од настанка тумора. Оба пута се спајају у туморским ћелијама и изазивају активацију фактора транскрипције што резултује стварањем проинфламацијских фактора (хемокини, цитокини). Наведени молекули активирају различите популације леукоцита попут макрофага, мастоцита, неутрофила и еозинофила. Позитивном спрегом долази до повећаног стварања проинфламацијских медијатора што покреће даљи раст тумора и његову инвазивност (109).



Слика 14. Прогресија тумора изазвана хроничном инфламацијом

Сама појава тумора углавном захтева садејство генетских мутација и епигенетских промена у здравим ћелијама, чему у значајној мери доприноси и инфламацијско микроокружење. Макрофаги и неутрофили, као најчешће активирани инфламацијске ћелије, главни су извор ROS и реактивних азотних врста, који изазивају мутације на великом броју важних гена одговорних за развој тумора (110). Такви су, на пример, гени одговорни за поправке неусклађености ДНК и тумор супресорски гени. Хронична инфламација може изазвати и хромозомску нестабилност и ометање функције

ДНК и хистон модификујућих ензима, микроРНК, што може довести до развоја тумора (111). Поједине студије су показале и да хронична инфламација потпомаже настанак тумора на тај начин што премалигне ћелије добијају карактеристике сличне матичним ћелијама и формирају нише које омогућавају преживљавање тумор иницијаторских ћелија (112).

Приликом развоја тумора, малигно трансформисане ћелије пролазе кроз фазу пролиферације како би формирале примарни тумор. Током ове фазе, инфламацијске ћелије имају улогу извора цитокина и фактора раста неопходних за преживљавање и пролиферацију туморских ћелија (108). У појединим студијама уочено је да инактивација проинфламацијске сигнализације и производње цитокина, као и елиминација гена који кодирају поједине цитокине и цитокинске рецепторе, узрокује инхибицију раста тумора (113,114). Проинфламацијска сигнализација утиче не само на ћелије тумора, већ и на ћелије имунолошког система, фибробласте и ендотелне ћелије, чиме се обликује туморско микроокружење и стимулише даља прогресија тумора (108).

Приликом даље прогресије, туморске ћелије добијају малигне карактеристике попут способности метастазе, што узрокује стање неконтролисаног раста малигнућ ћелија. Међу најважнијим догађајима у овој фази развоја тумора је епително-мезенхимска транзиција. У овој фази туморске ћелије епитела добијају мезенхимске карактеристике, као и побољшане способности миграције у организму (115). Проинфламацијски цитокини попут $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-11$ и $IL-8$ представљају медијаторе који поспешују овај процес (116). Метастазирање и миграција туморских ћелија до дисталних органа контролисани су нивоом хемокина који се формирају у туморском микроокружењу и присуством специфичних хемокинских рецептора у циљном ткиву, по чему овај процес значајно подсећа на кретање леукоцита током запаљења (117). Цитокини попут $TNF-\alpha$ и $IL-1\beta$ индукују експресију хемокина. Макрофаги активирани током хроничне инфламације стимулишу ангиогенезу и лимфангиогенезу посредовану васкуларним ендотелијалним фактором раста. Када метастатске ћелије тумора уђу у циркулацију, проинфламацијски медијатори ослобођени из ћелија имунолошког система подржавају њихово нагомилавање и преживљавање у циљном органу (112). Истраживања су показала да повећање активности неутрофила претвара успаване ћелије карцинома плућа у агресивно растуће метастазе (118).

1.6. Значај дуалне COX/LOX инхибиције

Арахидонска киселина представља најважнији прекурсорски молекул у развоју инфламације. Постоје различити спољашњи и унутрашњи фактори који доводе до активације фосфолипазе A_2 , која представља кључни ензим у ослобађању арахидонске киселине из фосфолипида ћелијске мембране. На тај начин, арахидонска киселина постаје доступна за метаболизам посредован COX- и LOX-зависним путевима (119). COX и LOX су проинфламацијски ензими значајни за продукцију простагландина и леукотриена неопходних за физиолошку производњу еикосаноида. COX врши оксидацију арахидонске киселине до простагландина G_2 и прекурсорског простагландина H_2 омогућавајући даљу продукцију тромбоксана. Дејством LOX ензима из арахидонске киселине настају леукотриени који, такође, имају важну улогу у процесу инфламације (120). Постоји већи број различитих изоформи LOX ензима као што су 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX и 15-LOX који катализују формирање четири различита типа хидропероксиеикосатетраенске киселине (5-, 8-, 12- и 15-HPETE). Наведени метаболити се даље трансформишу до леукотриена, хепоксилина и липоксина. 5-LOX изоензим је одговоран за кључни метаболички пут којим се ствара 5-HPETE, а из њега даље LTA₄

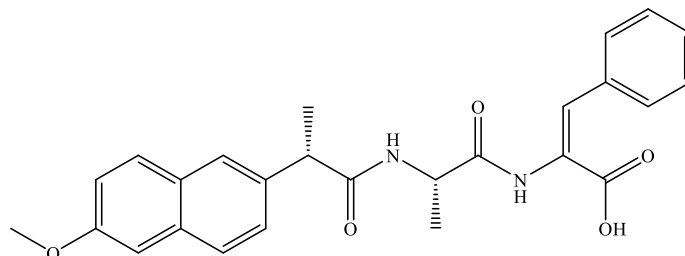
(енгл. *Leukotriene A₄*) који је прекурсор за LTB₄ и LTC₄(121). 5-LOX метаболички пут завршава се стварањем LTB₄, који је посредник у бројним инфламацијским и алергијским стањима попут атеросклерозе, кардиоваскуларних болести и тумора (Схема 2) (122,123). Друге изоформе LOX ензима (попут 12-LOX и 15-LOX) такође имају значајну улогу у стварању леукотриена (124). С обзиром на то да инхибиција COX ензима доводи до појачане активности LOX метаболичког пута и повећане производње леукотриена, истовремена инхибиција LOX ензима може помоћи у смањењу ризика од настанка различитих обољења уз очување антиинфламацијских ефеката инхибиције COX-2.

Нестероидни антиинфламацијски лекови генерално су показали значајне нежељене ефекте попут гастроинтестиналних поремећаја, кардиоваскуларних проблема и бубрежних оштећења. Истовремена инхибиција COX и LOX ензима спречава продукцију леукотриена и простагландина као значајних медијатора инфламације (119). Самим тим, оваква паралелна инхибиција оба метаболичка пута арахидонске киселине помаже у развоју нових лекова са снажнијим антиинфламацијским ефектом и мањим бројем нежељених ефеката. На тај начин је обезбеђен бољи гастроинтестинални безбедносни профил и заштитни ефекат на слузницу желуца (125). Приликом дизајна дуалних COX/LOX инхибитора највећи значај имају подаци о начину везивања арахидонске киселине у активним местима ових ензима. Примећено је да у везујућим местима COX и LOX ензима арахидонска киселина остварује интеракције са три аминокиселине – леуцин, фенилаланин и тирозин, као и то да су ароматичне-π интеракције заступљеније у односу на алифатичне-π контакте. Серин у положају 530 COX-2 ензима и глутамин у положају 363 5-LOX ензима имају улогу акцептора водоничне везе, док се бочни остаци тирозина (Tyr355) и хистидина (His372) понашају истовремено као доноси и акцептори водоничне везе (126).

Истраживања су показала да COX-2 и 5-LOX изоензими имају кључну улогу у развоју појединих врста карцинома код људи. И COX-2 и 5-LOX се појачано експримирају код карцинома дебелог црева, простате, дојке и плућа, где стимулишу пролиферацију и ангиогену активност у ћелијама. Јасно је да инхибиција једног метаболичког пута арахидонске киселине може појачати други пут, па је овакав ефекат равнотеже уочен код раста ћелија сквамозног карцинома главе и врата. Недавна истраживања показују да инхибиција COX-2 ензима може довести до усмеравања метаболизма арахидонске киселине према стварању леукотриена током туморигенезе дебелог црева, као и то да комбинована терапија COX-2 и 5-LOX инхибиторима спречава раст тумора. Са друге стране, уочено је да комбинација COX-1 и 5-LOX инхибитора смањује туморигенезу карцинома плућа (127). Комбинација 5-LOX инхибитора (MK886) и инхибитора циклооксигеназе се показала веома ефикасном и у терапији карцинома простате и колоне (128). Такође, целекоксиб и зилеутон примењени истовремено поседују адитивни инхибиторни ефекат према ћелијама езофагеалног карцинома, као и у превенцији јетрених метастаза код карцинома панкреаса код људи (129).

Последњих година влада све веће интересовање истраживача према развоју дуалних COX-2/5-LOX инхибитора као ефикасних антиинфламацијских лекова. Концепт ове паралелне инхибиције заснован је на истовременом спречавању стварања простагландина и леукотриена. Током последњих 30 година синтетисана су бројна једињења која делују на нивоу биосинтезе простагландина и леукотриена, а поједина су ушла и у фазу клиничких испитивања. Међутим, до данас ниједан од испитиваних молекула није остварио обећавајући антиинфламацијски ефекат уз висок афинитет према активним местима COX-2 и 5-LOX. Студије односа структуре и активности показале су да фармакофоре у облику слова „Y“ имају висок потенцијал за остваривање

водоничних и *van der Waals*-ових интеракција са активним местима COX-2 и 5-LOX enzima. Поред синтетичких једињења, значајан број једињења биљног порекла попут флавона, флавонооксида и куркумина могу дуалном COX-2/5-LOX инхибицијом спречити стварање PGE₂ и LTB₄ (130). Истраживања су показала да поједини напроксен-дехидродипептидни деривати (Слика 15) представљају значајне кандидате за дуалну COX-2/5-LOX инхибицију уз високу антиинфламацијску и антитуморску активност (131).



Слика 15. Хемијска структура деривата напроксена са особинама дуалног COX-2/5-LOX инхибитора

1.7. Испитивање физичко-хемијских и фармакокинетичких особина фармаколошки активних једињења

1.7.1. Партициони коефицијент и одређивање $\log P$ вредности

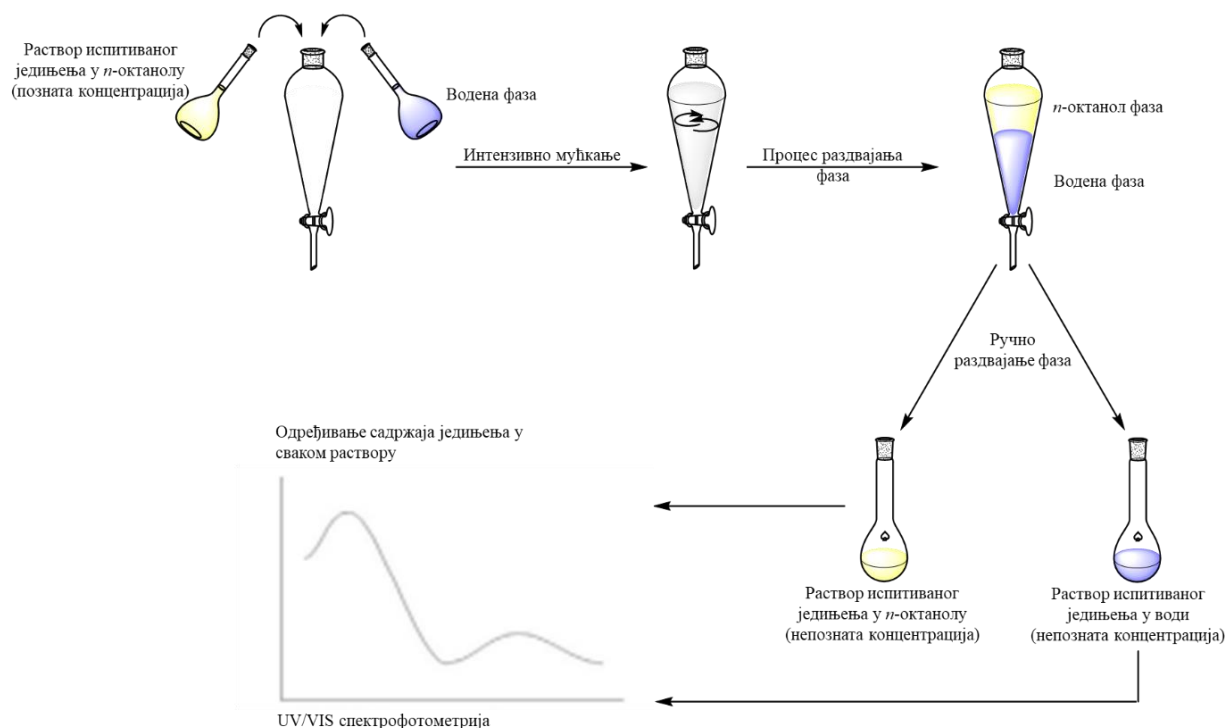
Липофилност представља једну од најважнијих физичко-хемијских карактеристика лекова и указује на афинитет неког молекула према воденом или липофилном окружењу. На основу липофилности се може предвидети способност молекула да прође ћелијску мембрану, која је углавном хидрофобне природе, и веже се за циљне протеине (132). Липофилност је веома важан параметар у процесу открића лекова, јер је једно од најзначајнијих физичко-хемијских својстава у фармацеутској хемији. Липофилност утиче на њихову растворљивост, пермеабилност кроз биолошке мембране, метаболизам, фармакокинетичку, фармакодинамски и токсиколошки профил. Уколико је липофилност лека превисока постоји повећан ризик за појаву токсичних ефеката, слабе растворљивости и убрзаног метаболизма, као и за акумулацију лека у масном ткиву. Превелика липофилност може продужити деловање биолошки активних молекула, али може бити и ограничавајући фактор за пролазак кроз биолошке мембране, јер овај процес захтева и изванредан степен поларности једињења. Са друге стране, уколико је липофилност прениска, лек ће генерално показати лоше фармакокинетичке особине (133,134).

Липофилност се експериментално процењује на основу партиционог коефицијента (P) и дистрибуционог коефицијента (D). Партициони коефицијент је параметар који описује равнотежу расподеле супстанце између органског растварача и водене фазе. Израчунава се као однос између концентрација неутралног облика лека у липидној и воденој средини. Ради једноставнијег поређења вредности партиционог коефицијента различитих супстанци примењује се његова логаритамска вредност ($\log P$). Веће вредности $\log P$ указују на већу липофилност једињења (135). Уколико испитивано једињење поседује јонизујуће групе, адекватнији параметар за дефинисање липофилности је коефицијент дистрибуције, односно његова логаритмована вредност ($\log D$). У том случају ће липофилност лека зависити од pH вредности средине. Наведени

коэффициент представља однос између јонизованог и нејонизованог облика лека у липидној и воденој фази. Оба параметра ($\log P$ и $\log D$) имају значајан утицај на гастроинтестиналну апсорпцију лека (136).

Прецизно и ефикасно одређивање липофилности је важан захтев у дизајну нових лекова. Ипак, у пракси се често користи израчуната вредност $\log P$ уместо измерене вредности (135). Израчунавање овог параметра се може извршити у различитим рачунарским програмима (*Molinspiration*, *MarvinSketch*) који користе алгоритме базиране на различитим методама фрагментације молекула. Зато се израчунате вредности једног истог молекула у различитим програмима могу значајно разликовати. Поједини истраживачи су недавно анализирали разлику између предвиђене и измерене $\log P$ вредности на великом узорку једињења и показали ниску тачност предвиђања за већину коришћених метода за израчунавање $\log P$ (137).

Постоје бројне методе за експериментално одређивање $\log P$ вредности. Две детаљно описане и често коришћене експерименталне технике за мерење липофилности јесу *shake-flask* метода и потенциометријска титрација. *Shake-flask* метода се спроводи растварањем испитиваног једињења у једној од фаза формиране смеше претходно пуфероване воде и *n*-октанола (Слика 16). Затим се врши мешање док се не постигне равнотежа у систему, након чега следи пажљиво одвајање *n*-октанола и водене фазе и мерење концентрација растворене супстанце у обе фазе најчешће применом UV/VIS спектрофотометрије. *Shake-flask* метода има значајне недостатке као што су дужина трајања експеримента, могућност стварања емулзије приликом мућкања, немогућност примене методе код високо липофилних и високо хидрофилних једињења и мања могућност аутоматизације методе (138). У потенциометријској титрацији $\log P$ се одређује поређењем pK_a вредности у воденој фази у односу на привидну pK_a вредност измерену у двофазном систему вода/*n*-октанол формирањем криве титрације (135).



Слика 16. Схематски приказ експерименталне процедуре за одређивање липофилности применом *shake-flask* методе

С обзиром на то да ране фазе испитивања нових молекула захтевају потрошњу малих количина једињења, последњих година су развијене алтернативне методе за одређивање липофилности које имају за циљ да обезбеде једноставније извођење уз утросак мањих количина испитиваних супстанци. Такве методе су, на пример, хроматографске технике, електрофоретске методе и имобилизована вештачка мембрана HPLC колоне (139). У многим лабораторијама методе избора за процену липофилности једињења јесу хроматографске методе због брзине извођења, прецизности, репродуктивности и коришћења релативно малих количина узорака. Углавном се користе реверзно фазне хроматографске технике попут RT-TLC (енгл. *Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography*) и RP-HPLC (енгл. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) (140). RT-TLC метода изводи се као и стандардне методе танкослојне хроматографије, где се липофилност једињења процењује на основу пређеног пута испитиване супстанце на танком слоју стационарне фазе. Разлика је у томе што код реверзно-фазне методе стационарна фаза мора бити мање поларна у односу на мобилну фазу. Као мобилна фаза се користи смеша воде и неког органског растварача, при чему се обично користе четири различита процентна удела органске компоненте (141). RP-HPLC метода је базирана на мерењу ретенционих времена у HPLC систему применом смеше воде и неког органског растварача, као мобилних фаза, са четири различита процентна садржаја органске фазе. На основу ретенционих времена се израчунава логаритам ретенционог фактора ($\log k_w$) који је могуће корелисати са концентрацијом органске компоненте у мобилној фази. Липофилност испитиване супстанце измерена овом методом се углавном изражава у виду параметра k_w (142).

1.7.2. Процена гастроинтестиналне апсорпције

Најчешћи и најкомфорнији начин примене лекова је перорална примена код које се биорасположивост лека смањује због хемијске деградације у желуцу или због лоших фармакокинетичких особина. Из наведених разлога је веома важно проценити фармакокинетичке особине једињења у раној фази развоја лекова како би се на време донела одлука о евентуалном прекиду даљег испитивања, без обзира на то што једињење показује значајну фармаколошку активност (143). Да би лек доспео до циљног места и остварио жељено дејство неопходно је да прође бројне биолошке баријере, тј. да се апсорбује. Апсорпција је критична карактеристика орално примењених лекова, пошто је неопходно да лек прође кроз цревни епител како би доспео у системску циркулацију. Апсорпција лека не зависи само од особина гастроинтестиналног тракта, већ и од физичко-хемијских особина лека. Студије су показале да је апсорпција лека карактеристична за одређену регију гастроинтестиналног тракта, па се рН градијент дигестивног тракта сматра главним фактором утицаја на апсорпцију. Претпоставља се да се највећи део апсорпције одвија на нивоу танког црева (дуоденум, јејунум и илеум), где се рН креће у интервалу од 4 до 7. Овај феномен се објашњава чињеницом да само нејонизована једињења могу проћи кроз липидну мембрану, па ће и пролазност једињења кроз зид црева бити највећа у рН окружењу при којем је једињење најмање јонизовано (144).

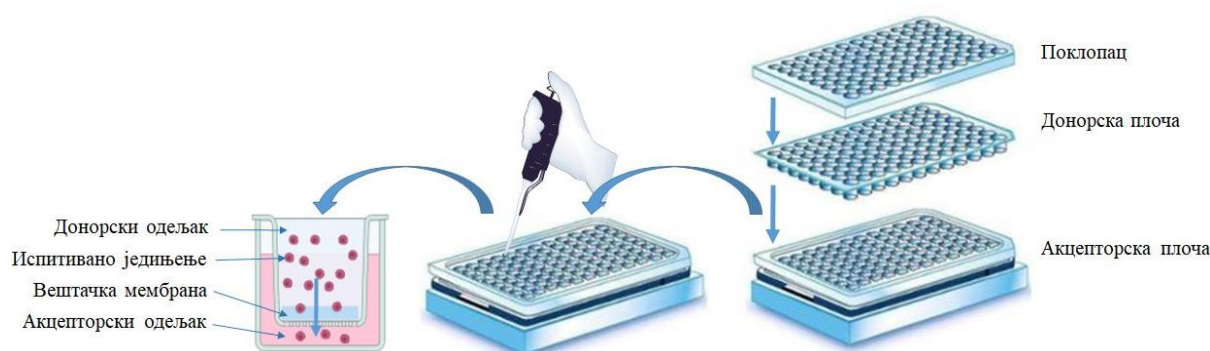
Апсорпција лека из гастроинтестиналног тракта се може проценити бројним *in silico*, *in vitro* и *in vivo* методама. *In vivo* тестови и анимални модели нису погодни за ране фазе развоја потенцијално фармаколошки активних супстанци. Примена *in vitro* тестова представља значајну погодност због једноставности, исплативости, етичких принципа, али и могућности истовременог испитивања већег броја једињења. Један од једноставнијих и ефикаснијих *in vitro* тестова за процену пермеабилности једињења кроз различите биолошке мембране попут крвно-мождане баријере, гастроинтестиналног

тракта и коже јесте РАМРА (енгл. *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) модел (145).

1.7.2.1. Испитивање пермеабилности применом теста пермеабилности на паралелним вештачким мембранама (РАМРА)

РАМРА представља метод којим се може испитати пермеабилност и апсорпција супстанце која је резултат просте дифузије. Вештачка мембрана која се користи у овом моделу има улогу да симулира биолошку мембрану чиме се имитира пасивни трансцелуларни транспорт. Овакав модел може пружити значајне информације о апсорпцији испитиваног једињења с обзиром на то да се већина лекова (80-95%) апсорбује кроз мембране потпуно или углавном пасивним транспортом. Из наведених разлога је РАМРА модел нашао широку примену у раној фази развоја лекова (146).

РАМРА модел се састоји од дозорског и акцепторског одељка које раздваја вештачка мембрана. У дозорском одељку се налази раствор испитиваног једињења у погодном растварачу, док је акцепторски одељак испуњен растварачем. Приликом спајања акцепторског и дозорског одељка формира се такозвани РАМРА „сендвич“. Под утицајем градијента концентрације долази до пасивне дифузије испитиваног једињења из дозорског у акцепторски одељак (Слика 17). Када се РАМРА моделом испитује гастроинтестинална апсорпција једињења неопходно је подесити рН акцепторског и дозорског раствора на одговарајуће вредности. Након дефинисаног времена инкубације врши се раздвајање два одељка, а затим се одређује концентрација испитиване супстанце у дозорском и акцепторском раствору (147).



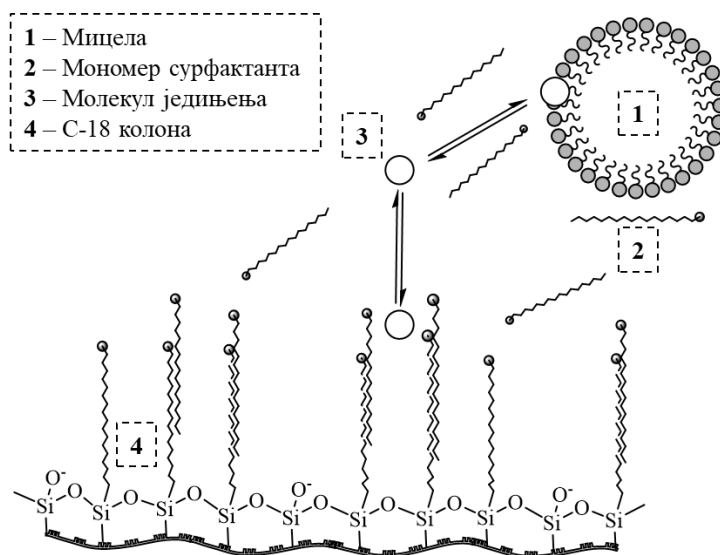
Слика 17. Принцип извођења РАМРА методе

У зависности од тога да ли се испитује пермеабилност кроз крвно-мождану баријеру, кожу или зид гастроинтестиналног тракта разликују се и компоненте које се налазе у саставу вештачке мембране. Тако се за РАМРА испитивање апсорпције кроз крвно-мождану баријеру могу користити поларни липиди мозга животиња растворени у додекану, за испитивање апсорпције кроз кожу се обично употребљава силиконско уље, изопрропилмиристанат или њихове смеше у различитим односима, док се за процену гастроинтестиналне апсорпције користи вештачка мембрана направљена од лецитина јајета раствореног у додекану или смеша хексадекана и хексана (148-150).

1.7.2.2. Испитивање пермеабилности применом биопартиционе мицеларне хроматографије (ВМС)

ВМС (енгл. *Biopartitioning Micellar Chromatography*) представља модификовану верзију мицеларне хроматографије код које мобилну фазу чини раствор сурфактанта (полиоксиетилен лаурил етар - Brij 35) изнад критичне мицеларне концентрације. Ова техника је веома корисна приликом описивања биолошког понашања различитих врста органских једињења, јер може имитирати бројне биолошке процесе попут проласка кроз крвно-мождану баријеру, кожу, апсорпцију из гастроинтестиналног тракта, као и раздвајања лека у биолошким системима. Главна предност ВМС методе огледа се у чињеници да су карактеристике ВМС система врло сличне биолошким мембранама и екстрацелуларним течностима. Главним недостатком ВМС система може се сматрати то што испитивање изразито неполарних анализата може бити споро, па зато захтева примену мањих удела органских растварача (151,152).

У ВМС моделу, мономери сурфактанта се делом адсорбују на површини стационарне фазе, док преостала количина сурфактанта формира мицеле у мобилној фази (Слика 18). Ретенција испитиваног једињења зависи, пре свега, од његове способности да интерагује са мономерима на стационарној фази и мицелама у мобилној фази. Мономерне јединице сурфактанта које су адсорбоване на површини стационарне фазе подсећају на фосфолипидне угљоводоничне низове, док хидрофилни делови молекула подсећају на поларне делове биолошких мембрана. Мобилна фаза ВМС система се припрема на тај начин да се могу опонашати биолошки услови при којима долази до расподеле лека (153). Ретенционо понашање тестираних једињења одређује се на основу њихове расподеле између водене фазе и мицела, водене и стационарне фазе, као и између стационарне фазе и мицела. ВМС систем који садржи C-18 стационарну фазу и Brij 35 као сурфактант у мобилној фази користи се за процену пермеације кроз крвно-мождану баријеру, кожу, као и за процену апсорпције из гастроинтестиналног тракта (154,155).



Слика 18. Схематски приказ ВМС методе

Приликом извођења ВМС методе неопходно је одредити удео органског растварача како би се добила прихватљива ретенциона времена, адекватан изглед пикова, као и могућност формирања мицела од примењеног сурфактанта. Органски

растварач смањује поларност мобилне фазе, утиче на адсорпцију мономера сурфактанта на стационарној фази, а уколико се дода у већим количинама од критичних може довести и до распада мицела. Зато је за сваки ВМС систем неопходно одредити оптимални удео органског растварача у мобилној фази. Најчешће се у те сврхе примењује тест мерења 50 капи, који је базиран на чињеници да 50 капи мобилне фазе која садржи мицеле имају мању масу од исте количине мобилне фазе где је дошло до распада мицела (155).

1.8. Формирање, процена квалитета и валидација QSPR и QSRR модела

Математички модели којима се описује квантитативни однос структуре и пермеабилности (енгл. *Quantitative Structure-Permeability Relationships - QSPR*) или структуре и ретенције (енгл. *Quantitative Structure-Retention Relationships - QSRR*) у одређеном хроматографском систему веома су важни, јер се њиховом применом могу одредити дескриптори који имају највећи утицај на одређену карактеристику једињења. Овакве компјутерске методе користе податке добијене у *in vitro* или *in vivo* испитивањима, како би се на основу њих формирали погодни математички модели. Значај наведених модела огледа се у томе што се њиховим тумачењем могу добити подаци о томе на који начин треба изменити структуру тестираних једињења како би се побољшала одређена особина молекула. На овај начин је могуће добити информације како треба усмерити даљу синтезу нових једињења, што омогућава уштеду времена и материјала.

Формирање модела обухвата укупно три корака. Први корак подразумева израчунавање термодинамичких, геометријских, физичко-хемијских и електронских молекулских дескриптора. У другом кораку се спроводи формирање модела употребом погодних статистичких метода. Последњи корак обухвата валидацију модела и процењује се могућност примене формираног модела како би се могла дизајнирати нова једињења која поседују оптималне особине (156,157).

1.8.1. Избор молекулског сета података

Приликом спровођења QSPR и QSRR анализе неопходно је одабрати погодан број једињења. Није практично тестирати превелики број једињења, док мали број једињења доводи у сумњу поузданост модела. Сва тестирана једињења се сврставају у две групе. Једну групу молекула чини тренинг сет на основу ког се формира модел, док се друга група назива тест сет којим се процењује могућност предвиђања испитиване особине једињења (валидација модела). Уколико је број једињења у тренинг сету премали, може доћи до формирања погрешног модела, док се проблем са превеликим бројем једињења у тренинг сету може решити поделом на неколико мањих сетова (158).

1.8.2. Молекулски дескриптори

Молекулски дескриптори представљају резултат математичког прорачуна којим се врши квантификација информација о структури молекула и њихово превођење у нумеричке вредности. Овакви дескриптори се називају теоријски дескриптори. Са друге стране, експериментални дескриптори представљају резултат експерименталног истраживања. Постоји више начина поделе дескриптора. Једна од најважнијих подела је на основу димензионалности дескриптора, при чему се могу поделити на нулте (0D), једнодимензионалне (1D), дводимензионалне (2D), тродимензионалне (3D) и

четвородимензионалне (4D) дескрипторе. Од значаја су они дескриптори који се могу интерпретирати, односно, они који утичу на неку од физичко-хемијских, биолошких особина или на активност (159).

1.8.3. Статистичке методе за формирање QSPR и QSRR модела

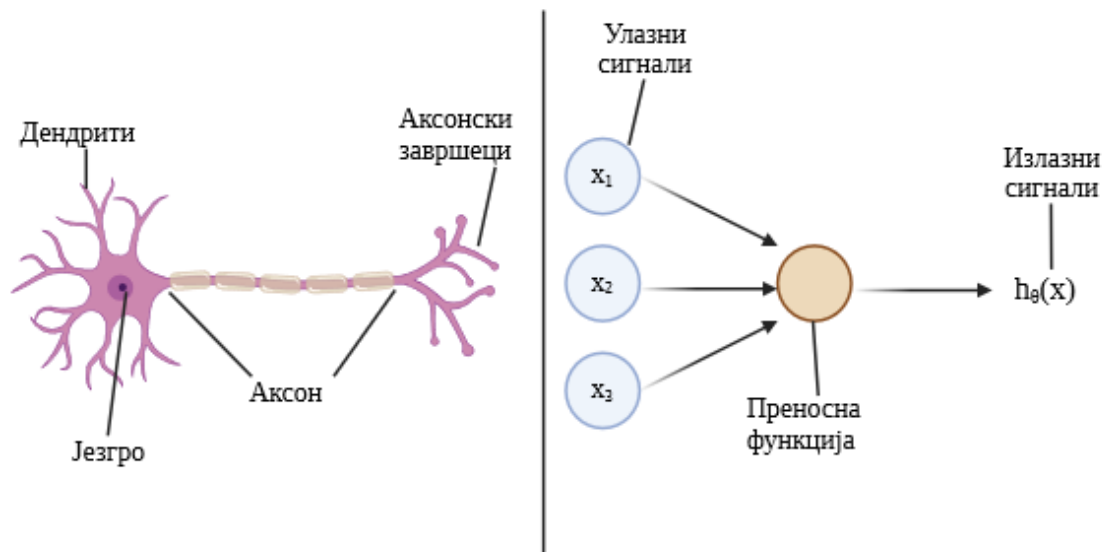
Једна од најчешће коришћених метода за формирање QSPR и QSRR модела је мултипла линеарна регресија (енгл. *Multiple Linear Regression* - MLR). Применом ове методе може се наћи линеарна зависност између зависне варијабле (ретенција или пермеабилност) и независних варијабли (дескриптори). Главна предност ове методе огледа се у томе што омогућава формирање поузданих модела од релативно малог броја молекулских дескриптора. Када се користи ова метода, број дескриптора не сме знатно да премашу број тестираних једињења. Методе које се користе за избор најпогоднијег сета дескриптора су поступна мултилинеарна регресија (MLR), генетски алгоритми и анализа главних компоненти (енгл. *Principal Component Analysis* - PCA) (160).

Метода парцијалних најмањих квадрата (енгл. *Partial Least Squares* - PLS) развијена је како би се превазишли проблеми приликом моделовања сета података где није могуће применити MLR метод. Овај приступ је погодан у ситуацијама када се анализирају подаци са великим бројем независних варијабли (X), подаци који су непотпуни или колинеарни. Предност ове методе огледа се у томе што је могуће у исто време моделовати више зависних променљивих (Y). Утицај израчунатих дескриптора на зависну варијаблу процењује се на основу вредности VIP (енгл. *Variable Importance in the Projection*). Дескриптори се могу поделити према значајности према зависној варијабли на:

- најзначајније дескрипторе $VIP > 1$,
- умерено значајне дескрипторе $0,5 < VIP < 1$ и
- безначајне дескрипторе $VIP < 0,5$.

Након што су VIP вредности израчунате за сваки од дескриптора, дескриптори са најнижим VIP вредностима се постепено уклањају из модела (161).

Вештачке неуронске мреже (енгл. *Artificial Neural Networks* - ANN) представљају групу статистичких метода које су дизајниране по узору на начин обраде и преноса података који се врши у људском мозгу. Оваквом методом симулира се велика количина међусобно повезаних неурона, чиме је омогућено препознавање шаблона, учење појмова и извођење закључака слично људском мозгу. Главни делови сваког неурона су тежински улаз (енгл. *weight input*), преносна функција (енгл. *transfer function*) и излаз (енгл. *output*) (Слика 19). Улазни сигнали умножавају се тежинским факторима везе, а затим се сабирају. Након тога, сигнали пролазе кроз преносну функцију, а читав процес се завршава излазним сигналом за тај неурон. Тежински фактори везе подлежу променама зависно од искуства, што чини неуронске мреже способним за учење и адаптацију. Овај део неуронских мрежа је кључан за адаптацију модела одређеној групи података зато што се после сваког израчунавања мењају њихове вредности. У тренутку када улазни подаци не изазивају промене тежинских фактора мрежа се сматра обученом за решавање одређеног проблема. Преносна функција је углавном сигмоидална. Пре него што се формирају одговарајући модели, испитивана једињења се деле у три групе и то: тренинг сет (користи се за формирање модела), верификациони сет (користи се за праћење карактеристика мреже и процес тренирања) и тест сет (користи се за проверу квалитета мреже) (162).



Слика 19. Сличност у структури хуманог (лево) и ANN неурона (десно)

1.8.4. Валидација QSPR и QSRR модела

Валидација модела представља кључни корак у процени ефикасности формираног модела. Наиме, валидација је процедура којом се проверавају квалитет и способност предвиђања формираних QSPR и QSRR модела. Статистички параметри којима се врши валидација формираних модела јесу RMSEE (енгл. *Root Mean Square Error of Estimation*), RMSEP (енгл. *Root Mean Square Error of Prediction*), R^2 (коэффициент детерминације), F-однос, p-вредност (ниво значајности F односа), Q^2 (интерни валидациони параметар), r (коэффициент корелације предвиђених и експерименталних вредности зависне варијабле једињења тест сета) и R^2_{pred} (екстерни валидациони параметар).

RMSEE је грешка предвиђања модела за тренинг сет, док је RMSEP грешка предвиђања за тест сет и верификациони сет. Q^2 представља интерни валидациони параметар који се израчунава применом LOO (енгл. *leave-one-out*) укрштеном валидацијом, где се свако једињење из тренинг сета елиминише по једном, док се од осталих формира модел. Q^2 је параметар који се користи за процену способности предвиђања QSPR и QSRR модела код једињења сличним тренинг сету, док се за једињења која се структурно разликују од тренинг сета користи параметар R^2_{pred} . Када су Q^2 и R^2_{pred} већи од 0,5 сматра се да модели имају добру моћ предвиђања. Поред тога што добар модел карактеришу високе вредности параметара Q^2 и R^2_{pred} , формиран модел би морао да има и високе вредности корелације између предвиђених и експерименталних вредности одређених зависних варијабли тест сета. F-однос се користи за процену статистичке значајности модела, а p-вредност указује на ниво значајности F-односа. Статистички значајним сматрају се они модели код којих је $p < 0,05$ (163,164).

1.9. Начини испитивања биолошке активности потенцијално фармаколошки активних једињења

1.9.1. *In vivo* испитивање антиинфламацијске активности

Инфламацијске болести су глобално дефинисане као један од главних узрочника морбидитета у општој популацији. Стања праћена инфламацијом су повезана са прекомерном активацијом имунолошког система укључујући активирани хелије имунолошког система и биомолекуле. Акутни инфламацијски одговор се карактерише појавом црвенила, топлоте, отока, бола и поремећајем функције ткива услед повећане васкуларне пермеабилности и хиперсензитивности периферних нерава (165,166). Проналазак безбедног и ефикасног лека за терапију инфламације представља велики изазов, па су зато развијени бројни анимални модели за процену антиинфламацијских својстава нових молекула. Избор адекватног анималног модела за претклиничко испитивање може бити кључни корак у утврђивању ефикасности и механизма дејства лекова. Иако су доступни бројни *in vivo* и *in vitro* модели за испитивање потенцијалних антиинфламацијских лекова, неодговарајући избор анималног модела може довести до лажно позитивних или лажно негативних резултата што може узроковати неадекватну селекцију једињења за даље испитивање на људима (165). С обзиром на то да постоје три фазе у развоју инфламацијског одговора (акутна, субакутна и хронична), развијени су и одговарајући анимални модели у складу са наведеним стадијумима који су наведени у Табели 2.

Табела 2. Експериментални анимални модели за испитивање антиинфламацијске активности

Фаза инфламације	Врста анималног модела
Акутна фаза (вазодилатација, повећана пермеабилност крвних судова и последична ексудација течности)	<ul style="list-style-type: none">▪ Едем шапе пацова изазван карагенаном▪ Едем ува пацова или мишева изазван кротонским уљем▪ Еритем код замораца изазван UV зрачењем▪ Модел едема плућа код пацова
Субакутна фаза (инфилтрација леукоцита и фагоцита)	<ul style="list-style-type: none">▪ Модел гранулома▪ Модел повећане васкуларне пермеабилности▪ Модел едема ува пацова изазван оксазолоном
Хронична фаза (формирање гранулома)	<ul style="list-style-type: none">▪ Модел гранулома изазван памучном ватом▪ Модел гранулома изазван стакленим штапићем▪ Модел имплантације сунђера

Модел едема шапе изазван карагенаном често се користи за процену антиинфламацијске активности како природних тако и синтетских супстанци. Карагенан је неантигенска флогистичка супстанца без значајнијих системских ефеката. Сулфоновани угљени хидрати присутни у карагенану одговорни су за активацију

система комплемента и ослобађање проинфламацијских цитокина. Стимулација активности фосфолипазе A₂ карагенаном иницира рану фазу инфламације, док су цитокини одговорни за даљи развој упале. Карагенан изазива дилатацију посткапиларних венула што узрокује ексудацију инфламацијске течности и ћелија. Сви наведени догађаји представљају рану ексудативну фазу инфламације и њеном инхибицијом се може завршити инфламацијски процес. Модел карагенаном изазване инфламације повезан је са активацијом циклооксигеназног пута. Едем који је изазван карагенаном представља двофазни процес. У првој фази долази до трауме ткива услед убризгавања супстанце и ослобађања медијатора акутне фазе инфламације. За другу фазу, која се јавља око три сата након инјекције карагенана, одговорно је ослобађање простагландина (167-169).

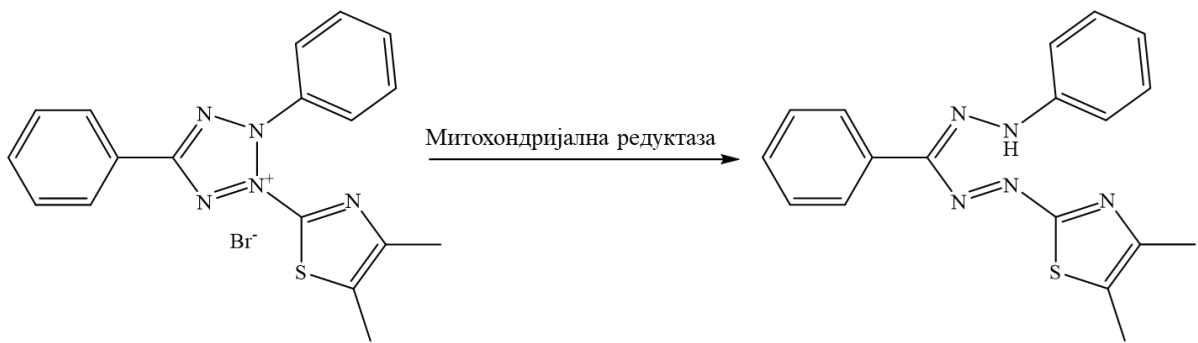
1.9.2. *In vitro* испитивање ензимске инхибиције

In vitro испитивање ензимске инхибиције омогућава истовремено испитивање великог броја једињења пре било каквог *in vivo* испитивања, као и процену потенцијалног механизма дејства фармаколошки активних једињења. Постоји мноштво различитих врста модела који подразумевају примену разних типова ћелија попут ћелија крви, хрскавице или аорте (170). Међутим, данас се ова врста испитивања углавном спроводи на изолованим пречишћеним или рекомбинантним формама ензима. Значајно поузданији резултати се добијају применом комерцијално доступних китова којима се повећава прецизност у процени инхибиторног потенцијала према одређеној врсти ензима. Китови су нарочито погодни када се испитује селективност новосинтетисаних једињења према одређеној изоформи ензима (171).

1.9.3. *In vitro* испитивање цитотоксичне активности

Хемиотерапија цитотоксичним лековима представља један од најчешћих принципа лечења појединих врста тумора. Од велике је важности пре примене код пацијената обезбедити да хемиотерапеутски лекови буду снажни и ефикасни. *In vitro* тестови за испитивање цитотоксичности на одређеним ћелијским линијама развијени су за брзу процену цитотоксичне активности више испитиваних једињења истовремено. Ови тестови су такође корисни и за одређивање осетљивости различитих ћелијских линија на дејство више цитотоксичних агенаса (172).

МТТ ((3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)2,5-дифенил тетразолијум бромид) тест представља једну од најчешће коришћених *in vitro* метода за мерење преживљавања/пролиферације ћелија. Ова врста теста се успешно користи за мерење цитотоксичности посредоване макрофагима. МТТ тестом се цитотоксични ефекат испитиваног једињења процењује поређењем интензитета боје коју дају ћелије излагане само медијуму и ћелије излагане испитиваној супстанци. МТТ представља кристалну супстанцу жуте боје која лако пролази кроз ћелијску мембрану и која се у метаболички активним ћелијама редукује до љубичастих кристала формаза (Слика 20) под утицајем митохондријалне редуктазе која је активна само у живим ћелијама (173).



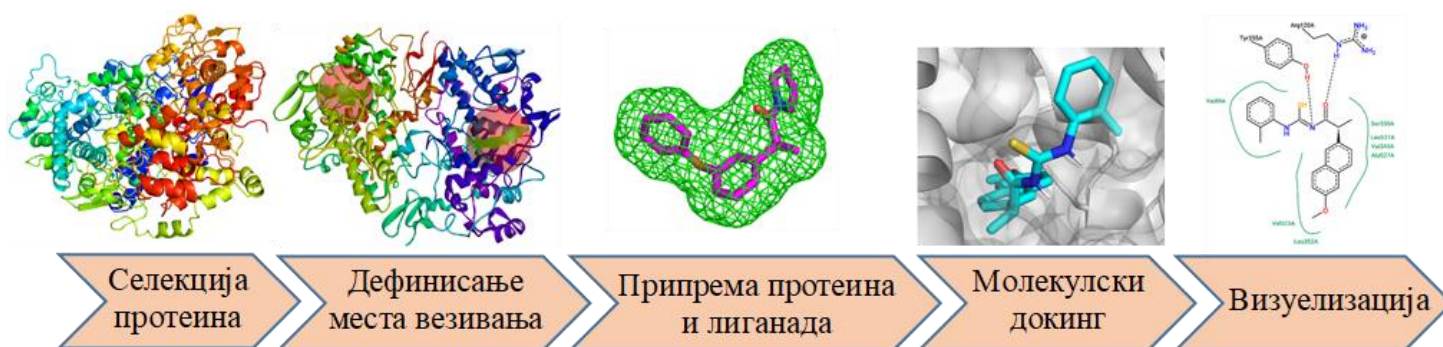
Слика 20. Реакција редукције МТТ до формазана

Процент цитотоксичности испитиваног једињења израчунава се коришћењем једначине која узима у обзир популацију нетретираних ћелија као негативну контролу, а гласи:

$$\% \text{ цитотоксичности} = \frac{\text{1-апсорбанција експерименталног одељка}}{\text{апсорбанција одељка негативне контроле}} \times 100$$

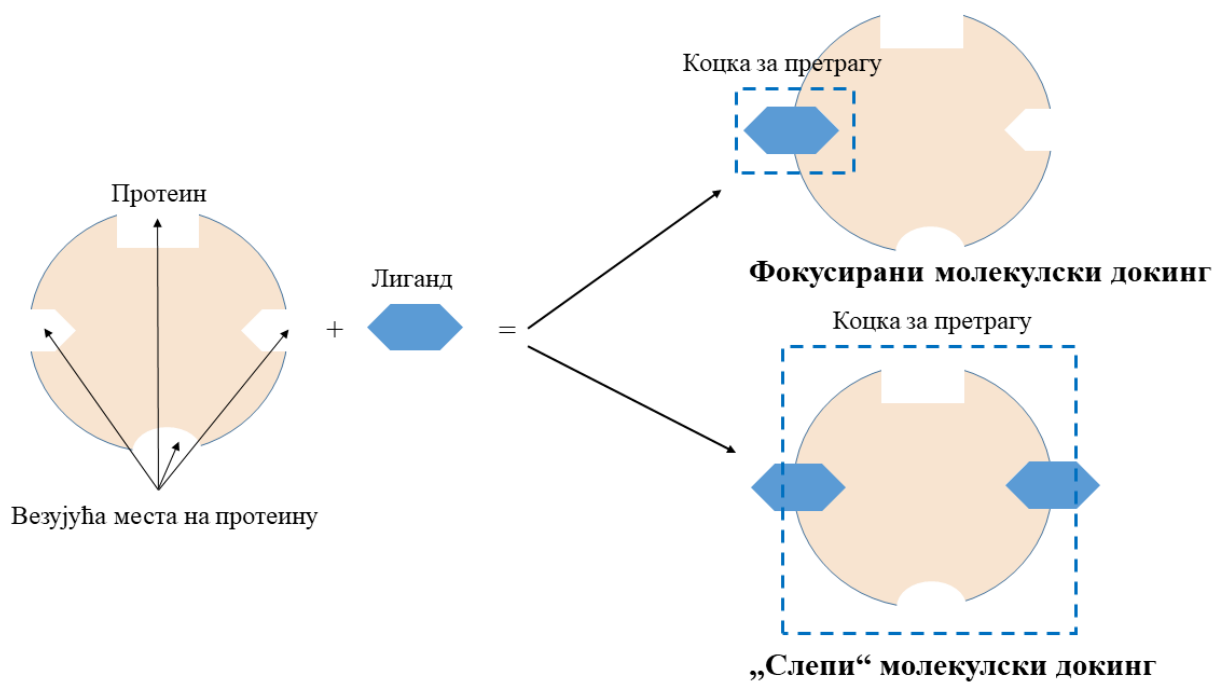
1.10. Студије молекулског уклапања (докинга)

Биоинформатичке методе представљају посебну област биологије која се базира на употреби компјутерских метода у испитивању биолошких система, при чему могу да пруже прецизна предвиђања која би могла добити своју потврду у лабораторијским и клиничким студијама (174). Увођење биолошких компјутерских метода довело је до праве револуције у науци, омогућавајући биомедицинским истраживачким центрима да значајно смање трошкове лабораторијских експеримената на анималним моделима (175,176). Студије молекулског докинга постале су интегрални део *in silico* развоја нових лекова последњих година (177,178). Ова компјутерска симулација омогућава прецизно предвиђање интеракција између малог молекула и циљаног протеина на атомском нивоу, што даље пружа могућност детаљног испитивања понашања малих молекула у оквиру везујућег места циљаног макромолекула. Приступ молекулског докинга се широко користи у оквиру дизајна лекова заснованог на структури (енгл. *Structure-Based Drug Design*), при чему захтева доступност тродимензионалних структура протеина добијених техникама рендгенске кристалографије, нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије и крио-електронске микроскопије (179). Битна предност ове *in silico* методе огледа се у могућности виртуелног скрининга великог броја хипотетичких, синтетичких (180) и молекула из природних извора (181) са циљем да се идентификује једињење које остварује најбољу интеракцију са циљаним протеином (енгл. *lead compound*). Метод молекулског уклапања заснива се на покушајима да се испитивано једињење у различитим просторним оријентацијама (позама) веже за одређени део циљаног протеина, при чему је главни циљ ове *in silico* методе да се предвиди највероватнија конформација испитиваног молекула, при којој се гради најстабилнији комплекс лиганд-рецептор са најмањом израчунатом енергијом везивања (182). Поред израчунате енергије везивања (енгл. *docking score*), у оквиру анализе молекулског уклапања идентификују се и оне интермолекулске нековалентне интеракције које имају највећу улогу у стабилизацији лиганд-рецептор комплекса (Слика 21). Коначно, на основу интеракција и стабилности добијеног комплекса може се предвидети афинитет испитиваног молекула за циљани протеин, а самим тим и биолошка активност (183).



Слика 21. Основни кораци у процесу молекулног докинга

Најпознатија класификација молекулног докинга односи се на флексибилност лиганда и протеина, при чему разликујемо ригидно, семи-флексибилно и флексибилно молекулно уклапање (184). Ригидно молекулно уклапање подразумева позиционирање испитиваног молекула у својој стабилној конформацији у везивно место протеина без промене конформације лиганда и циљаног протеина током симулације. Овакав приступ се најчешће користи када желимо да извршимо брзу претрагу великих база биоактивних молекула или када спроводимо протеин-протеин докинг (185). У флексибилном докинг протоколу који се још назива и индуковано уклапање (енгл. *induced fit*), лиганд и аминокиселине активног места циљаног протеина могу да слободно мењају своју конформацију заузимајући различите просторне оријентације при грађењу најстабилнијег лиганд-протеин комплекса са најнижом енергијом везивања. Примена овог типа молекулног уклапања је ограничена због неопходности примене комплексних рачунарских система и великог утрошка времена које је потребно да се заврши израчунавање параметара молекулног докинга (186). Далеко најчешће коришћени модалитет везивања јесте семи-флексибилни докинг протокол у коме вршимо спајање конформационо флексибилног лиганда у активно место конформационо ригидног протеина (187). Највећи број докинг метода заснива се на молекулском уклапању испитиваног молекула у тачне координате већ познатог везујућег места на циљаном протеину, па у том случају говоримо о фокусираном молекулском докингу. Са друге стране тзв. „слепи“ докинг подразумева претрагу целокупне површине протеина у потрази за новим непознатим местима везивања (Слика 22) (188).



Слика 22. Илустрација фокусираног и „слепог“ молекулског докинга

Приликом спровођења студија молекулског уклапања користе се различити алгоритми који врше одабир најповољније оријентације испитиваног молекула при везивању за циљни протеин. Поменути алгоритми заснивају се на параметрима процене и називају се функције вредновања које одређују квалитет добијене позе тј. колико је енергетски повољна оријентација испитиваног молекула (189). Спроведена докинг студија пружа информације о структури лиганд-протеин комплекса, његовој стабилности, о мутацијама циљаног маркомолекула које би могле довести до грађења стабилнијег комплекса, као и структурним променама испитиваног молекула које би могле довести до оптимизације интеракције лиганд-рецептор. Тачност предвиђања докинг резултата зависи од више фактора који укључују квалитет кристалне структуре циљаног протеина, предвиђање интеракција растварача и окружења, одабир алгоритма за претраживање конформационог простора, одабир функције вредновања и многе друге факторе који се бирају током извођења *in silico* експеримента (190).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

А) ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Синтетисати тиоуреидне деривате напроксена.
2. Спровести физичко-хемијску карактеризацију новосинтетисаних једињења (структурна анализа и одређивање параметара липофилности).
3. Проценити пасивну гастроинтестиналну апсорпцију новосинтетисаних једињења.
4. Спровести QSPR и QSRR анализу добијених резултата у циљу дефинисања структурних карактеристика новосинтетисаних једињења које имају највећи утицај на пасивну гастроинтестиналну апсорпцију.
5. Испитати *in vivo* антиинфламацијску активност новосинтетисаних једињења.
6. Испитати *in vitro* цитотоксичну активност новосинтетисаних једињења.

Б) ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

1. Реакцијом напроксена, калијум-тиоцијаната и једињења са аминокиселине и ароматични амини) настају тиоуреидни деривати напроксена.
2. RP-TLC и RP-HPLC представљају поуздане замене за традиционалну *shake-flask* методу при одређивању параметара липофилности новосинтетисаних једињења.
3. Од структуре изабраних естара аминокиселина и ароматичних амина, који ће бити употребљени у синтези, зависи степен пасивне гастроинтестиналне апсорпције новосинтетисаних једињења.
4. Неки од новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена показују снажнији антиинфламацијски ефекат у поређењу са напроксеном.
5. Неки од новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена показују снажнији цитотоксични ефекат према туморским ћелијским линијама у односу на ћелије хуманог фибробласта.
6. Неки од новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена индукују апоптозу туморских ћелија.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Синтеза и структурна карактеризација тиоуреидних деривата напроксена

Синтеза тиоуреидних деривата напроксена спроведена је применом тростепеног поступка, а који је описан у претходно објављеним публикацијама (64,191). Први корак подразумева растварање 250 mg *S*-напроксена (1,09 mmol) у 5 ml дихлорметана (CH₂Cl₂) на собној температури, након чега је 186 μL оксалил-хлорида (2,17 mmol) додато у капима уз три капи DMF-а, што представља каталитичку количину неопходну да би се реакција десила. Након тога је реакциона смеша остављена да се меша на собној температури током три сата, а затим упарена до сува на вакуум упаривачу како би се добио чист напроксеноил-хлорид. У другом кораку је 125 mg напроксеноил-хлорида (0,5 mmol) растворено у 3,5 ml анхидрованог ацетона и у капима додато претходно припремљеној суспензији 48,59 mg калијум-тиоцијаната (0,5 mmol) у 3,5 mL ацетона. Добијена реакциона смеша је постављена на вертикални кондензатор уз мешање и загревање како би се обезбедио рефлукс у трајању од једног сата. Последњи (трећи) корак подразумева додавање раствора одговарајућег ароматичног амина или естра аминокиселине у реакциону смешу. Једињења **1-5** и **8-12** синтетисана су додатком раствора 0,5 mmol ароматичног амина у 3,5 ml анхидрованог ацетона у реакциону смешу добијену у другом кораку. Са друге стране, деривати **6, 7, 13** и **14** добијени су додатком еквимоларне количине триетиламина (TEA) у суспензију 0,5 mmol хидрохлоридне соли одговарајућег естра ароматичне аминокиселине у 3,5 ml анхидрованог ацетона, након чега је добијена смеша профильтрирана и додата у реакциону смешу из другог корака. Крајња реакциона смеша је рефлугована током три сата, након чега је остављена да упари до сува на собној температури.

Добијени производи су пречишћени применом препаративне хроматографије на танком слоју (енгл. TLC - *Thin-Layer Chromatography*). Као мобилна фаза за препаративну TLC коришћен је хлороформ (за пречишћавање деривата ароматичних амина) и смеша хлороформ/метанол у односу 99:1 v/v (за пречишћавање деривата естара ароматичних аминокиселина). Једини изузетак представљало је пречишћавање једињења **11**, где је као мобилна фаза коришћен систем дихлорметан/метанол у односу 99:1 v/v.

Према наведеној процедури синтетисани су следећи деривати:

(*S*)-*N*-((4-флуорофенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид (дериват **1**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 55,56 mg *p*-флуороанилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-((4-метоксифенил)карбамотиоил)пропанамид (дериват **2**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 61,58 mg *p*-метоксианилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-*N*-((4-етоксифенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид (дериват **3**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 68,59 mg *p*-етоксианилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-((3-метоксифенил)карбамотиоил)пропанамид (дериват **4**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 61,58 mg *m*-метоксианилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-*N*-((4-ацетилфенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид (дериват **5**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 67,58 mg *p*-аминоацетофенона и 125 mg напроксеноил-хлорида.

Етилестар(((*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)-*L*-фенилаланина (дериват **6**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 114,86 mg етилестра фенилаланина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

Метилестар-*N*^α-(((*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)-1-метилтриптофана (дериват **7**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 134,37 mg метилестра *N*-метилтриптофана и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-(фенилкарбамотиоил)пропанамид (дериват **8**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 46,57 mg анилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-(*p*-толуилкарбамотиоил)пропанамид (дериват **9**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 53,58 mg *p*-метиланилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-(*o*-толуилкарбамотиоил)пропанамид (дериват **10**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 53,58 mg *o*-метиланилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-((2-метоксифенил)карбамотиоил)пропанамид (дериват **11**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 61,58 mg *o*-метоксианилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

(*S*)-*N*-((2-флуорофенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид (дериват **12**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 55,56 mg *o*-флуороанилина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

Метилестар(((*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)фенилаланина (дериват **13**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 107,84 mg метилестра фенилаланина и 125 mg напроксеноил-хлорида.

Метилестар(((*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)триптофана (дериват **14**) - синтетисан претходно описаним тростепеним поступком уз употребу 127,36 mg метилестра триптофана и 125 mg напроксеноил-хлорида.

Тачке топљења новосинтетисаних једињења одређене су методом тренутног топљења применом уређаја *Voetius PHMK 05* (Radebeul, Немачка) опремљеним дигиталним термометром.

NMR (енгл. *Nuclear Magnetic Resonance*) спектри (¹H и ¹³C) снимљени су применом уређаја *BRUKER ADVANCE III 400* (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Немачка). Новосинтетисана једињења су растворена у DMSO-у, док су хемијска померања одређивана поређењем са тетраметилсиланом као интерним стандардом.

Инфрацрвени (енгл. *Infrared* - IR) спектри снимљени су применом ATR-FTIR (енгл. *The Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

спектрофотометра *Nicolet iS10* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Madison, WI, САД). Примењена је метода атенуисане рефлексије уз употребу АТР модула SMART iTR опремљеног дијамантским кристалом. Рачунарски програм *OMNIC 8.0* коришћен је за обраду снимљених спектра.

MS-MS фрагментација спроведена је применом UHPLC-MS-MS система опремљеним UHPLC течним хроматографом *ACCELA* (*Thermo Scientific Inc.*, Madison, WI, САД) и триплквруполским масеним детектором (*Thermo Scientific Inc.*, Madison, WI, САД). Употребљена је електроспреј јонизација са загревањем, при чему су изоловани јони у позитивном моду. Рачунарски софтвер *Xcalibur 1.2* (*Thermo Fisher Scientific*, San Jose, САД) примењен је за обраду добијених резултата.

Течни хроматограф спрегнут са масеним детектором тачних маса *LTQ Orbitrap XL* (*Thermo Scientific Inc.*, Madison, WI, САД) коришћен је за одређивање тачних маса новосинтетисаних деривата напроксена. Јони су детектовани у позитивном моду применом електроспреј јонизације са загревањем.

3.2. Испитивање липофилности новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена

3.2.1. *In silico* предвиђање липофилности

Партициони коефицијент ($\log P$) може се одредити експериментално, а може се и израчунати применом различитих рачунарских програма. За израчунавање липофилности коришћено је неколико софтверских пакета који користе алгоритме засноване на различитим методама фрагментације, па се вредности добијене за исто једињење могу међусобно значајно разликовати. Шест различитих параметара липофилности ($i\log P$, $x\log P3$, $w\log P$, $m\log P$, *SILICOS-IT*, *Consensus logP*) одређено је употребом *SwissADME* веб сервера (192). *MilogP* вредност израчуната је применом *Molinspiration* веб софтвера (193). Преостале две $\log P$ вредности одређене су помоћу *MarvinSketch* ($\log P$) и *ChemDes* ($\log P$ по *Kripen-y*) софтвера (194,195). Све врсте партиционих коефицијената добијене на овај начин су касније корелисане са експериментално одређеним параметрима липофилности у циљу утврђивања модела који најпоузданије може предвидети липофилност испитиваних једињења.

Принципи израчунавања одређених типова $\log P$ вредности:

- $i\log P$ - метод заснован на израчунавању слободне енергије солватације у *n*-октанолу и води израчунате помоћу модела површине доступне растварачима,
- $x\log P3$ - предиктивни модел који користи атомистички метод који узима у обзир корективне факторе,
- $w\log P$ - имплементација *SwissADME* система заснована на принципу фрагментације молекула,
- $m\log P$ - тополошки метод који поседује линеарну повезаност са 13 молекулских дескриптора,
- *SILICOS-IT* - хибридни (фрагментни/тополошки) метод који је потпомогнут са 27 фрагмената и седам тополошких дескриптора. Израчунавање се врши помоћу *FILTER-IT* програма,
- *Consensus logP* - просечна вредност пет претходно наведених предиктора,
- *MilogP* - одређује се на основу вредности хидрофобности 35 малих једноставних фрагмената и за 185 већих фрагмената, а које описују утицај интрамолекулских водоничних веза и јонских интеракција на $\log P$ вредност,

- *MarvinSketch* ($\log P$) - заснива се на фрагментацији молекула, при чему је једнак простом збиру предвиђених вредности за сваки неводоников атом у молекулу и
- *ChemDes* ($\log P$ по *Krippen-y*) - метод заснован на утицају атомске и молекулске рефрактивности на вредност партиционог коефицијента.

3.2.2. Одређивање партиционог коефицијента у систему *n*-октанол/вода применом *shake-flask* методе

Липофилност (хидрофобност) је термин који су увели *Fujita, Iwasa* и *Hansch* 1964. године (196), а користи се за описивање интеракција хемијских једињења са неполарним (мастима) и поларним (водом) растварачима. Кретање лека кроз организам најприближније одговара његовој расподели између *n*-октанола и воде. Хидрофобност, односно, липофилност се може изразити преко партиционог коефицијента ($\log P$ вредности). Логаритамска вредност партиционог коефицијента се дефинише као логаритам односа концентрације испитиване супстанце у обе фазе засићеног двофазног система који се састоји из *n*-октанола и воде (196)

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_w} \quad (1)$$

где је:

C_o - концентрација компоненте у *n*-октанолу и

C_w - концентрација компоненте у води, када је систем у равнотежи.

У случају да испитивана супстанца јонизује у воденој фази, у том случају C_w је концентрација недисосованог облика испитиване компоненте у води.

Традиционална метода за одређивање липофилности, односно $\log P$ вредности молекула, је *shake-flask* метода. Метода се огледа у томе што се позната концентрација испитиване супстанце (аналита) унесе у одређену количину *n*-октанола и воде и након расподеле анализата између две фазе његова концентрација у свакој фази се одређује одабраном методом (спектрофотометријом, HPLC-ом, гасном хроматографијом) (197). Метода има и одређене недостатке, као што су лоша репродуктивност, дужина трајања експеримента и немогућност примене на веома хидрофилним или веома липофилним супстанцама (198,199).

3.2.2.1. Одређивање партиционог коефицијента напроксена

Одређивање партиционог коефицијента напроксена је спроведено применом традиционалне *shake-flask* методе у систему *n*-октанол/вода (pH=3). Концентрација напроксена након расподеле у систему *n*-октанол/вода одређивана је спектрофотометријском методом. Да би се одредила концентрација напроксена у *n*-октанолу неопходно је припремити серију стандардних раствора познате концентрације напроксена. Серија стандардних раствора служи да се, након читавања њихове апсорбанције на спектрофотометру, конструише калибрациона крива која показује зависност између апсорбанције и концентрације напроксена у раствору. За конструисање калибрационе криве направљена је серија раствора познатих концентрација напроксена (од 0,1 mg/ml до 0,2 mg/ml) у *n*-октанолу и сваком раствору је измерена апсорбанција на таласној дужини $\lambda = 332$ nm. На основу вредности измерене

апсорбанције серије раствора познатих концентрација напроксена конструисана је калибрациона крива.

Полазни раствор напроксена припремљен је растварањем 5 mg напроксена у 10 ml *n*-октанола како би се добио раствор концентрације 0,5 mg/ml. Одређивање липофилности је спроведено у систему растварача (*n*-октанол/вода (pH=3) у односу 1:300 v/v) у коме је додата тачно одређена количина напроксена (0,15 mg/ml, 0,2 mg/ml и 0,3 mg/ml). Две фазе система растварача су претходно засићене на собној температури (25°C). Систем растварача и напроксена је мешан на механичком шејкеру (*GFL Reciprocating Motion Shaker 3006*) током два сата на 200 грм. Након мешања, систем је остављен да стоји 24 часа у левку за одвајање на собној температури како би дошло до јасног раздвајања фаза. У издвојеној фази *n*-октанола анализирана је концентрација напроксена мерењем апсорбанције на таласној дужини $\lambda=332$ nm UV/VIS *BioTech Epoch Microplate* спектрофотометром (California, САД).

3.2.2.2. Одређивање партиционог коефицијента испитиваних једињења

Одређивање партиционог коефицијента испитиваних једињења је спроведено у систему *n*-октанол/вода. За конструисање калибрационе криве направљена је серија раствора познатих концентрација испитиване супстанце (од 0,01 mg/ml до 0,035 mg/ml) у *n*-октанолу и сваком раствору је измерена апсорбанција на таласној дужини $\lambda = 320$ nm. Полазни раствор испитиване супстанце припремљен је растварањем 5 mg испитиваног једињења у 10 ml *n*-октанола, како би се добио раствор концентрације 0,5 mg/ml. За одређивање липофилности испитиваног једињења коришћен је систем растварача (*n*-октанол/вода у односу 1:500 v/v) у коме је додата тачно одређена количина испитиване супстанце (0,02 mg/ml, 0,03 mg/ml и 0,04 mg/ml). Систем растварача претходно је засићен на собној температури (25°C). Тако засићен систем растварача, коме је додата тачно одређена количина испитиване супстанце, мешан је на механичком шејкеру (*GFL Reciprocating Motion Shaker 3006*) током два сата на 200 грм. Након мешања, систем је остављен да стоји 24 часа у левку за одвајање на собној температури како би дошло до јасног раздвајања фаза. Након раздвајања фаза, UV/VIS *BioTech Epoch Microplate* спектрофотометар (California, САД) је коришћен за мерење апсорбанције испитиване супстанце која се налази у *n*-октанолу (*n*-октанол/вода) на таласној дужини $\lambda=320$ nm (200,201).

$\log P$ вредност је израчуната према једначини:

$$\log P = \log C_O - \log C_W \quad (2)$$

где је:

C_O - количинска концентрација испитиваног једињења у *n*-октанолу и

C_W - количинска концентрација испитиваног једињења у води.

C_W се израчунава према једначини:

$$C_W = C_{O(b)} - C_O \quad (3)$$

где је:

$C_{O(b)}$ - количинска концентрација испитиваног једињења у *n*-октанолу пре мућкања и

C_O - количинска концентрација испитиваног једињења у *n*-октанолу након мућкања.

3.2.3. Испитивање липофилности применом RP-TLC методе

Хроматографско понашање новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена и полазног лека испитано је применом реверзно-фазних C-18 силика гел плоча за TLC. Раствори испитиваних једињења припремљени су од претходно направљених штокова чија је концентрација 2 mg/ml, са DMSO као растварачем. Одмерено је 0,05 ml штока и разблажено са метанолом до 1 ml како би се добила радна концентрација растворене супстанце од 0,1 mg/ml. Добијени раствор се затим наноси на RP-TLC плочу у запремини од 2 μ l. Мобилне фазе коришћене за испитивање липофилности наведене су у Табели 3.

Табела 3. Мобилне фазе коришћене за испитивање липофилности RP-TLC методом

Мобилна фаза	Састав
I	ацетонитрил/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v)
II	ацетон/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v)
III	тетрахидрофуран/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v)
IV	апсолутни етанол/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v)
V	пропанол/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v)

Детекција положаја испитиваних једињења након спроведене хроматографије вршена је помоћу UV лампе на таласној дужини од 254 nm. Хроматографски параметри израчунати су према следећим једначинама:

$$R_F = \frac{l}{l_0} \quad (4)$$

где је:

l - растојање између старта и центра зоне која одговара испитиваном једињењу и
 l_0 - растојање између старта и фронта мобилне фазе.

$$R_M = \log \left[\left(\frac{1}{R_F} \right) - 1 \right] \quad (5)$$

За испитивана једињења израчунате су R_M вредности које су корелисане са примењеним процентима органског растварача. Корелација између параметра R_M и удела органског растварача у мобилној фази одређена је применом *Soczewinski-Wachtmeister*-ове једначине (141).

$$R_M = R_M^0 + S \cdot C \quad (6)$$

Када се изврши екстраполација праве која представља зависност R_M од удела органског растварача на у-осу добија се R_M^0 параметар (одсечак на у-оси). Ова вредност представља R_M испитиваног једињења у хроматографском систему сачињеном од воде, без присуства органског растварача у мобилној фази. Као параметри липофилности користе се још и вредности S и C_0 . Параметар S представља нагиб праве која показује зависност R_M вредности од удела органског растварача. C_0 се дефинише као процентни удео органског растварача у мобилној фази када је расподела између две фазе једнака, а израчунава се према следећој једначини (202):

$$C_0 = -\frac{R_M^0}{S} \quad (7)$$

3.2.4. Испитивање липофилности применом RP-HPLC методе

Испитивање липофилности RP-HPLC методом спроведено је на *Agilent 1200* хроматографу (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, САД) уз употребу *Zorbax Eclipse Plus C8* (150 × 4,6 mm, 5 μm) колоне. Као мобилне фазе коришћене су смеше ацетонитрила и пуфера рН = 5,5, ацетонитрила и пуфера рН = 7,4 и ацетонитрила и воде у односима 50:50, 60:40, 70:30 и 80:20 v/v. Радни раствори испитиваних једињења припремљени су од полазних штокова у којима су синтетисана једињења растворена у DMSO, при чему је њихова концентрација износила 2 mg/ml. Радна концентрација раствора од 0,1 mg/ml добијена је разблаживањем штокова метанолом. Раствор сваког испитиваног једињења је инјектован у дупликату.

Одређивање липофилности RP-HPLC методом базира се на израчунавању ретенционих времена испитиваних једињења на основу којих се може одредити ретенциони фактор (k) према једначини:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (8)$$

где је:

t_R - ретенционо време испитиване супстанце и

t_0 - мртво време (ретенционо време супстанце која пролази без задржавања на колони) (197).

Логаритмована вредност ретенционог фактора k се може корелисати са уделом органске компоненте у мобилној фази и изражава се једначином праве:

$$\log k = \log k_w + S \cdot \varphi \quad (9)$$

где је:

$\log k_w$ - одсечак на у-оси,

S - нагиб праве и

φ - проценат органског растварача у мобилној фази (203).

Још једна величина која може да одражава меру липофилности испитиваног једињења је $\log k_w$ параметар, који представља $\log k$ вредност екстраполисану на нулу концентрације органске компоненте мобилне фазе.

На основу вредности $\log k_w$ (одсечак праве на у-оси) и S (нагиб праве) може се израчунати још један параметар липофилности испитиване супстанце - φ_0 .

$$\varphi_0 = -\frac{\log k_w}{S} \quad (10)$$

Параметар φ_0 дефинише се као удео органске компоненте у мобилној фази при којој је расподела испитиване супстанце између стационарне и мобилне фазе 1:1, док је $\log k = 0$ (197).

3.3. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена

3.3.1. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције применом РАМРА теста

3.3.1.1. Припрема раствора

Раствор фосфатног пуфера pH = 5,5 и 7,4 (20 mmol/l). Одмери се 0,5292 g натријум-дихидрогенфосфата монохидрата ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) и 0,0234 g динатријум-хидрогенфосфата (Na_2HPO_4) и раствори се у води у одмерном суду од 200 ml. Након растварања одмерни суд се допуни до ознаке водом. Припремљени раствор се подели на два дела по 100 ml, након чега се једном делу раствора подешава рН вредност на 5,5 применом фосфорне киселине, док се другој половини рН вредност подешава на 7,4 додатком раствора натријум-хидроксида.

Раствор DMSO (5%) у фосфатном пуферу pH = 7,4. Одмери се 0,5 ml DMSO и пренесе у нормални суд од 10 ml. Затим се дода кап TWEEN80, након чега се одмерни суд допуни до ознаке раствором фосфатног пуфера pH = 7,4. Концентрација сурфактанта TWEEN80 у овако припремљеном раствору је 0,2%.

Раствори испитиваних једињења и напроксена (50 $\mu\text{mol/l}$). Раствори се припремају разблаживањем шток раствора испитиваних супстанци и напроксена у DMSO, у којима је концентрација 5 mmol/l. Одмери се 100 μl тог раствора и пренесе у нормални суд од 10 ml. Затим се дода једна кап TWEEN80 (0,2%) и допуни до ознаке раствором фосфатног пуфера pH = 5,5.

Смеша хексадекана и хексана (5:95 v/v) (први РАМРА модел). Припрема раствора изводи се у одмерном суду запремине 10 ml. Најпре се у суд пренесе 500 μl хексадекана, а затим се хексаном суд напуни до ознаке.

Раствор лецитина јајета (1% v/v) у додекану (други РАМРА модел). Одмери се 10 mg лецитина јајета (60%, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Немачка), пренесе у вијалу и раствори у 1 ml додекана.

3.3.1.2. Извођење РАМРА теста (први РАМРА модел)

Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције вршена је на поликарбонатним плочама од 96 одељака. Сваки одељак се импрегнира са 15 μl раствора хексадекана/хексан и остави се да се осуши током 20 минута на собној температури. У сваки одељак акцепторске плоче (доња плоча) се додаје 300 μl раствора DMSO (5%) у фосфатном пуферу pH = 7,4. Затим се акцепторска плоча преклопи доворском плочом (горња плоча) и у одговарајуће одељке доворске плоче пренесе се 300 μl раствора испитиваних једињења и напроксена. Свака супстанца се испитује у триплекату. Овако припремљени систем се прекрије парафилмом и одговарајућим поклопцем, како би се спречило испаравање растварача, након чега се поставља на вибрациону мешалицу. Након 5 сати се плоче РАМРА „сендвич“ раздвајају и применом HPLC-DAD методе се одређује концентрација једињења у полазним растворима, доворским и акцепторским одељцима (204,205).

3.3.1.3. Извођење РАМРА теста (други РАМРА модел)

Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције испитиваних једињења извршена је и употребом другог РАМРА модела са раствором лецитина јајета (1%) у додекану као вештачком липидном баријером. Сваки одељак хидрофобне *Millipore PVDF* микротитарске плоче за филтрирање је импрегниран са 5 μ l раствора лецитина јајета, након чега је остављен током 30 минута на собној температури да растварач потпуно упари. У сваки одељак донорске плоче (доња плоча) пренесе се по 300 μ l раствора испитиваних једињења и напроксена и поклопи се акцепторском плочом (горња плоча). У одговарајуће одељке акцепторске плоче се пренесе по 300 μ l раствора DMSO (5%) у фосфатном пуферу pH = 7,4. Свака супстанца се испитује у трипликату. Акцепторска плоча се прекрије парафилмом и одговарајућим поклопцем, како би се спречило испаравање растварача. Цео систем се инкубира на собној температури током 17 сати, након чега се одређује концентрација испитиваних једињења у полазним растворима и акцепторским одељцима применом HPLC-DAD методе, као и код првог РАМРА модела.

3.3.1.4. HPLC-DAD метода одређивања концентрације испитиваних једињења

Концентрације испитиваних једињења и напроксена одређене су HPLC-DAD методом на *Dionex Ultimate 3000 (Thermo scientific, Немачка)* уређају који се састоји од *Dionex Ultimate 3000* кватернерне пумпе, аутосемплера и PDA детектора. Мобилну фазу чине ацетонитрил и вода у односу 75:25 v/v, док је однос ацетонитрила и воде приликом испитивања напроксена износио 50:50 v/v. Испитивање је извршено на колони *Zorbax Eclipse Plus C8 (150 \times 4,6 mm, 5 μ m)*. Температура колоне износила је 25°C. Проток мобилне фазе је био подешен на 1 ml/min, а таласна дужина детекције на 280 nm за синтетисана једињења, односно, на 230 nm за напроксен.

3.3.1.5. HPLC-MS/MS метода одређивања концентрације испитиваних једињења

HPLC-MS/MS одређивање садржаја испитиваних једињења спроведено је на UHPLC хроматографу *ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, САД)*, који је повезан са триплквдруполским масеним детектором *TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, САД)* који врши електроспреј јонизацију анализата са загревањем. Коришћена је *Zorbax Eclipse Plus C8 (150 \times 4,6 mm, 5 μ m)* колоне. Мобилну фазу су чинили ацетонитрил и 0,1% раствор мравље киселине у води 50:50 v/v. Проток мобилне фазе подешен је на 0,5 ml/min, а температура колоне на 25°C. Једињења су анализирана у позитивном и негативном јонизационом моду.

3.3.1.6. Израчунавање РАМРА параметара

Применом једначина 11, 12 и 13 израчунати су ретенција (R), коефицијент пермеабилности ($\log Pe$), пермеациони параметар ($C_A(t)/C_D(0)$) и проценат транспорта ($\%T$) испитиваних једињења за први РАМРА модел (204,206). Према дефиницији, ретенција (R) представља удео супстанце који се задржава у РАМРА мембрани и не прелази у акцепторски раствор.

$$R = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A C_A(t)}{V_D C_D(0)} \quad (11)$$

$$\log Pe = \log \left[-\frac{2.303V_D}{A(t-t_{LAG})} \left(\frac{V_A}{V_A+V_D} \right) \log \left[1 - \left(\frac{V_A+V_D}{V_D(1-R)} \right) \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right] \right] \quad (12)$$

$$\%T = 100 \cdot \frac{C_A(t) \cdot V_A}{C_{D0} \cdot V_D} \quad (13)$$

где је:

V_A - запремина раствора у акцепторским одељцима (ml),

V_D - запремина раствора у дозорским одељцима (ml),

A - филтрациона површина (0,28 cm²),

t - време инкубације (18 000 s),

t_{LAG} - *steady-state* време (s),

$C_D(t)$ - концентрација испитиваног једињења у дозорском одељку након времена t (μM),

$C_A(t)$ - концентрација испитиваног једињења у акцепторском одељку након времена t (μM) и

$C_D(0)$ - концентрација испитиваног једињења у дозорском одељку на почетку инкубације (μM).

Steady-state време (t_{LAG}) представља време које је неопходно да се у РАМРА систему мембрана засити испитиваном супстанцом и релативно је кратко у односу на време инкубације. Обично износи око 20 минута за РАМРА експерименте који се изводе без мућкања на вибрационој мешалици (207). Концентрација испитиване супстанце у дозорском одељку на почетку инкубације ($C_D(0)$) једнака је концентрацији једињења у полазном раствору.

Када је у питању други РАМРА модел, применом једначина 14 и 15 израчунати су проценат транспорта ($\%T$) и привидни коефицијент пермеабилности (P_{app}). Такође, како би се добијени резултати лакше интерпретирали, додатно се може израчунати логаритамска вредност привидног коефицијента пермеабилности ($\log P_{app}$) (208).

$$\%T = 100 \cdot \frac{A_A \cdot V_A}{A_{D0} \cdot V_D} \quad (14)$$

$$P_{app} = \frac{V_D \cdot V_A}{(V_D + V_A) \cdot S \cdot t} \cdot \ln \left[\frac{100 \cdot V_D}{100 \cdot V_D - \%T \cdot (V_D + V_A)} \right] \quad (15)$$

где је:

A_A - површина пика испитиваног једињења у акцепторском раствору,

A_{D0} - површина пика испитиваног једињења у дозорском раствору пре инкубације (полазни раствор),

V_A - запремина раствора у акцепторском одељку (ml),

V_D - запремина раствора у дозорском одељку (ml),

t - време инкубације (61 200 s) и

S - површина вештачке мембране (0,28 cm²).

3.3.2. Избор дескриптора и QSPR анализа

3.3.2.1. Израчунавање дескриптора применом *alvaDesc* софтвера, избор дескриптора и прављење QSPR модела применом *alvaModel* софтвера

QSPR студија је спроведена са циљем испитивања односа $\log Pe$ вредности добијених RAMPA моделом (зависне варијабле) са израчунатим молекулским дескрипторима (независне варијабле). Геометријска оптимизација свих испитиваних једињења извршена је применом семи-емпиријске PM3, а затим и Hartree-Fock методе уз 3-21-G базни сет у *Gaussian 98* софтверу у овиму *Chem3D Ultra 9.0.1* програма (209). У *alvaDescriptor* софтверу је израчунато укупно 5666 дескриптора без претходне поделе једињења на тренинг и тест сет. *alvaDescriptor* представља софтвер којим се може израчунати преко 6000 различитих дескриптора, а који су класификовани у 33 групе на основу особина које описују. Основна карактеристика која описује својство сваког дескриптора је његова димензионалност, па се тако могу поделити на 0D, 1D, 2D и 3D дескрипторе. Они који припадају дескрипторима нулте димензије (*Constitutional indices*, *Ring descriptors*) израчунавају се без разматрања везе између атома. Део целокупне топологије молекула се узима у обзир приликом израчунавања једнодимензионалних дескриптора (*Atom-centred fragments*), док се дводимензионални дескриптори (*2D matrix-based descriptors*, *2D autocorrelations*, *2D Atom Pairs*) израчунавају на основу целокупног графа молекула. 3D дескриптори (*CATS 3D descriptors*, *3D matrix-based descriptors*, *3D-MoRSE descriptors*) одређују се на основу тродимензионалних координата молекула, при чему треба узети у обзир да један молекул може имати више различитих конформација које могу утицати на вредности израчунатих дескриптора. Сва испитивана једињења подељена су у две групе: тест и тренинг сет. Тест сет се састојао од четири деривата (**1**, **3**, **4** и **11**), док су тренинг сет чинила преостала новосинтетисана једињења и напроксен. Тест сет је одабран на тај начин да су $\log Pe$ вредности ових деривата хомогено распоређене у читавом опсегу вредности $\log Pe$ за сва испитивана једињења. Софтвер *alvaModel* коришћен је за формирање PLS (енгл. *Partial Least Squares*), OLS (енгл. *Ordinary Least Squares*) и SVM (енгл. *Support Vector Machine*) модела (210). У *alvaModel* софтверу је применом PLS, OLS и SVM методологије са 10000 итерација вршен избор дескриптора, од којих ће бити редом направљени PLS($\log Pe$), OLS($\log Pe$) и SVM($\log Pe$) модели. PLS моделовање корисно је у ситуацијама када се врши анализа колинеарних и бројних дескриптора. Оптималан број PLS компоненти одређује се на основу $R^2(Y)$ сваке компоненте и на основу кумулативне $R^2(Y)$ вредности, која подразумева допринос свих компоненти у моделу. Утицај дескриптора на модел процењен је на основу његовог коефицијента регресије. За PLS ($\log Pe$) модел је изабрано укупно 30 дескриптора и то: *RDCHI*, *VE2_D/Dt*, *SM4_Dz(i)*, *Wi_B(e)*, *MATS6e*, *GGI3*, *SpMax4_Bh(m)*, *SpMax4_Bh(i)*, *P_VSA_p_2*, *Chi1_AEA(bo)*, *SM06_AEA(dm)*, *Eig07_EA(ri)*, *Eig10_AEA(ed)*, *RDF040v*, *RDF155p*, *E3v*, *L2p*, *ISH*, *H7m*, *HATS2e*, *R1p+*, *SP19*, *SsF*, *NssO*, *gmin*, *F05[C-S]*, *CATS3D_03_DL*, *CATS3D_10_AA*, *CATS3D_02_AL* и *s34_phRelSize*. Код SVM алгоритма имплементираних у *alvaModel* софтвер, хиперраван се налази решавањем скупа линеарних једначина уместо проблема конвексног квадратног програмирања (енгл. QP - *Quadratic Programming*), као што је то случај код класичног SVM. Дескриптори који формирају наведени модел су *SM07_EA(dm)* и *CATS3D_02_AL*, док OLS модел формирају дескриптори *F06[C-C]* и *WHALES100_Rem*. SVM је једини од три наведена модела који је прошао валидационе тестове.

3.3.2.2. Избор дескриптора и прављење QSPR модела применом софтвера STATISTICA

Софтвер *STATISTICA* је, такође, коришћен за одабир молекулских дескриптора, као и за формирање MLR (енгл. *Multiple Linear Regression*), PLS и SVM модела (211). Једињења су, као и код претходно описане методе, била подељена на исти начин на тренинг и тест сет. Пре израде модела неопходно је извршити избор одговарајућих дескриптора. Постоји више метода за избор дескриптора, а у програму *STATISTICA* коришћене су следеће методе: *Feature Selection and Variable Screening (FSVS)* и *MLR forward stepwise* (148). FSVS метода примењена је за избор дескриптора за формирање PLS(log*Pe*) и SVM(log*Pe*) модела, док су дескриптори за прављење MLR(log*Pe*) модела изабрани применом *MLR forward stepwise* методе. Приликом примене *MLR forward stepwise* методе независне варијабле се додају једна по једна у модел, процењују се у сваком кораку и на крају се задржавају или елиминишу на основу специфичних критеријума (у овој студији *F to enter* = 9 и *F to remove* = 4). Са друге стране, FSVS метода дизајнирана је тако да омогућава израчунавања у оквиру изузетно великих скупова континуалних и/или категоријских дескриптора, као и за процену зависности између зависне променљиве и дескриптора. Опсег вредности сваког дескриптора је подељен на укупно *k* интервала. То би значило да уколико је *k* = 2, испитују се само појединачни односи између дескриптора и зависне променљиве. Наведени параметар у спроведеном истраживању је подешен на *k* = 10. MLR модел користи се за процену линеарног односа између израчунатих молекулских дескриптора и log*Pe*. У овом истраживању креирање модела за MLR(log*Pe*) је покушано применом анализе вишеструке регресије према следећим критеријумима: *F to enter* = 9 и *F to remove* = 4. Међутим, за MLR(log*Pe*) није било могуће направити модел. SVM(log*Pe*) модел креиран је коришћењем радијалне базне функције и регресије тип 1. Оптимална *gamma* вредност износила је 0,5, док су вредности капацитета (*C*) и епсилон (*ε*) оптимизоване од стране софтвера и износиле су *C* = 100 и *ε* = 0,3. SVM(log*Pe*) модел састојао се од 5 подржаних вектора (1 ограничен). За PLS(log*Pe*) модел је изабрано укупно 30 дескриптора и то: *Mor25m*, *minssO*, *RDF020m*, *s34_relSize*, *GATS2i*, *E2s*, *LOGP99*, *GATS2e*, *SpMin5_Bh(s)*, *R8p+*, *R7p+*, *MATS2v*, *H8p*, *SpMin6_Bh(s)*, *JGI3*, *RDF130s*, *ATSC2m*, *Mor14v*, *Mor13v*, *P_VSA_i_3*, *GATS7p*, *CATS3D_05_AA*, *P_VSA_ppp_A*, *WHALES60_Rem*, *SpMax_L*, *SpMAD_Coulomb*, *CATS2D_09_AA*, *SpDiam_AEA(ri)*, *RDF075i* и *HATS8i*. MLR(log*Pe*) модел није могао бити направљен, док преостала два модела (PLS(log*Pe*) и SVM(log*Pe*)) не пролазе валидационе тестове.

3.3.2.3. Процена поузданости формираних QSPR модела

Процена поузданости формираних QSPR модела извршена је на основу следећих статистичких параметара: RMSEE (енгл. *Root Mean Squared Error of Estimation*), RMSEP (енгл. *Root Mean Squared Error of Prediction*), *F* однос, *p* вредност, *r*, *Q*² и *R*².

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum (Y_{\text{obs}(\text{training})} - \bar{Y}_{\text{training}})^2} \quad (16)$$

$$R_{\text{pred}}^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum (Y_{\text{obs}(\text{test})} - \bar{Y}_{\text{training}})^2} \quad (17)$$

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (18)$$

RMSEE вредност је израчуната за тренинг сет, док је RMSEP вредност израчуната за тест сет. Q^2 представља интерни параметар валидације који се користи за процену потенцијала предвиђања модела за једињења која су слична тренинг сету. Наведени параметар се израчунава по принципу изостављања LOO (енгл. *Leave-One-Out*), што подразумева да је свако једињење тренинг сета елиминисано у једном израчунавању, док су преостала једињења искоришћена за формирање модела. Затим се тако направљен модел користи за предвиђање вредности зависне варијабле елиминисаног једињења. Оваква процедура се понавља све док сва једињења из тренинг сета нису по једном обрисана. Q^2 се израчунава према једначини 16 у којој је Y_{training} просечна вредност, док је $Y_{\text{obs(training)}}$ експериментално одређена $\log Pe$ вредност за тренинг сет једињења (212). PRESS (енгл. *Predicted Residual Error Sum of Squares*) се израчунава након завршетка LOO процедуре према једначини 18. У наведеној једначини $e_{(i)}$ представља разлику између експериментално добијених и предвиђених $\log Pe$ вредности. R^2 је параметар екстерне валидације који се користи за процену предиктивног потенцијала модела за једињења која се структурно разликују од чланова тренинг сета. Овај параметар се израчунава помоћу једначине 17 у којој је $Y_{\text{obs(test)}}$ експериментално одређена вредност $\log Pe$ за једињења из тест сета (213). PRESS вредност за тест сет једињења се израчунава такође према једначини 16. Висок предиктивни потенцијал модела може се очекивати уколико су Q^2 и R^2 већи од 0,5 (163,212,214). Модели са r вредношћу нижом од 0,05 могу се сматрати статистички значајним (163).

3.3.3. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције применом ВМС теста

3.3.3.1. Припрема раствора

Раствор фосфатног пуфера pH = 5,5 (7 mmol/l). Одмери се 0,49 g натријум-хидрогенфосфата (Na_2HPO_4) и раствори се у води HPLC чистоће у одмерном суду од 500 ml. Затим се истим растварачем суд допуни до ознаке, а pH вредност раствора се подеси на 5,5 уз додатак фосфорне киселине.

Раствор 0,04 mol/l Brij 35 у пуферу pH = 5,5. Одмери се 24 g Brij 35 и раствори се у 500 ml претходно припремљеног фосфатног пуфера уз загревање на магнетној мешалици.

Раствори испитиваних једињења и напроксена (0,1 mg/l). Раствори се припремају од претходно припремљених раствора (штокова) испитиваних једињења и напроксена у DMSO концентрације 5 mmol/l. Одмери се 50 μl тог раствора, пренесе у пеницилинску бочицу и разблажи са 950 μl мобилне фазе.

3.3.3.2. Извођење ВМС теста

Ретенционо понашање синтетисаних једињења и напроксена анализирано је применом HPLC уређаја *Agilent Technologies 1200 Series systems* (Santa Clara, CA, САД) опремљеним бинарном пумпом, мануелним инјектором чија је инјекциона запремина 20 μl , DAD детектором и уз употребу колоне *Zorbax Extend-C18* (150 x 4,6 mm; 5 μm). Мобилну фазу чине ацетонитрил и раствор 0,04 mol/l Brij 35 у пуферу pH = 5,5 (30:70 v/v). Претходним истраживањем је показано да 0,04 mol/l Brij 35 може бити у смеши са највише 30% ацетонитрила, а да се притом формирају стабилне мицеле (155). Температура колоне подешена је на 36,5°C, проток мобилне фазе на 1 ml/min, а таласна дужина детекције на 280 nm за синтетисана једињења, односно на 230 nm за напроксен

и DMSO. За свако испитивано једињење израчуната је вредност ретенционог фактора (k) према следећој формули:

$$k = \frac{t_R - t_R(0)}{t_R(0)} \quad (19)$$

где је:

t_R - ретенционо време испитиваног једињења и

$t_R(0)$ - ретенционо време пика DMSO који је присутан у растворима (153,155,215).

3.3.4. QSRR анализа, одабир дескриптора и формирање QSRR модела

Квантитативни односи структуре и ретенције (QSRR) испитани су са циљем утврђивања везе између k вредности израчунатих у ВМС систему (зависна варијабла) и одређених геометријских, термодинамичких, физичко-хемијских и електронских молекулских параметара (независне варијабле). Приликом формирања QSRR модела коришћене су k вредности за укупно седам једињења која су испитана у оквиру ВМС анализе. QSRR анализа извршена је применом софтвера *STATISTICA*. Дескриптори неопходни за формирање MLR(k) модела одабрани су употребом *FSVS* и *MLR forward stepwise* метода, као што је описано код формирања QSPR модела. Приликом примене *MLR forward stepwise* методе дефинисани су критеријуми *F to enter* = 9 и *F to remove* = 4, док је код *FSVS* методе параметар k подешен на вредност 10. Због релативно малог броја испитиваних једињења, одабран је један дескриптор (*Mor20u*).

3.4. *In vivo* испитивање акутне токсичности и антиинфламацијске активности новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена на *Wistar Albino* пацовима

In vivo испитивање акутне токсичности и антиинфламацијске активности 14 новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена спроведено је у Центру за претклиничка и функционална истраживања Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Животиње су добијене са Војномедицинске академије у Београду и чуване су на температури од $22 \pm 2^\circ\text{C}$ уз присуство аутоматског осветљења током 12 сати. Пацови су по потреби конзумирали комерцијално доступну храну за пацове са протеинским садржајем од 20% (Ветеринарски институт Суботица) и воду. У складу са прописима Етичке комисије за добробит лабораторијских животиња Факултета медицинских наука (шифра протокола: 01-10742, датум одобрења: 14.10.2021. године), као и према принципима Добре лабораторијске праксе и Директиве Европског савета (86/609/ЕЕС) дизајниран је протокол истраживања.

3.4.1. Испитивање акутне оралне токсичности

За спровођење студије акутне оралне токсичности коришћени су здрави мужјаци *Wistar Albino* пацова који су подељени у 15 група (14 једињења + DMSO) од по три животиње чија је телесна тежина била у интервалу 180-200 г. Животиње су подељене у следеће групе:

- Експерименталне групе - пацови који су *per os* примили испитивана једињења (1-14) у појединачној дози од 10 mg/kg и
- Контролна група - пацови који су *per os* примили једну дозу 1% DMSO.

Након апликације наведених супстанци, животиње су чуване у појединачним кавезима и праћене су током периода од 14 дана. Свакодневно током двонедељног периода мерен је унос хране и воде, мерена је телесна тежина, а праћени су и сви знаци токсичности који обухватају промене коже и крзна, очију, саливације, дисања, мокрења (боја и количина), фецеса (конзистенција и боја), као и промене у обрасцу понашања. Након наведеног периода, животиње су жртвоване и мерена је тежина органа (срца, јетре, бубрега, желуца) (216,217). Након тога је израчуната релативна тежина органа према следећој формули:

$$\text{Релативна тежина органа} = \frac{\text{Апсолутна тежина органа} \cdot 100\%}{\text{Телесна тежина пацова на дан жртвовања}} \quad (20)$$

3.4.2. *In vivo* испитивање антиинфламацијске активности

In vivo испитивање антиинфламацијске активности новосинтетисаних једињења (1-14) спроведено је применом модела карагенаном изазваног едема шапе пацова. Инфламација је изазвана интраплантарном применом 1 ml инјекције 0,5% раствора карагенана у физиолошком раствору, која је апликована у леву задњу шапу пацова. Све животиње су подељене у експерименталне и контролне групе.

Експериментална група животиња је подељена у следеће подгрупе:

- Животиње које су *per os* примиле испитивана једињења (1-14) растворена у 1% DMSO у дози од 2,5 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације (n=112 пацова, 8 пацова по подгрупи),
- Животиње које су *per os* примиле испитивана једињења (1-14) растворена у 1% DMSO у дози од 5 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације (n=112 пацова, 8 пацова по подгрупи) и
- Животиње које су *per os* примиле испитивана једињења (1-14) растворена у 1% DMSO у дози од 10 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације (n=112 пацова, 8 пацова по подгрупи).

Контролна група животиња је подељена у следеће подгрупе:

- Животиње које су *per os* примиле напроксен растворен у 1% DMSO у дози од 2,5 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације (n=8 пацова),
- Животиње које су *per os* примиле напроксен растворен у 1% DMSO у дози од 5 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације (n=8 пацова),
- Животиње које су *per os* примиле напроксен растворен у 1% DMSO у дози од 10 mg/kg, 60 минута пре изазивања инфламације (n=8 пацова) и
- Животиње које су *per os* примиле 1% DMSO у истој запремини као и растворе контролних група, 60 минута пре изазивања инфламације (n=8 пацова).

Наведене дозе испитиваних једињења и напроксена дефинисане су на основу претходно објављених публикација (64,218). Дебљина ткива задње леве шапе сваког пацова мерена је у тренутку непосредно пре изазивања инфламације (моменат 0), као и један, два, три и четири сата након апликације карагенана, а све то у циљу квантификације антиинфламацијског ефекта. За мерење дебљине ткива коришћен је дигитални калипер, а проценат инхибиције едема шапе израчунат је према следећој формули:

$$\% \text{ инхибиције} = 100 \cdot \frac{Y_t}{Y_c} \quad (21)$$

где је:

Y_t - просечно повећање дебљине шапе третираних пацова између два тренутка мерења и Y_c - просечно повећање дебљине шапе нетретираних пацова између два тренутка мерења (219).

3.5. Испитивање COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности

COX-2 и 5-LOX инхибиторна активност процењена је применом COX-2 и 5-LOX ензимских флуориметријских китова. Наведени тестови су базирани на флуориметријској детекцији производа каталитичке активности ензима COX-2 (простагландина G₂) и интермедијера који је производ активности 5-LOX ензима. Сва испитивања су спроведена према упутствима произвођача (220,221).

Тест раствори потребни за испитивање COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности припремљени су од полазних (шток) раствора испитиваних супстанци у DMSO (5 mmol/l), који су разблажени истим растварачем. Тест раствори су након тога 5 пута разблажени пуфером за испитивање COX инхибиторне активности, на тај начин што је 2 μ l тест раствора помешано са 8 μ l COX пуфера. Инхибиторска контрола припремљена је додавањем 2 μ l раствора селективног COX-2 инхибитора (целекоксиба) и 8 μ l COX пуфера у одговарајуће одељке. Контрола растварача припремљена је применом 2 μ l DMSO и 8 μ l COX пуфера, док је ензимска контрола добијена додавањем 10 μ l COX пуфера у одговарајуће одељке. По 10 μ l разблаженог тест раствора сваког испитиваног једињења је додато у одељке предвиђене за тест узорке.

За процену инхибиторне активности према 5-LOX ензиму, раствори испитиваних једињења припремљени су од полазних штокова у којима су испитивана једињења растворена у DMSO, при чему је концентрација супстанци износила 5 mmol/l. Ови раствори су затим разблажени применом истог растварача, како би се добили тест раствори. Након тога је по 2 μ l припремљених тест раствора додато у одговарајуће одељке. Контроле ензима (COX пуфер), растварача (DMSO) и инхибитора (зилеутона) формиране су додавањем по 2 μ l одговарајуће контроле у предвиђене одељке.

Флуоресценција узорака мерена је кинетички на 25°C коришћењем *Synergy LX multimode microplate* (BioTek, Shoreline, Winooski, Vermont, WA, САД) читача. Параметри читавања били су следећи: за COX-2 Ex/Em = 535/587 nm током 10 минута, а за 5-LOX: Ex/Em = 500/536 nm током 20 минута.

3.6. Студија молекулског докинга

У циљу *in silico* процене афинитета везивања новсинтетисаних једињења (1-14) за COX-2 и 5-LOX ензиме спроведена је студија молекулског докинга. Кристалне структуре циљних протеина преузете са Протеинске базе података (енгл. PDB - *Protein Data Bank*) биле су: 3NT1 (напроксен везан за COX-2) (89) и 6N2W (NDGA везан за 5-LOX) (222). Софтвер *MAKE Receptor* коришћен је за припрему циљних ензима (223). Део ензима у коме је извршено уклапање испитиваних молекула дефинисан је у облику „кутија“ око кокристалних лиганата, а чије су димензије биле 33,67Å×27,33Å×23,33Å за COX-2 и 19,67Å×14,67Å×22,67Å за 5-LOX. Укупне запремине спољашњих контура кокристалних лиганата износиле су 617Å³ за COX-2 и 908 Å³ за 5-LOX. Подешавање за формирање облика везујућег места је дефинисано као уравнотежено без задатих

ограничења. Скупови података о конформацијама испитиваних једињења припремљени су у софтверу *OMEGA* 2.5.1.4 (224,225), док је софтвер *OEDocking* 3.2.0.2 (226-228) са својим алатом за брзо ригидно уклапање (енгл. *FRED - Fast Rigid Exhaustive Docking*) употребљен за анализу начина везивања припремљених конформација лиганата у активним местима циљних ензима. Уклапани конформери су затим квантификовани коришћењем *Chemgauss4* (229) скоринг функције, док је даља оптимизација конформера извршена применом *OEChemscore* (230) функције вредновања. *Chemgauss4* функција је коришћена и за бодовање и избор одговарајуће позе лиганата, док су преостала подешавања постављена као подразумевана. Како би се извршила валидација спроведене студије молекулског докинга, конформације напроксена и NDGA су уклоњене па поново уклапане у активна места COX-2 и 5-LOX. Конформери кокристалних лиганата који су добијени студијом молекулског докинга су преклопљени са њиховим кристалографским конформацијама. Добијени резултат је изражен у облику RMSD (енгл. *Root-Mean-Square-Deviation*) вредности, која представља меру просечног растојања између истих атома две преклопљене конформације једног истог молекула. Израчунате RMSD вредности су биле мање од 2Å, што потврђује валидност спроведене студије молекулског докинга (231).

3.7. Испитивање цитотоксичне активности

Истраживање је спроведено као експериментална *in vitro* студија у којој су коришћене ћелијске линије хуманог порекла, и то ћелијска линија аденокарцинома дојке (MDA-MB-231), карцинома грлића материце (HeLa) и карцинома колона (HCT 116). Такође, у истраживање је укључена и једна малигно неизмењена ћелијска линија фибробласта (MRC-5). Све претходно наведене ћелијске линије су добијене захваљујући љубазности проф. др Петра Чановића са Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

3.7.1. Варијабле истраживања

Независне варијабле студије (узрок) представљали су примењени новосинтетисани тиоуреидни деривати напроксена, док зависне варијабле (исход) представљају измерене вредности параметара вијабилности и апоптозе малигно измењених ћелија. Сва испитивања која су се односила на антитуморску активност новосинтетисаних једињења спроведена су у лабораторијама Института Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

3.7.2. МТТ тест

Применом МТТ теста може се јасно дефинисати потенцијални антитуморски ефекат тестираних једињења. Прецизније, овим тестом можемо утврдити степен вијабилности ћелијских линија које су укључене у истраживање. МТТ тестом детектује се степен активности ензима NAD(P)H-зависне оксидоредуктазе који је присутан у живим ћелијама. Активношћу овог ензима доћи ће до редукције жутог раствора тетразолијум-бромида у формазан који је љубичасте боје. Стога, јасно је да раствор који је љубичасте боје након извођења теста садржи велики број вијабилних (живих) ћелија.

Спроведено истраживање је обухватило тестирање степена вијабилности ћелијских линија MDA-MB-231, HeLa, HCT 116 и MRC-5. Вијабилност претходно поменутих ћелијских линија је тестирана у три временска интервала (24, 48 и 72 сата) у присуству растућих концентрација тестираних тиоуреидних деривата напроксена.

Испитиване концентрације четрнаест деривата напроксена су биле у опсегу 0,3-100 μM . Поред ових једињења, тестиран је и антипролиферативни утицај напроксена, као контролног лека.

Након подизања ћелија из фласкова, око 5000 ћелија је засејано у појединачне бунаре микротитар плоча од 96 бунара. Од кључног је значаја да су претходно засејане ћелије биле у експоненцијалној фази раста. Наредни корак је обухватио третирање ћелија растућим концентрацијама деривата напроксена. Сви експерименти су рађени у трипликату. Након 24, 48 и 72 сата додаван је 10% раствор тетразолијум-бромида у PBS-у од 0,5 mg/ml. Након два сата инкубације додато је по 200 μL DMSO-а у сваки бунар. Следећи корак је обухватао лагано мешање плоча, а све у циљу растварања кристала формазана у DMSO-у. На крају, апсорбанција је читавана на *ELISA*-читачу на 595 nm. Вредност цитотоксичности је израчуната према формули:

$$C = 100\% - V \quad (22)$$

где је:

C - цитотоксичност и

V - стопа преживљавања ћелија.

Након добијених резултата, за свако тестирано једињење израчунате су IC_{50} вредности, које представљају вредност половине максималне инхибиторне моларне концентрације.

3.7.3. Одређивање релативног односа ћелија које се налазе у апоптози и некрози

Након што је одређен степен вијабилности тестираних ћелија, као и биолошки ефекат деривата напроксена, у другом кораку је дефинисан њихов механизам деловања. Прецизније, тестирано је деловање деривата напроксена на релативни однос ћелија у апоптози и некрози, при чему је коришћен анексин V/PI (енгл. *Propidium Iodide*) тест. Однос ћелија у апоптози и некрози је детектован проточном цитометријом. Тестиране ћелије су биле малигне ћелије карцинома грлића материце (HeLa).

Одређивање релативног односа ћелија које се налазе у апоптози и некрози је засновано на бојењу тестираних ћелија које су у првом кораку третиране IC_{50} вредностима једињења. Услед антипролиферативног ефекта тестираних једињења долази до активирања процеса апоптозе, при чему су у апоптотичним ћелијама остаци фосфатидил-серина (компоненте ћелијске мембране) окренути ка спољашњој средини. Ово омогућава да се анексин V веже за фосфатидил-серин, при чему можемо рећи да су ћелије које су активирале процес апоптозе заправо анексин позитивне. За молекул анексина је чврсто везана флуоресцентна боја која емитује флуоресценцију у спектру зелене боје, флуоресцеин-изотиоцијанат (енгл. *Fluorescein isothiocyanate* - FITC). Са друге стране, PI се може везати за једро, при чему прави јасну разлику између PI позитивних (мртвих ћелија) и PI негативних (живих ћелија).

Након инкубације од 24 часа, тестиране ћелије су трипсинизоване, испране у PBS-у и растворене у пуферу за везивање ћелија (енгл. *Binding buffer*) у концентрацији од 10^6 ћелија/mL. У следећем кораку је 100 mL суспензије ћелија пребачено у по три епрувете запремине 5 mL. У сваку постављену епрувету додато је по 5 mL анексин V-FITC и PI. Затим је спроведено вортексовање ћелија и инкубација у временском интервалу од 15 минута у мраку на собној температури. Последњи корак подразумева додавање 400 mL пуфера за везивање ћелија и читавање добијених резултата. Обрада и презентовање

добијених резултата су подразумевали коришћење програма за проточну цитометрију *FlowJo VX*.

3.7.4. Анализа ћелијског циклуса

Осим активације процеса апоптозе, антипролиферативни ефекат се може испољити и заустављањем ћелијског циклуса. Стога, у следећем кораку циљ је био дафинисање утицаја деривата напроксена на ћелијски циклус HeLa ћелија. Прецизније, дефинисан је релативни однос ћелија које се налазе у различитим стадијумима ћелијског циклуса применом PI бојења. Мерење релативног односа је рађено уз помоћ проточне цитометрије.

Анализа ћелијског циклуса се заснива на могућности молекула пропидијум-јодида да се веже за молекулу ДНК. На основу интензитета флуоресценције, коју емитују тако везани молекули пропидијум-јодида у свакој појединачној ћелији, можемо одредити у којој фази ћелијског циклуса се обојене ћелије налазе.

У првом кораку HeLa ћелије су третиране одговарајућим IC₅₀ вредностима испитиваних једињења. Након тога су ћелије подигнуте, односно трипсинизоване и једном испране медијумом и два пута фосфатним пуфером. Затим су ћелије фиксиране ледено хладним 70% етанолом и држане у етанолу на 4°C најмање 1 сат (у просеку су инкубиране 20-ак часова). Даље су ћелије два пута опране у ледено хладном фосфатном пуферу, додато је 100 µg/ml *RNase* и 200 µl раствора пропидијум-јодида. Након тога, додато је још 300 µl фосфатног пуфера и добијени резултати су прочитани на проточном цитометру.

3.7.5. Анализа протеина апоптозе

Активација процеса апоптозе се може одиграти активацијом спољашњег или унутрашњег (митохондријалног) пута. У циљу јасног дефинисања механизма деловања деривата напроксена одређене су концентрације протеина који учествују у процесу апоптозе. Тестиране ћелије су биле HeLa малигне ћелије карцинома грлића материце. Анализирани протеини су активни *Bax* као и протеин *Bcl-2*. Такође, мерено је присуство активне каспазе-3.

Реагенси коришћени у овим експериментима су били следећи:

- Сет за фиксацију и пермеабилizацију ћелија - *Invitrogen™ eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set*, Catalog number: 88-8824-00 (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88-8824-00>)
- Примарно антитело за активни протеин *Bax* - *Santa Cruz™ rabbit polyclonal IgG Anti-Bax Antibody (N-20)*, Catalog number: sc-493
- Примарно обележено флуоресцеин-изотиоцијанатом (FITC) антитело за протеин *Bcl-2* - *Life technologies™ bcl-2 fluorescein isothiocyanate (FITC) primary antibody*, Catalog number: MHBCL01
- Примарно антитело за активни протеин каспаза-3 - *Cell Signaling™ rabbit Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody*, Catalog number: #9661
- Секундарно обележено флуоресцеин-изотиоцијанатом (FITC) антитело за необележена примарна антитела - *Abcam™ secondary goat anti-rabbit IgG-FITC antibody*, Catalog number: Ab6717-1

Након третмана туморских HeLa ћелија IC₅₀ концентрацијом деривата напроксена, ћелије су подигнуте, односно, трипсинизоване и једном испране медијумом и два пута ледено хладним фосфатним пуфером. Након фиксације и пермеабилizације додато је одговарајуће примарно и секундарно обележено антитело. Резултати су очитани на проточном цитометру (232).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Синтеза и структурна карактеризација тиоуреидних деривата напроксена

Поступак синтезе тиоуреидних деривата напроксена приказан је на Схеми 3. Приноси синтетисаних једињења кретали су се у интервалу од 25% (једињење 7) до 43% (једињење 4).

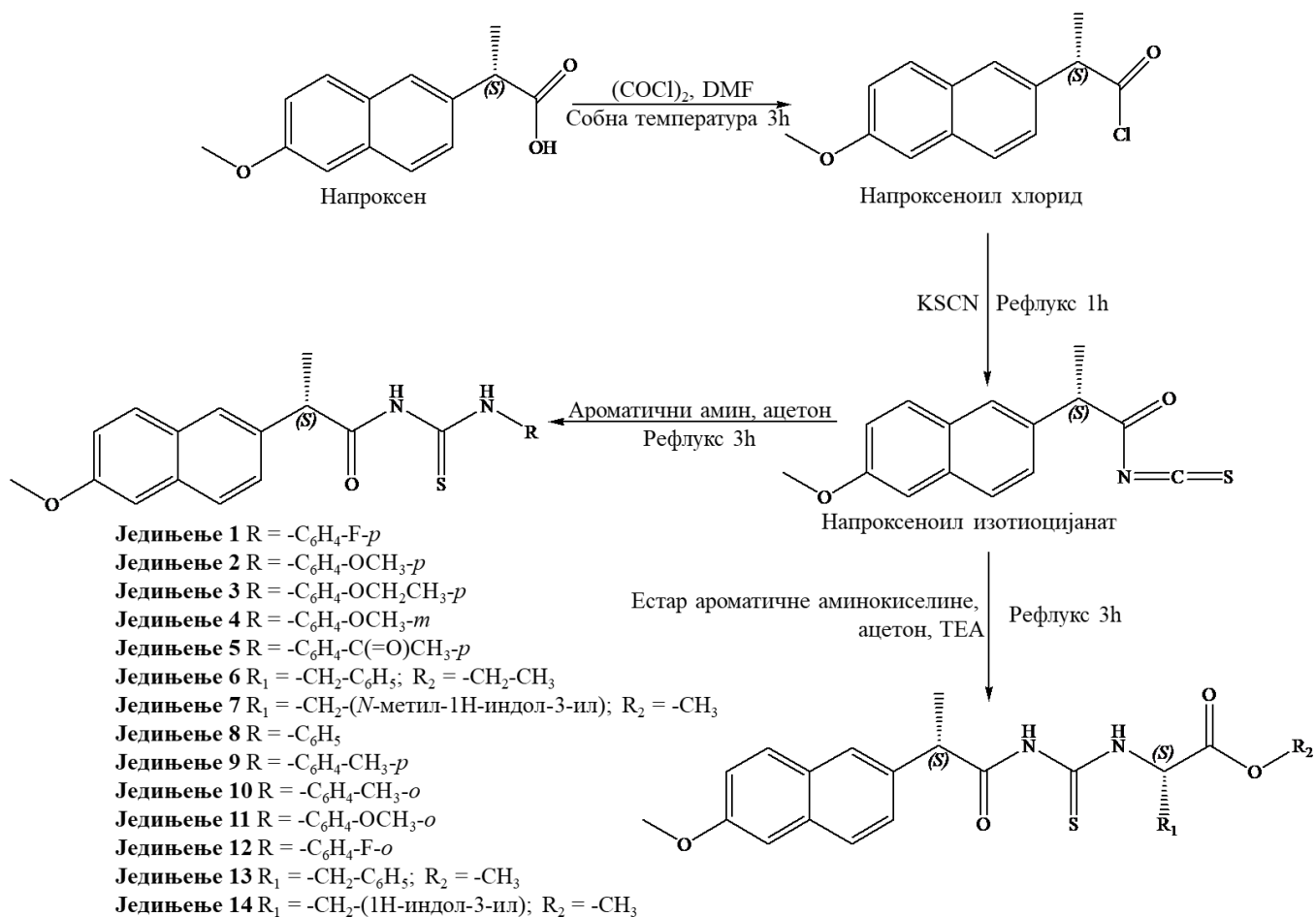


Схема 3. Поступак синтезе тиоуреидних деривата напроксена

Хемијске структуре и приноси синтетисаних тиюреидних деривата напроксена приказани су у Табели 4.

Табела 4. Структуре и приноси новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена

Деривати ароматичних амина			Деривати естара ароматичних аминокиселина			
Једињење	R	Принос	Једињење	R ₁	R ₂	Принос
1		28%	6		CH ₃ —CH ₂ —	30%
2		33%				
3		31%				
4		43%	7		H ₃ C—	25%
5		38%				
8		28%				
9		26%				
10		42%	13		H ₃ C—	30%
11		38%	14		H ₃ C—	32%
12		33%				

Структурна карактеризација синтетисаних тиоуреидних деривата напроксена:

(S)-N-((4-флуорофенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид
(дериват **1**) - Жути кристални прашак. **Принос:** 28%. **Температура топљења:** 57-59 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 1145,06; 1686,94; 2934,27 и 3168,25. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 1,51 (3H, d, J = 6,8 Hz, CH₃Naп); 3,87 (3H, s, OCH₃Naп); 4,22 (1H, q, J = 6,8 Hz, CH₂Naп); 7,16–7,85 (10H, m, ArH); 11,72 (1H, s, NHCS) и 12,31 (1H, s, CSNH). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 17,45 (CH₃Naп); 44,35 (CH₂Naп); 54,59 (OCH₃Naп); 105,12; 114,71 (CFCHCHCH-, J = 22,6 Hz); 118,26; 125,36; 125,66; 126,31 (CFCHCHCH-, J = 8,4 Hz); 126,36; 126,45; 127,74; 128,65; 132,88; 133,51 (CFCHCHCH-, J = 2,9 Hz); 134,66; 156,69; 159,40 (CFCHCHCH-, J = 242,3); 175,46 (CONH) и 178,97 (NHCS). ***m/z*** = 383,1; [M+H]⁺; 229,97; 185,02; 170,96; 169,05; 154,00 и 112,14. **MS [M+Na]⁺** израчунато за C₂₁H₁₉FN₂O₂S = 405,10435; одређено = 405,10432.

(S)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-N-((4-метоксифенил)карбамотиоил)пропанамид
(дериват **2**) - Жути кристални прашак. **Принос:** 33%. **Температура топљења:** 112-114 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 1146,07; 1686,55; 2932,67 и 3184,85. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 1,49 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH₃Naп); 3,74 (3H, s, OCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃Naп); 4,21 (1H, q, J = 6,4 Hz, CH₂Naп); 6,90-7,82 (10H, m, ArH); 11,61 (1H, s, NHCS) и 12,26 (1H, s, CSNH). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 18,51 (CH₃Naп); 45,40 (CH₂Naп); 55,65 (OCH₃Naп); 55,73 (OCH₃); 106,19-157,89 (ароматични угљеници); 176,56 (CONH) и 179,52 (NHCS). ***m/z*** = 394,9 [M+H]⁺; 230,03; 184,99; 183,01; 169,78; 153,11 и 124,10. **MS [M+Na]⁺** израчунато за C₂₂H₂₂N₂O₃S = 417,12433; одређено = 417,12418.

(S)-N-((4-етоксифенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид
(дериват **3**) - Жути кристални прашак. **Принос:** 31%. **Температура топљења:** 115-116 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 1142,79; 1677,97; 2935,29 и 3255,39. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 1,31 (3H, t, J = 7,2 Hz, OCH₂CH₃), 1,50 (3H, d, J = 6,8 Hz, CH₃Naп); 3,87 (3H, s, OCH₃Naп); 4,01 (2H, q, J = 6,8 Hz, OCH₂CH₃); 4,22 (1H, q, J = 6,8 Hz, CH₂Naп); 6,90-7,85 (10H, m, ArH); 11,63 (1H, s, NHCS) и 12,27 (1H, s, CSNH). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 14,02 (OCH₂CH₃); 17,46 (CH₃Naп); 44,34 (CH₂Naп); 54,59 (OCH₃Naп); 62,61 (OCH₂CH₃); 105,13-156,69 (ароматични угљеници); 175,49 (CONH) и 178,40 (NHCS). ***m/z*** = 409,0 [M+H]⁺; 229,92; 196,92; 184,99; 179,93; 170,01 и 153,04. **MS [M+Na]⁺** израчунато за C₂₃H₂₄N₂O₃S = 431,13998; одређено = 431,14020.

(S)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-N-((3-метоксифенил)карбамотиоил)пропанамид
(дериват **4**) - Зелени кристални прашак. **Принос:** 43%. **Температура топљења:** 144-145 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 1155,54; 1683,27; 3014,24 и 3224,80. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 1,50 (3H, d, J = 6,8 Hz, CH₃Naп); 3,72 (3H, s, OCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃Naп); 4,21 (1H, q, J = 7,2 Hz, CH₂Naп); 6,79-7,84 (10H, m, ArH); 11,68 (1H, s, NHCS) и 12,46 (1H, s, CSNH). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 18,50 (CH₃Naп); 45,44 (CH₂Naп); 55,65 (OCH₃Naп); 55,36 (OCH₃); 106,20-159,76 (ароматични угљеници); 176,67 (CONH) и 179,19 (NHCS). ***m/z*** = 395,2 [M+H]⁺; 230,10; 185,08; 183,03; 170,07; 154,11 и 153,11. **MS [M+H]⁺** израчунато за C₂₂H₂₂N₂O₃S = 395,14239; одређено = 395,14197.

(S)-N-((4-ацетилфенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид
(дериват **5**) - Жути кристални прашак. **Принос:** 38%. **Температура топљења:** 132-134 °C. **IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹):** 1145,15; 1685,96; 2988,46 и 3180,83. **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 1,52 (3H, d, J = 6,8 Hz, CH₃Naп); 2,56 (3H, s, C(=O)CH₃); 3,87 (3H, s, OCH₃Naп); 4,23 (1H, q, J = 7,2 Hz, CH₂Naп); 7,16-7,97 (10H, m, ArH); 11,80 (1H, s, NHCS)

и 12,67 (1H, s, CSNH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 17,47 ($\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 26,08 (C(=O)CH_3); 44,43 (CH_{Nap}); 54,59 ($\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 105,14-156,71 (ароматични угљеници); 175,60 (CONH); 178,26 (NHCS) и 196,22 (C(=O)CH_3). m/z = 407,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 230,07; 195,05; 185,11; 170,09; 152,36 и 136,14. MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ = 429,12433; одређено = 429,12489.

Етилестар(((*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)-*L*-фенилаланина (дериват 6) - Жути кристални прашак. Принос: 30%. Температура топљења: 59-61 °C. IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}): 1155,75; 1688,89; 1737,73; 2934,28 и 3197,26. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,16 (3H, t, J = 7,2 Hz, $\text{R-C(=O)OCH}_2\text{CH}_3$); 1,43 (3H, d, J = 6,8 Hz, $\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 3,15 (2H, dd, J = 5,6 Hz, J = 10 Hz, $\text{CH}_2\text{-Phe}$); 3,87 (3H, s, $\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 4,10 (1H, q, J = 7,2 Hz, CH_{Nap}); 4,13 (2H, q, J = 3,6 Hz, $\text{R-C(=O)OCH}_2\text{CH}_3$); 5,04 (1H, q, J = 6,4 Hz, $\text{CH}_{\text{-Phe}}$); 7,07-7,83 (11H, m, ArH); 10,98 (1H, s, NHCS) и 11,57 (1H, s, CSNH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 14,39 ($\text{R-C(=O)OCH}_2\text{CH}_3$); 18,60 ($\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 36,71 ($\text{CH}_2\text{-Phe}$); 45,41 (CH_{Nap}); 55,68 ($\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 58,94 ($\text{CH}_{\text{-Phe}}$); 61,59 ($\text{R-C(=O)OCH}_2\text{CH}_3$); 106,27-157,78 (ароматични угљеници); 170,30 ($\text{R-C(=O)OCH}_2\text{CH}_3$); 176,50 (CONH) и 180,77 (NHCS). m/z = 465,00 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 418,86; 390,73; 184,95; 178,93; 169,96 и 120,08. MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ = 487,16620; одређено = 487,16578.

Метилестар-*N* $^{\alpha}$ -(((*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)-*I*-метилтриптофана (дериват 7) - Бледожути кристални прашак. Принос: 25%. Температура топљења: 88-90 °C. IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}): 1174,36; 1693,37; 1740,80; 2932,10 и 3188,46. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,40 (3H, d, J = 7,2 Hz, $\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 3,20 (2H, dd, J = 4,0 Hz, J = 12 Hz, $\text{CH}_2\text{-Trp}$); 3,62 (3H, s, $\text{NCH}_3\text{-Trp}$); 3,63 (3H, s, R-C(=O)OCH_3); 3,87 (3H, s, $\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 4,10 (1H, q, J = 7,2 Hz, CH_{Nap}); 5,06 (1H, q, J = 5,6 Hz, $\text{CH}_{\text{-Trp}}$); 6,67-7,81 (11H, m, ArH); 10,99 (1H, s, NHCS) и 11,59 (1H, s, CSNH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 18,54 ($\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 26,72 ($\text{CH}_2\text{-Trp}$); 32,67 ($\text{NCH}_3\text{-Trp}$); 45,30 (CH_{Nap}); 52,76 (R-C(=O)OCH_3); 55,68 ($\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 58,90 ($\text{CH}_{\text{-Trp}}$); 106,21-157,75 (ароматични угљеници); 171,13 (R-C(=O)OCH_3); 176,44 (CONH) и 180,61 (NHCS). m/z = 504,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 470,36; 275,05; 216,07; 185,09; 174,11 и 144,14. MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ израчунато за $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ = 526,17710; одређено = 526,17742.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-(фенилкарбамотиоил)пропанамид (дериват 8) - Бледожути кристални прашак. Принос: 28%. Температура топљења: 137-139 °C. IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}): 1149,16; 1688,36; 3031,36 и 3169,36. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,50 (3H, d, J =6,8, $\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 3,86 (3H, s, $\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 4,22 (1H, q, J =6,8, CH_{Nap}); 7,15-7,84 (11H, m, ArH); 11,67 (1H, s, NHCS) и 12,43 (1H, s, CSNH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 18,52 ($\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 45,45 (CH_{Nap}); 55,65 ($\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 106,20-157,76 (ароматични угљеници); 176,65 (CONH) и 179,46 (NHCS). m/z = 364,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 364,06; 229,90; 184,84; 169,83; 154,05 и 152,88. MS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ = 387,11377; одређено = 387,11342.

(*S*)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-*N*-(*p*-толуилкарбамотиоил)пропанамид (дериват 9) - Бледожути кристални прашак. Принос: 26%. Температура топљења: 123-124 °C. IR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}): 1154,72; 1682,19; 3023,16 и 3176,53. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,50 (3H, d, J =7,2, $\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 2,29 (3H, s, CH_3); 3,87 (3H, s, $\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 4,22 (1H, q, J =6,8, CH_{Nap}); 7,16-7,85 (10H, m, ArH); 11,64 (1H, s, NHCS) и 12,37 (1H, s, CSNH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 17,45 ($\text{CH}_{3\text{Nap}}$); 19,96 (CH_3); 44,29 (CH_{Nap}); 54,59 ($\text{OCH}_{3\text{Nap}}$); 105,14-156,69 (ароматични угљеници); 175,56 (CONH) и 178,27 (NHCS). m/z = 379,1

[M+H]⁺; 230,07; 185,06; 169,95; 167,10; 149,98 и 108,19. MS [M+Na]⁺ израчунато за C₂₂H₂₂N₂O₂S = 401,12942; одређено = 401,12959.

(S)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-N-(o-толуилкарбамотиоил)пропанамид (дериват **10**) - Жути кристални прах. Принос: 42%. Температура топљења: 110-110,5 °C. IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 1157,26; 1686,27; 3025,90 и 3177,30. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,50 (3H, d, J=6,8, CH₃_{Nap}); 2,17 (3H, s, CH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃_{Nap}); 4,22 (1H, q, J=6,8, CH_{Nap}); 7,15-7,84 (10H, m, ArH); 11,68 (1H, s, NHCS) и 12,08 (1H, s, CSNH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 18,02 (CH₃_{Nap}); 18,61 (CH₃); 45,43 (CH_{Nap}); 55,66 (OCH₃_{Nap}); 106,22-157,77 (ароматични угљеници); 176,58 (CONH) и 180,30 (NHCS). m/z = 379,2 [M+H]⁺; 230,13; 185,12; 170,08; 167,09; 153,11 и 150,08. MS [M+Na]⁺ израчунато за C₂₂H₂₂N₂O₂S = 401,12942; одређено = 401,12956.

(S)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)-N-((2-метоксифенил)карбамотиоил)пропанамид (дериват **11**) - Бледожути кристални прах. Принос: 38%. Температура топљења: 159-160 °C. IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 1156,80; 1684,26; 2976,29 и 3208,73. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,50 (3H, d, J=6,8, CH₃_{Nap}); 3,84 (3H, s, OCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃_{Nap}); 4,22 (1H, q, J=6,8, CH_{Nap}); 6,94-8,49 (10H, m, ArH); 11,63 (1H, s, NHCS) и 12,71 (1H, s, CSNH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 18,44 (CH₃_{Nap}); 45,37 (CH_{Nap}); 55,65 (OCH₃_{Nap}); 56,47 (OCH₃); 106,18-157,75 (ароматични угљеници); 176,47 (CONH) и 178,24 (NHCS). m/z = 395,3 [M+H]⁺; 230,18; 185,19; 183,18; 170,20; 153,22 и 124,24. MS [M+Na]⁺ израчунато за C₂₂H₂₂N₂O₃S = 417,12433; одређено = 417,12460.

(S)-N-((2-флуорофенил)карбамотиоил)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропанамид (дериват **12**) - Бели кристални прах. Принос: 33%. Температура топљења: 146-147 °C. IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 1144,87; 1685,51; 2937,68 и 3183,02. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,52 (3H, d, J=6,8, CH₃_{Nap}); 3,87 (3H, s, OCH₃_{Nap}); 4,23 (1H, q, J=7,2, CH_{Nap}); 7,16-8,00 (10H, m, ArH); 11,85 (1H, s, NHCS) и 12,34 (1H, s, CSNH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 17,45 (CH₃_{Nap}); 44,37 (CH_{Nap}); 54,60 (OCH₃_{Nap}); 105,15-156,72 (ароматични угљеници); 175,66 (CONH) и 179,43 (NHCS). m/z = 383,1 [M+H]⁺; 230,14; 185,10; 171,07; 169,13; 153,11 и 152,06. MS [M+Na]⁺ израчунато за C₂₁H₁₉FN₂O₂S = 405,10435; одређено = 405,10465.

Метилестар(((S)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)фенилаланина (дериват **13**) - Бели кристални прах. Принос: 30%. Температура топљења: 58-60 °C. IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 1173,47; 1693,18; 1742,27; 2933,81 и 3183,77. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,43 (3H, d, J=6,8, CH₃_{Nap}); 3,15 (2H, dd, J=5,6, J=10, CH₂-Phe); 3,64 (3H, s, R-C(=O)OCH₃); 3,86 (3H, s, OCH₃_{Nap}); 4,10 (1H, q, J=6,4, CH_{Nap}); 5,05 (1H, q, J=6,4, CH_{-Phe}); 7,05-7,82 (11H, m, ArH); 10,97 (1H, s, NHCS) и 11,59 (1H, s, CSNH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 18,61 (CH₃_{Nap}); 36,63 (CH₂-Phe); 45,39 (CH_{Nap}); 52,73 (R-C(=O)OCH₃); 55,66 (OCH₃_{Nap}); 58,95 (CH_{-Phe}); 106,21-157,75 (ароматични угљеници); 170,79 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 176,50 (CONH) и 180,82 (NHCS). m/z = 451,1 [M+H]⁺; 419,11; 391,28; 185,06; 180,16; 169,90 и 153,19. MS [M+Na]⁺ израчунато за C₂₅H₂₆N₂O₄S = 473,15055; одређено = 473,15096.

Метилестар(((S)-2-(6-метоксинафтален-2-ил)пропаноил)карбамотиоил)триптофана (дериват **14**) - Бели кристални прах. Принос: 32%. Температура топљења: 91-93 °C. IR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 1154,16; 1683,78; 1740,19; 3017,40 и 3190,00. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,41 (3H, d, J=6,8, CH₃_{Nap}); 3,16 (2H, dd, J=4,0, J=12, CH₂-Trp); 3,63 (3H, s, R-C(=O)OCH₃); 3,88 (3H, s, OCH₃_{Nap}); 4,12 (1H, q, J=6,8, CH_{Nap}); 5,10 (1H, q, J=6, CH_{-Trp}); 7,05-7,82 (11H, m, ArH); 10,97 (1H, s, NHCS) и 11,59 (1H, s, CSNH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 18,61 (CH₃_{Nap}); 36,63 (CH₂-Trp); 45,39 (CH_{Nap}); 52,73 (R-C(=O)OCH₃); 55,66 (OCH₃_{Nap}); 58,95 (CH_{-Trp}); 106,21-157,75 (ароматични угљеници); 170,79 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 176,50 (CONH) и 180,82 (NHCS). m/z = 451,1 [M+H]⁺; 419,11; 391,28; 185,06; 180,16; 169,90 и 153,19. MS [M+Na]⁺ израчунато за C₂₅H₂₆N₂O₄S = 473,15055; одређено = 473,15096.

Trp); 6,69-7,82 (1H, m, ArH); 10,94 (1H, s, NHCS); 11,00 (1H, s, NH-Trp) и 11,58 (1H, s, CSNH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 17,54 (CH₃Nap); 25,91 (CH₂-Trp); 44,28 (CH_{Nap}); 51,64 (R-C(=O)OCH₃); 54,61 (OCH₃Nap); 57,82 (CH-Trp); 105,14-156,68 (ароматични угљеници); 170,12 (R-C(=O)OCH₃); 175,33 (CONH) и 179,65 (NHCS). *m/z* = 490,2 [M+H]⁺; 329,12; 261,06; 202,09; 185,10; 170,09 и 160,11. MS [M+Na]⁺ израчунато за C₂₇H₂₇N₃O₄S = 512,16145; одређено = 512,16195.

4.2. Испитивање липофилности новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена

4.2.1. *In silico* предвиђање липофилности

Вредности партиционог коефицијента (*logP*) израчунате применом *Molinspiration*, *SwissADME*, *MarvinSketch* и *ChemDes* софтвера приказане су у Табели 5.

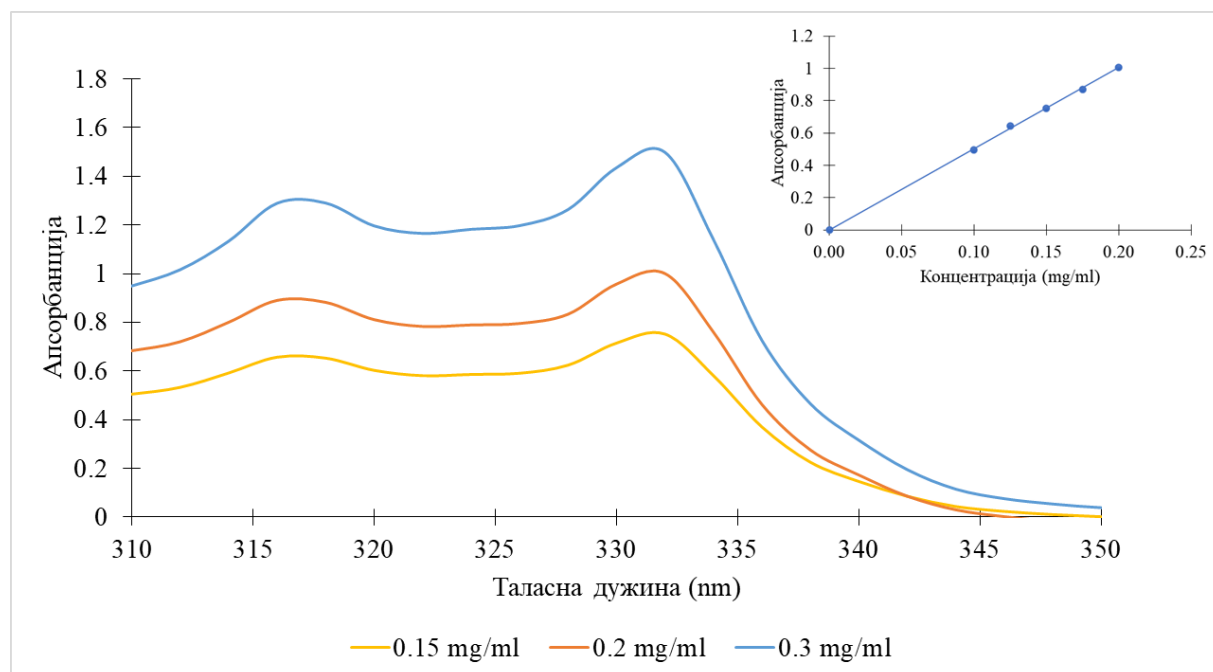
Табела 5. Вредности партиционог коефицијента (*logP*) новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена

Софтвер	<i>Molinspiration</i>	<i>SwissADME</i>						<i>MarvinSketch</i>	<i>ChemDes</i>
Једињење	Milog <i>P</i>	ilog <i>P</i>	xlog <i>P</i> 3	wlog <i>P</i>	mlog <i>P</i>	SILICOS-IT	Consensus log <i>P</i>	log <i>P</i>	log <i>P</i> по Kripen-y
1	4,65	3,05	5,51	4,83	3,33	5,31	4,41	5,13	4,60
2	4,54	3,11	5,38	4,28	2,61	4,95	4,07	4,74	4,47
3	4,92	3,79	5,75	4,67	2,82	5,36	4,48	5,08	4,86
4	4,52	3,46	5,22	4,28	2,61	4,95	4,11	4,74	4,47
5	4,39	2,95	5,09	4,48	2,48	5,36	4,07	4,3	4,67
6	5,46	4,18	5,97	4,12	2,84	5,83	4,59	4,97	4,12
7	5,30	4,21	5,68	4,22	2,17	5,48	4,35	4,98	4,22
8	4,49	2,80	5,41	4,27	2,95	4,88	4,06	4,99	4,47
9	4,94	3,19	5,77	4,58	3,17	5,41	4,42	5,46	4,77
10	4,89	3,10	5,61	4,58	3,17	5,41	4,37	5,46	4,77
11	4,50	3,15	5,22	4,28	2,61	4,95	4,04	4,74	4,47
12	4,60	2,90	5,35	4,83	3,33	5,31	4,34	5,13	4,60
13	5,08	3,90	5,60	3,73	2,63	5,42	4,26	4,63	3,73
14	5,23	3,72	5,73	4,21	1,97	5,99	4,32	4,73	3,73

4.2.2. Одређивање партиционог коефицијента у систему *n*-октанол/вода применом *shake-flask* методе

За валидацију методе одређивања партиционог коефицијента новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена коришћен је напроксен као контрола. Партициони коефицијент напроксена иницијално је испитан у систему *n*-октанол/вода. Приликом процеса мућкања две фазе дошло је до формирања суспензије напроксена у међуфази што је онемогућило мерење апсорбанције у октанолном раствору. С обзиром на то да је *pK_a* вредност напроксена 4,2 (233), било је неопходно подесити рН вредност воде на вредност при којој ће бити значајно сузбијена јонизација молекуског напроксена. Из наведеног разлога рН вредност водене фазе је подешена на 3, након чега је процес

поновљен применом система *n*-октанол/вода рН = 3 у запреминском односу 1:300 *v/v*. На Слици 23. приказани су спектри напроксена добијени анализом раствора *n*-октанола након раздвајања фаза (*n*-октанол/вода рН = 3), као и калибрациони дијаграм серије раствора познате концентрације напроксена у *n*-октанолу.



Слика 23. Резултати UV/VIS спектрофотометријског одређивања напроксена

Са калибрационе криве, а на основу измерених вредности апсорбанције напроксена у *n*-октанолу након раздвајања фаза, одређена је концентрација заосталог напроксена у *n*-октанолу (Слика 23.). Количина напроксена која је прешла у водену фазу (рН = 3) израчуната је из једначине (3).

Из добијених експерименталних резултата применом једначина (1) и (3) израчуната је липофилност (хидрофобност), односно, $\log P$ вредности напроксена које износе 2,69 (за 0,15 mg/ml), 2,42 (за 0,2 mg/ml) и 2,34 (за 0,3 mg/ml), а средња вредност је $\log P = 2,48 \pm 0,18$.

За процену применљивости наведене методе за одређивање $\log P$ вредности новосинтетисаних једињења одабран је дериват **5**, као репрезентативни представник испитиваног сета. Партициони коефицијент испитиваног једињења је одређен у систему *n*-октанол/вода у запреминском односу 1:500 *v/v*. Међутим, приликом мерења апсорбанције деривата **5** у *n*-октанолу након процеса мућкања закључено је да скоро целокупна количина једињења остаје растворена у *n*-октанолу, односно, да се испитивано једињење готово не раствара у води. Наиме, није било могуће одредити разлику између апсорбанције испитиваног једињења у *n*-октанолу пре и након мућкања са прихватљивим степеном прецизности. На основу добијених резултата за дериват **5** можемо претпоставити да синтетисана једињења имају знатно већу липофилност од напроксена, па није било могуће одредити $\log P$ вредности синтетисаних једињења применом спектрофотометријске методе. Према томе описана метода није била погодна за испитивање липофилности синтетисаних једињења (198,199).

4.2.3. Испитивање липофилности применом RP-TLC методе

Ретенциона понашања новосинтетисаних тиюреидних деривата напроксена испитивана су у пет различитих хроматографских система које су чинили вода и органски растварач (ацетонитрил, ацетон, тетра hidroфуран, апсолутни етанол и пропанол) у четири различита запреминска односа (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v). Вредности параметара липофилности добијених применом RP-TLC методе наведени су у Табели 6.

Табела 6. Вредности хроматографских параметара (R_M^0 , S и C_0) новосинтетисаних једињења добијени RP-TLC методом

TLC систем*	Параметар	Једињење													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
I	R_M^0	2,98	3,11	3,23	2,92	3,08	2,90	3,56	2,88	3,42	3,06	2,96	3,20	3,13	3,29
	S	-0,037	-0,040	-0,040	-0,036	-0,040	-0,034	-0,046	-0,036	-0,042	-0,039	-0,037	-0,040	-0,040	-0,044
	C_0	80,35	78,03	80,92	80,98	77,72	84,34	77,28	80,64	81,24	79,38	80,68	79,50	78,67	75,23
II	R_M^0	3,96	3,99	4,22	3,83	3,42	3,90	4,23	3,85	4,10	3,90	3,77	3,79	4,23	3,98
	S	-0,052	-0,053	-0,056	-0,050	-0,045	-0,051	-0,056	-0,051	-0,054	-0,051	-0,050	-0,049	-0,056	-0,054
	C_0	75,86	74,80	75,94	76,67	75,60	76,75	75,50	75,97	76,73	75,85	75,92	76,75	75,45	74,28
III	R_M^0	2,85	2,93	3,23	2,89	2,81	3,06	3,37	2,82	3,33	3,30	3,08	3,07	3,12	2,93
	S	-0,037	-0,038	-0,043	-0,038	-0,038	-0,040	-0,046	-0,037	-0,044	-0,044	-0,042	-0,041	-0,041	-0,040
	C_0	77,15	76,17	75,91	76,41	74,87	76,60	73,12	76,36	75,22	75,30	73,22	75,71	76,03	74,28
IV	R_M^0	3,32	3,33	3,50	3,28	3,36	3,70	3,42	3,38	3,64	3,70	3,46	3,32	3,57	3,40
	S	-0,042	-0,043	-0,044	-0,043	-0,044	-0,048	-0,045	-0,044	-0,046	-0,047	-0,046	-0,042	-0,045	-0,047
	C_0	78,35	76,97	79,65	77,01	75,84	76,70	75,65	77,22	80,05	78,81	75,82	78,51	78,70	72,58
V	R_M^0	1,74	1,46	1,63	1,58	1,86	1,56	1,58	1,63	1,61	1,56	1,57	1,50	1,37	1,21
	S	-0,028	-0,025	-0,027	-0,025	-0,031	-0,026	-0,026	-0,027	-0,026	-0,026	-0,026	-0,025	-0,025	-0,024
	C_0	62,08	58,00	60,45	62,24	59,46	59,90	59,94	61,42	62,19	59,45	60,21	59,81	55,28	51,10

* I - ацетонитрил/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v), II - ацетон/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v), III - тетраhydroфуран/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v), IV - апсолутни етанол/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v), V - пропанол/вода (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v)

Додатно је спроведена и линеарна корелациона анализа резултата RP-TLC испитивања липофилности. Вредности добијене овом методом (R_M^0 , S и C_0) корелисане су са *in silico* одређеним вредностима партиционог коефицијента. Израчунати су одговарајући коефицијенти корелације (r) и закључено је да RP-TLC није погодна метода за испитивање липофилности новосинтетисаних једињења. Међу примењеним хроматографским системима најбољу корелацију са *in silico* израчунатим вредностима $\log P$ показао је систем апсолутни етанол/вода. Коефицијенти корелације (r) за наведени хроматографски систем приказани су у Табели 7.

Табела 7. Вредности коефицијента корелације (r) између хроматографских параметара за RP-TLC систем апсолутни етанол/вода и партиционог коефицијента

Партициони коефицијент	Хроматографски параметри		
	R_M^0	S	C_0
<i>MilogP</i>	0,61	-0,72	-0,14
<i>ilogP</i>	0,37	-0,52	-0,21
<i>xlogP3</i>	0,68	-0,61	0,15
<i>wlogP</i>	-0,21	0,45	0,37
<i>mlogP</i>	0,20	0,30	0,80
<i>SILICOS-IT</i>	0,45	-0,65	-0,29
<i>Consensus logP</i>	0,57	-0,39	0,33
<i>MarvinSketch (logP)</i>	0,47	-0,11	0,59
<i>ChemDes (logP)</i>	-0,04	0,41	0,58

4.2.4. Испитивање липофилности применом RP-HPLC методе

Са циљем одређивања утицаја рН вредности на параметре липофилности одређене RP-HPLC методом, одабран је иницијални сет од четири једињења (деривати **2**, **3**, **8** и **14**) који је испитан применом три различите мобилне фазе (ацетонитрил/пуфер рН = 5,5, ацетонитрил/пуфер рН = 7,4 и ацетонитрил/вода) у четири различита запреминска односа (50:50, 60:40, 70:30 и 80:20 *v/v*). Наведени сет одабран је на тај начин да буде у хемијском смислу репрезентативан за цео скуп новосинтетисаних једињења. Параметри липофилности за одабрану групу једињења наведени су у Табели 8.

Табела 8. Вредности хроматографских параметара ($\log k_w$, S и φ_o) новосинтетисаних једињења

Једињење	Параметар	Мобилна фаза		
		ацетонитрил/пуфер	ацетонитрил/пуфер	ацетонитрил/вода
		pH = 5,5	pH = 7,4	
2	$\log k_w$	3,19	3,18	3,21
	S	-0,042	-0,042	-0,042
	φ_o	76,06	75,80	76,16
3	$\log k_w$	3,48	3,49	3,50
	S	-0,044	-0,044	-0,044
	φ_o	78,82	78,65	78,75
8	$\log k_w$	3,20	3,24	3,23
	S	-0,041	-0,042	-0,042
	φ_o	77,65	77,52	77,74
14	$\log k_w$	3,30	3,30	3,29
	S	-0,045	-0,045	-0,045
	φ_o	73,71	73,38	73,85

На основу наведених резултата може се закључити да су вредности хроматографских параметара за иницијални сет једињења врло сличне без обзира на примењену мобилну фазу, односно, да липофилност једињења није зависна од pH вредности средине. Из тог разлога одлучено је да се испитивање липофилности применом RP-HPLC методе за преосталих десет једињења спроведе уз употребу мобилне фазе ацетонитрил/вода. Вредности параметара липофилности новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена наведене су у Табели 9.

Табела 9. Вредности хроматографских параметара ($\log k_w$, S и φ_o) новосинтетисаних једињења добијених применом хроматографског система ацетонитрил/вода

Једињење	Хроматографски параметар		
	$\log k_w$	S	φ_o
1	3,35	-0,043	77,29
2	3,21	-0,042	76,16
3	3,50	-0,044	78,75
4	3,34	-0,043	77,25
5	3,06	-0,041	73,81
6	3,70	-0,046	80,18
7	3,66	-0,047	78,23
8	3,23	-0,042	77,74
9	3,50	-0,044	79,94
10	3,32	-0,042	78,36
11	3,31	-0,043	77,44
12	3,32	-0,043	77,12
13	3,45	-0,044	77,62
14	3,29	-0,045	73,85

Хроматографски параметри добијени RP-HPLC методом ($\log k_w$, S и ϕ_o) су корелисани са *in silico* одређеним вредностима партиционог коефицијента применом просте линеарне корелационе анализе. Добијени су одговарајући коефицијенти корелације (r) чије су вредности приказане у Табели 10.

Табела 10. Вредности коефицијената корелације (r) између хроматографских параметара добијених RP-HPLC методом и партиционог коефицијента

Партициони коефицијент	Хроматографски параметар		
	$\log k_w$	S	ϕ_o
<i>MilogP</i>	0,82	-0,90	0,38
<i>ilogP</i>	0,80	-0,92	0,30
<i>xlogP3</i>	0,80	-0,75	0,57
<i>wlogP</i>	-0,21	0,31	0,04
<i>mlogP</i>	0,00	0,33	0,51
<i>SILICOS-IT</i>	0,45	-0,65	-0,03
<i>Consensus logP</i>	0,75	-0,69	0,56
<i>MarvinSketch (logP)</i>	0,42	-0,16	0,69
<i>ChemDes (logP)</i>	-0,23	0,48	0,24

За парове хроматографских параметара и партиционих коефицијената који су показали највећи степен корелације ($|r| > 0,7$) извршена је проста линеарна регресиона анализа, при чему су формиране одговарајуће регресионе једначине и израчунати коефицијенти детерминације (R^2). Резултати регресионе анализе приказани су у Табели 11.

Табела 11. Регресионе једначине и коефицијенти детерминације линеарних зависности између $\log P$ и RP-HPLC параметара.

Регресиона једначина	R^2
$MilogP = 0,4147 \cdot \log k_w + 1,3729$	0,668
$ilogP = 0,2914 \cdot \log k_w + 2,3839$	0,637
$xlogP3 = 0,5518 \cdot \log k_w + 0,3266$	0,633
$Consensus logP = 0,7372 \cdot \log k_w + 0,2192$	0,565
$MilogP = -0,0042 \cdot S - 0,0233$	0,809
$ilogP = -0,0031 \cdot S + 0,033$	0,852
$xlogP3 = -0,0048 \cdot S - 0,0171$	0,564

4.3. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена

4.3.1. Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције применом РАМРА теста

Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције седам одабраних новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена (**2-7** и **11**) је најпре испитана применом оба РАМРА модела како би се утврдило да ли постоје разлике у добијеним резултатима. Резултати РАМРА теста за испитивани сет једињења наведени су у Табели 12.

Табела 12. РАРМА параметри пермеабилности и ретенције тиоуреидних деривата напроксена (2-7, 11) и напроксена

РАРМА модел	Једињење	$C_A(t)/C_D(0)$	$Pe (\cdot 10^{-6})$	$\log Pe$	R	$\%T$	$P_{app} (\cdot 10^{-6})$	$\log P_{app}$
хексадекан/хексан (први РАРМА модел)	2	$0,11 \pm 0,01$	$46,52 \pm 6,92$	$-4,34 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,07$	$10,92 \pm 0,66$	/	/
	3	$0,11 \pm 0,03$	$53,08 \pm 3,65$	$-4,28 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,18$	$10,76 \pm 2,55$	/	/
	4	$0,15 \pm 0,01$	$74,78 \pm 6,54$	$-4,13 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,04$	$15,02 \pm 1,07$	/	/
	5	$0,12 \pm 0,00$	$44,78 \pm 2,27$	$-4,35 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,02$	$11,92 \pm 0,35$	/	/
	6	$0,11 \pm 0,03$	$67,74 \pm 17,24$	$-4,18 \pm 0,11$	$0,34 \pm 0,30$	$10,53 \pm 2,92$	/	/
	7	$0,13 \pm 0,01$	$115,21 \pm 9,63$	$-3,94 \pm 0,04$	$-0,07 \pm 0,03$	$13,03 \pm 0,76$	/	/
	11	$0,11 \pm 0,30$	$50,30 \pm 4,02$	$-4,30 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,21$	$10,71 \pm 3,00$	/	/
лецитин јајета у додекану (други РАРМА модел)	2	$0,22 \pm 0,01$	/	$-5,34 \pm 0,02$	/	$21,85 \pm 0,65$	$4,57 \pm 0,18$	$5,34 \pm 0,02$
	3	$0,18 \pm 0,02$	/	$-5,43 \pm 0,06$	/	$17,92 \pm 1,66$	$3,54 \pm 0,41$	$5,43 \pm 0,06$
	4	$0,14 \pm 0,02$	/	$-5,57 \pm 0,06$	/	$14,43 \pm 1,71$	$2,72 \pm 0,39$	$5,57 \pm 0,06$
	5	$0,15 \pm 0,00$	/	$-5,55 \pm 0,01$	/	$14,82 \pm 0,21$	$2,80 \pm 0,05$	$5,55 \pm 0,01$
	6	$0,22 \pm 0,01$	/	$-5,34 \pm 0,02$	/	$21,67 \pm 0,71$	$4,52 \pm 0,20$	$5,35 \pm 0,02$
	7	$0,16 \pm 0,01$	/	$-5,52 \pm 0,04$	/	$15,87 \pm 1,23$	$3,04 \pm 0,29$	$5,52 \pm 0,04$
	11	$0,23 \pm 0,01$	/	$-5,37 \pm 0,03$	/	$22,49 \pm 1,22$	$4,76 \pm 0,35$	$5,32 \pm 0,03$

С обзиром на то да су резултати добијени помоћу два наведена модела слични, да се првим РАРМА моделом могу израчунати ретенције испитиваних једињења и да је приликом његове примене време инкубације значајно краће, одлучено је да се испитивање преосталих једињења изврши употребом система хексадекан/хексан као вештачке РАРМА мембране. Резултати РАРМА теста за преосталих седам новосинтетисаних једињења наведени су у Табели 13.

Табела 13. РАРМА параметри пермеабилности и ретенције тиюреидних деривата напроксена (**1, 8-10, 12-14**) и напроксена добијени првим РАРМА моделом

Једињење	$C_A(t)/C_D(0)$	$Pe (\cdot 10^{-6})$	$\log Pe$	R	$\%T$
1	$0,11 \pm 0,01$	$40,14 \pm 3,10$	$-4,40 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,01$	$10,83 \pm 1,09$
8	$0,10 \pm 0,04$	$44,72 \pm 7,37$	$-4,35 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,28$	$9,89 \pm 3,75$
9	$0,11 \pm 0,00$	$39,38 \pm 1,56$	$-4,41 \pm 0,02$	$-0,06 \pm 0,01$	$10,89 \pm 0,38$
10	$0,11 \pm 0,00$	$38,93 \pm 1,44$	$-4,41 \pm 0,02$	$-0,03 \pm 0,02$	$10,78 \pm 0,35$
12	$0,12 \pm 0,01$	$43,72 \pm 2,61$	$-4,36 \pm 0,03$	$-0,01 \pm 0,03$	$11,90 \pm 0,65$
13	$0,07 \pm 0,02$	$29,62 \pm 0,43$	$-4,53 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,19$	$6,92 \pm 1,58$
14	$0,10 \pm 0,00$	$34,17 \pm 0,48$	$-4,47 \pm 0,01$	$-0,03 \pm 0,02$	$9,60 \pm 0,12$
Напроксен	$0,18 \pm 0,03$	$98,63 \pm 15,70$	$-4,01 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,06$	$18,09 \pm 3,44$

4.3.2. Статистичка анализа QSPR модела

Вредности статистичких параметара QSPR модела формираних у софтверима *alvaModel* и *STATISTICA* наведени су у Табели 14.

Табела 14. Статистички параметри QSPR модела добијени у *alvaModel* и *STATISTICA* софтверима

Софтвер	Модел	Регресиона једначина	RMSEE	RMSEP	Q ² _{test}	r	r ²	Q ² _{training}
<i>alvaModel</i>	OLS(log <i>Pe</i>)	$\log Pe = 4,469 + 0,063 * F06[C-C] - 0,637 * WHALES100_Rem$	0,080	0,166	-1,685	0,333	0,111	0,483
	PLS(log <i>Pe</i>)	$\log Pe = f(RDCHI, VE2_D/Dt, SM4_Dz(i), Wi_B(e), MATS6e, GGI3, SpMax4_Bh(m), SpMax4_Bh(i), P_VSA_p_2, Chi1_AEA(bo), SM06_AEA(dm), Eig07_EA(ri), Eig10_AEA(ed), RDF040v, RDF155p, E3v, L2p, ISH, H7m, HATS2e, R1p+, SP19, SsF, NssO, gmin, F05[C-S], CATS3D_03_DL, CATS3D_10_AA, CATS3D_02_AL, s34_phRelSize)$	0,055	0,072	0,495	0,747	0,559	-4,674
	SVM(log <i>Pe</i>)	$\log Pe = f(SM07_EA(dm), CATS3D_02_AL)$	0,077	0,069	0,536	0,956	0,914	0,543
	MLR(log <i>Pe</i>)	/	/	/	/	/	/	/
	PLS(log <i>Pe</i>)	$\log Pe = f(Mor25m, minssO, RDF020m, s34_relSize, GATS2i, E2s, LOGP99, GATS2e, SpMin5_Bh(s), R8p+, R7p+, MATS2v, H8p, SpMin6_Bh(s), JGI3, RDF130s, ATSC2m, Mor14v, Mor13v, P_VSA_i_3, GATS7p, CATS3D_05_AA, P_VSA_ppp_A, WHALES60_Rem, SpMax_L, SpMAD_Coulomb, CATS2D_09_AA, SpDiam_AEA(ri), RDF075i, HATS8i.)$	0,058	0,109	-0,166	0,467	0,218	/
SVM(log <i>Pe</i>)	$\log Pe = f(Mor25m, minssO)$	0,125	0,140	-0,930	0,554	0,307	/	

4.3.3. Ретенционо понашање испитиваних једињења у ВМС систему

ВМС испитивање спроведено је на сету од седам тиоуреидних деривата напроксена (**2-7** и **11**) и напроксену као референтном једињењу. Приликом одабира сета за испитивање бирају се једињења која припадају хемијски различитим дериватима како би се на основу њиховог понашања проценила могућност примене ВМС испитивања на преосталих седам новосинтетисаних деривата. Добијени резултати изражени су као ретенционо време (t_R), ретенциони фактор (k) и његова логаритмована вредност ($\log k$), а приказани су у Табели 15.

Табела 15. Ретенциони фактори испитиваних једињења (**2-7** и **11**) у ВМС систему

Једињење	t_R (s)	k	$\log k$
2	37,24	30,03333	1,477604
3	35,54	28,61667	1,456619
4	42,06	34,05	1,532117
5	27,57	21,975	1,341929
6	57,9	47,25	1,674402
7	43,94	35,61667	1,551653
11	37,9	30,58333	1,485485

4.3.4. Статистичка анализа QSRR модела

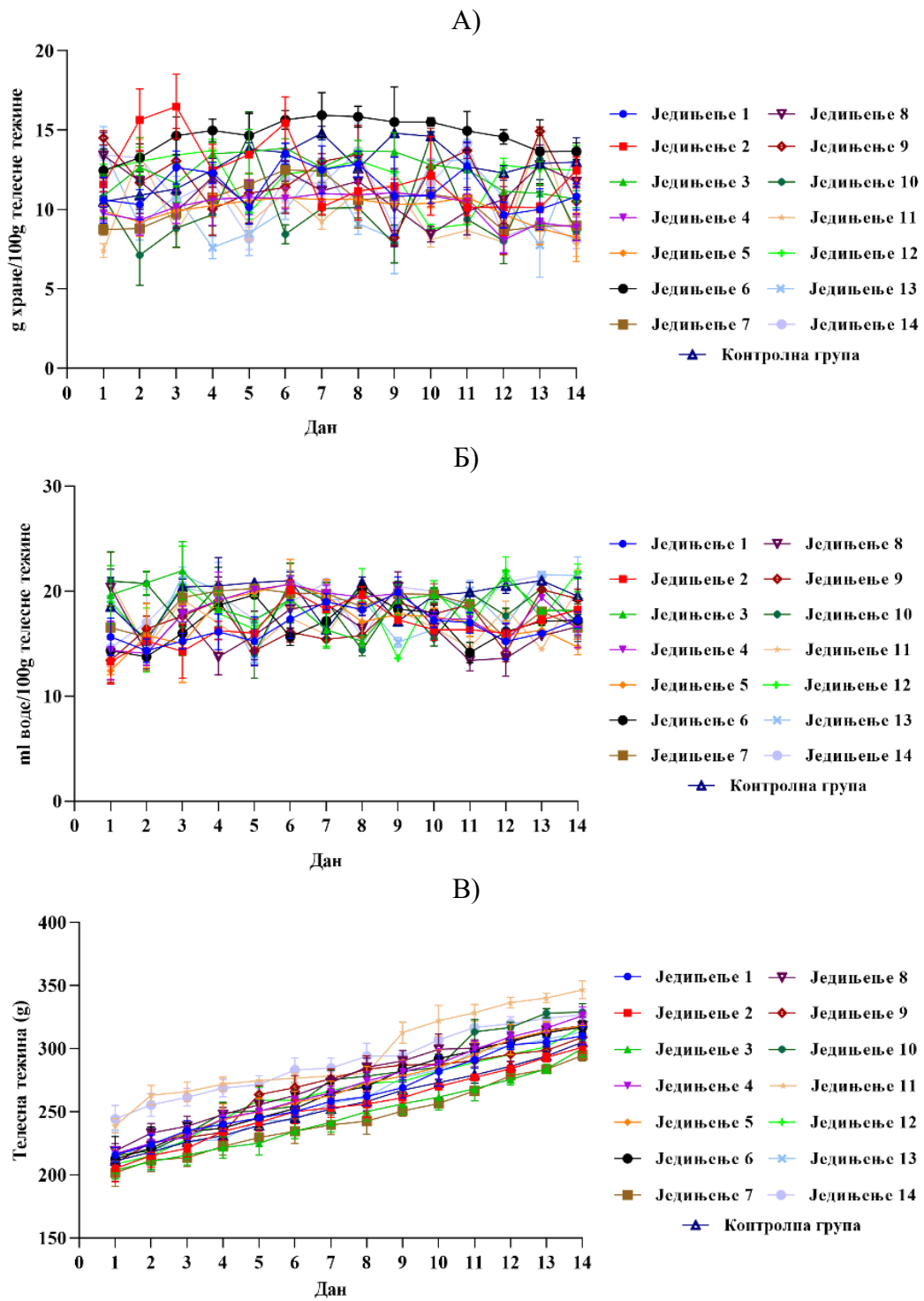
Формирање $MLR(k)$ модела извршено је применом MLR *forward stepwise* метода. *FSVS* поступком одабран је *VE2sign_A* дескриптор, међутим, њиме није могуће формирати валидан $MLR(k)$ модел. Применом MLR *forward stepwise* методе изабрани дескриптор је *Mor20u* и њиме је добијен валидан модел. Овај модел карактеришу високе вредности R и R^2 које износе 0,977, односно 0,955. Изведена једначина $MLR(k)$ модела гласи:

$$\log k = -25,5626 + 18,0194 * Mor20u$$

4.4. *In vivo* испитивање акутне токсичности и антиинфламацијске активности на *Wistar Albino* пацовима

4.4.1. Испитивање акутне оралне токсичности

Како би се окарактерисао безбедносни профил 14 новосинтетисаних једињења, испитан је њихов токсични потенцијал на виталне органе. Резултати уноса хране, воде и повећања телесне тежине, као важни параметри општег стања експерименталних животиња, приказани су на Слици 24. Спроведено истраживање је показало да нема статистички значајне разлике у релативној тежини виталних органа између пацова третиране и контролне групе (Табела 16).



Слика 24. Унос хране (А), воде (Б) и телесна тежина (В) код експерименталних група и контролне групе пацова

Табела 16. Релативна тежина органа код експерименталних група и контролне групе пацова

Орган Једињење	Бубрег	Срце	Јетра	Желудац
1	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,02	2,73 ± 0,24	0,54 ± 0,05
2	0,34 ± 0,04	0,33 ± 0,04	3,07 ± 0,38	0,57 ± 0,04
3	0,32 ± 0,06	0,31 ± 0,03	2,85 ± 0,17	0,50 ± 0,05
4	0,33 ± 0,07	0,30 ± 0,03	2,45 ± 0,15	0,50 ± 0,05
5	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,03	2,97 ± 0,33	0,53 ± 0,04
6	0,35 ± 0,05	0,34 ± 0,02	3,01 ± 0,29	0,55 ± 0,03
7	0,29 ± 0,03	0,33 ± 0,03	2,64 ± 0,46	0,50 ± 0,04
8	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,01	2,65 ± 0,15	0,51 ± 0,06
9	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,03	3,01 ± 0,27	0,56 ± 0,03
10	0,31 ± 0,04	0,34 ± 0,04	2,67 ± 0,15	0,58 ± 0,04
11	0,33 ± 0,05	0,32 ± 0,02	2,83 ± 0,20	0,54 ± 0,05
12	0,32 ± 0,04	0,35 ± 0,03	2,76 ± 0,36	0,59 ± 0,05
13	0,28 ± 0,06	0,30 ± 0,04	3,09 ± 0,27	0,50 ± 0,06
14	0,29 ± 0,04	0,31 ± 0,02	2,03 ± 0,42	0,53 ± 0,04
Контролна група	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01	2,91 ± 0,10	0,53 ± 0,04

4.4.2. *In vivo* испитивање антиинфламацијске активности

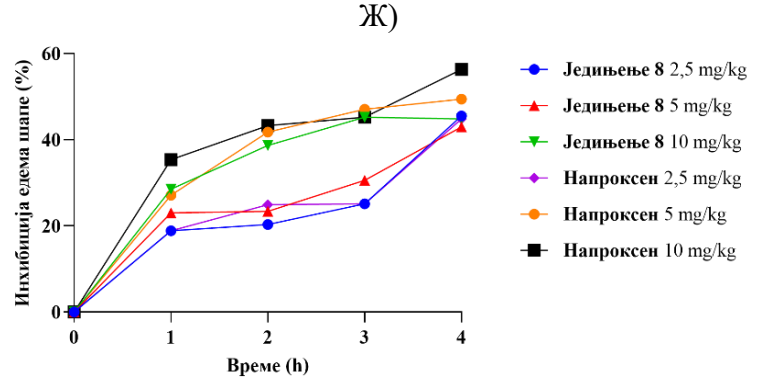
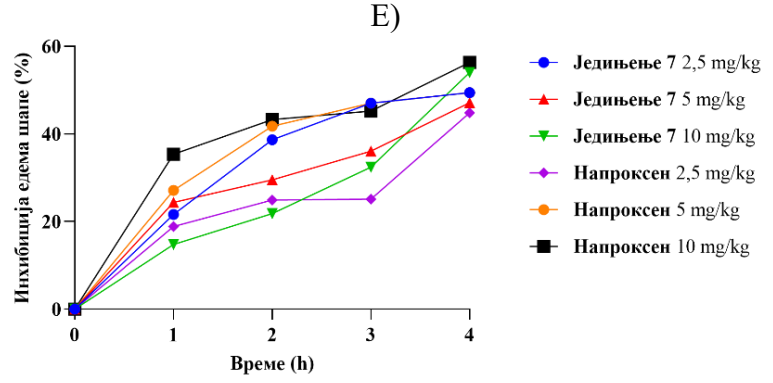
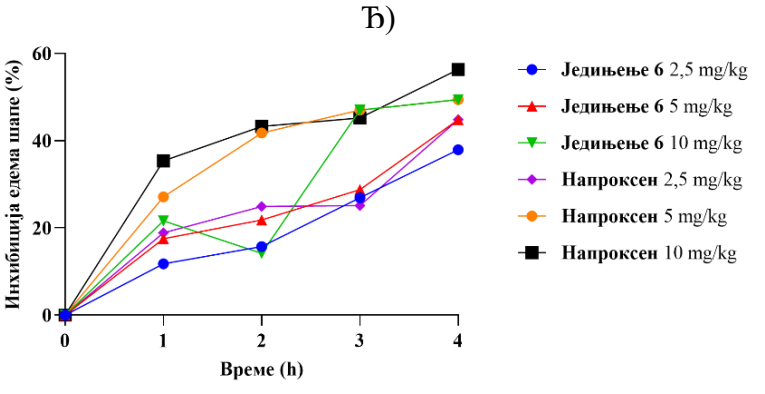
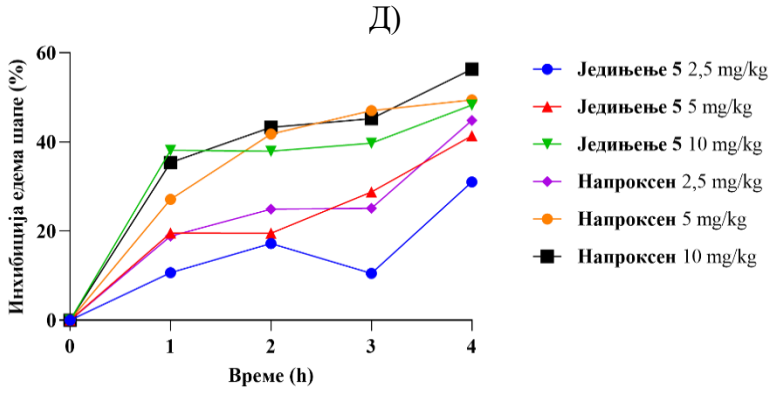
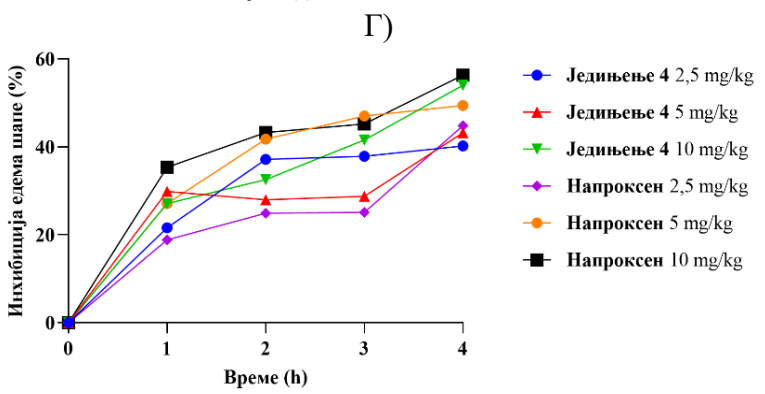
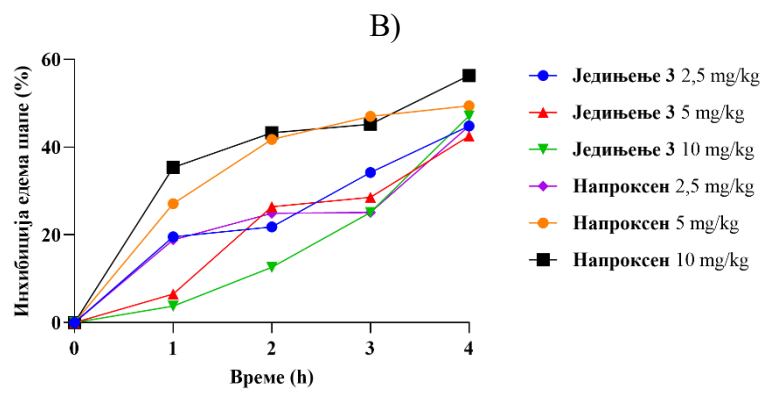
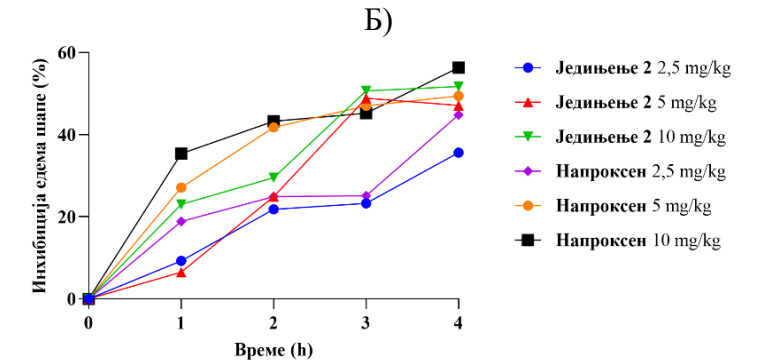
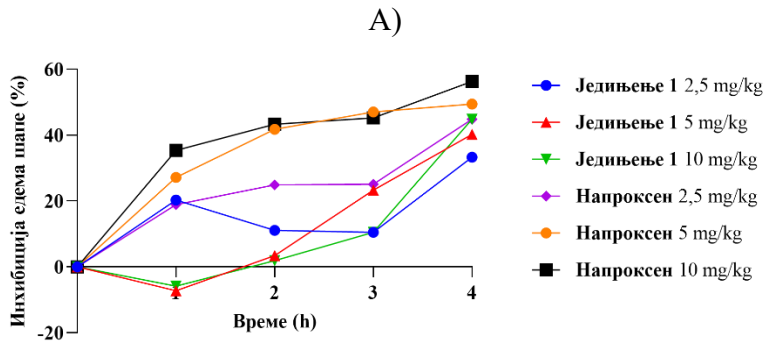
С обзиром на то да синтетисана једињења у највећој дози од 10 mg/kg нису показала токсичност, спроведено је *in vivo* испитивање антиинфламацијске активности употребом модела инфламације изазване карагенаном. Карагенаном индукована инфламација се манифестовала у виду отока шапе, а ефекат примењених супстанци је квантификован мерењем дебљине шапе калипером. Резултати антиинфламацијске активности приказани су у Табели 17 и на Слици 25.

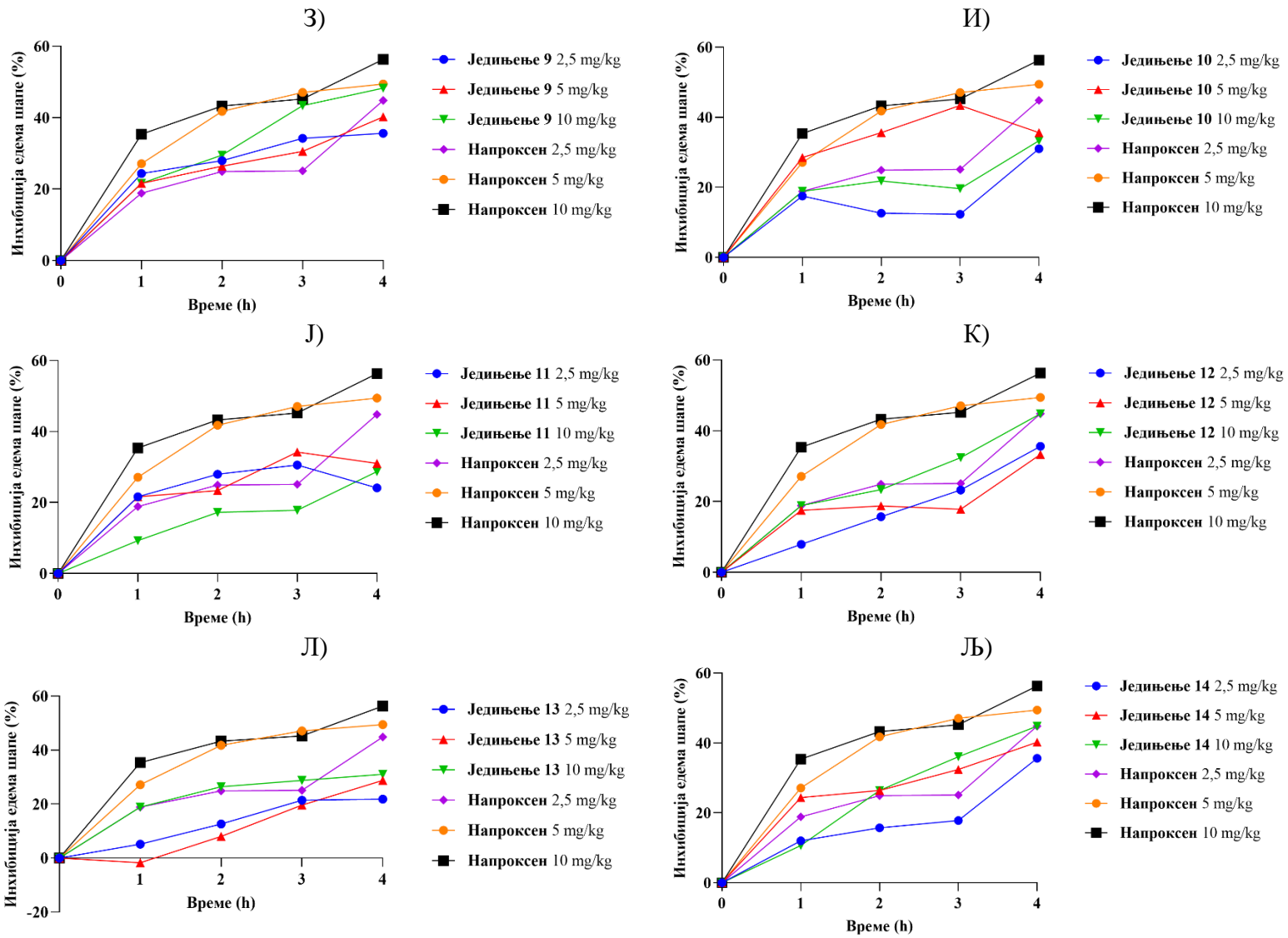
Табела 17. Антиинфламацијска активност испитиваних једињења и напроксена. Резултати су изражени као средња вредност дебљине шапе ± стандардна девијација и као проценат инхибиције

Експериментална група	Дебљина шапе пацова (mm) (% инхибиције)				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Једињење 1 2,5 mg/kg	4,57 ± 0,31	6,50 ± 0,40 (20,275%)	6,50 ± 0,40 (11,111%)	6,20 ± 0,30 (10,502%)	5,53 ± 0,29 (33,333%)
Једињење 1 5,0 mg/kg	4,40 ± 0,36	7,00 ± 0,10 (-7,216%)	6,50 ± 0,17 (3,448%)	5,8 ± 0,20 (23,288%)	5,27 ± 0,29 (40,230%)
Једињење 1 10,0 mg/kg	4,47 ± 0,51	7,03 ± 0,12 (-5,842%)	6,60 ± 0,10 (1,916%)	6,10 ± 0,17 (10,502%)	5,27 ± 0,50 (44,800%)*
Једињење 2 2,5 mg/kg	4,37 ± 0,15	6,57 ± 1,16 (9,278%)	6,07 ± 0,72 (21,839%)	5,77 ± 0,42 (23,288%)	5,30 ± 0,26 (35,632%)
Једињење 2 5,0 mg/kg	4,77 ± 0,21	7,03 ± 0,47 (6,529%)	6,40 ± 0,53 (24,904%)	5,70 ± 0,20 (48,858%)*	5,53 ± 0,29 (47,126%)*
Једињење 2 10,0 mg/kg	4,63 ± 0,06	6,5 ± 0,40 (23,024%)	6,17 ± 0,67 (29,502%)	5,53 ± 0,15 (50,685%)*	5,33 ± 0,25 (51,724%)*
Једињење 3 2,5 mg/kg	4,30 ± 0,28	6,25 ± 0,21 (19,588%)	6,0 ± 0,57 (21,839%)	5,50 ± 0,42 (34,247%)	5,10 ± 0,14 (44,737%)
Једињење 3 5,0 mg/kg	4,13 ± 0,25	6,40 ± 0,79 (6,529%)	5,73 ± 0,38 (26,437%)*	5,44 ± 0,28 (28,584%)	4,97 ± 0,42 (42,529%)*
Једињење 3 10,0 mg/kg	3,90 ± 0,20	6,23 ± 0,25 (3,780%)	5,80 ± 0,26 (12,644%)	5,27 ± 0,15 (25,114%)	4,67 ± 0,38 (47,217%)*
Једињење 4 2,5 mg/kg	4,03 ± 0,06	5,93 ± 0,25 (21,649%)	5,40 ± 0,10 (37,165%)*	5,17 ± 0,15 (37,900%)	4,90 ± 0,10 (40,523%)*
Једињење 4 5,0 mg/kg	4,40 ± 0,62	6,10 ± 0,44 (29,897%)*	5,97 ± 0,25 (27,969%)	5,70 ± 0,46 (28,767%)	5,22 ± 0,50 (43,218%)*
Једињење 4 10,0 mg/kg	4,23 ± 0,06	6,00 ± 0,10 (27,148%)*	5,70 ± 0,20 (32,567%)*	5,30 ± 0,17 (41,553%)*	4,90 ± 0,20 (54,013%)*
Једињење 5 2,5 mg/kg	3,57 ± 0,12	5,73 ± 0,12 (10,653%)	5,37 ± 0,25 (17,241%)	5,20 ± 0,20 (10,502%)	4,57 ± 0,15 (31,034%)
Једињење 5 5,0 mg/kg	3,10 ± 0,00	5,05 ± 0,07 (19,588%)	4,85 ± 0,07 (19,540%)	4,40 ± 0,14 (28,767%)	3,95 ± 0,07 (41,379%)
Једињење 5 10,0 mg/kg	4,00 ± 0,28	5,5 ± 0,71 (38,144%)*	5,35 ± 0,64 (37,931%)*	5,90 ± 0,71 (39,726%)	4,75 ± 0,49 (48,276%)
Једињење 6 2,5 mg/kg	4,03 ± 0,06	6,17 ± 0,31 (11,753%)	5,87 ± 0,23 (15,709%)	5,37 ± 0,55 (26,941%)	4,93 ± 0,21 (37,931%)
Једињење 6 5,0 mg/kg	4,47 ± 0,35	6,47 ± 0,57 (17,526%)	6,17 ± 0,06 (21,839%)	5,77 ± 0,06 (28,767%)	5,27 ± 0,21 (44,724%)
Једињење 6 10,0 mg/kg	4,30 ± 0,62	6,20 ± 0,20 (21,649%)	6,17 ± 0,23 (14,176%)	5,27 ± 0,72 (47,103%)	5,03 ± 0,76 (49,425%)*
Једињење 7 2,5 mg/kg	5,13 ± 0,29	7,03 ± 0,15 (21,649%)	6,47 ± 0,21 (38,697%)*	6,10 ± 0,20 (47,032%)*	5,87 ± 0,21 (49,425%)*
Једињење 7 5,0 mg/kg	5,27 ± 0,40	7,10 ± 0,17 (24,399%)	6,80 ± 0,20 (29,502%)*	6,43 ± 0,32 (36,073%)	6,03 ± 0,61 (47,126%)
Једињење 7 10,0 mg/kg	4,80 ± 0,53	6,87 ± 0,25 (14,777%)	6,50 ± 0,36 (21,839%)	6,03 ± 0,21 (32,420%)	5,47 ± 0,38 (54,123%)*
Једињење 8 2,5 mg/kg	3,70 ± 0,44	5,67 ± 0,15 (18,900%)	5,43 ± 0,15 (20,307%)	5,07 ± 0,21 (25,114%)	4,53 ± 0,50 (42,529%)*
Једињење 8 5,0 mg/kg	4,13 ± 0,31	6,0 ± 0,36 (23,024%)*	5,8 ± 0,44 (23,372%)	5,40 ± 0,44 (30,594%)	4,96 ± 0,35 (42,989%)*
Једињење 8 10,0 mg/kg	4,27 ± 0,15	6,0 ± 0,40 (28,522%)*	5,60 ± 0,44 (38,697%)*	5,27 ± 0,38 (45,205%)*	5,07 ± 0,21 (44,828%)*
Једињење 9 2,5 mg/kg	4,77 ± 0,15	6,60 ± 0,10 (24,399%)*	6,33 ± 0,06 (27,969%)*	5,97 ± 0,06 (34,247%)	5,70 ± 0,26 (35,632%)
Једињење 9 5,0 mg/kg	4,63 ± 0,29	6,53 ± 0,32 (21,649%)	6,23 ± 0,23 (26,437%)	5,90 ± 0,17 (30,594%)	5,50 ± 0,36 (40,230%)*
Једињење 9 10,0 mg/kg	4,30 ± 0,20	6,20 ± 0,17 (21,649%)*	5,83 ± 0,29 (29,502%)*	5,33 ± 0,15 (43,379%)*	5,05 ± 0,09 (48,276%)*

Једињење 10 2,5 mg/kg	4,17 ± 0,60	6,17 ± 0,51 (17,526%)	6,07 ± 0,83 (12,644%)	5,77 ± 0,85 (12,329%)	5,17 ± 0,75 (31,034%)
Једињење 10 5,0 mg/kg	4,73 ± 0,15	6,47 ± 0,51 (28,522%)	6,13 ± 0,47 (35,632%)*	5,77 ± 0,32 (43,379%)*	5,67 ± 0,40 (35,632%)
Једињење 10 10,0 mg/kg	4,23 ± 0,38	6,20 ± 0,36 (18,900%)	5,93 ± 0,31 (21,839%)	5,70 ± 0,44 (19,635%)	5,20 ± 0,44 (33,333%)
Једињење 11 2,5 mg/kg	5,40 ± 0,80	7,30 ± 0,60 (21,649%)	6,97 ± 0,67 (27,969%)*	6,67 ± 0,80 (30,593%)	6,50 ± 0,80 (24,137%)
Једињење 11 5,0 mg/kg	5,07 ± 0,32	6,97 ± 0,12 (21,649%)	6,73 ± 0,15 (23,372%)	6,27 ± 0,23 (34,247%)	6,07 ± 0,15 (31,034%)
Једињење 11 10,0 mg/kg	5,13 ± 0,32	7,33 ± 0,06 (9,278%)	6,93 ± 0,12 (17,241%)	6,63 ± 0,15 (17,808%)	6,17 ± 0,31 (28,736%)
Једињење 12 2,5 mg/kg	4,60 ± 0,36	6,83 ± 0,38 (7,904%)	6,43 ± 0,40 (15,709%)	6,00 ± 0,30 (23,288%)	5,53 ± 0,06 (35,632%)
Једињење 12 5,0 mg/kg	4,07 ± 0,06	6,07 ± 0,64 (17,526%)	5,83 ± 0,49 (18,774%)	5,57 ± 0,38 (17,808%)	5,03 ± 0,12 (33,333%)
Једињење 12 10,0 mg/kg	4,37 ± 0,38	6,33 ± 0,21 (18,900%)	6,03 ± 0,06 (23,372%)	5,60 ± 0,10 (32,420%)	5,17 ± 0,21 (44,828%)*
Једињење 13 2,5 mg/kg	4,70 ± 0,17	7,0 ± 0,10 (5,155%)	6,60 ± 0,10 (12,644%)	6,13 ± 0,12 (21,461%)	5,83 ± 0,06 (21,839%)
Једињење 13 5,0 mg/kg	4,43 ± 0,31	6,90 ± 0,10 (-1,718%)	6,43 ± 0,32 (8,046%)	5,90 ± 0,36 (19,635%)	5,47 ± 0,23 (28,736%)
Једињење 13 10,0 mg/kg	4,80 ± 0,36	6,77 ± 0,42 (18,900%)	6,40 ± 0,36 (26,437%)*	6,10 ± 0,36 (28,767%)	5,80 ± 0,30 (31,034%)
Једињење 14 2,5 mg/kg	4,40 ± 0,53	6,53 ± 0,42 (12,027%)	6,23 ± 0,25 (15,709%)	5,90 ± 0,26 (17,808%)	5,33 ± 0,49 (35,632%)
Једињење 14 5,0 mg/kg	4,93 ± 0,12	6,77 ± 0,38 (24,399%)	6,53 ± 0,42 (26,437%)	6,17 ± 0,25 (32,420%)	5,80 ± 0,10 (40,230%)*
Једињење 14 10,0 mg/kg	4,87 ± 0,25	7,03 ± 0,21 (10,653%)	6,47 ± 0,06 (26,437%)*	6,03 ± 0,25 (36,073%)	5,67 ± 0,21 (44,828%)*
Напроксен 2,5 mg/kg	4,23 ± 0,40	6,20 ± 0,10 (18,900%)	5,87 ± 0,12 (24,904%)	5,60 ± 0,17 (25,114%)	5,03 ± 0,25 (44,828%)*
Напроксен 5,0 mg/kg	4,10 ± 0,10	5,87 ± 0,23 (27,148%)*	5,37 ± 0,31 (41,762%)*	5,07 ± 0,35 (47,083%)*	4,83 ± 0,21 (49,448%)*
Напроксен 10,0 mg/kg	4,17 ± 0,30	5,73 ± 0,20 (35,395%)*	5,40 ± 0,40 (43,295%)*	5,20 ± 0,30 (45,205%)*	4,80 ± 0,40 (56,322%)*
1% DMSO	4,40 ± 0,08	6,83 ± 0,30	6,58 ± 0,30	6,23 ± 0,46	5,85 ± 0,31

* Статистички значајна разлика са нивоом значајности $p < 0,05$ у односу на контролну групу





Слика 25. Процент инхибиције едема шапе пацова третираних једињењем 1 (А), једињењем 2 (Б), једињењем 3 (В), једињењем 4 (Г), једињењем 5 (Д), једињењем 6 (Ђ), једињењем 7 (Е), једињењем 8 (Ж), једињењем 9 (З), једињењем 10 (И), једињењем 11 (Ј), једињењем 12 (К), једињењем 13 (Л) и једињењем 14 (Љ) у дози од 2,5 mg/kg, 5 mg/kg и 10 mg/kg

4.5. Испитивање COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности

Са циљем да се процени потенцијални механизам антиинфламацијског дејства, испитан је инхибиторни потенцијал синтетисаних тиоуреидних деривата напроксена према COX-2 и 5-LOX ензимима. Резултати COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности, изражени као проценат инхибиције на 10 $\mu\text{mol/l}$ и IC₅₀ вредности, приказани су у Табели 18. Испитана је и инхибиторна активност селективног COX-2 (целекоксиб) и 5-LOX (зилеутон) инхибитора, као и полазног лека напроксена.

Табела 18. Резултати COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности

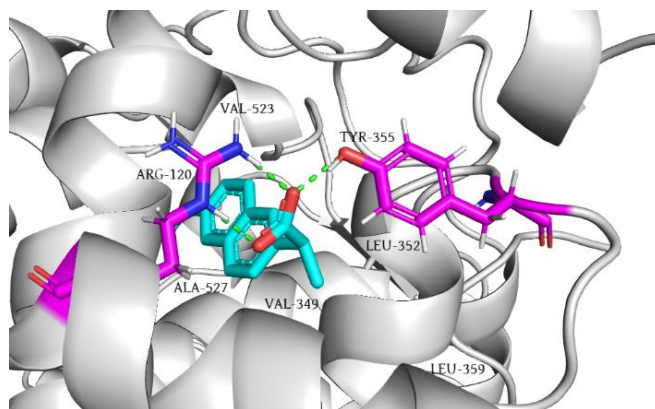
Једињење	COX-2 проценат инхибиције	COX-2 (IC ₅₀ μM)	5-LOX проценат инхибиције	5-LOX (IC ₅₀ μM)
1	24,73 \pm 1,11	НО	34,25 \pm 1,04	19,16 \pm 0,96
2	18,77 \pm 4,37	НО	25,12 \pm 1,83	39,77 \pm 1,98
3	23,39 \pm 0,57	НО	47,02 \pm 4,32	9,52 \pm 1,51
4	37,71 \pm 0,28	НО	77,20 \pm 0,26	0,30 \pm 0,12
5	19,58 \pm 4,55	НО	46,19 \pm 4,87	16,74 \pm 1,79
6	23,99 \pm 5,36	НО	23,63 \pm 2,14	НО
7	24,23 \pm 5,77	НО	20,72 \pm 4,19	НО
8	36,23 \pm 16,45	НО	34,63 \pm 5,84	НО
9	26,84 \pm 6,07	НО	12,94 \pm 5,47	НО
10	12,64 \pm 4,99	НО	27,92 \pm 0,57	НО
11	16,18 \pm 13,72	НО	31,24 \pm 5,45	НО
12	13,82 \pm 6,41	НО	29,72 \pm 8,56	НО
13	23,12 \pm 9,83	НО	19,84 \pm 13,22	НО
14	29,80 \pm 12,12	НО	46,24 \pm 0,40	НО
Напроксен	72,15 \pm 1,40	0.20 \pm 0.02	НИ	НИ
Целекоксиб	85,02 \pm 0,31	0.07 \pm 0.01	НИ	НИ
Зилеутон	НИ	НИ	64,85 \pm 0,39	0,36 \pm 0,10

*НО - Није могуће одредити

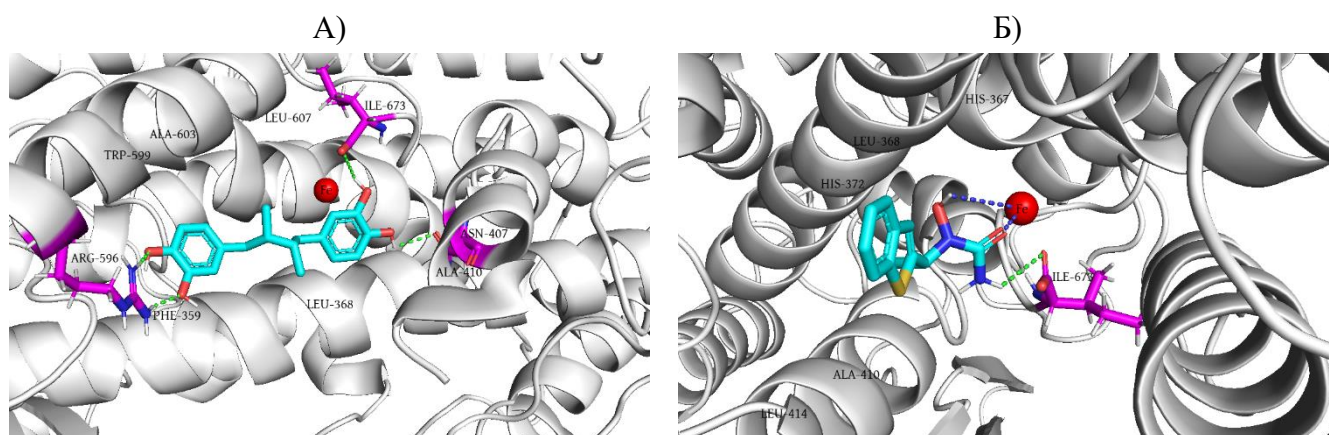
**НИ - Није испитивано

4.6. Студија молекулског докинга

In silico процена потенцијала испитиваних једињења да се вежу за активна места COX-2 и 5-LOX ензима спроведена је применом студије молекулског докинга. Потенцијал везивања је испитан на основу вредности енергије везивања, броја и типа везујућих интеракција. Модел везивања напроксена за активно место COX-2 приказан је на Слици 26, док је начин уклапања NDGA и зилеутона у каталитичком месту 5-LOX приказан на Слици 27. Свих 14 новосинтетисаних једињења је уклапано у оба циљна ензима. Енергетски најповољније конформације за везивање су приказане на Сликама 28 и 29, док су вредности њихове енергије везивања приказане у Табели 19.



Слика 26. Молекулко уклапање напроксена у активно место COX-2

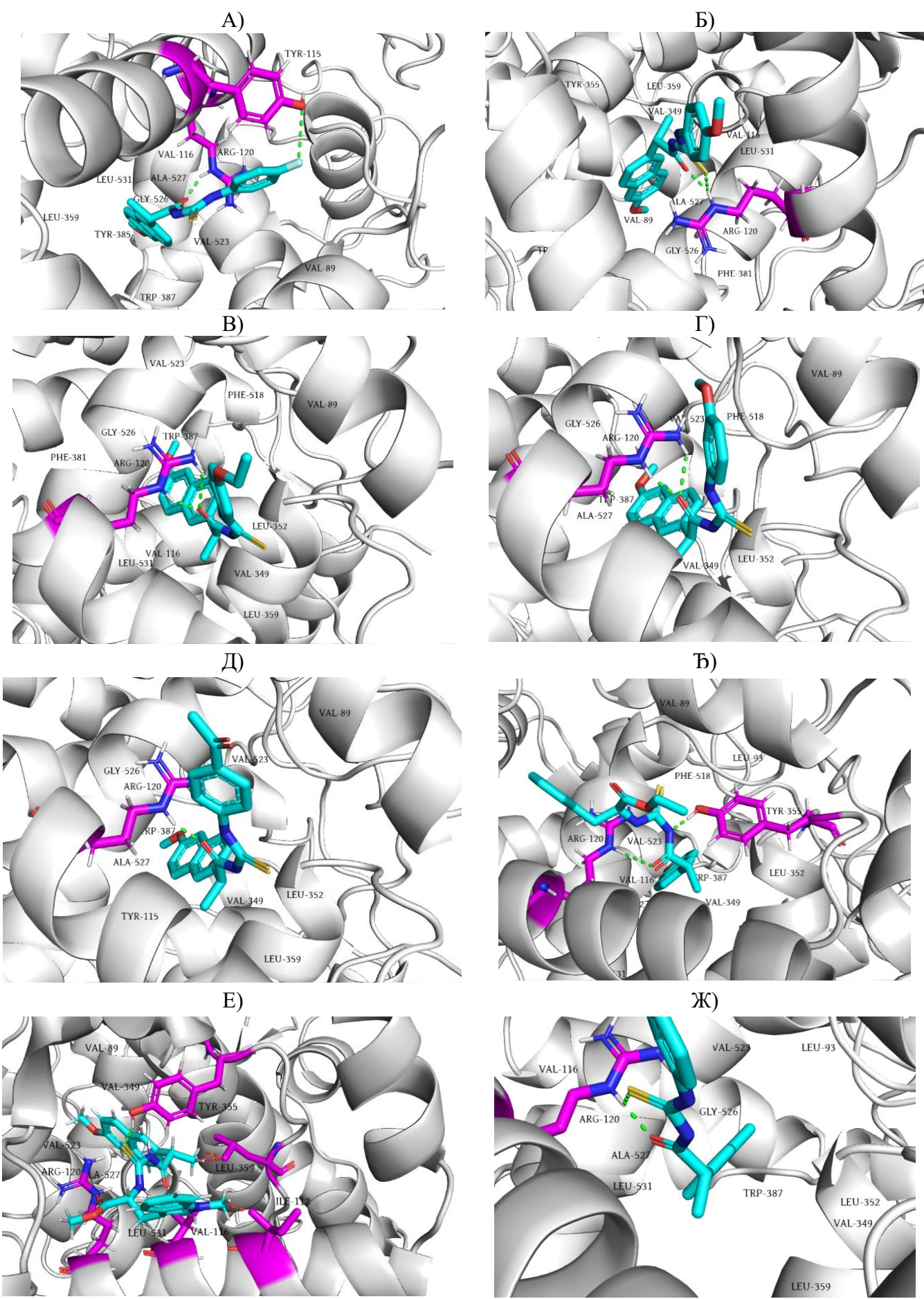


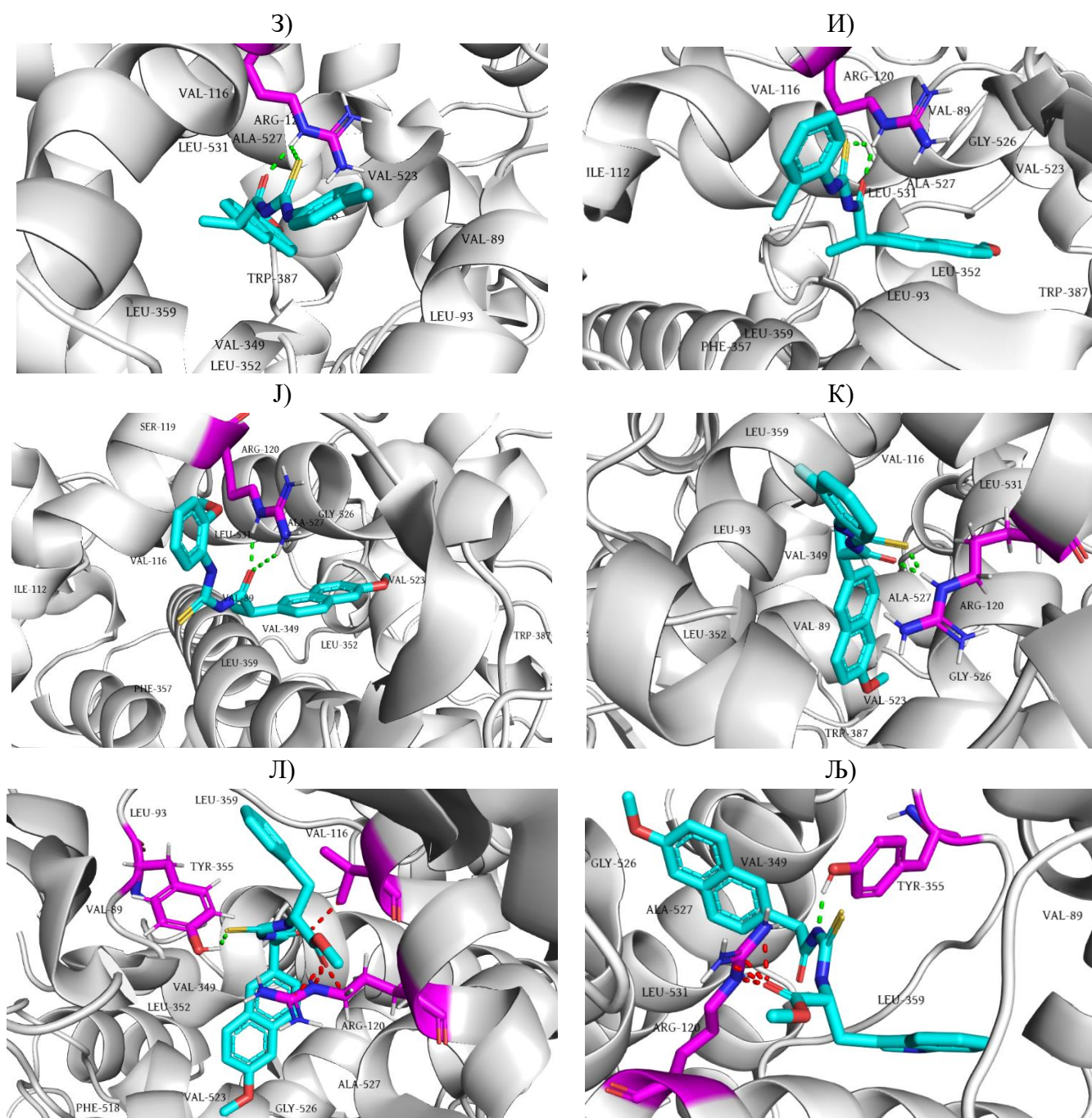
Слика 27. Молекулко уклапање NDGA (А) и zileутона (Б) у активно место 5-LOX

Табела 19. Вредности енергије везивања (kcal/mol) испитиваних једињења

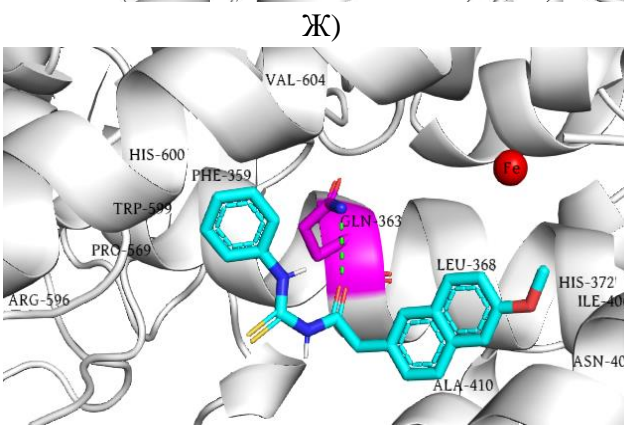
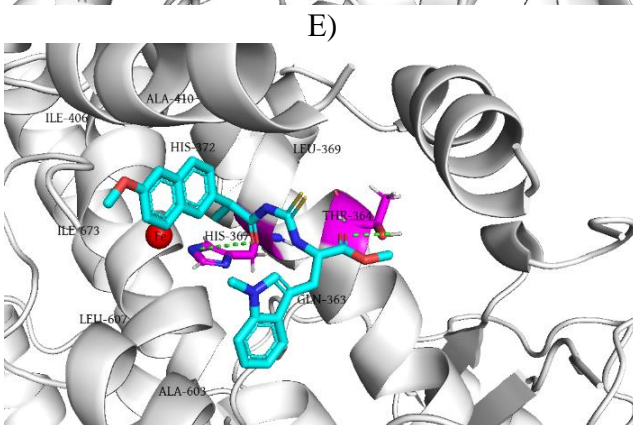
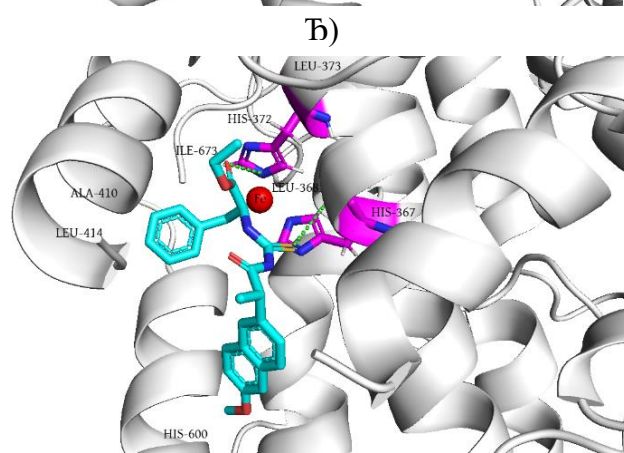
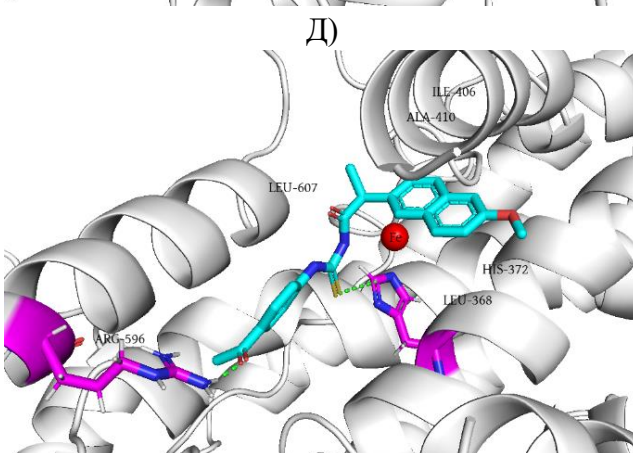
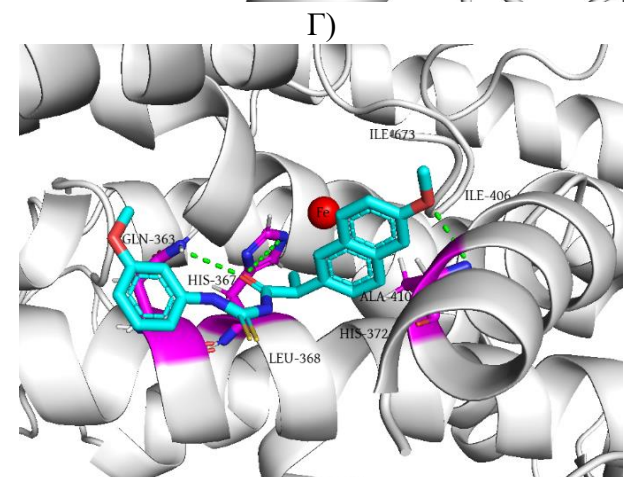
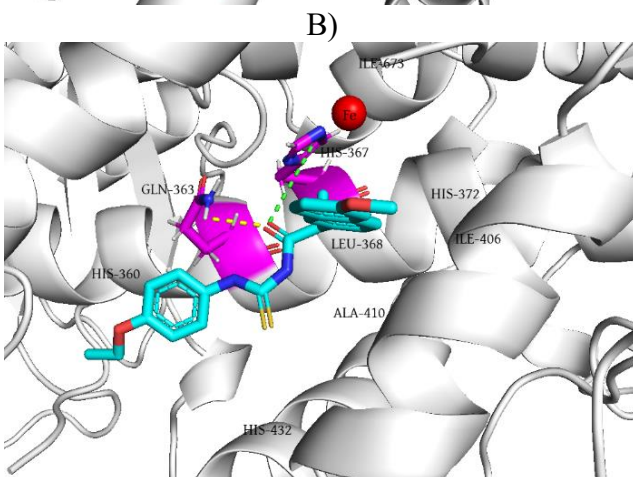
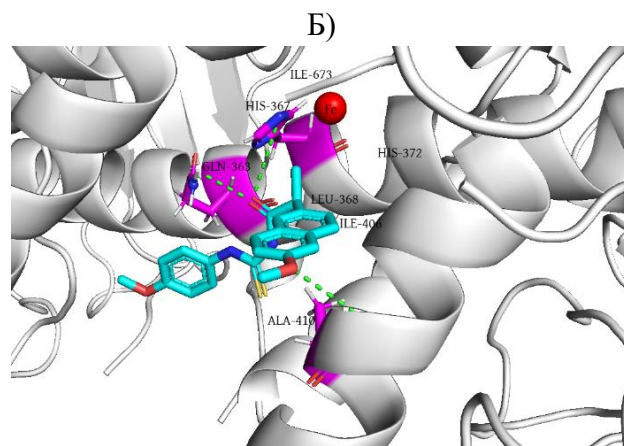
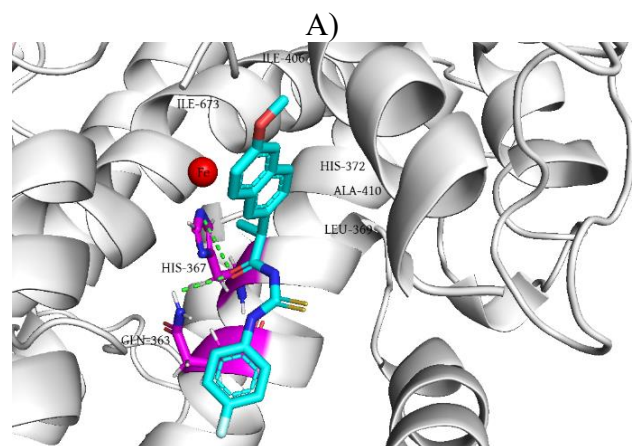
Једињење	COX-2	5-LOX
1	-14,40	-7,70
2	-14,90	-7,47
3	-14,13	-6,74
4	-14,94	-8,39
5	-14,42	-7,30
6	-8,76	-7,77
7	-9,41	-7,98
8	-14,53	-8,00
9	-14,57	-7,54
10	-14,27	-9,19
11	-12,77	-9,24
12	-14,62	-8,54
13	-11,28	-9,29
14	-8,99	-7,86
Напроксен	-13,13	НИ
Зилеутон	НИ	-10,67
NDGA	НИ	-8,77

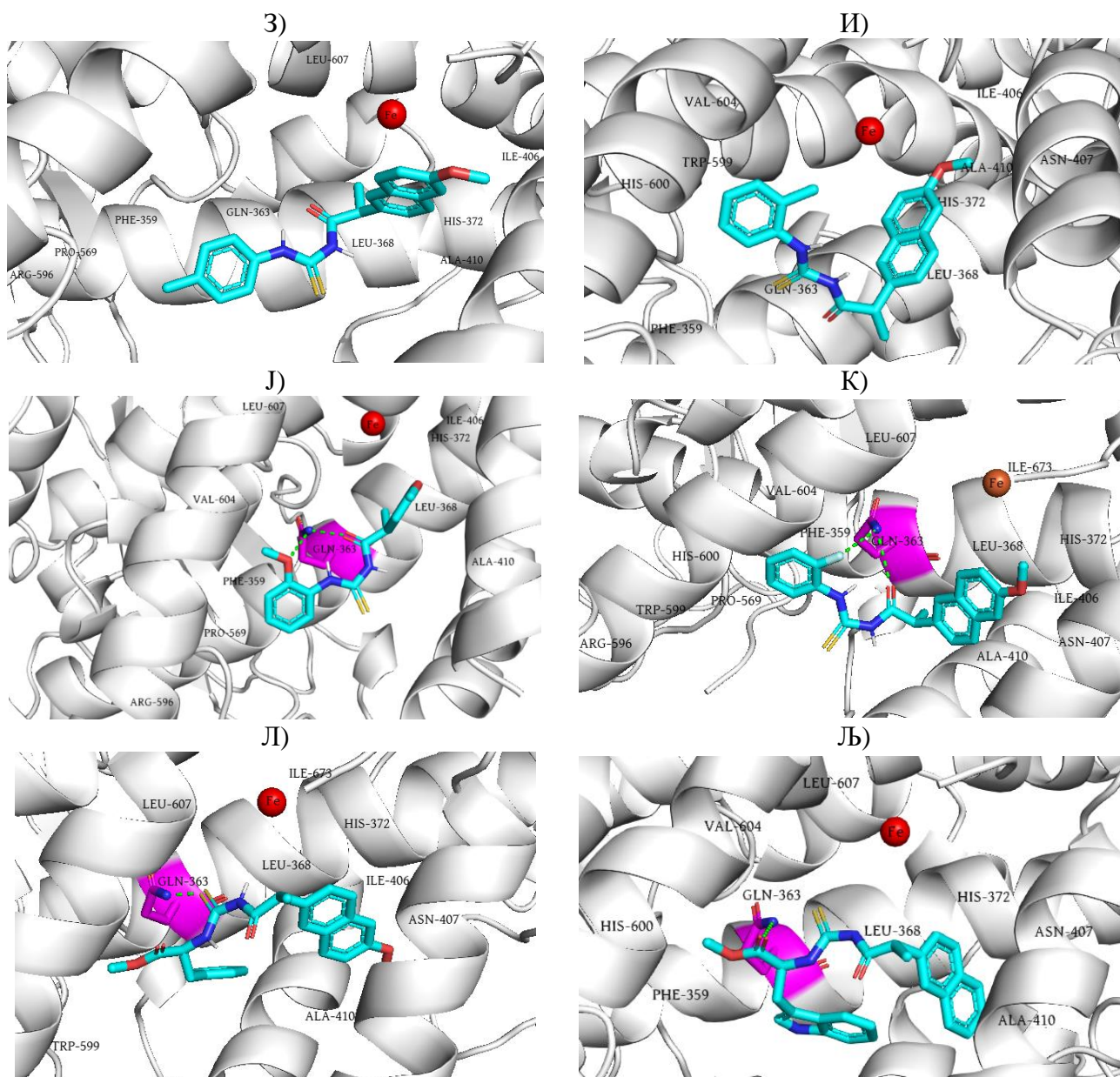
*НИ - Није испитивано





Слика 28. Молекулско уклапање једињења 1 (А), једињења 2 (Б), једињења 3 (В), једињења 4 (Г), једињења 5 (Д), једињења 6 (Ђ), једињења 7 (Е), једињења 8 (Ж), једињења 9 (З), једињења 10 (И), једињења 11 (Ј), једињења 12 (К), једињења 13 (Л) и једињења 14 (Љ) у активно место COX-2





Слика 29. Молекулско уклапање једињења 1 (А), једињења 2 (Б), једињења 3 (В), једињења 4 (Г), једињења 5 (Д), једињења 6 (Ђ), једињења 7 (Е), једињења 8 (Ж), једињења 9 (З), једињења 10 (И), једињења 11 (Ј), једињења 12 (К), једињења 13 (Л) и једињења 14 (Љ) у активно место 5-ЛОХ

4.7. Испитивање цитотоксичне активности

Резултати истраживања су обухватили одређивање степена антипролиферативне активности тиоуреидних деривата напроксена на малигно измењеним ћелијама и на контролној популацији (фибробластима). Поред тога, испитиван је и антипролиферативни ефекат напроксена као контролног лека. Антитуморски ефекат претходно поменутих једињења је одређен МТТ тестом у три временска интервала, при чему су израчунате IC₅₀ вредности за свако једињење појединачно (Табела 20).

Табела 20. IC₅₀ вредности једињења 1–14 и напроксена након 24, 48 и 72 сата према MRC5, MDA-MB-231, HCT 116 и HeLa ћелијским линијама. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

IC ₅₀ (μM)		MDA-MB-231			HeLa		
Једињење	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
1	>200	>200	>200	>200	>200	104 ± 8	
2	>200	>200	130,5 ± 10,4	>200	>200	>200	
3	>200	>200	>200	>200	120,5 ± 9,3	11,7 ± 4,3	
4	>200	>200	110,2 ± 12,9	>200	100,9 ± 12,2	90,8 ± 8,3	
5	>200	>200	120,3 ± 14,8	>200	160 ± 13	107 ± 10	
6	>200	>200	>200	>200	>200	>200	
7	>200	>200	>200	>200	>200	>200	
8	>200	>200	>200	>140,5 ± 7,2	97,6 ± 10,9	9,1 ± 2,5	
9	>200	>200	111,7 ± 18,1	>200	>200	120,4 ± 8,7	
10	100,9 ± 11,2	70,5 ± 8,3	42,2 ± 9,8	>200	110,7 ± 8,3	85,3 ± 9,1	
11	>200	>200	>200	>200	>200	>200	
12	>200	>200	>200	135,4 ± 16,8	103,2 ± 9,5	72,8 ± 6,9	
13	>200	>200	99,5 ± 8,2	>200	>200	>200	
14	>200	>200	117,4 ± 15,3	>200	150,7 ± 14,2	110,1 ± 11,5	
Напроксен	>200	>200	>200	>200	>200	>200	

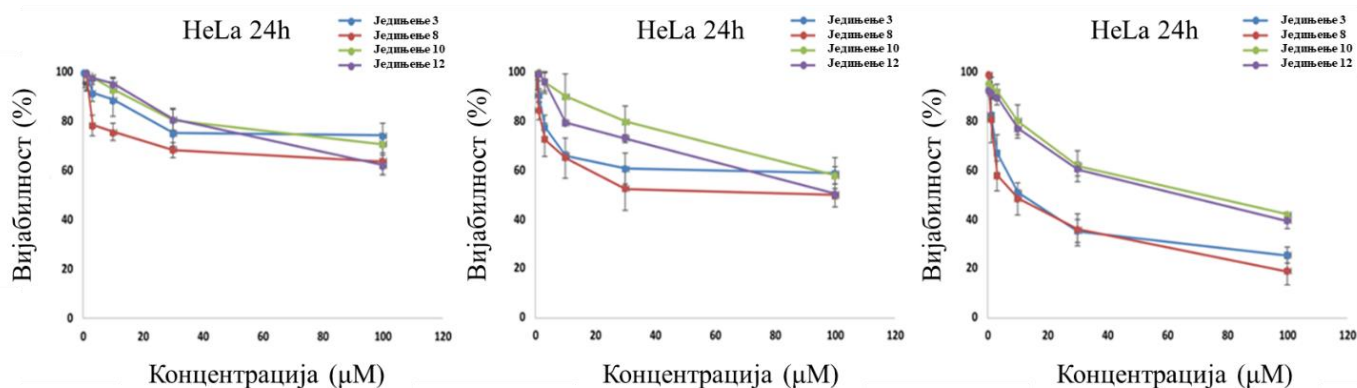
IC ₅₀ (μM)		MRC-5			HCT 116		
Једињење	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
1	>200	>200	>200	>200	>200	>200	
2	>200	>200	>200	>200	110,8 ± 15,2	82,8 ± 10,6	
3	>200	>200	>200	>200	>200	>200	
4	>200	>200	>200	200	106,4 ± 12,9	71,6 ± 9,9	
5	>200	>200	>200	>200	157,7 ± 9,3	108,6 ± 14,2	
6	>200	>200	>200	>200	>200	>200	
7	>200	>200	>200	>200	>200	100,4 ± 11,3	
8	>200	>200	>200	>200	>200	100,7 ± 15,5	
9	>200	>200	>200	>200	105,2 ± 14,8	52,9 ± 8,1	
10	>200	>200	>200	120,4 ± 8,8	97,2 ± 6,8	33,3 ± 5,5	
11	>200	>200	>200	>200	>200	>200	
12	>200	>200	>200	>200	159,3 ± 17,5	68,8 ± 9,5	
13	>200	>200	>200	>200	>200	99,6 ± 4,9	
14	>200	>200	>200	150,2 ± 7,6	107,5 ± 12,7	47,1 ± 5,4	
Напроксен	>200	>200	>200	>200	>200	>200	

4.7.1. Цитотоксични ефекат тиюреидних деривата напроксена на ћелије карцинома дојке MDA-MB-231

Испитиван је антитуморски ефекат четрнаест синтетисаних тиюреидних деривата напроксена на ћелије карцинома дојке MDA-MB-231. Резултати су показали да свих четрнаест једињења (1-14) након 24 часа инкубације испољавају веома слаб цитотоксични ефекат, при чему су све IC₅₀ вредности износиле преко 200 µM. Након 48 часовног третмана, једињење 10 је показало умерен цитотоксични ефекат, а IC₅₀ вредност је износила 70,5 µM. За разлику од претходно поменутог једињења, остали тиюреидни деривати напроксена су испољили веома слаб антитуморски ефекат на MDA-MB-231 ћелије, при чему су IC₅₀ вредности износиле преко 200 µM. Након 72 часа инкубације, једињења 10 и 13 су испољила умерен антитуморски ефекат на тестиране малигне ћелије, при чему су IC₅₀ вредности износиле 42,2 µM и 99,5 µM. Преосталих дванаест синтетисаних тиюреидних деривата напроксена је испољило веома слаб антипролиферативни ефекат. Напроксен је у сва три временска интервала показао веома слаб антитуморски ефекат на MDA-MB-231 ћелије при чему су IC₅₀ вредности износиле преко 200 µM (у сва три временска интервала). Може се закључити да претходно поменута једињења (1-14) нису остварила снажан антитуморски ефекат на ћелије карцинома дојке MDA-MB-231.

4.7.2. Цитотоксични ефекат тиюреидних деривата напроксена на ћелије карцинома грлића материце HeLa

Антипролиферативни ефекат тиюреидних деривата напроксена је испитиван на ћелијама карцинома грлића материце HeLa (Табела 20). Након 24 часа инкубације, свих четрнаест испитиваних једињења (1-14) је показало веома слаб цитотоксични ефекат, односно IC₅₀ вредности су износиле преко 100 µM и преко 200 µM. Након 48-часовног третмана, једињење 8 остварило је умерен цитотоксични ефекат на испитиване HeLa ћелије, при чему је израчуната IC₅₀ вредност износила 97,6 µM. Остала тестирана једињења су показала веома слаб антитуморски ефекат након 48 часова инкубације. Након 72 часа инкубације, једињење 3 је показало снажан цитотоксични ефекат на малигне ћелије, при чему је IC₅₀ вредност износила 11,7 µM (Слика 30). Једињење 4 је након 72 часа показало умерен антипролиферативни ефекат, при чему је IC₅₀ вредност износила 90,8 µM. За разлику од претходно поменутог једињења, једињење 8 је остварило снажан антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије, а израчуната IC₅₀ вредност је износила 9,81 µM (Слика 30). Једињења 10 и 12 су након 72 часа инкубације показала умерен цитотоксични ефекат на малигну измењене ћелије, а IC₅₀ вредности су износиле 85,3 µM и 72,8 µM (Слика 30). Преостала једињења су показала веома слаб антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома грлића материце након 72-часовне инкубације. Напроксен је у сва три временска интервала остварио веома слаб антипролиферативни ефекат на HeLa ћелије. Можемо закључити да су једињења 3 и 8 испољила снажан антитуморски ефекат на HeLa ћелије, док су једињења 4, 10 и 11 остварила умерен антипролиферативни ефекат.



Слика 30. Цитотоксични ефекат једињења **3**, **8**, **10** и **12** према HeLa ћелијској линији након 24, 48 и 72 сата. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација

4.7.3. Цитотоксични ефекат тиоуреидних деривата напроксена на ћелије колоректалног карцинома HCT 116

У спроведеном истраживању тестиран је антитуморски ефекат тиоуреидних деривата напроксена на ћелије карцинома колона HCT 116 (Табела 20). Након 24 часа инкубације свих четрнаест синтетисаних једињења (**1-14**) је остварило веома слаб антитуморски ефекат, при чему су добијене IC_{50} вредности износиле преко 200 μM . Након 48-часовне инкубације једињење **10** је показало умерен антипролиферативни ефекат на ћелије колоректалног карцинома. Остала једињења су остварила веома слаб антитуморски ефекат на канцерске ћелије након 48 часа инкубације, при чему су добијене IC_{50} вредности износиле преко 100 μM и преко 200 μM . Након 72-часовне инкубације једињења **2** и **4** су показала умерен антипролиферативни ефекат на HCT 116 ћелије, при чему су добијене IC_{50} вредности износиле 82,8 μM и 71,6 μM . Такође, једињења **9**, **10**, **12** и **14** су остварила умерену антитуморску активност након 72-часовне инкубације, док су добијене IC_{50} вредности износиле редом 52,9 μM , 33,3 μM , 68,8 μM и 47,1 μM . Са друге стране, напроксен је показао веома слаб антитуморски ефекат на HCT 116 ћелије у сва три временска интервала уз добијене IC_{50} вредности од преко 200 μM . На основу свега наведеног можемо закључити да су једињења **2**, **4**, **9**, **10**, **12** и **14** остварила умерен цитотоксични ефекат на канцерске ћелије, док су преостала једињења остварила веома слаб антипролиферативни ефекат на HCT 116 ћелије.

4.7.4. Антипролиферативни ефекат тиоуреидних деривата напроксена на малигно неизмењене ћелије фибробласта MRC-5

Контролна ћелијска линија MRC-5 укључена у истраживање заправо показује колики је степен селективности тиоуреидних деривата напроксена, прецизиније, какав је антипролиферативни ефекат ових једињења према малигно неизмењеним ћелијама (Табела 20). Након 24 часа инкубације сва испитивана једињења су показала веома слаб антипролиферативни ефекат, при чему су израчунате IC_{50} вредности износиле преко 200 μM . Такође, након 48 часа инкубације, једињења **1-14** су показала веома слаб антипролиферативни ефекат на MRC-5, при чему су добијене IC_{50} вредности износиле преко 200 μM . После 72-часовне инкубације, тиоуреидни деривати напроксена су показали веома слаб антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије. Такође,

контролни лек напроксен је у сва три временска интервала демонстрирао веома слаб антипролиферативни ефекат са добијеним IC₅₀ вредностима од преко 200 μM.

На основу свих претходно наведених чињеница можемо закључити да синтетисана једињења не показују антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије фибробласта.

4.7.5. Ефекат тиоуреидних деривата напроксена на процес апоптозе ћелија карцинома грлића материце HeLa

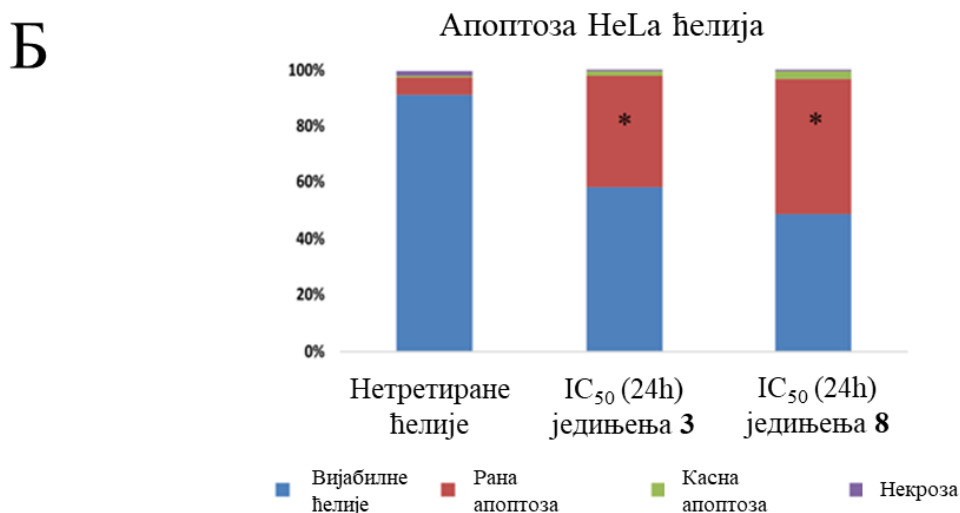
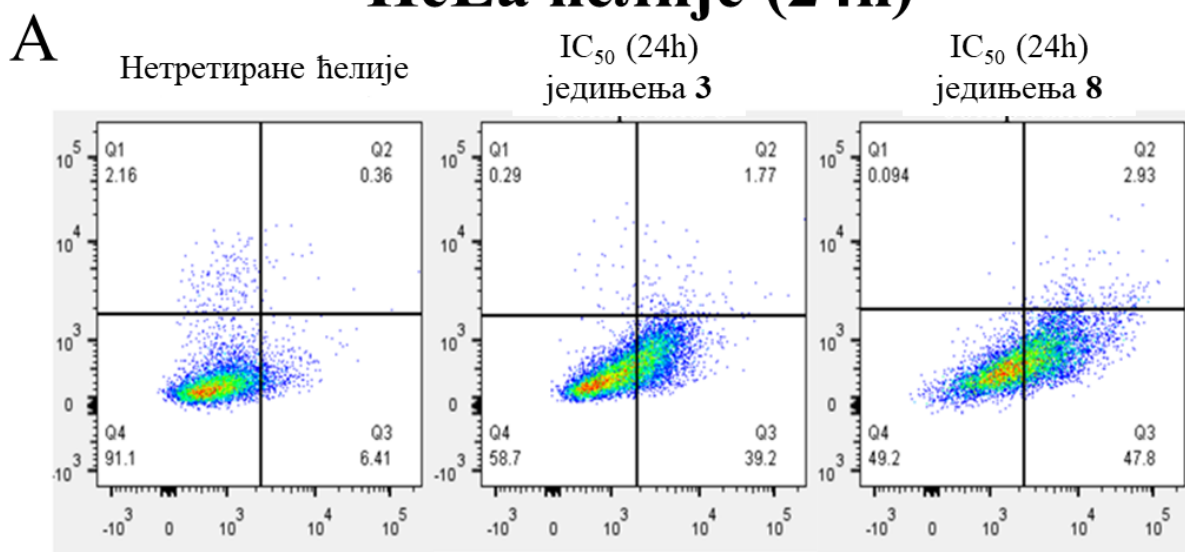
На основу претходно приказаних резултата закључено је да једињења **3** и **8** показују снажан антитуморски ефекат на HeLa ћелије. Следећи корак у истраживању подразумева испитивање којим типом ћелијске смрти долази до пада вијабилности малигнућних ћелија. Из претходно наведених разлога коришћена је анексин V/7AAD метода за детекцију типа ћелијске смрти. Канцерске HeLa ћелије су третиране одговарајућим IC₅₀ концентрацијама, а затим су након 24-часовне култивације бојене претходно поменутом методом. Тачан проценат апоптотских ћелија детектован је FACS анализом.

У контролној групи нетретираних ћелија највећи проценат су чиниле вијабилне ћелије (90%). Пошто је у питању контрола, односно ћелије које нису третиране, очекиван је највећи проценат вијабилних ћелија (Слика 31).

Истраживање је показало да након третмана HeLa ћелија додавањем једињења **3** долази до веома јаког антипролиферативног ефекта активацијом процеса апоптозе (Слика 31). Прецизније, око 40% ћелија од укупне популације је детектовано у раној апоптотичној фази, док је 3% ћелија детектовано у стадијуму касне апоптозе. Такође, регистровано је око 1% некротичних ћелија. Можемо закључити да је код око половине од укупне популације ћелија дошло до активирања ране апоптозе.

Након третмана HeLa ћелија додавањем једињења **8**, највећи проценат канцерских ћелија детектован је у раној апоптози, око 48% (Слика 31). Веома мали проценат ћелија је уочен у касној апоптотичној као и у некротичној фази. На основу тога, можемо закључити да једињење **8** свој антипролиферативни ефекат остварује активацијом ране апоптозе малигнућних ћелија.

HeLa ћелије (24h)



Слика 31. Проточна цитометријска анализа HeLa ћелија обојених анексином V/PI. У нетретираној (контролној) и 24-часовно третираној (IC_{50} једињења **3** и **8**) групи HeLa ћелија, тачкасти графикони показују проценат ћелијске вијабилности (доњи леви квадрант), ране апоптозе (доњи десни квадрант), касне апоптозе (горњи десни квадрант) и некрозе ћелија (горњи леви квадрант). Резултати су приказани као дијаграми густине анексин V-FITC и PI бојења (A), као и у форми дводимензионалних стубичастих графикона (B) са просечним вредностима вијабилности (плава), ране апоптозе (црвена), касне апоптозе (зелена) и некрозе ћелија (љубичаста) у три одвојена експеримента. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама (контролна група)

4.7.6. Ефекат тиоуреидних деривата напроксена на ћелијски циклус HeLa ћелија

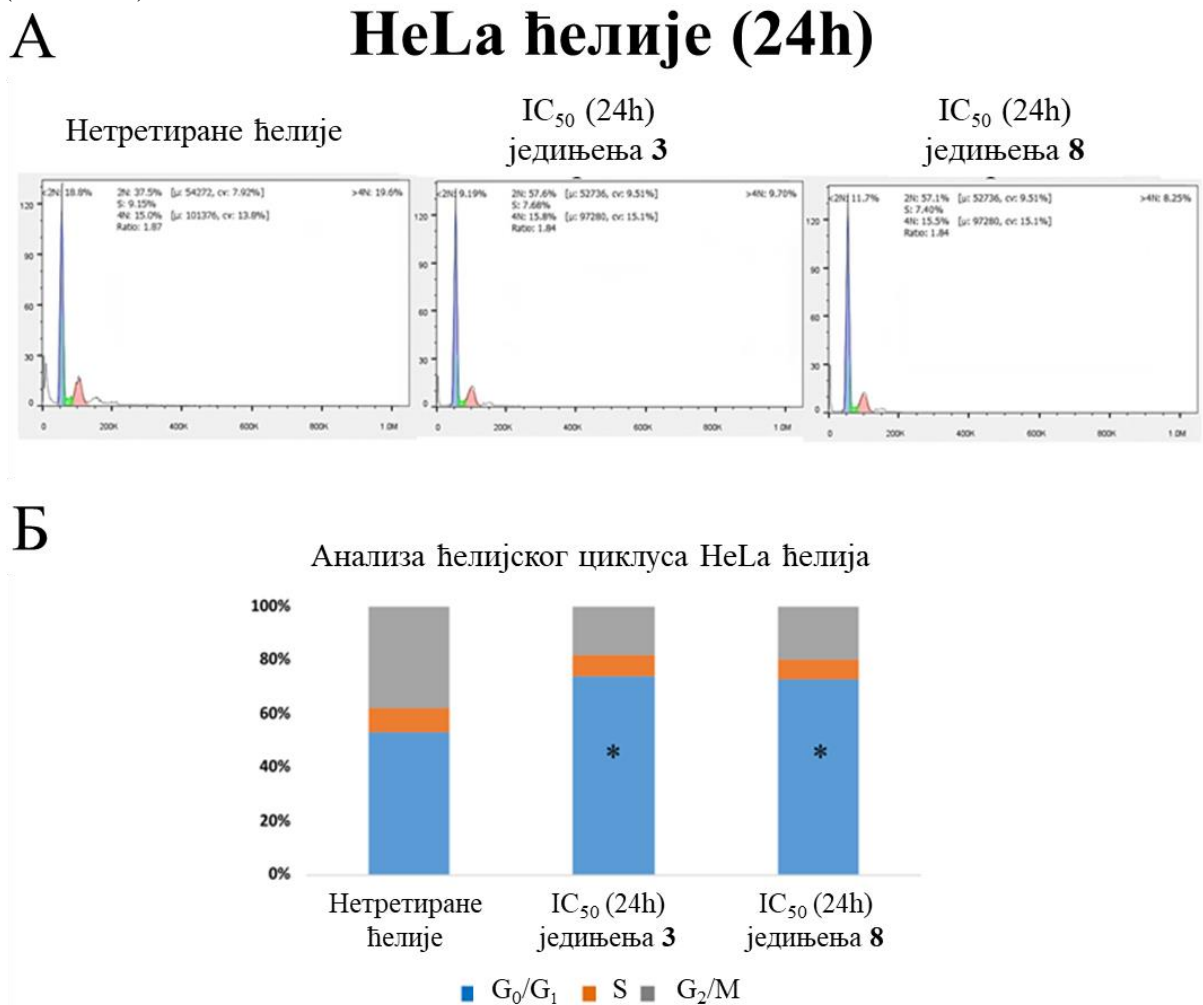
Антитуморски ефекат се може постићи на два начина: активацијом процеса програмиране ћелијске смрти или индукцијом застоја ћелијског циклуса. Због чињенице

да једињења **3** и **8** индукују активацију ране апоптозе, наредни корак у истраживању је обухватио испитивање утицаја ових једињења на ћелијски циклус канцерских ћелија.

Ћелијска линија HeLa је третирана добијеним IC₅₀ вредностима, а затим је вршена детекција ћелија у G₀/G₁, S и G₂/M фази ћелијског циклуса. Нетретиране ћелије су представљале контролну популацију и највећи проценат ћелија налазио се у G₀/G₁ и G₂ фази. Мањи проценат ћелија детектован је у S фази ћелијског циклуса (Слика 32).

Након третмана, односно додавања једињења **3**, можемо видети да је у односу на контролну ћелијску популацију највећи скок процента ћелија детектован у G₀/G₁ фази ћелијског циклуса. Можемо рећи да се антитуморски ефекат једињења **3** заснива на активацији програмиране ћелијске смрти и индукцији застоја у G₀/G₁ фази ћелијског циклуса (Слика 32).

Применом једињења **8** можемо јасно видети да је највећи скок процента ћелија у односу на контролну ћелијску популацију детектован у G₀/G₁ фази ћелијског циклуса. Прецизније, свој антипролиферативни ефекат једињење **8** остварује активацијом програмиране ћелијске смрти и индукцијом застоја у G₀/G₁ фази ћелијског циклуса (Слика 32).



Слика 32. Ефекти једињења **3** и **8** на ћелијски циклус HeLa ћелија. Резултати су приказани као дијаграми PI бојења (A) и дводимензионални стубичасти графикони (B) који показују просечан број ћелија у три одвојена експеримента које су у G₀/G₁ (плава), S (наранџаста) и G₂/M (сива) фази ћелијског циклуса нетретиране (контролна група) и 24-часовно третиране (IC₅₀ једињења **3** и **8**) групе HeLa ћелија.

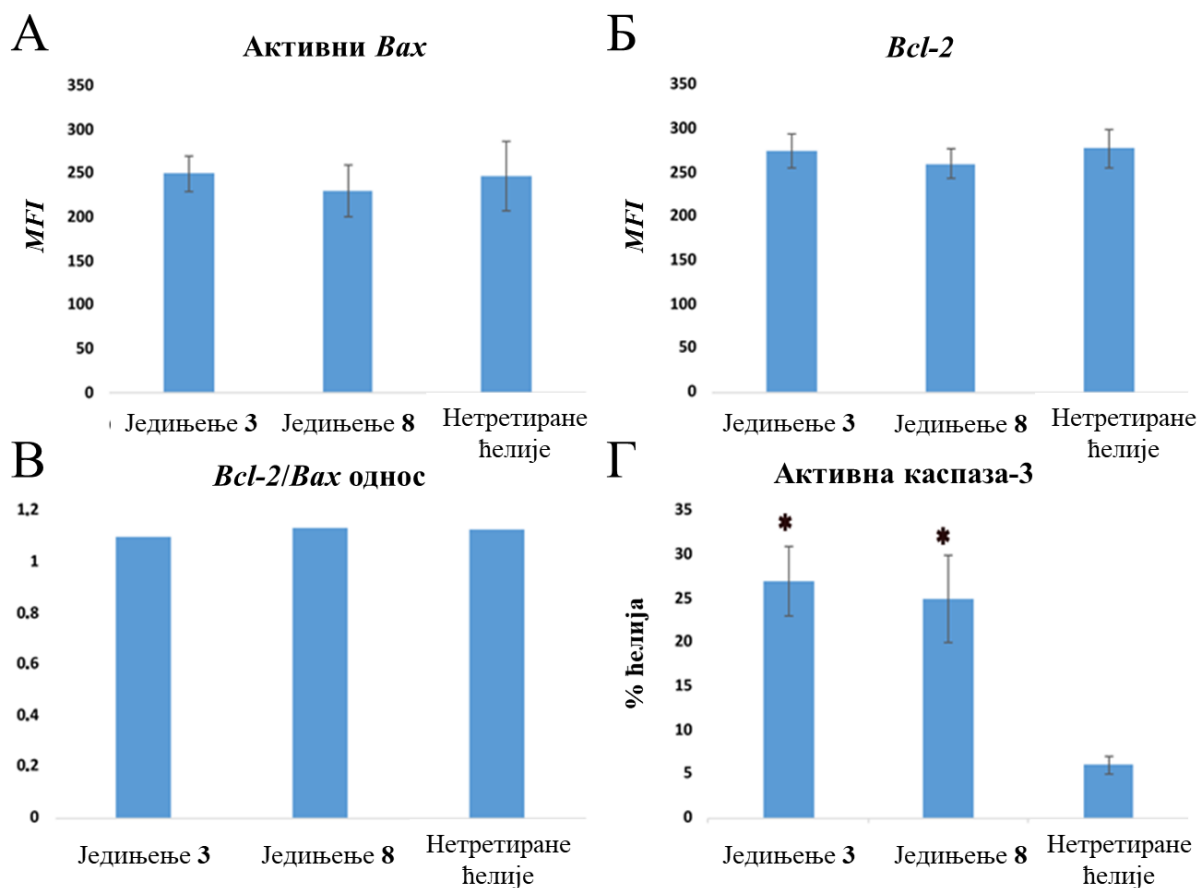
**p* < 0.05 у поређењу са нетретираним ћелијама (контролна група)

4.7.7. Механизам активације процеса програмиране ћелијске смрти

Два есенцијална сигнална пута у активацији процеса апоптозе су спољашњи и унутрашњи (митохондријални) пут. За активацију спољашњег апоптотског пута неопходно је везивање лиганда за рецептор смрти, при чему након серије каскадних реакција долази до активације егзекуторске каспазе-3. Са друге стране, за активацију унутрашњег митохондријалног пута од кључног је значаја промена односа проапоптотских и антиапоптотских протеина. Приликом активирања унутрашњег митохондријалног пута долази до пораста концентрације *Bax* протеина који одлази у спољашњу митохондријалну мембрану, формира поре и долази до отпуштања митохондријалног садржаја. Прецизније, након трансфера цитохрома-С у цитоплазму долази до активирања каспазе-3.

Након што је истраживање јасно показало да тиоуреидни деривати напроксена (једињења **3** и **8**) активирају рану фазу апоптозе, следећи корак је обухватио испитивање кључних молекула који имају улогу у активацији унутрашњег митохондријалног пута. Тестиран је утицај ових једињења на концентрацију *Bax*, *Bcl-2* и каспазе-3. Прецизније, самом детекцијом MFI (енгл. *Mean Fluorescence Intensity*) одређена је тачна концентрација претходно поменутих протеина.

Тестирана једињења (једињења **3** и **8**) нису довела до статистички значајног повећања MFI за *Bax* протеин у поређењу са контролном ћелијском групом. Такође, није дошло до статистички значајног повећања MFI за *Bcl-2* протеин у поређењу са нетретираном контролном ћелијском групом. Стога, јасно је да није дошло до статистички значајне промене односа *Bax/Bcl-2* код третираних ћелија у односу на контролну популацију (Слика 33). Са друге стране, након третирања HeLa ћелија детектован је пораст концентрације егзекуторске каспазе-3 у поређењу са контролном популацијом ћелија (Слика 33).



Слика 33. Утицај једињења **3** и **8** на ћелијску концентрацију активног проапоптотичког протеина *Bax*, антиапоптотичког протеина *Bcl-2* и проценат HeLa ћелија које експримирају активну каспазу-3 после 24-часовног третмана са IC_{50} вредностима одговарајућих једињења. (А) MFI вредности за активни проапоптотички протеин *Bax* HeLa ћелија након 24-часовног третмана са IC_{50} концентрацијама једињења **3** и **8**. (Б) MFI вредности (средњи интензитет флуоресценције) за антиапоптотички протеин *Bcl-2* HeLa ћелија третираних са IC_{50} концентрацијама једињења **3** и **8**. (В) *Bcl-2/Bax* однос за HeLa ћелије. (Г) Проценти ћелија које показују флуоресценцију за активну каспазу-3. Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација за три одвојена експеримента (А, Б и Г) или као медијана (В).

* $p < 0,05$ у поређењу са нетретираним ћелијама (контролна група).

5. ДИСКУСИЈА

Сprovedено истраживање је засновано на претпоставци да би функционализација карбоксилне групе напроксена у тиоуреидну групу применом стерно волуминозних и липофилних ароматичних амина и естара ароматичних аминокиселина довела до синтезе молекула који би имали бољу гастроинтестиналну подношљивост уз исту или потентнију антиинфламацијску активност у односу на напроксен, као и снажну антитуморску активност. За поступак синтезе је коришћена модификација претходно описане тростепене процедуре којом се напроксен најпре преводи у киселински хлорид, који у присуству калијум-тиоцијаната реагује са ароматичним аминима и естрима ароматичних аминокиселина формирајући жељени производ (64). Синтетисано је укупно 14 нових тиоуреидних деривата напроксена од којих су 10 деривати ароматичних амина (једињења **1-5** и **8-12**), а четири су деривати естара ароматичних аминокиселина (једињења **6**, **7**, **13** и **14**). Приноси једињења синтетисаних применом наведене процедуре били су у опсегу од 25% до 43%, при чему је највећи принос остварен приликом синтезе деривата **4** (дериват анилина), док је са најмањим приносом синтетисано једињење **7** (дериват метилестра триптофана). Као мобилне фазе за препаративну TLC приликом пречишћавања синтетисаних једињења коришћени су системи хлороформ/метанол у односу 99:1 v/v (за пречишћавање деривата естара ароматичних аминокиселина), дихлорметан/метанол у односу 99:1 v/v (једињење **11**) и хлороформ (за пречишћавање осталих деривата ароматичних амина). Чистоћа добијених једињења проверавана је TLC методом. Структурна карактеризација извршена је одређивањем тачке топљења, применом NMR (^1H и ^{13}C), IR, масене спектроскопије, као и одређивањем тачних маса (234,235).

Биолошка активност неке супстанце зависи од њених структурних и физичко-хемијских особина (197). Зато је потребно новосинтетисаним једињењима, након структурне карактеризације, испитати физичко-хемијске особине. Липофилност је једна од важних физичко-хемијских карактеристика лека која има значајан утицај на његову биолошку активност, ресорпцију, расподелу, везивање за рецептор, везивање за протеине плазме, пермеабилност кроз биолошке мембране као и на метаболизам и елиминацију. Бољу ресорпцију и расподелу као и већу способност продирања у ткива имају молекули (лекови) веће липофилности. Липофилност молекула (лека) значајно утиче и на његову елиминацију на тај начин што се слабо липофилни лекови добро елиминишу путем урина, док веома липофилни често имају и хепатични пут елиминације (236-240). Липофилност новосинтетисаних једињења је најпре испитана применом традиционалне *shake-flask* методе. Уочено је да због велике липофилности испитиваних једињења ($\log P > 4$) готово целокупна количина супстанце прелази у органску фазу што онемогућава адекватно израчунавање коефицијента расподеле овом методом. Наиме, услед високе липофилности једињења, њихова концентрација у воденој фази је изузетно ниска, односно, разлика у концентрацији синтетисаног једињења у *n*-октанолу пре и после мућкања фаза је толико мала да је није било могуће одредити на основу разлике измерених апсорбанција са довољним степеном прецизности. За разлику од испитиваних једињења, мање липофилни контролни лек (напроксен) постиже знатно већу концентрацију у воденој фази, а разлика у концентрацији напроксена у *n*-октанолу пре и после мућкања фаза је таква да се мерењем апсорбанције може одредити концентрација напроксена после расподеле у *n*-октанолу. Спектрофотометријска метода се може применити за одређивање $\log P$ вредности за мање липофилна једињења. На основу свега изложеног може се закључити да *shake-flask* метода није била погодна за испитивање липофилности синтетисане групе једињења и да је потребно употребити неку другу поузданију методу као замену за ову традиционалну методу. Претходно публиковани радови су показали да је ова метода погодна за процену липофилности једињења са вредностима $\log P$ између -3 и 4, што указује на то да се липофилност новосинтетисаних

тиоуреидних деривата напроксена не може одредити на овај начин (241) и да је вредност $\log P$ ових једињења већа од 4. Из наведеног разлога се даље приступило испитивању липофилности применом алтернативних RP-TLC и RP-HPLC метода.

RP-TLC методом испитивано је ретенционо понашање применом хроматографских система сачињених од воде и органског растварача (ацетонитрил, ацетон, тетрахидрофуран, апсолутни етанол и пропанол) у четири различита односа (50:50, 60:40, 70:30, 80:20 v/v). Резултати су показали да постоји линеарна зависност између R_M вредности и удела органског растварача у мобилној фази, а коју карактеришу високе вредности коефицијента детерминације ($R^2 = 0,95 - 0,99$). Такав резултат указује да постоји могућност примене методе екстраполације како би се одредила вредност параметра R_M^0 . Вредности хроматографских параметара су дистрибуиране у релативно уском опсегу, па се може сматрати да постоји слична липофилност испитиваних једињења. Међутим, у већини случајева највећу вредност R_M^0 и C_0 и највећу апсолутну вредност параметра S поседују једињења **6** и **7**. То указује да је применом RP-TLC методе показана нешто већа липофилност два наведена деривата у односу на остала испитивана једињења.

Са циљем процене липофилности примењена је и RP-HPLC метода. Параметри који се употребљавају за процену липофилности овом методом су $\log k$ и $\log k_w$, као и дескриптори S и ϕ_0 . Ранија истраживања показала су да хроматографски добијени параметри липофилности имају добру корелацију са компјутерски израчунатим и експериментално одређеним вредностима партиционог коефицијента $\log P$ чиме је потврђена могућност примене RP-HPLC методе за процену липофилности биолошки активних једињења (242,243). RP-HPLC анализа показала је изузетно високе вредности коефицијента детерминације (R^2) који је приликом одређивања хроматографских параметара за сва једињења износио преко 0,99 што указује на већу поузданост резултата у односу на RP-TLC методу. Резултати RP-HPLC методе довели су до сличних закључака као и RP-TLC метода. Наиме, највеће апсолутне вредности хроматографских параметара S , $\log k_w$ и ϕ_0 забележене су за једињења **6** (дериват етил естра фенилаланина) и **7** (дериват метил естра *N*-метил триптофана). Спроведена корелациона анализа показала је да RP-HPLC даје боље коефицијенте корелације хроматографских параметара са израчунатим $\log P$ вредностима у односу на RP-TLC параметре. Корелационом анализом уочено је да највећи степен корелације показује параметар S са вредностима $i\log P$ ($r = -0,92$) и $Mi\log P$ ($r = -0,90$), као и параметар $\log k_w$ са предвиђеним вредностима $Mi\log P$ ($r = 0,82$), $i\log P$ ($r = 0,80$) и $x\log P3$ ($r = 0,80$). Дескриптивном статистичком анализом показано је да се наведена зависност може изразити регресионим једначинама $i\log P = -0,0031 \cdot S + 0,033$; $Mi\log P = -0,0042 \cdot S - 0,0233$; $Mi\log P = 0,4147 \cdot \log k_w + 1,3729$; $i\log P = 0,2914 \cdot \log k_w + 2,3839$ и $x\log P3 = 0,5518 \cdot \log k_w + 0,3266$.

Резултати испитивања липофилности показују да су RP-HPLC и RP-TLC методе погодније за процену липофилности синтетисаног сета једињења у односу на традиционалну *shake-flask* методу. Ово потврђује наводе *Kempinske* и сарадника који су дошли до закључка да је RP-HPLC ефикасна метода за испитивање липофилности једињења чије се $\log P$ вредности крећу у интервалу од -3 до 8, док је RP-TLC метода погоднија код једињења са $\log P$ вредностима већим од 4. Са друге стране, *shake-flask* метода је намењена за испитивање липофилности једињења са $\log P$ вредностима између -3 и 4. Предност RP-HPLC и RP-TLC метода у односу на *shake-flask* огледа се и у томе што реверзно-фазне хроматографске методе захтевају примену релативно мале количине супстанце (до 1 mg), док је за *shake-flask* потребно од 10 до 50 mg испитиваног једињења (241).

За процену пасивне апсорпције из гастроинтестиналног тракта новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена коришћен је РАМРА тест. Мембране примењене у

овом испитивању представљале су смеша хексадекан/хексан и раствор лецитина јајета у додекану. Иницијални сет од седам једињења коришћен је за испитивање евентуалних разлика и предности једног од наведених модела. Из разлога што су резултати добијени применом два наведена модела били слични, што модел са раствором хексадекан/хексан омогућава процену ретенције испитиваних једињења у вештачкој мембрани, као и то да је време инкубације знатно краће, одлучено је да се испитивање пасивне гастроинтестиналне апсорпције преосталих седам новосинтетисаних једињења и напроксена спроведе применом првог РАМРА модела. рН вредност раствора у донорском одељку износила је 5,5 чиме се симулирају услови у танком цреву, док је рН вредност раствора у акцепторском одељку подешена на 7,4 чиме се импровизују услови у системској циркулацији. С обзиром на то да испитивана једињења у својој структури немају јонизујуће центре, очекује се да ће при физиолошким условима бити у нејонизованом облику без обзира на рН вредност, што у значајној мери доприноси бољој апсорпцији ових молекула из гастроинтестиналног тракта. Концентрације испитиваних једињења у полазним растворима, донорским и акцепторским одељцима одређене су применом HPLC-DAD методе. Због тога што је приликом примене HPLC-MS/MS методе на иницијалном сету од четири тест једињења (деривати **2**, **3**, **4** и **6**) сигнал који потиче од испитиваних једињења био сувише слаб, а то је највероватније последица присуства DMSO и TWEEN80 који могу значајно смањити сигнал, одустало се од њене даље примене, па су сва преостала мерења спроведена HPLC-DAD методом.

Најниже вредности логаритмованог коефицијента пермеабилности ($\log Pe$) поседују дериват **13** ($\log Pe = -4,53$) и дериват **14** ($\log Pe = -4,4$). Највећу вредност овог параметра показује дериват **7** ($\log Pe = -3,94$). Једињења са највишим вредностима $\log Pe$ (етил естар фенилаланина (дериват **6**) и метил естар *N*-метил триптофана (дериват **7**) спадају у групу најлипофилнијих једињења испитиваног сета. Са друге стране, деривати **3** и **6** поседују највише вредности ретенције у вештачкој мембрани (24% и 34%), што је онемогућило да ова једињења остваре још више вредности $\log Pe$ параметра од очекиваних на основу њихове липофилности. Важно је истаћи да анализирана једињења поседују значајно мањи потенцијал за пасивну гастроинтестиналну апсорпцију у односу на напроксен без обзира на извршену хемијску модификацију, при чему је само дериват **7** показао већи степен пермеабилности у односу на напроксен.

На основу резултата спроведене QSPR анализе, може се закључити да је једини модел који је прошао валидационе тестове SVM($\log Pe$) модел формиран у *alvaModel* софтверу. Два дескриптора од којих је формиран наведени модел су *SM07_EA(dm)* и *CATS3D_02_AL*.

SM07_EA(dm) је дескриптор из групе *Edge adjacency indices* дескриптора. То су молекулски дескриптори који су израчунати из матрице суседности ивица молекула. Оваква матрица је изведена из молекулског графикана у коме су уклоњени водоникови атоми и кодира повезаност између ивица формираног графикана. То је симетрична матрица квадратног облика димензија $B \times B$, где је B број веза између парова атома који нису водоници (244). Према дефиницији овај дескриптор представља спектрални моменат реда 7 суседности ивица математички израчунат диполним моментом (245). Спектрални моменат матрице суседности ивица израчунава се сабирањем дијагоналних елемената k -тог степена матрице суседности ивица. Спектрални моменат елемената k -тог реда може се изразити као линеарна комбинација различитих структурних фрагмената (подграфова) у једном графикану. На пример, спектрални моменат нултог реда одговара броју ивица у графикану (244). Вредности наведеног дескриптора за испитивана једињења крећу се у интервалу од 16,4408 до 17,3456. Једини молекули чија је вредност дескриптора била изнад 17 јесу дериват **7** (дериват метил естра *N*-метил триптофана) и дериват **14** (дериват метил естра триптофана). Дериват **7** у исто време поседује највеће

вредности $\log Pe$ и дескриптора $SM07_EA(dm)$, што указује на то да више вредности наведеног дескриптора могу имати позитиван утицај на пасивну гастроинтестиналну апсорпцију. Насупрот томе, најнижу вредност испитиваног дескриптора показао је напроксен (16,2353). На основу тога се може закључити да молекули који у својој структури поседују највећи број неводоникових атома имају највише вредности $SM07_EA(dm)$ дескриптора, док напроксен као полазни молекул у синтези поседује најнижу вредност.

$CATS3D_02_AL$ се убраја у групу $CATS3D$ дескриптора (15). $CATS$ дескриптори припадају класи тополошких дескриптора атомског пара. Ови дескриптори не карактеришу атоме према типу хемијског елемента. Уместо тога, атоми се додељују одређеним типовима потенцијалних фармакофорних тачака. $CATS3D$ дескриптори описују дистрибуцију потенцијалних фармакофорних тачака у тродимензионалном простору. Растојања између свих парова фармакофорних тачака се израчунавају и фреквенције парова који припадају дефинисаним опсезима се изражавају у облику вектора корелације (246). $CATS3D_02_AL$ дескриптор повезује информације о липофилности молекула и о броју акцептора водоничне везе (247). Вредности дескриптора $CATS3D_02_AL$ изражене су у облику целих бројева који се за испитивана једињења крећу у интервалу од 3 до 7. Највећу вредност наведеног дескриптора поседују деривати **3** и **5**, док је најмања вредност забележена за деривате **10** и **14**. Поређења ради, вредност овог дескриптора за напроксен износи 6. На основу наведеног се може закључити да су највише вредности $CATS3D_02_AL$ уочене код деривата ароматичних амина који у пара положају бензеновог прстена поседују групе са два атома угљеника и једним атомом кисеоника (етокси група код деривата **3** и ацетил група код деривата **5**).

Пасивна апсорпција синтетисаних тиоуреидних деривата напроксена из гастроинтестиналног тракта процењена је и помоћу биопартиционе мицеларне хроматографије. Иницијално испитивање је обухватило сет од седам новосинтетисаних једињења и напроксен уз примену ацетонитрила као органске компоненте мобилне фазе. Удео ацетонитрила износио је 30%, што представља максимални удео који се може применити, а да се очува постојаност формираних мицела. С обзиром на временску и економску нерационалност, јер су се ретенциона времена испитиваних једињења кретала и до 60 минута, одлучено је да се овом методом не испитује пасивна гастроинтестинална апсорпција преосталих седам једињења.

Добијени резултати су показали да се вредности ретенционог фактора (k) крећу у интервалу од 21,975 до 47,25. Највеће вредности ретенционог фактора (k) поседују дериват **6** (дериват етил естра фенилаланина) и дериват **7** (дериват метил естра N -метил триптофана). То показује да се од естара ароматичних аминокиселина очекује боља пасивна гастроинтестинална апсорпција у односу на деривате ароматичних амина. Најнижа вредност ретенционог фактора израчуната је за дериват **5** (дериват p -аминоацетофенона) што указује на то да тиоуреидни деривати напроксена са ароматичним аминима који поседују карбонилну групу имају нижи потенцијал за гастроинтестиналну апсорпцију у односу на оне са етарском групом.

Статистичка анализа QSRR модела показала је да је $Mor20u$ дескриптор који најбоље описује повезаност између структуре испитиваних једињења и њихове ретенционе способности у ВМС систему. $Mor20u$ представља дескриптор који припада 3D-MoRSE групи дескриптора (248). 3D-MoRSE дескриптори засновани су на наелектрисању атома, поларизабилности и *van der Waals*-овој запремини молекула. Тумачење ове врсте дескриптора је поприлично компликовано и понекад њихово значење није потпуно јасно (249,250,159). Студије су показале да присуство ароматичних система и незасићених веза, повећавају вредности ових дескриптора (251). 3D-MoRSE дескриптори узимају у обзир тродимензионални распоред атома у молекулу и не зависе

од величине молекула, па се могу применити на великом броју молекула (249). Вредност *Mor20i* дескриптора расте како се повећава поларизабилност молекула (252). Највише вредности наведеног дескриптора поседују једињења **6** (дериват етил естра фенилаланина) и **7** (дериват метил естра *N*-метил триптофана), што указује да су високе вредности карактеристика деривата естара ароматичних аминокиселина. Са друге стране, најнижа вредност дескриптора (2,7644) у испитиваном сету једињења забележена је за дериват **5** (дериват *p*-аминоацетофенона) који има и најмањи ретенциони фактор (21,975).

Збирно посматрани резултати процене пасивне гастроинтестиналне апсорпције применом РАМРА и ВМС методе указују на висок степен подударности два модела. Оба теста су показала да тиоуреидни деривати напроксена са естрима ароматичних аминокиселина (деривати **6** и **7**) поседују највећу очекивану пасивну гастроинтестиналну апсорпцију, док дериват *p*-аминоацетофенона (дериват **5**) има најмањи потенцијал за пасивну апсорпцију из гастроинтестиналног тракта.

Са циљем да се процени биолошки ефекат новосинтетисаних тиоуреидних деривата напроксена, спроведено је *in vivo* испитивање акутне токсичности и антиинфламацијске активности на *Wistar Albino* пацовима. Резултати су показали да нема клиничких знакова системске токсичности приликом примене свих 14 једињења током две недеље пажљивог праћења на дневном нивоу. Најбитније је истаћи да није било значајних промена у понашању и општем стању животиња као што су слабост, промене боје слузокоже, коже, промене крзна, конзистенција измета, боја урина, промене у локомоторним активностима, као и појава агресивности. Унос хране и воде и напредак у телесној тежини били су слични у експерименталној (третираној) и контролној (нетретираној) групи. Такође, није примећена статистички значајна разлика у релативној тежини органа између две наведене групе пацова.

Истраживање је показало да је ефекат на едем шапе пацова који су остварила испитивана једињења био дозно-зависан, тј. најјаче смањење дебљине шапе уочено је код животиња третираних највећом дозом тестираних једињења. Најинтензивнији пораст едема шапе примећен је током прва два сата након инјектовања карагенана када су једињења **4**, **5** и **8** у највишој дози остварила најјачи инхибиторни ефекат у односу на контролну групу. Посебно се наведена разлика између нетретиране и групе пацова којима су апликоване испитиване супстанце истиче након трећег и четвртог сата од изазивања инфламације. Једињења **2**, **4** и **7** показала су најснажнији потенцијал да редукују едем шапе пацова у највећој дози уз вредности процента инхибиције на крају експеримента од 51,724% (дериват **2**), 54,013% (дериват **4**) и 54,123% (дериват **7**). Наведене вредности су знатно веће у односу на нетретирану групу пацова, а упоредиве са инхибицијом коју је остварио напроксен (56,322%). У претходно публикованим истраживањима уочено је да тиоуреидни деривати имају потентнији антиинфламацијски ефекат у односу на уреидне, амидне и хидразонске деривате напроксена (63). Тиоуреидни деривати напроксена са тирозинским (58,5%) и хидразин-тирозинским (59,7%) остатком у бочном низу остварили су инхибицију едема шапе упоредиву са једињењима приказаним у овој дисертацији и напроксеном (64). Разумевање механизма развоја акутног инфламацијског одговора представља најважнију компоненту у развоју нових потенцијално ефикасних антиинфламацијских једињења (253). Модел едема шапе пацова, као релевантан и један од најчешће коришћених модела акутне инфламације карактеришу две фазе у развоју едема. У првих сат времена долази до ослобађања хистамина, серотонина, брадикинина и других проинфламацијских медијатора који су одговорни за појаву клиничких манифестација инфламације попут едема, хиперплазије и еритема (253,254). Наведена тврдња је у складу са добијеним резултатима истраживања, с обзиром на то да је највећи едем забележен у прва два сата у свим

испитиваним групама због венске опструкције и повећане пермеабилности крвних судова (255). Међутим, код пацова који су примили једињења **2**, **4** и **7**, едем шапе је изразито ублажен. Насупрот наведеном, продукција простагландина се јавља касније током инфламацијског одговора. Претпоставља се да је примена карагенана одговорна за продукцију TNF- α и IL-1 β који индукују синтезу простагландина (254). Максимум антиинфламацијског ефекта најефикаснијих деривата приказаних у овој дисертацији (деривати **2**, **4** и **7**) уочен је у периоду најизраженијег едема током трећег и четвртог сата након апликације карагенана. На основу тога би се могло претпоставити да је најинтензивнија инхибиција едема шапе током одложене фазе инфламације последица утицаја синтетисаних једињења на биосинтезу простагландина. Зато је било значајно спровести додатно испитивање потенцијала новосинтетисаних деривата да инхибирају ензиме укључене у продукцију проинфламацијских медијатора и тако остваре свој антиинфламацијски ефекат. Уколико се анализира однос структуре и антиинфламацијске активности испитиваних једињења може се закључити да присуство несупституисаних, мета- и пара-супституисаних ароматичних амина у бочном низу доприноси снажној антиинфламацијској активности.

Резултати испитивања инхибиције COX-2 и 5-LOX ензима показали су да сва синтетисана једињења поседују слабију COX-2 инхибиторну активност у односу на напроксен. Ниједно од испитиваних једињења није остварило 50% инхибиције COX-2 при концентрацијама нижим од 100 $\mu\text{mol/l}$. Процент инхибиције тиоуреидних деривата напроксена за COX-2 ензим при концентрацији 10 $\mu\text{mol/l}$ кретао се у интервалу од 12,64% (дериват **10**) до 37,71% (дериват **4**), што је значајно ниже у односу на напроксен (72,15%). Уколико се узму у обзир резултати добијени испитивањем инхибиције 5-LOX ензима, може се закључити да се једињења **1-5** могу сматрати инхибиторима овог ензима (IC_{50} вредности у опсегу 0,30-39,77 μM), при чему је постигнута IC_{50} вредност деривата **4** најнижа (0,30 μM) и упоредива са зилеутоном (0,36 μM). Поређењем процената COX-2 и 5-LOX инхибиције испитиваних једињења уочено је да генерално постоји већи потенцијал за инхибицију 5-LOX ензима у односу на COX-2. Претходно наведеним се могу објаснити резултати добијени *in vivo* истраживањем, односно, да је један од потенцијалних механизма антиинфламацијског ефекта новосинтетисаних једињења инхибиција 5-LOX ензима. Изразито висок степен 5-LOX инхибиције деривата **4**, као и највећи проценат инхибиције COX-2 у односу на остала испитивана једињења, указује на то да присуство *m*-анизидина у структури тиоуреидних деривата напроксена може потенцирати његов инхибиторни ефекат. Изражена редукција едема шапе пацова уз најснажнију COX-2 и 5-LOX инхибиторну активност коју је остварило једињење **4** издваја овај дериват као један од најпотентнијих антиинфламацијских агенаса у испитиваном сету једињења. Како би се претпоставио модел везивања испитиваних једињења за COX-2 и 5-LOX додатно је спроведена студија молекулског докинга.

На основу раније објављених резултата закључено је да се везивање кокристалног лиганда напроксена у активном месту COX-2 карактерише формирањем три водоничне везе и то једне са аминокиселином Tyr355 и две везе са Arg120. Атоми кисеоника карбонилног и хидроксилног дела карбоксилне групе напроксена формирају водоничне интеракције са аминокиселином Arg120, док карбонилни кисеоник формира додатну водоничну везу са фенолном групом остатка Tyr355. Са друге стране, метоксинафталенско језгро напроксена гради мрежу π -алкил интеракција са остацима Val349, Trp387, Leu352, Val523 и Ala527. Једна амид- π интеракција наведеног фрагмента кокристалала формира се са аминокиселином глицин на положају 526, док аминокиселински остаци Val116, Val349 и Leu531 остварују алкил интеракције са метил групом хиралног C-атома напроксена.

Резултати молекулског уклапања синтетисаних једињења показали су да карбонилни атоми кисеоника деривата **1** и **5** формирају водоничну везу са остатком Arg120, док се двострука водонична веза са наведеном аминокиселином успоставља са карбонилном и тиокарбонилном групом деривата **2**, **8-10** и **12**, односно, карбонилном групом деривата **3**, **4** и **11**. Сличан модел уклапања као и код кокрystalног лиганда уочен је код деривата естра фенилаланина (дериват **6**) који формира водоничне интеракције са остацима Arg120 и Tyr355, док деривати **7**, **13** и **14** формирају само једну водоничну везу са Tyr355.

Уколико се узму у обзир вредности енергије везивања, јасно је да деривати ароматичних амина формирају стабилније комплексе са COX-2 у односу на деривате ароматичних аминокиселина остварујући упоредиве вредности енергије везивања у односу на напроксен (-13,13 kcal/mol). Овакви резултати се могу објаснити формирањем додатних хидрофобних интеракција, које су остварене преко ароматичног прстена бочног остатка. Без обзира на то што се метоксинафталенски део новосинтетисаних једињења уклапа на сличан начин као и код напроксена, ароматични прстенови ароматичних амина су значајно допринели стабилизацији комплекса лиганд-рецептор формирањем додатних интеракција са остацима Val89, Leu93, Val116, Ile112, Phe357, Ser119 и Arg120. Најнижа вредност енергије везивања за дериват **4** у односу на остала испитивана једињења може се објаснити формирањем додатних контаката *m*-метоксифенилног остатка са аминокиселинама Val89 (π - σ и алкил) и Val116 (π -алкил). Насупрот наведеном, деривати естара ароматичних аминокиселина су остварили знатно више вредности енергије везивања приликом уклапања у активно место COX-2 у односу на напроксен. Без обзира на успостављене водоничне интеракције, мања стабилност комплекса које формирају наведени молекули може се објаснити појавом стерно неповољних интеракција које могу бити последица веће запремине бочних низова ових једињења у односу на напроксен и деривате ароматичних амина.

Као што је наведено, карбоксилна група напроксена формира три водоничне интеракције са остацима аминокиселина Arg120 и Tyr355 које су познате и као остаци места сужења које је лоцирано на улазу COX-2 ензима (256). Такође, истраживања су показала да уколико се изврши мутација две наведене аминокиселине долази до потпуне елиминације инхибиторних способности напроксена према ензиму (89). Немогућношћу испитиваних једињења да формирају три водоничне интеракције са наведеним аминокиселинама може се објаснити слабија COX-2 инхибиција у односу на напроксен.

Инхибитори 5-LOX ензима могу се поделити на хелаторе гвожђа, компетитивне нередокс инхибиторе и редокс активне инхибиторе (257). Један од најпознатијих 5-LOX инхибитора, зилеутон, своје дејство остварује хелирањем јона гвожђа у активном месту ензима и стабилизацијом оксидационог стања. Насупрот њему, лекови попут NDGA се компетицијом са арахидонском киселином везују за активно место ензима чиме инхибирају њен метаболизам (97). У циљу валидације студије молекулског докинга извршено је уклапање зилеутона и NDGA у активно место 5-LOX. Резултати су показали да NDGA нема способност хелирања јона гвожђа за разлику од зилеутона, чиме је потврђена валидност спроведеног истраживања.

На основу студије молекулског докинга може се закључити да испитивана једињења (**1-14**) не могу хелирати јон гвожђа у активном месту 5-LOX ензима. Нафталенски систем готово свих тестираних једињења се на исти начин уклапа у активно место 5-LOX. Овај део молекула у хидрофобном цепу циљног ензима остварује π -алкил интеракцију са остатком Ile406, π - σ контакт са Ala410 и π -анјонску интеракцију са остатком Ile673. Ниједно од испитиваних једињења није успело да формира кључне водоничне интеракције са остацима Arg596, Ile673 и His600 које је формирао NDGA. Са друге стране, сва једињења преко карбонилног кисеоника амидне групе граде водоничну

интеракцију са остатком Gln363 осим деривата **5-7, 9 и 10** који нису успели да остваре ниједну водоничну интеракцију.

Када се узму у обзир остварене вредности енергије везивања, може се закључити да су сва тестирана једињења остварила вредности које су упоредиве са NDGA (-8,77 kcal/mol), али не и са зилеутоном (-10,67 kcal/mol). То показује да молекули који имају способност да хелирају јон гвожђа формирају стабилније комплексе са 5-LOX. Када се упореде вредности енергије везивања испитиваних једињења међусобно, може се закључити да најстабилније комплексе са циљним ензимом граде деривати **11 и 13**. Дериват *o*-метоксианилина се у активном месту циљног ензима уклапа на сличан начин као и преостала једињења из анализираног сета. Оно што га издваја у односу на остале деривате је могућност формирања двоструке водоничне интеракције са остатком Gln363. Наиме, амидна група бочног низа наведене аминокиселине као донор водоничне везе интерагује са етарским кисеоником аминског дела и са карбонилном групом напроксенског дела једињења **11**. Стабилности формираног комплекса додатно доприносе π -алкил интеракције нафталенског система са остацима Leu368, His372 и Ala410, као и π - π (His372) и π - σ (Ala410) контакти. Са друге стране, нафталенско језгро деривата метилестра фенилаланина (једињење **13**) уклапа се на идентичан начин као и код једињења **11** уз додатну π -алкил интеракцију са остатком Pe406. Једину водоничну везу ово једињење остварује преко тиокарбонилног сумпора са NH групом имидазоловог прстена аминокиселине His367. Већа стабилност комплекса наведених деривата (**11 и 13**) се додатно може објаснити одсуством стерно неповољних интеракција приликом њиховог уклапања у активно место 5-LOX.

Избегавање активације процеса апоптозе има кључну улогу у развоју канцерогенезе. Апоптоза је веома сложен процес који се може активирати на два начина: преко рецептора (спољашњи пут) и митохондријалним путем (унутрашњи пут). Након активације програмиране ћелијске смрти долази до формирања апоптотских телашаца која се у следећем кораку фагоцитују од стране макрофага. Значајно је да приликом одвијања програмиране ћелијске смрти не долази до инфламаторног процеса (258).

Унутрашњи апоптотски пут је активиран након оштећења ДНК молекула или ћелијских органела. Кључни корак у активацији митохондријалног пута апоптозе је губитак трансмембранског потенцијала митохондрија и трансфер цитохрома-С из митохондрија у цитоплазму. Након тога, долази до активације каспазе-3 и формирања апоптозома. Молекули који имају есенцијалну улогу у регулацији апоптозе су протеини *Bcl-2* суперфамилије (259). Спољашњи апоптотски пут је активиран захваљујући везивању одговарајућег лиганда за рецептор смрти. Након серије повезаних апоптотских реакција долази до активације каспазе-3 као и формирања апоптозома (260).

Ћелијски циклус је строго контролисан процес који се одвија у више фаза и то: G₁, S, G₂ и M фаза. Приликом оштећења ДНК молекула код малигно неизмењених ћелија, ћелијски циклус се зауставља, долази до репарације и касније до наставка одвијања циклуса. Осим поремећаја у процесу програмиране ћелијске смрти, поремећаји у строгој контроли ћелијског циклуса могу довести до развоја процеса канцерогенезе (261). Савремени антитуморски лекови свој ефекат испољавају активацијом процеса апоптозе и/или индукцијом застоја ћелијског циклуса. Кључни недостаци савремене антитуморске терапије су неселективност, као и појава резистенције на лек након дуготрајне примене. Стога, јасно је да синтеза потенцијалних хемиотерапеутика има задатак да превазиђе претходно поменуто недостатке.

У представљеној дисертацији тестирано је четрнаест једињења (**1-14**) на ћелије аденокарцинома дојке MDA-MB-231, карцинома грлића материце HeLa, карцинома колона НСТ 116. У циљу испитивања селективности претходно поменутих једињења,

тестиран је антипролиферативни ефекат и на малигно неизмењеним фибробластима (MRC-5).

Тестирана једињења (1-14) показала су веома слаб антипролиферативни ефекат на MDA-MB-231 ћелијској линији. Такође, већина синтетисаних једињења је демонстрирала веома слаб антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома грлића материце HeLa. Прецизније, од четрнаест тестираних једињења само су једињења **3** и **8** испољила снажан антитуморски ефекат на HeLa ћелије. На ћелијској линији HCT 116 синтетисана једињења су показала умерен, односно слаб антитуморски ефекат. Веома слаб антипролиферативни ефекат тиоуреидних деривата напроксена (1-14) је показан на малигно неизмењеним фибробластима.

Истраживање које су публиковали *El-Husseiny* и сарадници је показало да деривати напроксена показују снажан антипролиферативни ефекат на MCF-7, MDA-231, HeLa и HCT 116 ћелијске линије, при чему су IC₅₀ вредности биле у опсегу од 4,83 до 14,49 μM (58). За разлику од претходно поменутог истраживања, у представљеној докторској дисертацији већина тиоуреидних деривата напроксена је остварила веома слаб антитуморски ефекат на MDA-MB-231, HeLa и HCT 116 ћелијским линијама. Изузетак су једињења **3** и **8** која су показала снажан антитуморски ефекат само на HeLa ћелијској линији.

Истраживање спроведено од стране *Deb*-а и сарадника је показало да дериват напроксена испољава снажан антипролиферативни ефекат на две ћелијске линије карцинома дојке MCF-7 и MDA-MB-231 (59). За разлику од претходно поменуте студије, у представљеном истраживању свих четрнаест тестираних једињења су демонстрирала веома слаб антипролиферативни ефекат на MDA-MB-231 ћелијској линији.

С обзиром на чињеницу да су од свих тестираних једињења само деривати **3** и **8** испољили снажан антипролиферативни ефекат на HeLa ћелије, неопходно је детаљно проучавање молекуларних механизма њиховог дејства. Наша студија је јасно показала да оба претходно поменута једињења активирају процес апоптозе и на тај начин смањују вијабилност тестираних канцерских ћелија. Слично нашим резултатима, у истраживању *Deb*-а и сарадника, дериват напроксена индуковао је активацију апоптозе и тиме смањио вијабилност тестираних малигнућелија (59).

Осим активације процеса апоптозе, једињења **3** и **8** свој антипролиферативни ефекат на HeLa ћелије остварују захваљујући индукцији застоја ћелијског циклуса у G₀/G₁ фази. Истраживање *Deb*-а и сарадника је показало да дериват напроксена свој снажан антитуморски ефекат заснива искључиво на активацији процеса апоптозе, без застоја ћелијског циклуса (59).

Проапоптотски и антиапоптотски протеини имају регулаторну улогу у контроли процеса апоптозе. Потенцијални антитуморски лекови могу повећати концентрацију проапоптотског *Bax* протеина и истовремено смањити концентрацију антиапоптског *Bcl-2* молекула. Поремећајем односа концентрације *Bcl-2/Bax* протеина унутар малигне ћелије доћи ће до активације егзекуторске каспазе-3. У представљеном истраживању, тестирана једињења **3** и **8** нису довела до значајног пораста концентрације проапоптотског протеина *Bax*. Такође, није детектован пад концентрације антиапоптотског *Bcl-2* протеина. Можемо закључити да није дошло до умањења односа *Bcl-2/Bax*. Такође, након третмана испитиваним једињењима детектована је повећана концентрација егзекуторске каспазе-3. Слично овим резултатима, студија *Deb*-а и сарадника је показала да дериват напроксена индукује активацију каспазе-3 и каспазе-9 (59).

6. ЗАКЉУЧАК

➤ Синтеза тиоуреидних деривата напроксена

Представљена докторска дисертација имала је за циљ да се функционализацијом карбоксилне групе напроксена у тиоуреидну групу применом стерно волуминозних и липофилних ароматичних амина и естара ароматичних аминокиселина синтетичу молекули који би имали исту или снажнију антиинфламацијску и цитотоксичну активност у односу на полазни напроксен. Синтеза је спроведена применом тростепене процедуре у којој киселински хлорид напроксена, добијен у првом кораку, у присуству калијум-тиоцијаната реагује са ароматичним аминима и естрима ароматичних аминокиселина формирајући жељени производ. Синтетисано је 14 тиоуреидних деривата напроксена и то 10 деривата ароматичних амина (једињења **1-5** и **8-12**) и четири деривата естара ароматичних аминокиселина (једињења **6**, **7**, **13** и **14**) уз принос од 25% до 43%. Пречишћавање добијених једињења извршено је применом препаративне TLC методе.

➤ Физичко-хемијска карактеризација новосинтетисаних једињења (структурна анализа и одређивање параметара липофилности)

Структурна карактеризација спроведена је применом методе одређивања тачке топљења и тачних маса, затим NMR (^1H и ^{13}C), IR и масене спектроскопије. Испитивање липофилности спроведено је применом традиционалне *shake-flask* методе, као и реверзно-фазних хроматографских метода (RP-TLC и RP-HPLC). Рачунарском предикцијом процењено је да сва једињења из испитиваног сета имају изразито липофилне особине, па је доказано да су RP-TLC и RP-HPLC методе погодније за процену липофилности синтетисаних једињења у односу на традиционалну *shake-flask* методу. Уочено је да због велике липофилности испитиваних једињења ($\log P > 4$) готово целокупна количина испитиване супстанце прелази у органску фазу што онемогућава адекватно израчунавање коефицијента расподеле применом спектрофотометријске *shake-flask* методе. Дистрибуција вредности хроматографских параметара RP-TLC и RP-HPLC методе налази се у релативно уском опсегу, што указује на сличну липофилност међу испитиваним једињењима. Међу тестираним дериватима напроксена највеће вредности RP-TLC и RP-HPLC хроматографских параметара поседују деривати **6** и **7**. С обзиром на то да синтетисана једињења не поседују јонизујуће центре, $\log P$ је једнак $\log D$ вредности при свим pH вредностима.

➤ Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције новосинтетисаних једињења. QSPR и QSRR анализа добијених резултата

Процена пасивне гастроинтестиналне апсорпције извршена је применом PAMPA и BMS модела. Пошто је PAMPA модел са системом хексадекан/хексан као вештачком мембраном омогућио процену ретенције испитиваних једињења у вештачкој мембрани, као и то да је време инкубације знатно краће у односу на модел са лецитином јајета као вештачком мембраном, одлучено је да се испитивање пасивне гастроинтестиналне апсорпције свих новосинтетисаних једињења и напроксена спроведе применом првог PAMPA модела. Једињења са највишим вредностима $\log Pe$ (дериват **6** и дериват **7**) спадају у групу најлипофилнијих једињења испитиваног сета. Са друге стране, деривати **3** и **6** поседују највише вредности ретенције у вештачкој мембрани (24% и 34%), што је онемогућило да ова једињења остваре још више вредности $\log Pe$ параметра од очекиваних на основу њихове липофилности. На основу резултата процене пасивне гастроинтестиналне апсорпције уочено је да анализирана једињења поседују значајно мањи потенцијал да прођу кроз гастроинтестиналну мембрану у односу на напроксен без

обзира на извршену хемијску модификацију, при чему је само дериват **7** показао већи степен пермеабилности у односу на напроксен. Резултати QSPR анализе су показали да су два дескриптора која најбоље описују однос структуре и пермеабилности испитиваних једињења *SM07_EA(dm)* и *CATS3D_02_AL*. Молекули који у својој структури поседују највећи број неводоникових атома имају највише вредности *SM07_EA(dm)* дескриптора, док напроксен поседује најнижу вредност. Дериват **7** поседује највеће вредности $\log Pe$ и дескриптора *SM07_EA(dm)*, што указује на то да више вредности наведеног дескриптора могу имати позитиван утицај на пасивну гастроинтестиналну апсорпцију. Са друге стране, највише вредности *CATS3D_02_AL* дескриптора уочене су код деривата ароматичних амина који у пара положају бензеновог прстена поседују групе са два атома угљеника и једним атомом кисеоника (етокси група код деривата **3** и ацетил група код деривата **5**). ВМС анализа показала је да се од естара ароматичних аминокиселина очекује боља пасивна гастроинтестинална апсорпција у односу на деривате ароматичних амина. Анализом QSRR модела закључено је да је *Mor20u* дескриптор који најбоље описује повезаност између структуре испитиваних једињења и њихове ретенционе способности у ВМС систему. РАМРА и ВМС анализа указују на висок степен усаглашености резултата ова два модела, јер су оба показала да тиюреидни деривати напроксена са естрима ароматичних аминокиселина (деривати **6** и **7**) поседују највећи, а дериват **5** најмањи потенцијал за пасивну гастроинтестиналну апсорпцију.

➤ Испитивање *in vivo* антиинфламацијске активности новосинтетисаних једињења

Једињења **2**, **4** и **7** показала су најснажнији потенцијал да редукују едем шапе пацова у највећој дози, који је знатно већи у односу на нетретирану групу пацова, а компарабилан са активношћу коју је остварио напроксен. Максимум антиинфламацијског ефекта најефикаснијих деривата (**2**, **4** и **7**) уочен је у периоду најизраженијег едема током трећег и четвртог сата након апликације карагенана, па би се могло претпоставити да је најинтензивнија инхибиција едема шапе током одложене фазе инфламације последица утицаја синтетисаних једињења на биосинтезу простагландина.

➤ Испитивање *in vitro* COX-2 и 5-LOX инхибиторне активности новосинтетисаних једињења

Резултати испитивања инхибиције COX-2 и 5-LOX ензима показали су да сва синтетисана једињења поседују слабију COX-2 инхибиторну активност у односу на напроксен. Карбоксилна група напроксена формира три водоничне интеракције са остацима аминокиселина Arg120 и Tyr355 на улазу COX-2 ензима, па се немогућношћу испитиваних једињења да формирају три водоничне интеракције са наведеним аминокиселинама може објаснити слабија COX-2 инхибиција у поређењу са напроксеном. Насупрот томе, значајна инхибиција 5-LOX ензима забележена за једињења **1-5**, при чему је постигнута IC₅₀ вредност деривата **4** најнижа и упоредива са зилеутоном. На основу студије молекулског докинга, може се закључити да испитивана једињења (**1-14**) не могу хелирати јон гвожђа у активном месту 5-LOX, што указује на то да спадају у групу нехелирајућих компетитивних инхибитора овог ензима. Када се узму у обзир вредности енергије везивања може се закључити да су сва тестирана једињења остварила вредности које су компарабилне са NDGA, али не и са зилеутоном, тако да молекули који имају способност да хелирају јон гвожђа формирају стабилније комплексе са 5-LOX.

➤ Испитивање *in vitro* цитотоксичне активности новосинтетисаних једињења.

Студијама цитотоксичности показано је да ниједно од синтетисаних једињења не поседује значајан цитотоксични ефекат на вијабилност ћелија фибробласта MRC-5 и веома благ ефекат на MDA-MB-231 ћелијску линију. Најизраженији цитотоксични ефекат остварили су деривати **3** и **8** на HeLa туморску ћелијску линију грлића материце уз доказану активацију екстринзичког апоптотског пута.

На основу свега наведеног може се закључити да *m*-супституисани, *p*-супституисани и несупституисани деривати ароматичних амина поседују снажан антиинфламацијски и цитотоксични ефекат, међу којима се истичу деривати **3** и **8** са најснажнијим цитотоксичним дејством и деривати **2**, **4** и **7** као најпотентнији антиинфламацијски агенси. Међу наведеним молекулима једињење **7** поседује значајну предвиђену пасивну гастроинтестиналну апсорпцију, што га чини добрим кандидатом за *per os* примену.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging Dis.* 2018;9(1):143.
2. Kay JF, MacNeil JD, Wang J, editors. Chemical analysis of non-antimicrobial veterinary drug residues in food. *JWS.* 2016;427-96.
3. Tacconelli S, Bruno A, Grande R, Ballerini P, Patrignani P. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cardiovascular safety - translating pharmacological data into clinical readouts. *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16(7):791-807.
4. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* 2020;180:114147.
5. Bonnesen K, Schmidt M. Recategorization of Non-Aspirin Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs According to Clinical Relevance: Abandoning the Traditional NSAID Terminology. *Can J Cardiol.* 2021;37(11):1705-7.
6. Wong RSY. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Adv Pharmacol Sci.* 2019;1-10.
7. Conaghan PG. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatol Int.* 2012;32(6):1491-502.
8. Wong RSY. Disease-Modifying Effects of Long-Term and Continuous Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Spondyloarthritis. *Adv Pharmacol Sci.* 2019;1-6.
9. Cooper C, Chapurlat R, Al-Daghri N, Herrero-Beaumont G, Bruyere O, Rannou F, et al. Safety of Oral Non-Selective NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Osteoarthritis: What Does the Literature Say? *Drugs Aging.* 2019;36(1):15-24.
10. Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalsecience.* 2016;10:610.
11. Zhang Z, Chen F, Shang L. Advances in antitumor effects of NSAIDs. *Cancer Manag Res.* 2018;10:4631-40.
12. Pallu R. Anti-inflammatory Drugs for Cancer Prevention and Treatment: Emerging Options. *J Cancer Sci Ther.* 2012;4(12):1.
13. Hilovska L, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Potency of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chemotherapy. *Mol Clin Oncol.* 2015;3(1):3-12.
14. Coyle C, Cafferty FH, Rowley S, MacKenzie M, Berkman L, Gupta S, et al. ADD-ASPIRIN: A phase III, double-blind, placebo controlled, randomised trial assessing the effects of aspirin on disease recurrence and survival after primary therapy in common non-metastatic solid tumours. *Contemp Clin Trials.* 2016;51:56-64.
15. Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem.* 2007;50(7):1425-41.
16. Rawat C, Kukal S, Dahiya UR, Kukreti R. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):1-5.
17. Zhang C, Wang Y, Wang D, Zhang J, Zhang F. NSAID exposure and risk of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis from cohort studies. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:1-9.
18. FitzGerald GA. Misguided drug advice for COVID-19. *Science.* 2020;367(6485):1434.
19. Zarghi A, Arfaei S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res.* 2011;10(4):655-83.
20. Varga Z, Sabzwari SRA, Vargova V. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. *Cureus.* 2017;9(4):1-12.

21. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(21):13926-31.
22. Bjarnason I, Scarpignato C, Holmgren E, Olszewski M, Rainsford KD, Lanas A. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology*. 2018;154(3):500-14.
23. Sandoval-Acuna C, Lopez-Alarcon C, Aliaga ME, Speisky H. Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action. *Chem Biol Interact*. 2012;199(1):18-28.
24. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
25. Mazumder S, De R, Sarkar S, Siddiqui AA, Saha SJ, Banerjee C, et al. Selective scavenging of intra-mitochondrial superoxide corrects diclofenac-induced mitochondrial dysfunction and gastric injury: A novel gastroprotective mechanism independent of gastric acid suppression. *Biochem Pharmacol*. 2016;121:33-51.
26. Chatterjee S, Dureja GP, Kadhe G, Mane A, Phansalkar AA, Sawant S, et al. Cross-Sectional Study for Prevalence of Non-Steroidal AntiInflammatory Drug-Induced Gastrointestinal Cardiac and Renal Complications in India: Interim Report. *Gastroenterology Res*. 2015;8(3-4):216-21.
27. Sinha M, Gautam L, Shukla PK, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Current perspectives in NSAID-induced gastropathy. *Mediators Inflamm*. 2013;1-11.
28. Grosser T, Yu Y, Fitzgerald GA. Emotion recollected in tranquility: lessons learned from the COX-2 saga. *Annu Rev Med*. 2010;61:17-33.
29. Salvo F, Antoniazzi S, Duong M, Molimard M, Bazin F, Fourrier-Reglat A, et al. Cardiovascular events associated with the long-term use of NSAIDs: a review of randomized controlled trials and observational studies. *Expert Opin Drug Saf*. 2014;13(5):573-85.
30. Pirlamarla P, Bond RM. FDA labeling of NSAIDs: Review of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2016;26(8):675-80.
31. Nissen SE, Yeomans ND, Solomon DH, Luscher TF, Libby P, Husni ME, et al. Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *N Engl J Med*. 2016;375(26):2519-29.
32. Lucas GNC, Leitao ACC, Alencar RL, Xavier RMF, Daher EF, Silva Junior GBD. Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bras Nefrol*. 2019;41(1):124-30.
33. Ejaz P, Bhojani K, Joshi VR. NSAIDs and kidney. *J Assoc Physicians India*. 2004;52:632-40.
34. Rahman S, Malcoun A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclooxygenase-2, and the kidneys. *Prim Care*. 2014;41(4):803-21.
35. Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World J Gastroenterol*. 2010;16(45):5651-61.
36. Sriuttha P, Sirichanchuen B, Permsuwan U. Hepatotoxicity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Int J Hepatol*. 2018;1-13.
37. Bessone F, Hernandez N, Roma MG, Ridruejo E, Mendizabal M, Medina-Caliz I, et al. Hepatotoxicity induced by coxibs: how concerned should we be? *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(11):1463-75.

38. Schink T, Kollhorst B, Varas Lorenzo C, Arfe A, Herings R, Lucchi S, et al. Risk of ischemic stroke and the use of individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: A multi-country European database study within the SOS Project. *PLoS One*. 2018;13(9):1-14.
39. White AA, Stevenson DD. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(11):1060-70.
40. Dzionek A, Wojcieszynska D, Hupert-Kocurek K, Adamczyk-Habrajska M, Guzik U. Immobilization of *Planococcus* sp. S5 strain on the loofah sponge and its application in naproxen removal. *Catalysts*. 2018;8:176.
41. Barcella CA, Lamberts M, McGettigan P, Fosbol EL, Lindhardsen J, Torp-Pedersen C, et al. Differences in cardiovascular safety with non-steroidal anti-inflammatory drug therapy-a nationwide study in patients with osteoarthritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019;124:629-41.
42. Han Mİ, Küçükgülzel ŞG. Anticancer and antimicrobial activities of naproxen and naproxen derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2020;20(13):1300-10.
43. Harrington PJ, Lodewijk E. Twenty years of naproxen technology. *Org Process Res Dev*. 1997;1(1):72-6.
44. Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. Variability in the response to non-steroidal anti-inflammatory drugs: mechanisms and perspectives. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;114:56-63.
45. Angiolillo DJ, Weisman SM. Clinical pharmacology and cardiovascular safety of naproxen. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2017;17:97-107.
46. Loetsch J, Oertel B. NSAIDs, Pharmacokinetics. *Encyclopedia of Pain*. 2013;2350-61.
47. Wojcieszynska D, Guzik U. Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104:1849-57.
48. Falany CN, Ström P, Swedmark S. Sulphation of o-desmethylnaproxen and related compounds by human cytosolic sulfotransferases. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60(6):632-40.
49. Bowalgaha K, Elliot DJ, Mackenzie PI, Knights KM, Swedmark S, Miners JO. S-Naproxen and desmethylnaproxen glucuronidation by human liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases (UGT): role of UGT2B7 in the elimination of naproxen. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60(4):423-33.
50. Scheiman JM. Balancing risks and benefits of cyclooxygenase-2 selective NSAIDs. *Gastroenterol Clin N Am*. 2009;38:305-14.
51. Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, Hochberg MC, Doherty M, Ehsam E, et al. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomized controlled trial. *Lancet*. 2004;364:665-74.
52. Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2013;382:769-79.
53. Scheiman JM. NSAID-induced gastrointestinal injury. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50(1):5-10.
54. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med*. 2001;345:1809-17.
55. Calonge N, Petitti DB, DeWitt TG, Gordi L, Gregor KD, Harris R, et al. Aspirin for the prevention of cardiovascular disease: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2009;150:396-404.

56. Ammar YA, Salem MA, Fayed EA, Helal MH, El-Gaby MS, Thabet HK. Naproxen derivatives: synthesis, reactions, and biological applications. *Synth Commun.* 2017;47(15):1341-67.
57. Mamatha N, Babu NS, Mukkanti K, Pal S. 2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl) propionic acid (1, 3-dimethylbutylidene) hydrazide. *Molbank.* 2011;2011(4):1-4.
58. El-Husseiny WM, Magda AA, Abdel-Aziz NI, El-Azab AS, Asiri YA, Alaa AM. Structural alterations based on naproxen scaffold: Synthesis, evaluation of antitumor activity and COX-2 inhibition, and molecular docking. *Eur J Med Chem.* 2018;158:134-43.
59. Deb J, Majumder J, Bhattacharyya S, Jana SS. A novel naproxen derivative capable of displaying anti-cancer and anti-migratory properties against human breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2014;14:1-8.
60. Khalifa MM, Ismail MM, Eissa S, Ammar Y. Design and synthesis, of some novel 6-methoxynaphthalene derivatives with potential anti-cancer activity. *Der Pharma Chem.* 2012;4(4):1552-66.
61. Aboul-Fadl T, Al-Hamad SS, Lee K, Li N, Gary BD, Keeton AB, et al. Novel non-cyclooxygenase inhibitory derivatives of naproxen for colorectal cancer chemoprevention. *Med Chem Res.* 2014;23:4177-88.
62. Elhenawy AA, Al-Harbi LM, El-Gazzar MA, Khowdiary MM, Alosaimi AM. Naproxenylamino acid derivatives: Design, synthesis, docking, QSAR and anti-inflammatory and analgesic activity. *Biomed Pharmacother.* 2019;116:1-12.
63. Eissa SI, Farrag AM, Galeel AA. Non-carboxylic analogues of aryl propionic acid: synthesis, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and ulcerogenic potential. *Drug Res.* 2014;64(9):485-92.
64. Elhenawy AA, Al-Harbi LM, Moustafa GO, El-Gazzar MA, Abdel-Rahman RF, Salim AE. Synthesis, comparative docking, and pharmacological activity of naproxen amino acid derivatives as possible anti-inflammatory and analgesic agents. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:1773-90.
65. Ammar YA, Fayed EA, Bayoumi AH, Saleh MA, El-Araby ME. Design and synthesis of pyridine-amide based compounds appended naproxen moiety as anti-microbial and anti-inflammatory agents. *Am J PharmTech Res.* 2015;5:245-73.
66. Mahfouz NM, Omar FA, Aboul-Fadl T. Cyclic amide derivatives as potential prodrugs II: N-hydroxymethylsuccinimide-/isatin esters of some NSAIDs as prodrugs with an improved therapeutic index. *Eur J Med Chem.* 1999;34(7-8):551-62.
67. Guillon J, Cohen A, Gueddouda NM, Das RN, Moreau S, Ronga L, et al. Design, synthesis and antimalarial activity of novel bis {N-[(pyrrolo [1, 2-a] quinoxalin-4-yl) benzyl]-3-aminopropyl} amine derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017;32(1):547-63.
68. Ranatunge RR, Augustyniak ME, Dhawan V, Ellis JL, Garvey DS, Janero DR, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of a series of N-substituted naproxen glycolamides: Nitric oxide-donor naproxen prodrugs. *Bioorg Med Chem.* 2006;14(8):2589-99.
69. Redasani VK, Bari SB. Synthesis and evaluation of glyceride prodrugs of naproxen. *Open J Med Chem.* 2013;3(3):87-92.
70. Geusens P. Naproxcinod, a new cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donator (CINOD). *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(5):649-57.
71. Shakeel A, Altaf AA, Qureshi AM, Badshah A. Thiourea derivatives in drug design and medicinal chemistry: A short review. *J Drug Des Med Chem.* 2016;2(1):10-20.
72. Saeed S, Rashid N, Jones PG, Ali M, Hussain R. Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2010;45(4):1323-31.

73. Li HQ, Lv PC, Yan T, Zhu HL. Urea derivatives as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009;9(4):471-80.
74. Li HQ, Yan T, Yang Y, Shi L, Zhou CF, Zhu HL. Synthesis and structure-activity relationships of N-benzyl-N-(X-2-hydroxybenzyl)-N'-phenylureas and thioureas as antitumor agents. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(1):305-13.
75. Lv PC, Li HQ, Sun J, Zhou Y, Zhu HL. Synthesis and biological evaluation of pyrazole derivatives containing thiourea skeleton as anticancer agents. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(13):4606-14.
76. Peng H, Liang Y, Chen L, Fu L, Wang H, He H. Efficient synthesis and biological evaluation of 1,3-benzenedicarbonyl dithioureas. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;21:1102-4.
77. Xiong X, Liu H, Fu L, Li L, Li J, Luo X, et al. Antitumor activity of a new N-substituted thiourea derivative, an EGFR signaling-targeted inhibitor against a panel of human lung cancer cell lines. *Chemotherapy.* 2008;54:463-74.
78. Liu W, Zhou J, Zhang T, Zhu H, Qian H, Zhang H, et al. Design and synthesis of thiourea derivatives containing a benzo [5,6] cyclohepta [1,2-b] pyridine moiety as potential antitumor and anti-inflammatory agents. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2012;22(8):2701-4.
79. Moneer AA, Mohammed KO, El-Nassan HB. Synthesis of novel substituted thiourea and benzimidazole derivatives containing a pyrazolone ring as anti-inflammatory agents. *Chem Biol Drug Des.* 2016;87(5):784-93.
80. Ghorab MM, El-Gaby MSA, Alsaid MS, Elshaier YAMM, Soliman AM, El-Senduny FF, et al. Novel thiourea derivatives bearing sulfonamide moiety as anticancer agents through COX-2 inhibition. *Anticancer Agents Med Chem.* 2017;17(10):1411-25.
81. Faki Y, Er A. Different chemical structures and physiological/pathological roles of cyclooxygenases. *Rambam Maimonides Med J.* 2021;12(1):1-13.
82. Mendes RT, Stanczyk CP, Sordi R, Otuki MF, dos Santos FA, Fernandes D. Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52:767-82.
83. Rius B, Clària J. Principles, mechanisms of action, and future prospects of anti-inflammatory drugs. In: *NSAIDs and aspirin.* Springer. 2016;2:17-34.
84. Smith WL, Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:115-28.
85. Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des.* 2003;9:2177-90.
86. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000;69(1):145-82.
87. Kiefer JR, Pawlitz JL, Moreland KT, Stegeman RA, Hood WF, Gierse JK, et al. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature.* 200;405(6782):97-101.
88. Mohale D, Tripathi AS, Wahane JB, Chandewar AV. A pharmacological review on cyclooxygenase enzyme. *Indian J Pharm Pharmacol.* 2014;1:46-58.
89. Duggan KC, Walters MJ, Musee J, Harp JM, Kiefer JR, Oates JA, et al. Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *J Biol Chem.* 2010;285(45):34950-9.
90. Knights KM, Mangoni AA, Miners JO. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2010;3(6):769-76.
91. Xu S, Mueser TC, Marnett LJ, Funk Jr MO. Crystal structure of 12-lipoxygenase catalytic-domain-inhibitor complex identifies a substrate-binding channel for catalysis. *Structure.* 2012;20:1490-7.
92. Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, Neau DB, Boeglin WE, Brash AR, et al. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science.* 2011;331:217-9.

93. Pettersen D, Davidsson O, Whatling C. Recent advances for FLAP inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25:2607-12.
94. Powell WS, Rokach J. Biochemistry, biology and chemistry of the 5-lipoxygenase product 5-oxo-ETE. *Prog Lipid Res*. 2005;44:154-83.
95. Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(7):332-41.
96. Okamoto H, Hammarberg T, Zhang YY, Persson B, Watanabe T, Samuelsson B, et al. Mutation analysis of the human 5-lipoxygenase C-terminus: support for a stabilizing C-terminal loop. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1749(1):123-31.
97. Kahnt AS, Angioni C, Göbel T, Hofmann B, Roos J, Steinbrink SD, et al. Inhibitors of human 5-lipoxygenase potently interfere with prostaglandin transport. *Front Pharmacol*. 2022;12:1-13.
98. Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*. 2016;529:307-15.
99. Sun SC. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:545-58.
100. Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*. 2015;27:149-60.
101. Serhan CN. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *Faseb J*. 2011;25:1441-8.
102. Kumar R, Clermont G, Vodovotz Y, Chow CC. The dynamics of acute inflammation. *J Theor Biol*. 2004;230:145-55.
103. Ploeger HE, Takken T, de Greef MH, Timmons BW. The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review. *Exerc Immunol Rev*. 2009;15:6-41.
104. Feehan KT, Gilroy DW. Is resolution the end of inflammation? *Trends Mol Med*. 2019;25:198-214.
105. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1-13.
106. Eiro N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2012;4:62-72.
107. Fujiki H. Gist of Dr. Katsusaburo Yamagiwa's papers entitled "Experimental study on the pathogenesis of epithelial tumors" (I to VI reports). *Cancer Sci*. 2014;105:143-9.
108. Hibino S, Kawazoe T, Kasahara H, Itoh S, Ishimoto T, Sakata-Yanagimoto M, et al. Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):1-37.
109. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2012;2:1-17.
110. Canli Ö, Nicolas AM, Gupta J, Finkelmeier F, Goncharova O, Pesic M, et al. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis. *Cancer Cell*. 2017;32:869-83.
111. Li T, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *J Exp Med*. 2018;215:1287-99.
112. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140:883-99.
113. Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*. 2005;121:977-90.
114. Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, et al. TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene*. 2014;33:3820-9.

115. Derynck R, Weinberg RA. EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Dev Cell*. 2019;49:313-6.
116. Sistigu A, Di Modugno F, Manic G, Nisticò P. Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoeediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;36:67-77.
117. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410:50-6.
118. Albregues J, Shields MA, Ng D, Park CG, Ambrico A, Poindexter ME, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*. 2018;361:1-30.
119. Meshram MA, Bhise UO, Makhal PN, Kaki VR. Synthetically-tailored and nature-derived dual COX-2/5-LOX inhibitors: structural aspects and SAR. *Eur J Med Chem*. 2021;225:1-27.
120. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*. 2005;174:589-94.
121. Kutil Z, Temml V, Maghradze D, Pribylova M, Dvorakova M, Schuster D, et al. Impact of Wines and Wine Constituents on Cyclooxygenase-1, Cyclooxygenase-2, and 5-lipoxygenase Catalytic Activity. *Mediators Inflamm*. 2014;1-8.
122. Nguyen HT, Vu TY, Chandi V, Polimati H, Tatipamula VB. Dual COX and 5-LOX inhibition by clerodane diterpenes from seeds of *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-10.
123. Kaur G, Silakari O. Multiple target-centric strategy to tame inflammation. *Future Med Chem*. 2017;9:1361-76.
124. Prasher P, Mudila H, Sharma M, Khati B. Developmental perspectives of the drugs targeting enzyme-instigated inflammation: a mini review. *Med Chem Res*. 2019;28:417-49.
125. Mukhopadhyay N, Shukla A, Makhal PN, Kaki VR. Natural product-driven dual COX-LOX inhibitors: Overview of recent studies on the development of novel anti-inflammatory agents. *Heliyon*. 2023;9(3):1-12.
126. Reddy KK, Vidya Rajan VK, Gupta A, Aparoy P, Reddanna P. Exploration of binding site pattern in arachidonic acid metabolizing enzymes, Cyclooxygenases and Lipoxygenases. *BMC Res Notes*. 2015;8(1):1-10.
127. Goossens L, Pommery N, Pierre Henichart J. COX-2/5-LOX dual acting anti-inflammatory drugs in cancer chemotherapy. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(3):283-96.
128. Gugliucci A, Ranzato L, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Cusan C, et al. Mitochondria are direct targets of the lipoxygenase inhibitor MK886. A strategy for cell killing by combined treatment with MK886 and cyclooxygenase inhibitors. *J Biol Chem*. 2002;277:31789-95.
129. Li N, Sood S, Wang S, Fang M, Wang P, Sun Z, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of zileuton and celecoxib. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2089-96.
130. Manju SL, Ethiraj KR, Elias G. Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach. *Eur J Pharm Sci*. 2018;121:356-81.
131. Moreira R, Jervis PJ, Carvalho A, Ferreira PM, Martins JA, Valentão P, et al. Biological evaluation of naproxen–dehydrodipeptide conjugates with self-hydrogelation capacity as dual LOX/COX inhibitors. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):1-18.
132. Lobo S. Is there enough focus on lipophilicity in drug discovery? *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(3):261-3.
133. Arnott JA, Planey SL. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin Drug Discov*. 2012;7(10):863-75.

134. Smith DA, Jones BC, Walker DK. Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics. *Med Res Rev.* 1996;16(3):243-66.
135. Testa B, Crivori P, Reist M, Carrupt PA. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples. *Perspect Drug Discov Des.* 2000;19:179-210.
136. Winiwarter S, Bonham NM, Ax F, Hallberg A, Lennernäs H, Karlén A. Correlation of human jejunal permeability (in Vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J Med Chem.* 1998;41(25):4939-49.
137. Mannhold R, Poda GI, Ostermann C, Tetko IV. Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 Compounds. *J Pharm Sci.* 2009;98(3):861-93.
138. Scherrer RA, Donovan SF. Automated potentiometric titrations in KCl/water-saturated octanol: method for quantifying factors influencing ion-pair partitioning. *Anal Chem.* 2009;81(7):2768-78.
139. Pallicer JM, Sales J, Rosés M, Ràfols C, Bosch E. Lipophilicity assessment of basic drugs (log P(o/w) determination) by a chromatographic method. *J Chromatogr A.* 2011;1218(37):6356-68.
140. Gocan S, Cimpan G, Comer J. Lipophilicity measurements by liquid chromatography. *Adv Chromatogr.* 2006;44:79-176.
141. Dobričić V, Vladimirov S, Čudina O. Synthesis and RP-TLC lipophilicity evaluation of a novel fluocinolon acetone soft drug derivative. *Kragujev J Sci.* 2016;(38):107-14.
142. Benhaim D, Grushka E. Effect of n-octanol in the mobile phase on lipophilicity determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a modified silica column. *J Chromatogr A.* 2008;1209(1-2):111-9.
143. Leucuta SE. Selecting oral bioavailability enhancing formulations during drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov.* 2014;9(2):139-50.
144. Williams J, Siramshetty V, Nguyễn ĐT, Padilha EC, Kabir M, Yu KR, et al. Using *in vitro* ADME data for lead compound selection: An emphasis on PAMPA pH 5 permeability and oral bioavailability. *Bioorg Med Chem.* 2022;56:1-28.
145. Sun H, Nguyen K, Kerns E, Yan Z, Yu KR, Shah P, et al. Highly predictive and interpretable models for PAMPA permeability. *Bioorg Med Chem.* 2017;25(3):1266-76.
146. Mandagere AK, Thompson TN, Hwang KK. Graphical model for estimating oral bioavailability of drugs in humans and other species from their Caco-2 permeability and in Vitro liver enzyme metabolic stability rates. *J Med Chem.* 2002;45(2):304-11.
147. Bujard A, Voirol H, Carrupt PA, Schappler J. Modification of a PAMPA model to predict passive gastrointestinal absorption and plasma protein binding. *Eur J Pharm Sci.* 2015;77:273-8.
148. Dobričić V, Marković B, Nikolic K, Savić V, Vladimirov S, Čudina O. 17 β -carboxamide steroids - *in vitro* prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique. *Eur J Pharm Sci.* 2014;52:95-108.
149. Sinkó B, Garrigues TM, Balogh GT, Nagy ZK, Tsinman O, Avdeef A, et al. Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *Eur J Pharm Sci.* 2012;45(5):698-707.
150. Vucicevic J, Nikolic K, Dobričić V, Agbaba D. Prediction of blood-brain barrier permeation of α -adrenergic and imidazoline receptor ligands using PAMPA technique and quantitative-structure permeability relationship analysis. *Eur J Pharm Sci.* 2015;68:94-105.

151. Štepnik KE, 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. *J Chromatogr A*. 2013;1286:127-36.
152. Molero-Monfort M, Escuder-Gilabert L, Villanueva-Camañas RM, Sagrado S, Medina-Hernández MJ. Biopartitioning micellar chromatography: an *in vitro* technique for predicting human drug absorption. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;753(2):225-36.
153. Čudina O, Marković B, Karljiković-Rajić K, Vladimirov S. Biopartitioning micellar chromatography-partition coefficient micelle/water as a potential descriptor for hydrophobicity in prediction of oral drug absorption. *Analytical letters*. 2012;45(7):677-88.
154. Escuder-Gilabert L, Molero-Monfort M, Villanueva-Camañas RM, Sagrado S, Medina-Hernández MJ. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an *in vitro* technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;807(2):193-201.
155. Dobričić V, Nikolic K, Vladimirov S, Čudina O. Biopartitioning micellar chromatography as a predictive tool for skin and corneal permeability of newly synthesized 17 β -carboxamide steroids. *Eur J Pharm Sci*. 2014;56:105-12.
156. Leach A. 2001. *Molecular Modelling* (2nd ed.). Harlow, England: Pearson Education.
157. Kumari P, Van Laethem T, Hubert P, Fillet M, Sacré PY, Hubert C. Quantitative Structure Retention-Relationship Modeling: Towards an Innovative General-Purpose Strategy. *Molecules*. 2023;28(4):1-17.
158. Golbraikh A, Tropsha A. Beware of q²! *J Mol Graph Model*. 2002;20(4):269-76.
159. Todeschini R, Consonni V. 2000. *Handbook of Molecular Descriptors*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
160. Filipic S, Nikolic K, Vovk I, Krizman M, Agbaba D. Quantitative structure-mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in CDs-mediated CE. *Electrophoresis*. 2013;34(3):471-82.
161. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr Intell Lab*. 2001;58:109-30.
162. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;22(5):717-27.
163. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikstrom C, Wold S. *Multi-and Megavariate Data Analysis*. 2001. *Basic Principles and Applications I* (2nd ed.). Umeå, Sweden: Umetrics Academy.
164. Kiralj R, Ferreira M. Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: theory and application. *J Braz Chem Soc*. 2009;20:770-87.
165. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):1-38.
166. Dewanjee S, Dua TK, Sahu R. Potential anti-inflammatory effect of *Leea macrophylla* Roxb. leaves: a wild edible plant. *Food Chem Toxicol*. 2013;59:514-20.
167. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544-7.
168. Sarkhel S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract in mice. *Toxicol Rep*. 2015;3:1-3.

169. Patil KR, Patil CR. Anti-inflammatory activity of bartogenic acid containing fraction of fruits of *Barringtonia racemosa* Roxb. in acute and chronic animal models of inflammation. *J Tradit Complement Med.* 2016;7(1):86-93.
170. Dannhardt G, Ulbrich H. In-vitro test system for the evaluation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors based on a single HPLC run with UV detection using bovine aortic coronary endothelial cells (BAECs). *Inflamm Res.* 2001;50(5):262-9.
171. Unsal-Tan O, Ozadali K, Piskin K, Balkan A. Molecular modeling, synthesis and screening of some new 4-thiazolidinone derivatives with promising selective COX-2 inhibitory activity. *Eur J Med Chem.* 2012;57:59-64.
172. Florento L, Matias R, Tuaño E, Santiago K, Dela Cruz F, Tuazon A. Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using In Vitro Cell-Based Approach. *Int J Biomed Sci.* 2012;8(1):76-80.
173. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods.* 1990;131(2):165-72.
174. Moradi M, Golmohammadi R, Najafi A, Moosazadeh Moghaddam M, Fasihi-Ramandi M, Mirnejad R. A contemporary review on the important role of *in silico* approaches for managing different aspects of COVID-19 crisis. *Inform Med Unlocked.* 2022;28:1-9.
175. Sabe VT, Ntombela T, Jhamba LA, Maguire GEM, Govender T, Naicker T, et al. Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *Eur J Med Chem.* 2021;224:113705.
176. Cox PB, Gupta R. Contemporary Computational Applications and Tools in Drug Discovery. *ACS Med Chem Lett.* 2022;13(7):1016-29.
177. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):1-23.
178. Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezeh EM, Ofoke IH, Ogbu CO, et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci Rep.* 2023;13(1):1-18.
179. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):1-18.
180. Mughal EU, Ashraf J, Hussein EM, Nazir Y, Alwuthaynani AS, Naeem N, et al. Design, Synthesis, and Structural Characterization of Thioflavones and Thioflavonols as Potential Tyrosinase Inhibitors: In Vitro and In Silico Studies. *ACS Omega.* 2022;7(20):17444-61.
181. Anwar S, Raut R, Alsahli MA, Almatroudi A, Alfheaid H, Alzahrani FM, et al. Role of Ajwa Date Fruit Pulp and Seed in the Management of Diseases through In Vitro and In Silico Analysis. *Biology (Basel).* 2022;11(1):1-29.
182. Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):1-29.
183. Chen G, Seukeep AJ, Guo M. Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs. *Mar Drugs.* 2020;18(11):1-22.
184. Salmaso V, Moro S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front Pharmacol.* 2018;9:1-16.
185. Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW. A review of protein-small molecule docking methods. *J Comput Aided Mol Des.* 2002;16(3):151-66.
186. Huang SY. Comprehensive assessment of flexible-ligand docking algorithms: current effectiveness and challenges. *Brief Bioinform.* 2018;19(5):982-94.
187. Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem.* 2007;28(6):1145-52.

188. Saadi H, Taboudjemat NH, Rahmoun A, Imbernón B, Pérez-Sánchez H, Cecilia JM. Efficient GPU-based parallelization of solvation calculation for the blind docking problem. *J Supercomput.* 2020;76:1980-98.
189. Li J, Fu A, Zhang L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip Sci.* 2019;11(2):320-8.
190. Guvench O, MacKerell AD Jr. Computational evaluation of protein-small molecule binding. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19(1):56-61.
191. Nordin NA, Chai TW, Tan BL, Choi CL, Abd Halim AN, Hussain H, et al. Novel synthetic monothiourea aspirin derivatives bearing alkylated amines as potential antimicrobial agents. *J Chem.* 2017;2017:1-7.
192. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7:1-13.
193. Molinspiration Cheminformatics free web services. Доступно на: <https://www.molinspiration.com/> (посећено 12.3.2023.)
194. Dong J, Cao DS, Miao HY, Liu S, Deng BC, Yun YH, et al. ChemDes: an integrated web-based platform for molecular descriptor and fingerprint computation. *J Cheminform.* 2015;7:1-10.
195. MarvinSketch: ChemAxon. Доступно на: <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/> (посећено 28.3.2023.)
196. Fujita T, Iwasa J, Hansch C. A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. *J Am Chem Soc.* 1964;86:5175-80.
197. Odović JV, Trbojević SJ. Chromatography methods in investigation of lipophilicity of the biological active substances. *Hem Ind.* 2009;63(1):33-7.
198. Poole SK, Poole CF. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;797(1-2):3-19.
199. Berthod A, Carda-Broch S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J Chromatogr A.* 2004;1037(1-2):3-14.
200. Samajpaty S. Solubility of Nifedipine by Shake Flask UV-Spectrometry; Review of Safety Concerns in Pregnancy. *Biomed Pharmacol J.* 2021;14(4):1823-9.
201. Mornar A, Jasprica I. Lipophilicity study of salicylamide. *Acta Pharm.* 2004;54:91-101.
202. Bieganowska ML, Doraczynska-Szopa A, Petruczynik A. The retention behavior of some sulfonamides on different TLC plates. 2. Comparison of the selectivity of the systems and quantitative determination of hydrophobicity parameters. *J Planar Chromatogr - Mod TLC.* 1995;8:122-8.
203. Dobričić V, Bošković J, Vukadinović D, Vladimirov S, Čudina O. Estimation of lipophilicity and design of new 17 β -carboxamide glucocorticoids using RP-HPLC and quantitative structure-retention relationships analysis. *Acta Chromatogr.* 2021;34(2):130-7.
204. Ottaviani G, Martel S, Carrupt PA. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J Med Chem.* 2006;49:3948-54.
205. Markovic B, Vladimirov S, Cudina O, Odovic J, Karljickovic-Rajic K. A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters. *Molecules.* 2012;17:480-91.
206. Avdeef A. Absorption and Drug Development. *J Med Chem.* 2004;47(7):1868.
207. Avdeef A, Strafford M, Block E, Balogh M, Chambliss W, Khan I. Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14:271-80.

208. Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK. 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.
209. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
210. Mauri A, Bertola M. Alvascience: A New Software Suite for the QSAR Workflow Applied to the Blood–Brain Barrier Permeability. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):1-17.
211. TIBCO Software Inc., 2017. Statistica (data analysis software system), version 13.
212. Ojha PK, Roy K. Comparative QSARs for antimalarial endochins: importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemometr Intell Lab.* 2011;109:146-61.
213. Marshall GR. Binding-site modeling of unknown receptors. In: Kubinyi H (ed) 3D QSAR in drug design – theory, methods and applications. ESCOM, Leiden.1994;80-116.
214. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation and exploitation. *Mol Inf.* 2010;29:476-88.
215. 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. *J Chromatogr A.* 2020;1621:1-14.
216. Ihsan A, Wang X, Huang XJ, Liu Y, Liu Q, Zhou W, et al. Acute and subchronic toxicological evaluation of Mequindox in Wistar rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;57:307-14.
217. Salga MS, Ali HM, Abdulla MA, Abdelwahab SI. Acute oral toxicity evaluations of some zinc(II) complexes derived from 1-(2-Salicylaldiminoethyl) piperazine schiff bases in rats. *Int J Mol Sci.* 2012;13:1393-404.
218. Rodríguez-Cal y Mayor A, Castañeda-Hernández G, Favari L, Martínez-Cruz A, Guízar-Sahagún G, Cruz-Antonio L. Pharmacokinetics and anti-inflammatory effect of naproxen in rats with acute and subacute spinal cord injury. *Naunyn-Schmiedeb Arch Pharmacol.* 2020;393:395-404.
219. Mićović T, Stanković JSK, Bauer R, Nöst X, Marković Z, Milenković D, et al. In vitro, in vivo and in silico evaluation of the anti-inflammatory potential of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2022;293:115201.
220. COX2. Inhibitor Screening Kit (Fluorometric) (ab283401). Доступно на: <https://www.abcam.com/products/assay-kits/cox2-inhibitor-screening-kit-fluorometric-ab283401.html> (посећено: 27.02.2023.).
221. ab284521–5-Lipoxygenase Inhibitor Screening Kit (Fluorometric). Доступно на: [https://www.abcam.com/ps/products/284/ab284521/documents/5-Lipoxygenase-Inhibitor-Screening-Kit-protocol-book-v2-ab284521%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/284/ab284521/documents/5-Lipoxygenase-Inhibitor-Screening-Kit-protocol-book-v2-ab284521%20(website).pdf) (посећено: 27.02.2023.).
222. Gilbert NC, Gerstmeier J, Schexnaydre EE, Börner F, Garscha U, Neau DB, et al. Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nat Chem Biol.* 2020;16:783-90.
223. MAKE Receptor 3.2.0.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. Доступно на: <https://www.eyesopen.com/> (посећено 28.3.2023.).
224. OMEGA 2.5.1.4: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. Доступно на: <http://www.eyesopen.com/> (посећено 28.3.2023.).
225. Hawkins PCD, Skillman AG, Warren GL, Ellingson BA, Stahl MT. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and the Cambridge Structural Database. *J Chem Inf Model.* 2010;50:572-84.

226. FRED 3.2.0.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. Доступно на: <https://www.eyesopen.com/> (посећено 28.3.2023.).
227. McGann M. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *J Chem Inf Model.* 2011;51:578-96.
228. McGann M. FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *J Comput Aided Mol Des.* 2012;26:897-906.
229. Du J, Bleylevens IW, Bitorina AV, Wichapong K, Nicolaes GA. Optimization of Compound Ranking for Structure-Based Virtual Ligand Screening Using an Established FRED–Surflex Consensus Approach. *Chem Biol Drug Des.* 2014;83:37-51.
230. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:935-49.
231. Carugo O, Pongor S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci.* 2001;10:1470-3.
232. Simić D, Zarić M, Nikolić I, Živković-Zarić R, Čanović P, Kočović A, et al. Newly synthesized palladium(II) complexes with aminothiazole derivatives: In vitro study of antimicrobial activity and antitumor activity on the human prostate cancer cell line. *Dalton Trans.* 2022;51:1191-205.
233. Li X, Cooper MA. Measurement of Drug Lipophilicity and pKa Using Acoustics. *Anal Chem.* 2012;84(6):2609-13.
234. Nedeljković N, Dobričić V, Bošković J, Vesović M, Bradić J, Anđić M, Kočović A, Jeremić N, Novaković J, Jakovljević V, Vujić Z, Nikolić M. Synthesis and Investigation of Anti-Inflammatory Activity of New Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceuticals.* 2023;16(5):666.
235. Nedeljković N, Nikolić M, Čanović P, Zarić M, Živković Zarić R, Bošković J, Vesović M, Bradić J, Anđić M, Kočović A, Nikolić M, Jakovljević V, Vujić Z, Dobričić V. Synthesis, Characterization, and Investigation of Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Novel Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceutics.* 2024;16(1):1.
236. Razzetti R, Acerbi D. Pharmacokinetic and pharmacologic properties of delapril, a lipophilic nonsulphydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am J Cardiol.* 1995;75:7-12.
237. Saruta T, Nishikawa K. Characteristics of a new angiotensin converting enzyme inhibitor: delapril. *Am J Hipertens.* 1991;2:23-8.
238. Miyazaki M, Kawamoto T, Okunishi H. Vascular affinity of trandolapril. *Am J Hiperten.* 1995;8:63-7.
239. Conen H, Brunner HR. Pharmacologic profile of trandolapril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am Heart J.* 1993;125:1525-31.
240. Ranadive SA, Chen AX, Serajuddin TM. Relative Lipophilicities and Structural-Pharmacological Considerations of Various Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors. *Pharm Res.* 1992;9(11):1480-6.
241. Kempieńska D, Chmiel T, Kot-Wasik A, Mroz A, Mazerska Z, Namieśnik J. State of the art and prospects of methods for determination of lipophilicity of chemical compounds. *Trends Anal Chem.* 2019;113:54-73.
242. Djakovic-Sekulic T, Acanski M, Perisic-Janjic N. Evaluation of the predictive power of calculation procedure for molecular hydrophobicity of some estradiol derivates. *J Chromatogr B.* 2002;766:67-75.
243. Pyka A, Miszczyk M. *Chromatographia.* Springer. 2005;61:37-42.
244. Edge adjacency indices. Доступно на: <http://chemgps.bmc.uu.se/help/dragonx/EdgeAdjacencyIndices.html> (посећено 12.9.2023.)

245. alvaDesc Molecular Descriptors. Доступно на: <https://www.alvascience.com/alvadesc-descriptors/> (поцењено 12.9.2023.)
246. Renner S, Hechenberger M, Noeske T, Böcker A, Jatzke C, Schmuker M, et al. Searching for drug scaffolds with 3D pharmacophores and neural network ensembles. *Angew Chem Int Ed.* 2007;46(28):5336-9.
247. Ciura K, Ulenberg S, Kapica H, Kawczak P, Belka M, Bączek T. Drug affinity to human serum albumin prediction by retention of cetyltrimethylammonium bromide pseudostationary phase in micellar electrokinetic chromatography and chemically advanced template search descriptors. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;188:1-8.
248. Mauri A, Consonni V, Pavan M, Todeschini R. Dragon software: An easy approach to molecular descriptor calculations. *Match.* 2006;56(2):237-48.
249. Duchowicz PR, Fernández M, Caballero J, Castro EA, Fernández FM. QSAR for non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorgan Med Chem.* 2006;14:5876-89.
250. Hancock T, Put R, Coomans D, Vander Heyden Y, Everingham Y. A performance comparison of modern statistical techniques for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic QSRR studies. *Chemometr Intell Lab Systems.* 2005;76:185-96..
251. Devinyak O, Havrylyuk D, Lesyk R. 3D-MORSE descriptors explained. *J Mol Graph Model.* 2014;54:194-203.
252. Xu J, Wang L, Zhang H, Shen X, Liang G. Quantitative structure-property relationships studies on free-radical polymerization chain-transfer constants for styrene. *J Appl Poly Sci.* 2012;123(1):356-64.
253. Zhang X, Retyunskiy V, Qiao S, Zhao Y, Tzeng CM. Alloferon-1 ameliorates acute inflammatory responses in λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Sci Rep.* 2022;12(1):1-10.
254. Mansouri MT, Hemmati AA, Naghizadeh B, Mard SA, Rezaie A, Ghorbanzadeh B. A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. *Indian J Pharmacol.* 2015;47(3):292-8.
255. Kim KH, Im HW, Karmacharya MB, Kim S, Min BH, Park SR, et al. Low-intensity ultrasound attenuates paw edema formation and decreases vascular permeability induced by carrageenan injection in rats. *J Inflamm.* 2020;17:1-8.
256. Ahmadi M, Bekeschus S, Weltmann KD, von Woedtke T, Wende K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: Recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. *RSC Med Chem* 2022;13:471-96.
257. Pergola C, Werz O. 5-Lipoxygenase inhibitors: A review of recent developments and patents. *Expert Opin Ther Pat.* 2010;20:355-75.
258. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):1-14.
259. Jan R. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(2):205-18.
260. Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2021;125:73-120.
261. Jamasbi E, Hamelian M, Hossain MA, Varmira K. The cell cycle, cancer development and therapy. *Mol Biol Rep.* 2022;49(11):10875-83.

8. ПРИЛОЗИ



Article

Synthesis and Investigation of Anti-Inflammatory Activity of New Thiourea Derivatives of Naproxen

Nikola Nedeljković ¹, Vladimir Dobričić ^{2,*}, Jelena Bošković ², Marina Vesović ¹, Jovana Bradić ^{1,3}, Marijana Andić ^{1,3}, Aleksandar Kočović ^{1,3}, Nevena Jeremić ^{1,3,4}, Jovana Novaković ^{1,3}, Vladimir Jakovljević ^{3,5,6}, Zorica Vujić ² and Miloš Nikolić ¹

- ¹ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
- ² Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia
- ³ Center of Excellence for Redox Balance Research in Cardiovascular and Metabolic Disorders, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
- ⁴ 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya 8/2, 119991 Moscow, Russia
- ⁵ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
- ⁶ Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya 8/2, 119991 Moscow, Russia
- * Correspondence: vladimir.dobricic@pharmacy.bg.ac.rs



Citation: Nedeljković, N.; Dobričić, V.; Bošković, J.; Vesović, M.; Bradić, J.; Andić, M.; Kočović, A.; Jeremić, N.; Novaković, J.; Jakovljević, V.; et al. Synthesis and Investigation of Anti-Inflammatory Activity of New Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 666. <https://doi.org/10.3390/ph16050666>

Academic Editors: Alfredo Berzal-Horranz and Maria Emilia De Sousa

Received: 10 April 2023
Revised: 26 April 2023
Accepted: 26 April 2023
Published: 28 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The aim of the study was a synthesis and investigation of the dose-dependent anti-inflammatory effect of new thiourea derivatives of naproxen with selected aromatic amines and esters of aromatic amino acids. The results of the in vivo study indicate that derivatives of *m*-anisidine (**4**) and *N*-methyl tryptophan methyl ester (**7**) showed the most potent anti-inflammatory activity four hours after injection of carrageenan, with the percentage of inhibition of 54.01% and 54.12%, respectively. In vitro assays of COX-2 inhibition demonstrated that none of the tested compounds achieved 50% inhibition at concentrations lower than 100 μ M. On the other hand, the aromatic amine derivatives (**1–5**) accomplished significant inhibition of 5-LOX, and the lowest IC₅₀ value was observed for compound **4** (0.30 μ M). High anti-edematous activity of compound **4** in the rat paw edema model, together with potent inhibition of 5-LOX, highlight this compound as a promising anti-inflammatory agent.







Keywords: naproxen; thiourea; carrageenan; paw edema; anti-inflammatory activity; COX-2; 5-LOX; molecular docking; FRED

1. Introduction

Inflammation is defined as a local or systemic response to tissue damage or different stimuli, such as biological, chemical, physical, and thermal factors [1]. Increased inflammatory response and elevated concentration of proinflammatory markers, such as cytokines and inflammatory chemokines, introduce the organism into a state of hyperinflammation [2]. Hyperinflammation in combination with reactive oxygen species (ROS) produced by oxidative stress is an important factor contributing to the development of various diseases, such as arthritis, cardiovascular disease, cancer, diabetes, etc. [3,4]. Arachidonic acid (AA) is a polyunsaturated ω -6 fatty acid that can be metabolized through various catabolic pathways. The two most important metabolic pathways of arachidonic acid are catalyzed by the enzymes cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) [5]. Two isoforms of COX enzyme are COX-1, which is constitutively expressed, and COX-2, which is induced by inflammatory factors, hormones, and growth factors. Two steps in the biosynthesis of leukotrienes are catalyzed by 5-LOX: the biotransformation of AA to the intermediate 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid and its further transformation to leukotrienes. On the

Article

Synthesis, Characterization, and Investigation of Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Novel Thiourea Derivatives of Naproxen

Nikola Nedeljković ¹ , Miloš Nikolić ^{1,*} , Petar Čanović ^{2,*} , Milan Zarić ² , Radica Živković Zarić ³, Jelena Bošković ⁴ , Marina Vesović ¹, Jovana Bradić ^{1,5}, Marijana Andić ^{1,5}, Aleksandar Kočović ^{1,5}, Marina Nikolić ^{5,6}, Vladimir Jakovljević ^{5,6,7}, Zorica Vujić ⁴ and Vladimir Dobričić ⁴ 

- ¹ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia; nikola.nedeljkovic@medf.kg.ac.rs (N.N.); marina.mijajlovic@medf.kg.ac.rs (M.V.); jovanabradic@medf.kg.ac.rs (J.B.); marijana.andjic@medf.kg.ac.rs (M.A.); salek@medf.kg.ac.rs (A.K.)
- ² Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia; zaricmilan@medf.kg.ac.rs
- ³ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia; iasst_a8@medf.kg.ac.rs
- ⁴ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia; jelena.boskovic@pharmacy.bg.ac.rs (J.B.); zorica.vujic@pharmacy.bg.ac.rs (Z.V.); vladimir.dobricic@pharmacy.bg.ac.rs (V.D.)
- ⁵ Center of Excellence for Redox Balance Research in Cardiovascular and Metabolic Disorders, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia; marina.nikolic@medf.kg.ac.rs (M.N.); vladimir.jakovljevic@medf.kg.ac.rs (V.J.)
- ⁶ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
- ⁷ Department of Human Pathology, First Moscow State Medical University IM Sechenov, 119435 Moscow, Russia
- * Correspondence: milos.nikolic@medf.kg.ac.rs (M.N.); petar.canovic@medf.kg.ac.rs (P.Č.)



Citation: Nedeljković, N.; Nikolić, M.; Čanović, P.; Zarić, M.; Živković Zarić, R.; Bošković, J.; Vesović, M.; Bradić, J.; Andić, M.; Kočović, A.; et al. Synthesis, Characterization, and Investigation of Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Novel Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 1. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010001>

Academic Editor: Anna Carbone

Received: 8 November 2023

Revised: 2 December 2023

Accepted: 5 December 2023

Published: 19 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The objective of this study was to synthesize seven novel thiourea derivatives of naproxen (8–14), examine the anti-inflammatory activity of the newly synthesized compounds, investigate the cytotoxic potential of both sets of synthesized compounds (1–7 and 8–14), and select the most promising anti-inflammatory and antitumor drug candidates. The results of the *in vivo* anti-inflammatory study clearly showed that compounds **8** and **9** were capable of decreasing paw edema, as evident from a high percentage of inhibition (44.83% and 49.29%, respectively). In addition, the results of *in vitro* enzyme inhibition assays demonstrated that neither of the newly synthesized compounds reached 50% inhibition of 5-LOX at concentrations lower than 100 μ M. In terms of antitumor potential, derivatives **3** and **8** exhibited strong cytotoxic effects on the HeLa cell line, suggesting the involvement of the extrinsic pathway of apoptosis. According to the overall results obtained for both sets of synthesized molecules, derivatives **4** and **8** can be underlined as molecules with the strongest anti-inflammatory activity, while derivatives **3** and **8** are the most promising cytotoxic agents.

Keywords: naproxen; thiourea; anti-inflammatory activity; paw edema; cytotoxic activity; MTT; apoptosis; COX-2; 5-LOX

1. Introduction

Inflammation represents the physiological response of the human body to various types of injury, including infection, physical and ischemic trauma, as well as exposure to different toxins. This protective reaction of the body triggers cellular changes in the inflamed tissue, resulting in the repair of the injury and consequent cell proliferation at the site of inflammation [1,2]. However, if the origin of inflammation is maintained, acute inflammation is converted into the pathophysiological chronic inflammation [3]. It is well

БИОГРАФИЈА

Никола Недељковић је рођен 27.02.1995. године у Крагујевцу, где је завршио основну и средњу медицинску школу (фармацеутски техничар) као носилац Вукове дипломе. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Интегрисане академске студије фармације, уписао је 2014. године, где је и дипломирао јула 2019. године као студент генерације. Студије је завршио са просечном оценом 9,81. У периоду од 2015. до 2019. године проглашаван је најуспешнијим студентом у генерацији. Стручни испит за магистра фармације положио је пред стручном комисијом Министарства здравља 24.12.2020. године.

Докторске академске студије уписао је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу 2019. године. Усмени докторски испит положио је 20.07.2021. године са оценом 10 (десет). Дана 12.04.2022. године на седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу усвојен је Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације под називом „Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација“.

Никола Недељковић активно учествује у извођењу практичне наставе као асистент за ужу научну област Фармацеутска хемија. Тренутно је ангажован и као истраживач-сарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја, као и на два Јуниор пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Од школске 2022/2023 је студент специјалистичких студија из Испитивања и контроле лекова на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду.

Никола Недељковић је аутор или коаутор девет научно-истраживачких радова који су објављени у домаћим и међународним часописима, од чега седам радова на SCI листи, као и 26 саопштења на конференцијама од међународног значаја међу којима има одржано једно предавање по позиву.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Nedeljković N**, Nikolić M, Čanović P, Zarić M, Živković Zarić R, Bošković J, Vesović M, Bradić J, Anđić M, Kočović A, Nikolić M, Jakovljević V, Vujić Z, Dobričić V. Synthesis, Characterization, and Investigation of Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Novel Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceutics*. 2024;16(1):1. (doi: 10.3390/pharmaceutics16010001) **(M21)**
2. **Nedeljković N**, Dobričić V, Bošković J, Vesović M, Bradić J, Anđić M, Kočović A, Jeremić N, Novaković J, Jakovljević V, Vujić Z, Nikolić M. Synthesis and Investigation of Anti-Inflammatory Activity of New Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceutics*. 2023;16(5):666. (doi: 10.3390/ph16050666) **(M21)**
3. **Nedeljković N**, Dobričić V, Mijajlović M, Vujić Z, Nikolić M. Molecular docking analysis of novel thiourea derivatives of naproxen with potential antitumor activity. *Experimental and Applied Biomedical Research*. 2023;24(3):235-42. (doi: 10.2478/sjecr-2021-0037) **(M51)**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 12.01.2024 године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Развој нових тиоуреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и
биолошка карактеризација“**

истоветне.

У Крагујевцу, 12.01.2024. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Никола Недељковић**,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Развој нових тиюреидних деривата напроксена: синтеза, физичко-хемијска и биолошка карактеризација“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 12. 01. 2024. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на:
<http://creativecommons.org.rs/>