

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Branka M. Ivković

**DIZAJNIRANJE, SINTEZA I BIOLOŠKA
AKTIVNOST AMINOALKOKSI DERIVATA
FENILPROPIOFENONA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Branka M. Ivković

**DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL
ACTIVITY OF PHENYLPROPIOFENONE
AMINOALCOXY DERIVATIVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTOR:

dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr sc. Ljiljana Gojković-Bukarica,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

dr sc. Katarina Nikolić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Olivera Čudina, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Vladimir Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za Farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu Farmaceutskog fakulteta pod mentorstvom prof. dr Sote Vladimirova. Deo doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za kardiovaskularnu farmakologiju, Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Univerziteta u Beogradu, Medicinskog fakulteta i Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Odsek za eksperimentalna istraživanja u onkologiji.

Zahvaljujem se mentoru ovoga rada, prof. dr Sote Vladimirovu i članovima komisije prof. dr Ljiljani Gojković Bukarica, doc. dr Oliveri Čudini, dr sc. Katarini Nikolić i prof. dr Vladimiru Saviću na pomoći i sugestijama u toku izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i kolegama iz Instituta za farmakologiju, eksperimentalnu farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, kao i kolegama iz Instituta za onkologiju i radiologiju, Odsek za eksperimentalna istraživanja u onkologiji.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim kolegama sa Katedre za Farmaceutsku hemiju koji su mi uvek pružali podršku i bili uz mene.

Sažetak

Dizajniranje, sinteza i biološka aktivnost aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je sinteza šest halkonskih intermedijera kao prekursora za sintezu šest novih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona i flavanona. Aminoalkoksi derivati fenilpropiofenona su strukturni analozi postojećeg antiaritmika Ic grupe, propafenona. U položaje 2 i 4 terminalnog benzenovog prstena uvedeni su supstituenti koji modifikuju hidrofobne i elektronske osobine molekula u cilju povećanja selektivnosti i potentnosti prema određenom tipu jonskog kanala. Sinteza propafenonskih derivata obuhvata pet faza: aldolnu kondenzaciju; katalitičku hidrogenizaciju; formiranje epoksida; aminolizu i građenje hidrohloridnih soli. Ako se alkalni, vodeno-etanolni rastvor trifluorometil halkona podvrgne dejstvu povišene temperature, nastaje flavanon koji hlađenjem kristališe u vidu igličastih kristala. Čistoća i struktura sintetisanih jedinjenja potvrđena je hromatografskim i spektroskopskim metodama, dok je struktura sintetisanog flavanona potvrđena i kristalografski.

Vazorelaksantna aktivnost propafenona i novosintetisanih derivata (1-100 μM) ispitana je na izolovanoj aorti pacova sa i bez endotela, koja je prethodno prekontrahovana rastvorom fenilefrina (10 μM). Svih šest sintetisanih derivata, uključujući i propafenon, pokazali su dozno-zavisni vazorelaksantni efekat za koji je eksperimentalno potvrđeno da nije endotel zavisan. Učehće jonskih kanala u vazorelaksantnom mehanizmu dejstva derivata propafenona ispitano je u prisustvu: lidokaina, antagonistu Na^+ kanala (3 mM), nifedipina, selektivnog antagonistu L-Ca^{2+} kanala (1 μM) i 4-aminopiridina (4-AP), neselektivnog antagonistu K^+ kanala (3 mM). Dobijeni rezultati ukazuju da su jonski kanali uključeni u mehanizam vazorelaksantnog dejstva i da uvedene strukturne modifikacije u molekulu propafenona doprinose postizanju izvesnog stepena selektivnosti. 4-AP antagonizovao je efekat derivata koji u *para* položaju terminalnog benzenovog prstena ima $-\text{CH}_3$ grupu (5PCH3). Srednja efektivna koncentracija za derivat 5PCH3 (pEC_{50} 4,41) tri puta je veća od koncentracije propafenona (pEC_{50} 4,97) i dva puta od koncentracije sledećeg u nizu po kompeticiji, *para* fluoro supstituisanog derivata (5PF). U prisustvu nifedipina, najbolji antagonizam postignut je kod *orto* trifluorometil supstituisanog derivata (5OCF3), što ukazuje na veću selektivnost ovog derivata (pEC_{50} 4,55) u odnosu na propafenon (pEC_{50} 4,90), ali i ostale derivate (pEC_{50} 4,70 - 4,97). Lidokain je antagonizovao efekat 5PF derivata. Srednja efektivna koncentracija 5PF derivata je dva i po puta veća u odnosu na propafenon (pEC_{50} 4,89) i druge derivate (pEC_{50} 4,86-5,19). *Docking* studije koje su sprovedene uz pomoć programa *AutoDock v. 4.0.1* doprinele su razjašnjenju rezultata dobijenih u *in vitro* ispitivanjima antagonističkog dejstva 4-AP-a i nifedipina. *Docking* eksperimenti sa kristalografskom strukturom bakterijskog KcsA kanala su izvedeni pod pretpostavkom da se ispitivana jedinjenja vezuju za istu aminokiselinsku sekvencu pore kanala (*Thr 107, Ala 108 i Ala 111*) kao i 4-AP. Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se, da 5OF derivat čiji vazorelaksantni efekat nije antagonizovan 4-AP-om, pokazuje najveći afinitet za vezivno mesto 4-AP-a u pori kanala. Ako se uporede rezultati dobijeni u *docking* eksperimentima na izdvojenom peptidu L-Ca^{2+} kanala, uočava se da 5OCF3 i 5OCl derivati pokazuju veći afinitet prema vezivnom mestu u poređenju sa ostalim *orto* i *para* supstituisanim derivatima.

Docking eksperimenti na homologom modelu hERG kanala prethodili su *in vivo* eksperimentima. Najveća pažnja tokom eksperimenata bila usmerena ka interakcijama propafenona i derivata sa aminokiselinama *Phe 656* i *Tyr 652* za koje se smatra da su odgovorne za neželjene efekte mnogih lekova. Na osnovu dobijenih rezultata izabrana su tri halogenovana derivata (5OCl, 5OF i 5PF) za *in vivo* ispitivanja.

Primenom akonitinskog testa, u *in vivo* eksperimentima na pacovima u dubokoj anesteziji, ispitivan je antiaritmijski potencijal halogenovanih derivata propafenona. Životinje su podeljene u tri eksperimentalne grupe. Prva grupa (kontrolna grupa) je tretirana akonitinom u

dozi od 60 µg/kg koja dovodi do vidnog poremećaja srčanog ritma u kratkom vremenskom periodu. Kao parametar za registrovanje poremećaja srčanog ritma uzeta je pojava ventrikularne ekstrasistole (VES). Drugu eksperimentalnu grupu činile su životinje na kojima je ispitivana uloga derivata propafenona u prevenciji pojave aritmije indukovane *i.v.* injekcijom akonitina (60 µg/kg), 10 min nakon aplikacije ispitivanog derivata ili propafenona. Proaritmogeni efekat koji je kod propafenona dozno-zavisan registrovan je samo kod 5OF derivata (doza od 6 mg/kg). Doza od 6 mg/kg 5OF derivata odložila je pojavu VES u potpunosti kod 83 % ispitivanih životinja što istom dozom 5PF, 5OCl derivata i propafenona nije postignuto. Propafenon, kao i 5OF derivat, nisu uspjeli da konvertuju poremećen srčani ritam (preživljavanje životinja je 0 %). Prilikom aplikacije 5PF derivata u dozi od 6 mg/kg životinje su preživele, uz povremeno uspostavljanje sinusnog ritma.

Kvantitativan odnos strukture i antiproliferativne aktivnosti sintetisanih jedinjenja analiziran je pomoću 2D i 3D QSAR studija. Bolju korelaciju pokazuju 3D QSAR modeli ($R^2 > 0,9$) koji su dobijeni pomoću programa *Pentacle*. 3D QSAR analiza pokazuje da supstitucija terminalnog benzenovog prstena u *orto* položaju predstavlja preduslov za antiproliferativnu aktivnost propafenonskih derivata.

Antiproliferativna aktivnost derivata propafenona i halkona ispitana je MTT testom na šest humanih malignih ćelijskih linija (HeLa, Fem-X, LS174, K562, PC3 i MCF-7). Ispitivana jedinjenja iz grupe halkona, kao i sintetisani derivati propafenona, pokazuju antiproliferativnu aktivnost na svih šest malignih ćelijskih linija. Veću osetljivost prema ispitivanim jedinjenjima pokazale su HeLa, Fem-X i K562 ćelijske linije ($3,0 \pm 1,5 - 38,2 \pm 3,0 \mu\text{M}$), dok je efekat na preostale tri ćelijske linije slabiji ($9,7 \pm 1,6 - 72,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Najaktivnije i najselektivnije jedinjenje iz grupe propafenonskih derivata je 5OCl (IC_{50} od $3,0 \pm 1,5$ na HeLa do $20,2 \pm 4,3$ na MCF-7 ćelijskoj liniji, IS od 19,63 na HeLa do 2,95 na MCF-7 ćelijskoj liniji). Iz halkonske grupe kao najaktivnije jedinjenje izdvaja se 1OF (IC_{50} od $4,8 \pm 0,6$ na K562 do $21,6 \pm 3,5$ na PC-3 ćelijskoj liniji), ali je selektivnost halkonskih derivata mala (IS od 3,67 na MCF-7 do čak 0,81 na PC-3 ćelijskoj liniji).

Ključne reči: sinteza, halkoni, derivati propafenona, *docking*, 3D QSAR, vazorelaksantna, antiaritmijaska, antiproliferativna aktivnost

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 616.006 : 547.583.1 (043.3)
303.645.063 : 577.338 (043.3)

Abstract

Design, synthesis and biological activity of phenylpropiophenone aminoalcoxy derivatives

Synthesis of six chalcones intermediates as the precursors of six novel phenylpropiophenone aminoalcoxy derivatives was described in this Ph.D. thesis. Phenylpropiophenone aminoalcoxy derivatives are structural analogs of present class I_c antiarrhythmic drug, propafenone. The substituents which modificate hydrophobic and electronic properties of molecule, in order to increase selectivity and potency on certain type of ion channels, are introduced in positions 2 and 4 of terminal benzene ring. The proposed propafenone derivatives were synthesized in five steps: 1) aldol condensation; 2) catalytic hydrogenation; 3) generation of epoxides; 4) aminolysis and 5) reaction with acid to give hydrochloride salts. Heating of alkali ethanol-water solution leads to formation of flavanone that crystallize as needle shaped crystals after cooling. The purity and structure of synthesized compounds were confirmed by chromatographic and spectroscopic methods, while the structure of flavanone was also confirmed by cristallographic methods.

Vasorelaxant potency of propafenone and novel derivatives (1-100 μM) was investigated on isolated rat aorta with or without endothelium, previously precontracted with phenylephrine (10 μM). All six synthesized compounds including propafenone show dose-dependent, endothelium-independent vasorelaxant effect. The role of ion channels in vasorelaxant mechanism of action of propafenone derivatives was tested in presence of: lidocaine, sodium channel blocker (3 mM), nifedipine, selective L-type calcium channel blocker (1 μM) and 4-aminopyridine (4-AP), nonselective potassium channel blocker (3 mM). The results obtained confirm that ion channels are involved in mechanism of vasorelaxant effect and that structural modification of propafenone molecule does affect pharmacological properties in terms of selectivity. The 4-aminopyridine inhibited relaxation induced by 5-para-methyl derivative (5PCH₃). The half-maximal effective concentration for 5PCH₃ (pEC_{50} 4,41) is higher than for propafenone (pEC_{50} 4,97) and next in the series, 5-para-fluoro derivative (5PF). Nifedipine inhibited relaxation of the rat aorta induced by 5-ortho-trifluoromethyl derivative, indicating the better selectivity (pEC_{50} 4,559 with regard to propafenone (pEC_{50} 4,90) and other derivatives (pEC_{50} 4,70-4,97). Lidocaine inhibited relaxation induced by 5PF derivative. The half-maximal effective concentration for 5PF derivative is two and a half times higher in comparison with propafenone (pEC_{50} 4,89) and other derivatives (pEC_{50} 4,86-5,19). Molecular docking (program AutoDock v. 4.0.1) contributed to the explanations of results obtained in *in vitro* studies of blocking effect of 4-AP and nifedipine. Docking studies using crystallographic structure of bacterial KcsA channel are performed assuming that tested compounds bind to the same amino acid sequence in channel pore as 4-AP does (Thr 107, Ala 108 and Ala 111). According to results obtained, 5OF derivative whose vasorelaxant effect is not inhibited by 4-AP, shows the high affinity for binding site of 4-AP in channel pore. Comparing results in docking studies on isolated peptide of L-type calcium channel, it can be concluded that 5OCF₃ and 5OCl derivatives show higher affinity for binding site than other ortho- and para-substituted derivatives.

Homology modelling involving hERG channel were performed before *in vivo* studies. Most attention during experiments has been focused on interaction of propafenone and derivatives with amino acids Phe 656 and Tyr 652, responsible for side effects of various drugs. Three halogenated derivatives (5OCl, 5OF and 5PF) are selected for *in vivo* researching. The antiarrhythmic effect of propafenone halogenated derivatives were investigated on rat in deep anesthesia using test with aconitine. The animals were divided in three experimental groups.

The first group (control group) was treated with aconitine in dose of 60 µg/kg, that leads to heart rhythm disorder in a short time.

The appearance of ventricular extrasystole (VES) as an important parameter in heart rhythm disorder. The second experimental group consisted of animals used to investigate the role of propafenone derivatives in arrhythmia prevention induced by i.v. injection of aconitine (60 µg/kg) 10 minutes after administration of tested derivative or propafenone. The blood pressure, EKG record and frequency heart rate were monitored in the time before aconitine administration, while the appearance of VES was monitored after aconitine administration. Pro-arrhythmogenic dose-dependent effect of propafenone was registered only with 5OF derivatives (dose of 6 mg/kg). This dose delayed the appearance of VES completely in 83 % of experimental animals, while the same dose of 5PF, 5OCl and propafenone did not have this effect. The third experimental group consisted of animals that received i.v. bolus injection of aconitine (60 µg/kg) as well as tested dose (4 or 6 mg/kg) of both fluorinated derivatives and propafenone 10 sec. after the appearance of VES. Propafenone and 5OF derivative did not convert abnormal heart rhythm (survival of experimental animals 0 %). Animals survived with occasional return of sinus rhythm when 5PF was administered in dose of 6 mg/kg.

Antiproliferative activity of propafenone derivatives and halkones was tested on six human cancer cell lines (HeLa, Fem-X, LS174, K562, PC3 and MCF-7). Selectivity of tested compounds were examined on mononuclear peripheral blood cells of healthy individuals. The tested compounds from the group of halkones, as well as synthesized propafenone derivatives showed antiproliferative activity in all six cancer cell lines. HeLa, Fem-X and K562 cell lines showed better selectivity to tested compounds ($3,0 \pm 1,5$ – $38,2 \pm 3,0$ µM), while the effect to remaining cell lines was lower ($9,7 \pm 1,6$ – $72,2 \pm 0,2$ µM). The most potent and selective compound from the group of propafenone derivatives was 5OCl (IC_{50} from $3,0 \pm 1,5$ in HeLa to $20,2 \pm 4,3$ in MCF-7 cell line, IS from 19,63 in HeLa to 2,95 in MCF-7 cell line). The most potent compound from halkones class was 1OF (IC_{50} from $4,8 \pm 0,6$ in K562 to $21,6 \pm 3,5$ in PC-3 cell line), but the selectivity of those compound was very low (IS from 3,67 in MCF-7 to 0,81 in PC-3 cell line). Quantitative structure-antiproliferative activity analysis of synthesized compounds was performed using 2D- and 3D-QSAR studies. 3D-QSAR model obtained (Pentacle program) showed better correlation ($R^2 > 0,9$). 3D-QSAR analysis shows that substitution in the benzyl moiety on the ortho position is a prerequisite for antiproliferative activity of propafenone derivatives and in order to increase efficiency, further structural modification should be directed to basic center. Modification of central benzene ring with existing modification of terminal benzene ring will lead to better antiproliferative activity of halkones derivatives.

Key words: synthesis, halkones, propafenone derivatives, docking, 3D-QSAR studies, vasorelaxant activity, antiarrhythmic activity

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDK number: 616.006 : 547.583.1 (043.3)

303.645.063 : 577.338 (043.3)

LISTA SKRAĆENICA

0D-nulti deskriptori

1,4-DHP-1,4-dihidropiridin

1CF3-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-(trifluorometil) fenil) prop-2-en-1-on

1D-jednodimenzionalni deskriptori

1OCH₃-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-metilfenil) prop-2-en-1-on

1OCl-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-hlorofenil) prop-2-en-1-on

1OF-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-fluorofenil) prop-2-en-1-on

1PCH₃-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-metilfenil) prop-2-en-1-on

1PF-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-fluorofenil) prop-2-en-1-on

2D-dvodimenzionalni deskriptori

3D-trodimenzionalni deskriptori

4-AP-4-aminopiridin

5CF₃-3-(2-trifluorometilfenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on

5OCH₃-3-(2-metilfenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on hidrohlorid

5OCl-3-(2-hlorofenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on hidrohlorid

5OF-3-(2-fluorofenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on hidrohlorid

5PCH₃-3-(4-metilfenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on hidrohlorid

5PF-3-(4-fluorofenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on hidrohlorid

Ach-acetil holing

Ala, A-alanin

AP-akcioni potencijal

Arg, R-arginin

ARP-asolutni refraktarni period

Asn, N-asparagin

Asp, D-aspartanska kiselina

ATP – adenzin-trifisfat

ATR-FTIR – refleksiona infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom

AV-atrioventrikularni čvor

B3LYP – *Becke's three-parameter hybrid functional*

BK_{Ca} - kalcijum-zavisni kalijumski kanali sa velikom provodljivošću

BTZ-benzotiazepin
CA-analiza klastera
CADD-kompijuterske metode u racionalnom dizajniranju lekova
cAMP-ciklični adenzin-monofosfat
CAST-Cardiac Arrhythmia Suppression Trial
Ca_v-voltažno-zavisni kalcijumski kanali
CEA-karcinoembrionalnog antigena
CNS-centralni nervni system
CoMFA-komparativna molekulska analiza polja
COMT-katehol O-metil transferaza
COSMO – *conductor-like screening model*
CSD-Cambridge Structural Database
Cys, C-cistein
DAG-diacetlglicerol
DEKA-aminokiselinska sekvenca aspartan-glutamin-lizin-arginin
DFT – *Density Functional Theory*
DMSO-dimetilsulfoksid
EC₅₀ – srednja efektivna koncentracija
EEEE-aminokiselinska sekvenca glutamat-glutaminska kiselina-glutaminska
EKG-elektrokardiogram
ERP-efektivni refraktarni period
Ev-vezivna energija leka za ciljno mesto
FAA-fenilalkilamin
FBS-serum fetusa govečeta
FCF3-2-[2-(trifluorometil)fenil]-2H-1-benzopiran-4(3H)-on
FE-fenilefrin
Fem-X- Čelije humanog melanoma
GA- genetski algoritam
Gln, Q-glutamin
Glu, E-glutaminska kiselina,
Gly, G-glicin
GVIA-omega konotoksin
GYG-aminokiselinska sekvenca glicin-tirozin-glicin

HeLa- Ćelije humanog fatalnog adenokarcinoma grlića materice

hERG- human Ether-à-go-go-Related Gene

hidrohlorid

His, H-histidin

HITS –metoda visoko-propusnog skrininga, *high-throughput screening*

HOMO- energija najviše popunjene molekulske orbitale

HVA- visokim naponom aktivirani kalcijumski kanali

HVA-visokim naponom aktivirani kalcijumski kanali

IC₅₀ –srednja inhibitorna koncentracija

IK_{Ca}- kalcijum-zavisni kalijumski kanali sa intermedijernom provodljivošću

Ile, I-izoleucin

IP3-inozitol-trifosfat

K562- Ćelije humane eritroleukemije

K_{ATP}-adenozin-trifosfat-zavisni kalijumski kanali

K_{Ca}-kalcijum-zavisni kalijumski kanali

KCNQ-kasno ispaljivački kalijumski kanali

KcsA-K⁺ kanal izolovan iz bakterije *Streptomyces lividans*

Ki-konstanta vezivanja leka za ciljni makromolekul

Kir-ulazno-ispaljivački kalijumski kanali

kiselina-glutaminska kiselina-glutaminska kiselina

KVS-kardiovaskularni system

Kv-voltažno-zavisni kalijumski kanali

L-Ca²⁺-voltažno-zavisni kalijumski kanali aktivirani visokim naponom

LC-MS – kuplovana tečna hromatografija sa masenom spektroskopijom

Leu, L-leucin

LOO- metoda unakrsne validacije

LS174- Ćelije adenokarcinoma kolona

LUMO-energija najniže nepopunjene molekulske orbitale

LVA-niskim naponom aktivirani kalcijumski kanali

LVA-niskim naponom aktivirani kalcijumski kanali

Lys, K-lizin

MCF-7- Ćelije humanog estrogen zavisnog karcinoma dojke

MC-Monte Carlo metoda

MD-metode molekulske dinamike
Met, M-metionin
MLCK-kinaza lakog lanca miozina
MLC-laki lanac miozina
MLR-multilinearna regresiona analiza
MM-molekulsko-mehanička metoda
MP-membranski potencijal
MPM-membranski potencijal mirovanja
MS-TOF – masena spektroskopija preciznih masa
MTT-3-(4,5-dimetil-(tiazol-2-il))-2,5-difenil) tetrazolijum-bromid
NaChBac-bakterijski voltažno-zavisni natrijumski kanal
Na_v-voltažno-zavisni natrijumski kanali
NLM-nelinearno mapiranje
NMR – nuklearna magnetna rezonanca
NO – azotmonoksid
p EC₅₀ – negativan dekadni logaritam srednje efektivne koncentracije
PC3- Čelije humanog karcinoma prostate
PCA- analiza glavnih komponenti
PDB-Protein Data Bank
PHA-hemaglutinin
Phe, F-fenilalanin
PLS- metoda parcijalnih najmanjih kvadrata
PLS metode parcijalnih najmanjih kvadrata
PRESS-suma kvadrata predviđenih koeficijenta korelacije
Pro, P-prolin
PVT-perzistentna ventrikularna tahikardija
QSAR – kvantitativni odnos strukture i aktivnosti
QSPR- kvantitativni odnos strukture i osobine
R-otpor
RRP-relativni refraktarni period
S.D. – standardna greška
S.E.M.-srednja greška
SAR-odnos strukture i dejstva

SA-sinoatrijalni čvor

SDS-natrijum-dodecilsulfat

Ser, S-serin

SK_{ca}-kalcijum-zavisni kalijumski kanali sa malom provodljivošću

SNP-supernormalni period

SSTo-ukupna suma kvadrata

SVM- algoritam potpornih vektora

SVT-supraventrikularna tahikardija

Thr, T-treonin

TNF- α – *tumor necrosis factor alpha*

Trp, W-triptofan

TTX-tetradotoksin

Tyr, Y-tirozin

Val, V-valin

VIP-*Variable Importance in the Project*

V-membranski potencijal

VT-ventrikularna tahikardija

WPW

X-Ray-difrakcija X zracima

ΔV -ravnotežni potencijal

SADRŽAJ

	Uvod	1
1.	OPŠTI DEO	4
1.1.	Racionalno dizajniranje lekova	5
1.1.1.	Struktura liganda	5
1.1.2.	Farmakofore. Mapiranje farmakofora	6
1.1.3.	Odnos strukture i dejstva (structure activity relationships) SAR studije	6
1.1.4.	Kvantitativni odnos stukture i dejstva (QSAR) i trodimenzionalni QSAR (3D-QSAR)	7
1.1.5.	Teorijske metode proračunavanja fizičko-hemijskih parametara	10
1.1.6.	Molekulsko modeliranje ciljnog makromolekula	11
1.1.7.	Molekulski docking	12
1.2.	Modulacija aktivnosti jonskih kanala	14
1.3	Jonski kanali, građa i funkcija	15
1.3.1.	Kalijumski kanali (K+kanal)	19
1.3.2.	Selektivnost i provodljivost	28
1.3.3.	Natrijumski kanali(Na+ kanali)	32
1.3.4.	Kalcijumski kanali	36
1.4.	Srčane aritmije, elektrofiziologija, dijagnostika, lečenje	44
1.4.1.	Anatomska građa srca	44
1.4.2.	Elektrofiziološke karakteristike srca	46
1.4.3.	Mehanizmi nastajanja srčanih aritmija	52
1.4.4.	Dijagnostika srčanih aritmija	55
1.4.5.	Klasifikacija srčanih aritmija	57
1.4.6.	Principi lečenja srčanih aritmija	58
1.5.	SAR i QSAR studije propafenona	62
2.	CILJ RADA	69
3.	SINTEZA AMINOALKOKSI DERIVATA FENILPROPIOFENONA I NJIHOVIH INTERMEDIJERA	72
3.1.	Eksperimentalni deo	73
3.1.1.	Oprema i Uređaji	73
3.1.2.	Hemikalije	73
3.1.3.	Kompjuterski programi	75
3.1.4.	Metode izračunavanja molekulskih deskriptora	75

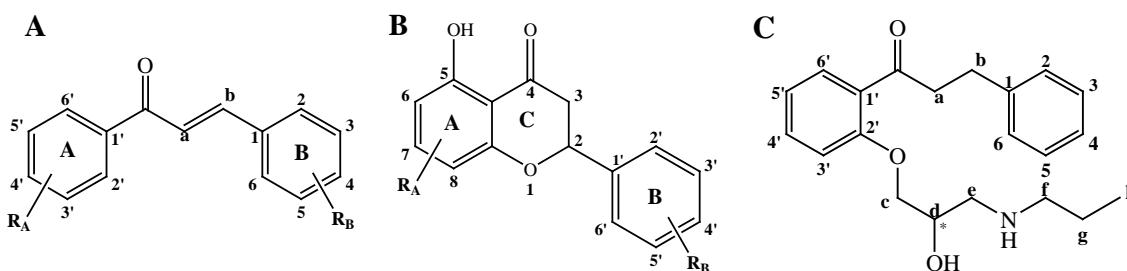
3.1.5.	Postupci sinteze	75
3.1.6.	Strukturalna analiza sintetisanih supstanci	82
3.2.	Rezultati	83
3.2.1.	Hemijske strukture novosintetisanih fenilpropiofenonskih derivata i njihovih intermedijera	83
3.2.2.	Određivanje lipofilnosti ispitivanih jedinjenja i izračunavanje parametara koji definišu hidrofobne, sterne i elektronske efekte supstituenata primenom računarskih programa	84
3.2.3.	Strukturalna analiza sintetisanih jedinjenja	85
3.2.4.	Spektroskopska i kristalografska analiza novosintetisanog flavanona	91
3.2.5.	MS-MS analiza propafenona i novosintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona i halkona 1CF3	94
4.	IN VITRO ISPITIVANJE VAZORELAKSANTE AKTIVNOSTI SINTETISANIH DERIVATA PROPAFENONA	96
4.1.	Eksperimentalni deo	97
4.1.1.	Oprema	97
4.1.2.	Hemikalije	97
4.1.3.	Materijal	97
4.1.4.	Računarski programi	98
4.1.5.	Statistička obrada rezultata	98
4.1.6.	Priprema rastvora	98
4.1.7.	Izolovanje i priprema preparata	101
4.1.8.	Ispitivanje uticaja rastvarača na tonus izolovane aorte pacova	102
4.1.9.	Ispitivanje prisustva funkcionalnog endotela	103
4.1.10.	Ispitivanje vazorelaksantnog efekta propafenona i novosintetisanih derivata na segmentima izolovane aorte pacova	103
4.1.11.	Ispitivanje uloge pojedinih tipova jonskih kanala u vazorelaksantnom dejstvu propafenona i sintetisanih derivata	105
4.1.12.	Priprema ispitivanih jedinjenja za docking simulaciju kanal ligand interakcija	106
4.1.13.	Modelovanje KcsA kanala	106
4.1.14.	Modelovanje L-Ca ²⁺ kanala	106
4.1.15.	.Docking simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), propafenona, 4-AP i amjodaroma sa KcsA kanalom	106
4.1.15.	.Docking simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), propafenona i nifedipina sa peptidom kompleksa koji povezuje β i α subjedinice u L-Ca ²⁺ kanalu	107
4.2.	Rezultati	108
4.2.1.	Ispitivanje vazorelaksantnog efekta sintetisanih derivata propafenona i propafenona na izolovanoj aorti pacova sa i bez endotela	108
4.2.2.	Uticaj blokatora K ⁺ kanala (4-AP) na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata	110
4.2.3.	Uticaj blokatora Na ⁺ kanala (lidokain) na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata	110

4.2.4.	Uticaj blokatora Ca ²⁺ kanala (nifedipina) na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata	112
4.2.5.	Priprema ispitivanih jedinjenja za docking simulaciju kanal-ligand interakcija	112
4.2.6.	<i>Docking</i> simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), propafenona, 4AP i amjodaroma sa KcsA kanalom	114
4.2.7.	<i>Docking</i> simulacija interakcija novosintetisanih jedinjenja (5a-5f), propafenona i nifedipina sa sa peptidom kompleksa koji povezuje β i α_1 subjedinice u L-Ca ²⁺ kanalu	119
5.	<i>IN VIVO</i> ISPITIVANJE ANTIARITMIJSKE AKTIVNOSTI SINTETISANIH DERIVATA PROPAFENONA	122
5.1.	Eksperimentalni deo	123
5.1.1.	Hemikalije	123
5.1.2.	Eksperimentalne životinje	123
5.1.3.	Oprema	123
5.1.4.	Kompijuterski programi	124
5.1.5.	Priprema rastvora	124
5.1.6.	Izgradnja homologih modela hERG kanala	126
5.1.7.	<i>Docking</i> simulacija interakcija sintetisanih derivata sa homologim modelom hERG kanala	127
5.1.8.	Eksperimentalni <i>in vivo</i> akonitinski model srčane aritmije kod pacova	127
5.2.	Rezultati	133
5.2.1.	<i>Docking</i> simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), sa homologim modelom hERG kanala	133
5.2.2.	Eksperimentalni <i>in vivo</i> akonitinski model srčane aritmije kod pacovima	135
6.	ISPITIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI DERIVATA PROPAFENONA I INTERMEDIJERA	139
6.1.	Eksperimentalni deo	140
6.1.1.	Oprema	140
6.1.2.	Materijal	140
6.1.3.	Hemikalije	140
6.1.4.	Ćelijske linije	141
6.1.5.	Računarski programi	142
6.1.6.	Priprema rastvora	142
6.1.7.	Hranljivi medijum	143
6.1.8.	Priprema ćelijskih linija	143
6.1.9.	Uslova gajenja ćelijskih linija	145
6.1.10.	Ispitivanje uticaja fenilpropiofenonskih ferivata na preživljavanje malignih ćelija	145
6.1.11.	Ispitivanje uticaja fenilpropiofenonskih ferivata na preživljavanje PBMC ćelija sa i bez hemaglutinina	147
6.1.12.	MTT test	147
6.1.13.	Računarske metode	148

6.2.	Rezultati	152
6.2.1.	Ispitivanje uticaja fenilpropiofenonskih ferivata na preživljavanje malignih ćelija i PBMC ćelija sa i bez hemaglutinina	152
6.2.2.	QSAR studije antitumorskog dejstva ispitivanih jedinjenja (1a-1f i 5a-5f)	155
7.	DISKUSIJA	168
8.	ZAKLJUČAK	200
9.	LITERATURA	204
10.	PRILOZI	223

UVOD

Fenilpropiofenonska struktura je osnova velikog broja prirodnih i sintetskih farmakološki aktivnih jedinjenja različitog farmakodinamskog i farmakokinetičkog profila¹⁻³. Među prirodnim proizvodima biljnog porekla, kao jedna od najznačajnijih podgrupa izdvajaju se α , β -nezasićeni ketoni, halkoni, derivati 1,3-diaril-2-propen-1-ona (Sl.1A). Halkoni predstavljaju intermedijere u sintezi flavonoida i flavanona (Sl.1B). U novije vreme dobijaju se polusintetski ili totalnom sintezom¹.



Slika 1. A. Opšta strukturna formula halkona, B. Opšta strukturna formula flavanona i C. Strukturna formula propafenona

Halkoni imaju širok spektar bioloških aktivnosti: antiinflamatornu^{1,4}, antibakterijsku^{1,5}, fungicidnu^{1,6}, antiproliferativnu^{1,7-8}, tuberkulostatsku^{1,9} i druge, ali i nisku selektivnost koja ograničava kliničku primenu ovih jedinjenja^{1,10}.

Polifenolska jedinjenja iz grupe flavanona najznačajniju biološku aktivnost ispoljavaju u kardiovaskularnom sistemu: utiču na mikrovaskulanu cirkulaciju, snižavaju sadržaj lipida u krvi, pokazuju antiaterogenu i antihipertenzivnu aktivnost i smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti¹¹. Flavanoni deluju i na endokrini pankreas povećavajući osetljivost receptora na insulin¹¹. Za razliku od halkona, ova grupa jedinjenja nalaze veću primenu kao dodatak u terapiji kardiovaskularnih oboljenja¹¹⁻¹².

Osamdesetih godina prošlog veka sintetisan je fenilpropiofenonski derivat, 2-[2'-hidroksi-3-(propilamino)propoksi]-3-fenilpropiofenon čiji je INN naziv propafenon (Sl.1C)¹³. U terapijskim dozama propafenon blokira natrijumske kanale kao i druga jedinjenja I grupe antiaritmika, ali dejstvo propafenona traje duže, što je odlika Ic podgrupe antiaritmika. U istom opsegu koncentracija, propafenon blokira i kalijumske kanale u srcu, dok posle primene većih doza deluje i na spore kalcijumove kanale. Zbog sličnosti u hemijskoj strukturi, propafenon pokazuje i slabiju beta-blokatorsku aktivnost, koja udružena sa blagom antiholinergičkom aktivnošću deprimira automatizam SA

čvora i produžava PR-interval, QRS-kompleks i refraktarni period u pretkomorama, komorama, AV čvoru i akscesornim putevima. Nakon resorpcije, propafenon se metaboliše u jetri pod dejstvom CYP450D6. Metabolit propafenona, 5-hidroksipropafenon, je podjednako efikasan u smislu blokade natrijumskih kanala, ali je znatno slabiji blokator β -receptora¹⁴. Kao antiaritmik, propafenon se u početku koristio u lečenju ventrikularnih aritmija (ventrikularne ekstrasistole, nepostojane i postojane ventrikularne tahikardije). U to vreme malo se znalo o molekulskoj građi jonskih kanala, posebno o I_{kr} kalijumskoj struji u srcu i hERG kanalu koji posreduje u njenom prenošenju. I_{kr} struja se smatra jednim od činilaca odgovornih za proaritmogeno dejstvo antiaritmika koje se kod I grupe manifestuje kontinuiranim ventrikularnim tahikardijama i širokim QRS-kompleksom. Navedeni rezultati CAST (*Cardiac Arrhythmia Suppression Trial*) studije doprineli su da se upotreba antiaritmika I klase u kliničkoj praksi smanji, a neki od njih i povuku iz upotrebe¹⁵. Otvorio se širi prostor za amjodaron, antiaritmik III grupe, koji se afirmiše kao pouzdan lek u terapiji aritmija. Nedostaci amjodarona su: sporo razvijanje efekta (spora i nepotpuna resorpcija), pojava plućnih infiltrata, veliki broj opisanih interakcija koje stvaraju predispoziciju za *torsade de pointes* i sl. Naprasnu srčanu smrt kao posledicu ventrikularne tahikardije ili fibrilacije amjodarom smanjuje, ali ne u očekivanom procentu¹⁷. U kliničkim studijama WPW (*Wolff-Parkinson-White*) sindroma se pokazalo da amjodarom može biti samo alternativni lek antiaritmicima Ic grupe. Navedene činjenice išle su u prilog *povratka* propafenona u kliničku praksu.

Danas se propafenon smatra relativno bezbednim lekom za supresiju supraventrikularnih aritmija, uključujući WPW sindrom i recidive atrijske fibrilacije. Jedni ga preporučuju samo kod bolesnika sa paroksizmalnom supraventrikularnom tahikardijom kod kojih nema strukturnih oštećenja srca, a drugi ga svrstavaju u lek izbora (*tableta u džepu*) kod bolesnika sa kratkotrajnom atrijskom fibrilacijom¹⁷. Pored modulacije jonskih kanala, propafenon modulira i aktivnost P-glikoproteina. Devedesetih godina prošlog veka postaje model molekula u studije razvoja rezistencija na lekove (*multidrug-resistant study*)¹⁸. Chiba i Ecker sa saradnicima su tokom višegodišnjih istraživanja izvršili sintezu i karakterizaciju, SAR i QSAR analizu oko 250 derivata propafenona sa strukturnim modifikacijama u aminskom i oksifenonskom

delu molekula (Sl.1C). Sintetisani analozi su potencijalni antikancerski i antimalarijski lekovi².

Mali je broj literaturnih podataka koji govore o interakciji do sada sintetisanih derivata propafenona sa jonskim kanalima¹⁹⁻²⁰ i njihovoj potencijalnoj antiaritmijskoj aktivnosti²¹⁻²². Novija istraživanja koja su bazirana na *in silico* metodama pokazuju da u modulaciji aktivnosti jonskih kanala, pored polarnih interakcija, ključno mesto zauzimaju i hidrofobne π - π i π -katjon interakcije. Može se pretpostaviti da bi modifikacija terminalnog benzilnog ostatka molekula propafenona (Sl.1C) mogla uticati na njegovu modulatornu aktivnost prema jonskim kanalima i drugim regulatornim proteinima u organizmu (enzimi, enzimski transporteri).

1. OPŠTI DEO

1.1. Racionalno dizajniranje lekova

Primarni cilj medicinske hemije je dizajniranje, sinteza i ispitivanje biološke aktivnosti novih lekovitih supstanci. Poslednje dve decenije prošlog veka obeležio je veliki napredak u molekularnoj biologiji²⁴⁻²⁷, eksperimentalnoj i teorijskoj hemiji, kao i kompjuterskoj tehnologiji, što je omogućilo brz razvoj medicinske hemije.

U racionalnom dizajniranju lekova koriste se dva pristupa:

- 1) pristup baziran na strukturi liganda (*ligand-based drug design*) koji obuhvata nekoliko metoda: studije kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (*Quantitative Structure-activity relationships, QSAR*), 3D-QSAR i mapiranje farmakofora;
- 2) pristup baziran na strukturi ciljnog makromolekula (*structure/target-based drug design*) koji podrazumeva poznavanje i definisanje strukture ciljnog makromolekula (konformaciona analiza, molekulska modeliranje ciljnog molekula kao i *docking* studije).

Osnovni cilj racionalnog dizajniranja i ispitivanja lekovitih supstanci je uspostavljanje korelacije između molekulskih parametara koji se izračunavaju na osnovu hemijske strukture i fizičko-hemijskih osobina molekula sa jedne strane i njihove biološke i farmakološke uloge u organizmu sa druge strane. Nakon toga je moguće predložiti strukturne promene molekula koje bi dovele do poboljšanja farmakodinamskih i farmakokinetičkih osobina molekula u tretmanu specifičnog oboljenja²⁸. Upotreba kompjuterskih metoda u racionalnom dizajniranju lekova (*Computer-Aided Drug Design, (CADD)*) pruža mogućnost efikasnijeg i ekonomičnijeg otkrivanja novih lekova kao i mogućnost optimizacije njihovih osobina²⁷.

1.1.1. Struktura liganda

Jedinjenja na kojima se bazira razvoj novih lekova poznata su kao osnovna jedinjenja (*lead compounds*), dok su sintetisana jedinjenja razvijena iz osnovnih poznata kao odgovarajući *analoz*.

Lead molekul je jedinjenje koje pokazuje odgovarajuću biološku aktivnost, ali zahteva dalju modifikaciju strukture u cilju optimizacije aktivnosti, selektivnosti, fizičko-hemijskih osobina i drugih parametara²⁹. *Lead* molekuli se često nalaze među

jedinjenjima prirodnog porekla ili njihovim sekundarnim metabolitima, u *kolekciji* jedinjenja koja su komercijalno dostupna i vlasništvo su različitih farmaceutskih kompanija. Izbor *lead* molekula može se izvršiti i metodama visoko-propusnog (*High-Throughput Screening -HITS*) ili virtualnog skrininga (*virtual screening*), kao i tokom metaboličkih i kliničkih studija³⁰.

1.1.2. Farmakofore. Mapiranje farmakofora

Termin *farmakofora* predstavlja skup strukturnih karakteristika sa definisanim relativnim rasporedom u prostoru koje jedno jedinjenje mora da poseduje kao uslov za ostvarivanje određene biološke aktivnosti. Proces kojim se definiše farmakofora poznat je pod nazivom **mapiranje farmakofore**³¹. Mapiranju farmakofora često prethodi analiza odnosa strukture i dejstva (*structure activity relationships, SAR*).

1.1.3. Odnos strukture i dejstva (*structure activity relationships*) SAR studije

Analizom odnosa strukture i dejstva (SAR studijama) se definišu funkcionalne grupe ili delovi strukture značajni za aktivnost. Potom sledi sinteza odgovarajućeg broja jedinjenja, sa ciljanim strukturnim razlikama u poređenju sa osnovnim jedinjenjem. Sintetisana jedinjenja se potom testiraju na biološku aktivnost i dobijeni rezultati poredi sa rezultatima dobijenim testiranjem osnovnog molekula pod istim uslovima.

Hemijske transformacije koje se najčešće izvode u SAR studijama su: varijacije supstituenata, ekstenzija strukture, varijacije prstena, uvođenje izosternih grupa, pojednostavljenje strukture i rigidifikacija strukture²⁹.

Funkcionalne grupe koje podležu modifikaciji u SAR studijama su grupe preko kojih ligand najčešće ostvaruje interakcije sa ciljnim makromolekulom: alkoholna, fenolska, amino, amidska, keto, etarska, estarska grupa, dvostruka veza. Varijacija supstituenta podrazumeva varijaciju alkil i/ili aril grupa u cilju proučavanja i optimizacije hidrofobnih i stereoselektivnih osobina molekula. Proširivanje strukture može se izvesti uvođenjem dodatnih funkcionalnih grupa koje mogu ostvariti dodatne interakcije (npr. sa porom jonskog kanala, receptorom u ćeliji ili u/na ćelijskoj membrani). Ponekad ove dodatne interakcije vode ka dobijanju jedinjenja sa suprotnim efektom na ciljnom mestu. Da bi se dokazala funkcija odgovarajuće grupe u ostvarivanju interakcija, vrši se izosterna zamena postojećih atoma ili atomskih grupa

atomima ili grupama sa istom valencom ili istim brojem elektrona u spoljašnjem valentnom nivou. Struktura aktivnog jedinjenja se može uprostiti uklaňanjem tzv. *nevažnih* funkcionalnih grupa u čemu poznavanje odnosa struktura /aktivnost olakšava proces. U cilju postizanja veće selektivnosti obično se vrši rigidifikacija strukture čime se smanjuje broj mogućih konformacija koje molekul može da zauzme u prostoru tj. u/na mestu dejstva.

1.1.4. Kvantitativni odnos strukture i dejstva (QSAR) i trodimenzionalni QSAR (3D-QSAR)

Poznato je da od strukture molekula zavise fizičke osobine, hemijska reaktivnost i biološka aktivnost jedinjenja, kao i da se slična jedinjenja slično ponašaju. Na osnovu molekulske strukture uz pomoć molekulskih deskriptora i odgovarajućih matematičkih modela moguće je predvideti određene osobine molekula.

Molekulski deskriptori su parametri koji predstavljaju numeričke vrednosti odgovarajućih karakteristika hemijskih jedinjenja. Prema definiciji, **molekulski deskriptori** su konačni rezultat logičkog i matematičkog postupka koji pretvara hemijsku informaciju sadržanu u simboličkom predstavljanju molekula u numeričku vrednost ili su rezultat nekog standardizovanog eksperimenta. Jednostavnije rečeno, molekulski deskriptori su vrednosti kojima se mogu prikazati karakteristike odabranog molekula u celini ili dela molekula. Do numeričke vrednosti molekuskog deskriptora se može doći računski (primenom nekog matematičkog algoritma) ili eksperimentalnim putem³².

Pored toga što omogućavaju uvid u određenu fizičko-hemijsku osobinu, deskriptori mogu da se koriste za predviđanje, odnosno procenu određene karakteristike molekula³²⁻³³. Molekulski deskriptori se razlikuju po složenosti informacija koje u sebi nose, pa samim tim i po vremenu koje je potrebno za njihovo izračunavanje³²⁻³³. U zavisnosti od načina na koji se izračunavaju, deskriptori se mogu podeliti na:

- **nulte, najjednostavnije deskriptore (OD)** - dobijaju se iz molekulske formule i nezavisni su od molekulske strukture;
- **jednodimenzionalne deskriptore (1D)** – kvantifikuju osobine molekula u celini (npr. molekulska masa);

- **dvodimenzionalne deskriptore (2D)** – karakterišu dvodimenzionalnu strukturu koja se odnosi na veličinu, fleksibilnost/rigidnost ili hidrofilitnost/lipofilitnost (fragmentacioni doprinosi, topološki indeks i sl.);
- **trodimenzionalni deskriptori (3D)** – zavisni od konformacije molekula i rasporeda atoma u trodimenzionalnom prostoru (površinske osobine molekula, *van der Waalsove* zapremine, energije interakcije i dr.)³²⁻³⁴.

Druga podela deskriptora zasniva se na prirodi osobine koju deskriptori opisuju: lipofilitnost, sposobnost građenja vodoničnih veza, elektronske osobine molekula (naelektrisanje, polarizabilnost, dipolni moment, različite vrste energije), sterne karakteristike, topološke osobine molekula (atomske veze u molekulu, veličina, simetrija, račvanje, oblik molekula).

Prema trećoj podeli deskriptori mogu biti: empirijski, kvantno-mehanički, matematički, topološke (2D), geometrijske (3D).

Poseban je problem izabrati skup deskriptora za QSAR analizu³⁴. Većina deskriptora je po prirodi korelisana jer različiti deskriptori daju istu informaciju (redundantnu informaciju, informaciju koja se ponavlja): npr. molekululska masa, površina molekula i molarna refraktivnost uglavnom su visoko korelisane pa je u tom slučaju opravdano u QSAR model uvrstiti samo jednu od njih. Korelacija, pa čak i slučajna, je verovatnija kada je broj deskriptora veći³⁵. Skup nekorelisanih deskriptora je poželjan, jer daje robustne modele koje je lako interpretirati.

Matematički model koji povezuje hemijsku strukturu i aktivnost skraćeno se obeležava sa **QSAR** (*Quantitative Structure Activity Relationships*)^{32,34}, a model koji povezuje hemijsku strukturu i osobine sa **QSPR** (*Quantitative Structure Property Relationship*)³⁶.

U osnovi svakog matematičkog modela koji povezuje karakteristike molekula sa molekulskim deskriptorima je empirijska matematička funkcija **f**:

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad (1)$$

u kojoj **y** predstavlja zavisno promenljivu (biološka aktivnost), dok je **x** nezavisno promenljiva (molekulski deskriptori) kojih može biti više. Biološka aktivnost je obično izražena kao **c** (koncentracija leka u organizmu), **Ki** (konsanta vezivanja leka za ciljani makromolekul), **IC₅₀** (koncentracija pri kojoj se ispoljava 50 % maksimalnog

inhibitornog dejstva leka) ili kao **ED₅₀** (doza koja proizvodi 50 % maksimalnog efekta leka).

QSAR analiza objedinjuje širok skup statističkih metoda među kojima su: multilinearna regresiona analiza (*multiple linear regression* (**MLR**)), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (*partial least squares regresion* (**PLS**)), neuronske mreže (*neural networks* (**NN**)), algoritam potpornih vektora (*support vector machine* (**SVM**)), genetski algoritmi (*genetic algorithms* (**GA**)), analiza glavnih komponenta (*principal component analysis* (**PCA**)), nelinearno mapiranje (*non-linear mapping* (**NLM**)) i analiza klastera (*cluster analysis* (**CA**)).

Tipična QSAR jednačina ima sledeći oblik:

$$\log Y = a_0 + a_1 x_1^{n_1} + \dots + a_i x_i^{n_i} + \dots + a_n x_n^{n_n} \quad (2)$$

gde eksponent može biti 1 ili 2 (linearna ili kvadratna zavisnost od datog parametra x). Koeficijenti a_n se računaju regresionom analizom i proveravaju statističkom analizom, da bi se dobila krajnja jednačina koja dobro opisuje specifičnu aktivnost molekula i njenu varijaciju sa promenom parametara.

Kvalitet konstruisanih QSAR modela ocenjuje se na osnovu statističkih parametara : koeficijenta determinacije (**R²**), srednje kvadratne greške (*root mean square error*, **RMSE**), Fisherovog odnosa varijansi (**F-vrednost**), unakrsno validacijskog koeficijenta korelacije (**Q²**), nivoa statističke značajnosti, verovatnoće (**p-vrednost**).

Klasični QSAR pristup većinom se oslanja na *Hansch-ov* metod (upotreba empirijskih deskriptora povezanih sa fizičko-hemijskim osobinama molekula)³⁷ ili *Free-Wilson-ov* metod³⁸. Brz napredak računarske tehnike i odgovarajućih softverskih paketa doprineo je da se klasični QSAR pristup danas sve više zamenjuje 3D QSAR analizom, a u novije vreme i tzv. četvorodimenzionalnom i šestodimenzionalnom QSAR metodologijom (4D QSAR i 6D QSAR)³⁹.

1.1.4.1. 3D QSAR

Deskriptori koji se odnose na trodimenzionalne strukture liganada i receptora se izučavaju u okviru posebnih QSAR metoda koje se nazivaju trodimenzionalni QSAR. 3D QSAR se zasniva na tvrdnjama da biološku aktivnost molekula određuju njegova

veličina, oblik, fleksibilnost i raspodela naelektrisanja. To su parametri koji se na osnovu trodimenzionalne strukture molekula kompjuterski mogu kvantifikovati. Važna područja biološki aktivnih molekula (npr. područja hidrofobnosti, hidrofilnosti, donora i akceptora vodoničnih veza) na poseban se način mapiraju u 3D obliku. Tako se dobija trodimenzionalni uzorak funkcionalno značajnih područja za lekove.

Najzastupljenija metoda korišćena u 3D-QSAR-u je komparativna molekulska analiza polja (CoMFA). Ova metoda kao deskriptore koristi sterna (interakcije prouzrokovane *van der Waals-ovim* silama) i elektrostatička svojstva molekula⁴⁰. Ovi podaci o molekulu dobijaju se pretraživanjem trodimenzionalne rešetke i nizom superponiranih konformacija molekula. Pomoću CoMFA računaju se koeficijenti QSAR jednačine.

1.1.5. Teorijske metode izračunavanja fizičko-hemijskih parametara

Konformaciona analiza podrazumeva analizu fizičkih i hemijskih osobina jedinjenja preko analize njihovih konformacija u osnovnom, prelaznom ili pobuđenom stanju⁴¹. Od samog početka konformaciona analiza bila je povezana sa oblašću hemije koja je poznata kao molekulska modelovanje ili računarska hemija. Prvi korak svake konformacione analize je pronalaženje optimalne (najstabilnije) konformacije ispitivanog jedinjenja nakon čega se izračunavaju molekulske parametri izabranih optimalnih konformacija.

Prva izračunavanja energije sternih interakcija i njihovog uticaja na reaktivnost molekula potiču iz 1946.godine⁴². Hendrikson je 1961. godine formulisao jednačinu za izračunavanje energije molekula⁴³ koja je, u sličnom obliku i danas u upotrebi u **molekulsko-mehaničkoj (MM)** ili **empirijskoj računskoj** metodi⁴⁴. **MM** metoda se bazira na osnovnim principima vibracione spektroskopije i ideji da veze imaju prirodnu dužinu i ugao, tako da molekul teži da formira prostorni raspored u kom će u najvećoj meri biti postignute te vrednosti. Jednostavna, brza **MM** metoda se koristi za optimizaciju molekulske strukture, iznalaženje konformacije sa minimumom potencijalne energije, kao i za izračunavanje molekulskih veličina kao što su: toplota nastajanja, sterna napon, konformaciona energija, vibracioni spektri, parametri kristalne rešetke. Danas se **MM** metoda, u kombinaciji sa **MonteCarlo (MC)** metodom i metodom **molekulske dinamike (MD)**, koristi za izračunavanja na velikim molekulima

i molekulskim sistemima (npr. optimizacija strukture jonskog kanala u fragmentu ćelijske membrane). Pored MM u dizajniranju lekova koriste se **semiempirijske, ab initio kvantno-hemijske metode**, kao i **teorija funkcionalne gustine** (*Density Functional Theory* (DFT))²⁷ koje danas predstavljaju standardne metode molekulskog modelovanja.

Semiempirijske kvantno-mehaničke metode koriste matematičke formule talasnih funkcija (*Schrodinger*-ova jednačina sa aproksimacijama) koje opisuju vodonikov tip orbitala (*Slater*-tip ili *Gaussian*-tip orbitala) i vrše veliki broj linearnih kombinacija orbitala do trenutka pronalaženja sistema sa minimalnim sadržajem energije. Najčešće korišćen program baziran na semiempirijskim kvantno-mehaničkim metodama je *Mopac* kojim se vrše proračunavanja: vibracionih frekvencija, energije nulte tačke (*Zero Point Field Energy*), parcijalnog naelektrisanja atoma, dipolnog momenta, jonizacionog potencijala, reda veze, toplote formiranja i energetskog minimuma²⁷.

Ab initio kvantno-mehaničke metode koriste u osnovi *Schrodinger*-ovu jednačinu bez aproksimacija. Ove metode su veoma korisne u slučajevima kada ne postoje odgovarajući eksperimentalni podaci. Najčešće korišćeni *ab initio* kvantno-mehanički program je *Gaussian*, koji u sebi sadrže različite metode (B3LYP, CASSCF itd.) sa više tipova proračunavanja u zavisnosti od grupe orbitala koje se koriste u eksperimentu²⁷. Razvoj opisanih računskih metoda, kao i kristalografsko određivanje strukture velikih biomolekula (proteina i nukleinskih kiselina) podstakli su razvoj novih računskih metoda, te je 1982. godine publikovan prvi algoritam⁴⁵ koji je kasnije ugrađen u program za molekulsko modeliranje *Dock*.

1.1.6. Molekulsko modeliranje ciljnog makromolekula

Ukoliko je moguće utvrditi kristalnu strukturu odgovarajućeg proteina (enzima, receptora, jonskog kanala), tada se radi sa egzaktnim modelom koji predstavlja ciljno mesto dizajniranja lekova. Iako je do sada sekvencioniran veliki broj proteina, trodimenzionalne strukture visoke rezolucije (difrakcija X-zraka i NMR podaci) dostupne su za mali broj membranskih proteina, što je posledica brojnih poteškoća koje se javljaju u procesu njihovog izolovanja, prečišćavanja, solubilizacije i kristalizacije⁴⁶. To je slučaj i sa jonskim kanalima, transmembranskim oligomernim proteinima. Do

sada su izolovane i definisane kristalografske strukture dva bakterijska K⁺ kanala i jednog K⁺ kanala kod sisara²³⁻²⁵. Uprkos značajnim razlikama u primarnoj aminokiselinskoj sekvenci, većina proteina u okviru jedne familije (npr. voltažno-zavisni jonski kanali) ima visoko očuvanu topološku organizaciju. To otvara mogućnost za modeliranje hipotetički aktivnih mesta na osnovu postojećih sličnosti struktura (modeliranje zasnovano na homologiji, tzv. *homologi modeli*). Pri upotrebi termina *homologo modelovanje* mora se imati na umu da termin *homologija* ne znači obavezno i sličnost u strukturi. Preciznije značenje termina homologija je sa *istim evolutivnim poreklom*⁴⁷⁻⁴⁸. Zato je homologija u stvari kvalitativan opis odnosa dva ili više proteina, a sličnosti u trodimenzionalnoj strukturi može biti dodatni podatak koji podržava tezu o homologiji. Homologo modelovanje polazi od stanovišta da se tokom molekulske evolucije proteina među homologim proteinima lakše zadržala prostorna struktura od sekvence⁴⁷⁻⁴⁸. Trodimenzionalna struktura ciljanog proteina modelira se prema matrici koju predstavlja dostupna kristalografska struktura njemu delimično homologog proteina⁴⁷. Idenične aminokiselinske sekvence se preklapaju, pri čemu je ovaj postupak relativno jednostavan ako je stepen homologije visok (veći od 30%). Ako je nivo homologije nizak, to zahteva složenije procedure, što za posledicu može da ima i značajnu grešku u konstrukciji modela⁴⁸⁻⁴⁹. Za izgradnju ciljnog modela proteina koriste se tri metode:

- 1) Metoda sklapanja segmenata ili metoda rigidnog tela
- 2) Metoda uparivanja segmenata ili rekonstrukcije koordinata
- 3) Metoda prostornih ograničenja

1.1.7. Molekulski docking

Metoda uklapanja (*Molekulski docking*) postala je naročito popularna u proteinskoj hemiji gde se koristi za izučavanje kompleksa proteina sa drugim proteinima, nukleinskim kiselinama ili kompleksa proteina sa malim molekulima kakvi su i lekovi. To je proces u kojem se kompjuterski simulira interakcija između liganda i ciljnog makromolekula čija je trodimenzionalna struktura definisana. Metod se sastoji u nizu pokušaja da se ligand (lek) uklopi u strukturu receptora, na raznim položajima u receptoru i u različitim orjentacijama (*binding mode*), tako da se ostvari najniža energija receptor-ligand interakcije, a to znači i najstabilniji kompleks. U zavisnosti od pristupa prilikom molekulskog uklapanja, strukture liganda i ciljni makromolekuli mogu biti

rigidni (*docking krutih struktura*) ili ligand i/ili vezivno mesto mogu da poseduju izvesnu konformacionu fleksibilnost (*fleksibilni docking*)³⁹. U prvom slučaju ligand poseduje samo šest stepeni slobode, dok se uvođenjem konformacione slobode broj mogućih varijacija položaja i orijentacija povećava, a to za sobom povlači i veći broj kompjuterskih proračuna. Zbog toga je razvijen veliki broj algoritama (*search algorithms*) čiji je cilj racionalizacija u definisanju *optimalne poze* liganda. Svaki algoritam se oslanja na odgovarajuću funkciju procene (*scoring function*) kojom se procenjuje koliko je energetski povoljna data *poza liganda*⁵⁰. Ono što se očekuje od *docking* studije je da da odgovore o: a) strukturi kompleksa tj. o vezivnoj konformaciji receptora i liganda, b) stabilnosti kompleksa izraženoj preko energije vezivanja, koja se izračunava molekularno-mehanički ili kvantno-hemijski i c) mutacijama proteinskog receptora koje bi mogle dovesti do stabilnijeg kompleksa. U kojoj meri će rezultati *dockinga* simulirati interakciju u biološkoj sredini i koliko će predviđeni afinitet biti tačan tj. realan, zavisi od velikog broja faktora: kvaliteta trodimenzionalne strukture ciljnog makromolekula, konformacione slobode prilikom *dockinga*, simulacije efekata rastvarača i okruženja, funkcije procene, kao i drugih faktora koji su vezani za samu metodologiju *dockinga*⁵⁰⁻⁵¹.

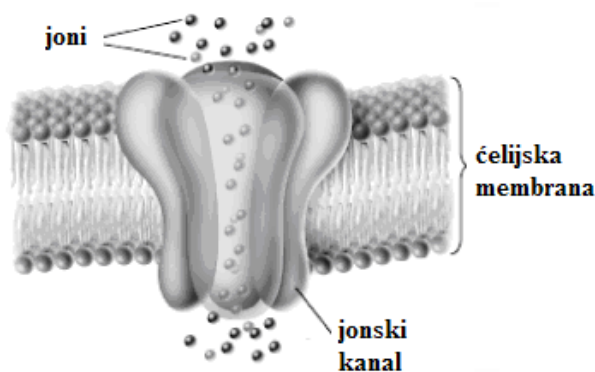
Svakako treba pomenuti i razvoj kompjuterske grafike koja je integralni deo savremenih kompjuterskih programa za molekularno modelovanje. Uvođenje grafičke komunikacije znatno poboljšava način predstavljanja i interpretacije rezultata izračunavanja. Danas postoji veliki broj kompjuterskih programa koji se koriste u okviru **CADD**: *Dragon* programski paket koji omogućava računanje 1D, 2D i 3D molekularskih deskriptora, *Mopac* za semiempirijska izračunavanja, *Gamess* i *Gaussian* za kvantno-hemijska izračunavanja, *Namd* za **MC** i molekularnu dinamiku, *AutoDock* za molekularno uklapanje, *Pentacle* za procenu povoljnih interakcija između receptora i molekula.

1.2. Modulacija aktivnosti jonskih kanala

Veliki broj lekovitih supstanci i fizioloških medijatora ostvaruju svoje efekte menjajući ponašanje jonskih kanala. Modulacija jonskih kanala predstavlja moderan pristup za eksperimentalna i klinička istraživanja u neprekidnom traganju za boljim lekovima^{2,52-59}. Modulatori jonskih kanala (pre svega modulatori kalijumskih kanala) poslednjih decenija postaju sve važniji ciljni molekuli u medicinskoj hemiji, jer jonski kanali kao sastavni delovi svake žive ćelije igraju ključnu ulogu u njenoj deobi, proliferaciji, ekscitaciji i apoptozi⁶⁰. Modulatori jonskih kanala koriste se u lečenju različitih oboljenja: aritmija, hipertenzija, epilepsija, ataksija, migrena, hipoksija, hroničnog bola, dijabetesa, a u novije vreme sve više imaju značaja i u lečenju bakterijskih, gljivičnih, parazitskih, virusnih kao i malignih i autoimunih oboljenja^{16-17, 53-60}. Većina modulatora jonskih kanala koja se danas nalazi na tržištu razvijena je bez velikog poznavanja molekulske strukture, podtipova jonskih kanala kao i njihove ekspresije i funkcije u samom patološkom procesu. Kako su naučna saznanja postajala sveobuhvatnija, tako je i sinteza modulatora jonskih kanala bila usmerena ka odgovarajućem podtipu kanala preko mehanizama koji uključuju ili direktnu blokadu kanala ili modulaciju ekspresije i funkcije samog kanala. Posle decenija u kojima su dominirali blokatori kalcijumskih kanala (antagonisti kalcijuma), sada su u žiži naučnih interesovanja kalijumski kanali (K^+ kanali) i njihovi modulatori. Pošto ovi kanali imaju važnu ulogu u održavanju membranskog potencijala u tkivima i učestvuju u regulaciji akcionog potencijala, od novih modulatora K^+ kanala se očekuje veća selektivnost koja će doprineti bezbednijoj terapiji aritmija, kao i potencijalnoj primeni u lečenju malignih i autoimunih oboljenja.

1.3. Jonski kanali, građa i funkcija

Jonski kanali su makromolekularni, proteinski kompleksi (*tzv. proteinski tuneli*) koji prolaze kroz lipidni omotač ćelijske membrane i omogućavaju komunikaciju ćelija sa spoljašnjom sredinom (Sl.2). Predstavljaju *pore* kroz koje uz veću ili manju selektivnost prolaze joni Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Cl^- u pravcu električnog ili gradijenta koncentracija⁶⁰.



Slika2. Prikaz strukture jonskog kanala

Interesovanje za jonske kanale počinje još šezdesetih godina prošloga veka kada su Hočkin i Haksli dobili Nobelovu nagradu za istraživanja koja se odnose na generisanje i širenje akcionog potencijala (AP) u neuronu. Hipoteza o jonskim kanalima koju su postavili potvrđena je nekoliko decenija kasnije⁶¹. Hočkin-Hakslijev model AP-a se bazira na električnim merenjima jonskih struja kroz aksonsku membranu primenom tehnike nazvane *metod nametnute voltaže (voltage clamp)*. Prema ovoj teoriji AP je rezultat promene provodljivosti membrane za jone Na^+ i K^+ koja specifično zavisi od membranskog potencijala (MP) i vremena. Hočkin i Haksli su na osnovu ovih merenja postavili model jonske osnove ćelijske ekscitabilnosti koji se smatra jednim od najuspešnijih modela u biologiji. Iz ovog modela su proizašli i novi metodološki pristupi izučavanju membranskih mehanizama, kao što je metoda nametnute voltaže na deliću membrane (*patch clamp*)⁶². Primenom ove tehnike moguće je registrovati jonske struje pojedinačnih jonskih kanala u membrani kako životinjskih tako i biljnih ćelija.

Saznanja o građi jonskih kanala postajala su sve brojnija. Ranih 80-tih godina prošlog veka klonirani su prvi receptorski kanali (nikotinski holinergički receptori). Tri laboratorije, nezavisno jedna od druge, 1987. godine, uspevaju da izoluju prvi gen iz *Shark* lokusa, mutanta vinske mušice *Drosophila melanogaster* (*Shaker* slični kanali), a

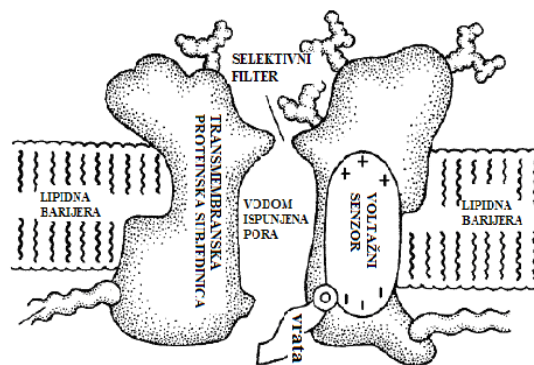
potom i još tri: *Shal*, *Shaw* i *Shab* koji kodiraju voltažno-zavisne K^+ kanale. Homolozi svih navedenih familija pronađeni su i kod kičmenjaka⁶³⁻⁶⁵. Krajem XX veka, Šremp i saradnici su identifikovali i okarakterisali K^+ kanal iz bakterije *Streptomyces lividans* i nazvali ga KcsA⁶⁶. Kanal je bio dovoljno sličan eukariotskom K^+ kanalu i imao iste ključne strukturne elemente. Ovaj bakterijski kanal je veoma otporan, tako da se može lako ugraditi u veštačke membrane. Činjenica da je to bakterijski kanal omogućila je njegovo dobijanje u čistom obliku u većim količinama. Ali, čak ni sa većom količinom proteina nije bilo lako dobiti detaljne informacije o strukturi. Kristali su osetljivi na radijaciju, anizotropno difraktuju X-zrake i bilo je potrebno napraviti niz mutanata da bi se formiralo mesto za vezivanje teških atoma. MakKinon i saradnici su 1998. godine uspeali da snime kristalografsku strukturu KcsA kanala²⁶. Ovako snimljena struktura imala je odlučujuću ulogu u otkrivanju mehanizma transporta jona kroz kanal, razumevanju osnovnih funkcionalnih osobina pore kanala, selektivnog filtera, voltažnog senzora, vrata koja regulišu otvoreno i zatvoreno stanje kanala^{25, 67-68}. Kako jonski kanali omogućavaju komunikaciju ćelije sa spoljašnjom sredinom? Primljena informacija (stimulus) dovodi do alosterne promene u proteinu kanala, tj. aktivacije kanala. Posledica aktivacije kanala je pojava električne struje, struje jona kroz kanal u membrani, što dovodi do promene MP, kao i promene intracelularnog jonskog sadržaja. Obe promene kodirane su prostorno, vremenski i frekventno i predstavljaju informacije koje modifikuju aktivnost drugih elemenata signalizacije na membrani, kao i aktivnost složenih sistema unutarćelijske signalizacije koji uključuje sekundarne glasnike i raznovrsne enzimske procese. Jonski kanali poseduju tri važne fiziološke funkcije⁶⁰:

- 1) odgovorni su za uspostavljanje membranskog potencijala mirovanja (MPM) i sprovođenje AP-a kod svih ćelija;
- 2) regulišu intracelularne procese tj. signale za koje je odgovoran prvenstveno jon Ca^{2+} (mišićna kontrakcija, hormonska sekrecija, oslobađanje neurotransmitera, promene u ekspresiji gena);
- 3) regulišu ćelijski volumen.

Četiri elementa u strukturi jonskih kanala (Sl.3) su neophodna za ostvarivanje ove tri navedene funkcije:

- 1) deo kanala koji *prima* stimulus i u tom procesu menja svoju konformaciju (alosterna promena);

- 2) pora kanala kroz koju protiču joni, što dovodi do promene MP i promene intracelularnog jonskog sadržaja;
- 3) deo kanala koji može da otvori ili zatvori poru kanala tzv. *vrata* ili *kapija* (*gate*). Kod najvećeg broja kanala postoje samo jedna *vrata*. Kod nekih jonskih kanala kao što su voltažno-zavisni kanali za Na^+ i Ca^{2+} postoje i druga vrata locirana intracelularno između transmembranskih segmenata i ona omogućavaju da ovi proteini budu u zatvorenom, otvorenom ili inaktivisanom funkcionalnom stanju;
- 4) *senzor* ili jonski filter koji se nalazi na *vratima* kanala i reaguje na promenu električnog potencijala ili hemijski signal. U zavisnosti od promene membranskog potencijala on kontroliše otvoreno/zatvoreno stanje *vrata* tj. pore kanala.

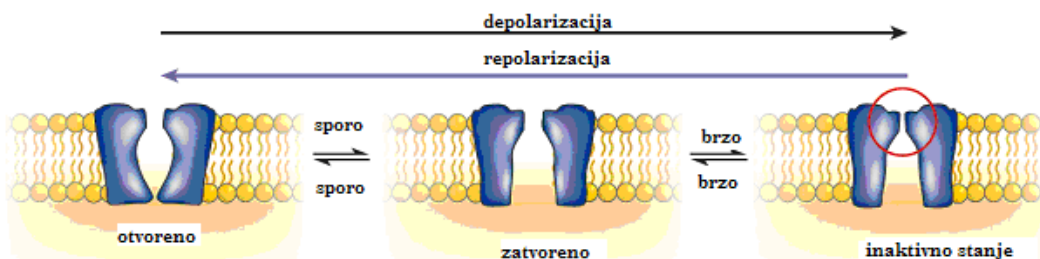


Slika 3. Prikaz funkcionalne organizacije jonskog kanala.

(Preuzeto i prilagođeno iz: Hille B. Ionic channels of excitable membranes, 2nd ed. 1992, Sunderland, MA: Sinauer Associates)

Svi kanali se sastoje od nekoliko (tri, četiri ili pet) identičnih ili sličnih transmembranskih domena, koji su organizovani u vidu odvojenih subjedinica ili jednog velikog proteina, sa unutrašnjim prečnicima oko 1 nm, rastojanjima između susednih kanala oko 100 nm i gustinom od oko 100 kanala/ μm^2 . Svaka subjedinica (domen) sadrži 2-6 transmembranskih spiralnih segmenata. Centralna, vodom ispunjena pora, koja se uočava na aksijalnom preseku kanala, prolazi kroz sredinu kanala obuhvatajući celu širinu membrane. U mnogim kanalima *zidove* pore formiraju dve ili više proteinskih subjedinica (dimeri, trimeri, tetrameri, pentameri, heksameri) simetrično raspoređenih u krug⁶⁰. Kao i svaki protein i jonski kanal može da ima dva ili više konformacionih oblika, a svaka od ovih stabilnih konformacija predstavlja različito funkcionalno stanje kanala. Svaki jonski kanal ima najmanje jedno *otvoreno* i jedno ili dva *zatvorena* stanja.

Proces prelaska kanala iz jednog u drugo konformaciono stanje definiše se kao tzv. *transformacija* kanala. Molekularna preuređenja koja se dešavaju za vreme prelaza iz *zatvorenih* u *otvorena* stanja pojačavaju jonsko provođenje kroz kanal ne samo pravljjenjem šireg otvora, već i pomeranjem polarnijih aminokiselinskih ostataka ka spoljašnjem delu kanala što dovodi do njegovog otvaranja. Pravac i veličina jonske struje kroz kanale zavise od jonskog gradijenta koncentracije i naelektrisanja (membranskog potencijala). Kombinacija ova dva efekta poznata je kao elektrohemijski gradijent. (Sl.4). Kada je potencijal negativan kanal je zatvoren, depolarizacija membrane polako otvara kanal koji zatim veoma brzo prelazi u inaktivno stanje, posebno kada je potencijal visok. Pri repolarizaciji membrane redosled konformacionih stanja je obrnut⁶⁹.



Slika 4. Prikaz tri moguća konformaciona stanja jonskih kanala.

(Preuzeto i prilagođeno iz: Sanguinetti MC& Tristani-Firouzi M, *Nature* 2006, 440: 463-469)

Om ovim zakonom se može izračunati sprovodljivost svakog kanala:

$$i = V/R \quad (3)$$

gde je i [pA] sprovodljivost kanala, V [mV] membranski potencijal, a R [Ω] otpor koji nastaje pri prolasku jona kroz kanal

Za svaki jon definisan je ravnotežni potencijal, ΔV , pri kome joni ne mogu da prolaze kroz membranu; ΔV može da se odredi iz Nernstove jednačine:

$$\Delta V = V_{in} - V_{out} = \frac{-k_B T}{ze} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}} \quad (4)$$

gde je ΔV transmembranski potencijal, k_B *Bolcmanova* konstanta, e elementarno naelektrisanje, z valenca jona, c_{in} koncentracija jona unutar ćelije, c_{out} koncentracija jona u ekstracelularnom prostoru. Negativan predznak ukazuje da je unutrašnja strana ćelijske membrane negativno naelektrisana.

Opšta kategorizacija kanala svrstava ih u pasivne i aktivne:

PASIVNI kanali (*membranske pore*) su neselektivni, ne poseduju *vrata*, uvek su otvoreni kada se ćelija nalazi u mirovanju i ne reaguju na nadražaje iz spoljašnje sredine.

AKTIVNI kanali su selektivni, poseduju *vrata*, a otvorenost ili zatvorvorenost se kontroliše membranskim potencijalom, sinaptičkim transmiterima, specifičnim receptorskim agonistima ili antagonistima i raznim fizičkim podsticajima. U zavisnosti od tipa nadražaja na koji reaguju, razlikuju se sledeće vrste aktivnih jonskih kanala:

1. voltažno-zavisni
2. ligand-zavisni
3. mehano-senzitivni

1.3.1. Kalijumski kanali

Svaki tip kalijumskih kanala (K^+ kanala) ima posebnu fiziološku ulogu u organizmu, a njihova distribucija zavisi od vrste tkiva i organa. Nalaze se u membranama ćelija: glatkih mišića, miocita, skeletnih mišića, endokrinog pankreasa, pljuvačnih žlezda, hipofize, bubrega, jetre, kao i različitih tipova nervnih ćelija. Samim tim i njihove funkcije su brojne: kontrola MP, ekscitabilnost ćelije, sekrecija insulina, oslobađanje neurotransmitera, kontrola ćelijskog volumena, ćelijske proliferacije i migracije^{60, 70}. U vaskularnom glatkom mišiću učešće K^+ kanala u regulaciji tonusa je indirektno ili modulatorno, jer se preko K^+ kanala ostvaruju uslovi za neposrednu modulaciju homeostaze Ca^{2+} ⁷¹. U srcu su K^+ struje brojne i kompleksno uklopljene sa kretanjima jona u elektrofiziološke osobine srca⁷¹⁻⁷².

Veliki progresivni pomak u istraživanju strukture K^+ kanala nastao je po otkriću životinjskih toksina (karbidotoksin, dendrotoksin, margatoksin, iberiotoksin i dr.) koji su visoko specifični za pojedine podtipove K^+ kanala. Uvođenje elektrofizioloških metoda (*voltage clamp* i *patch clamp*), kristalografskih i NMR visokorezolucionih strukturnih metoda, imunohistohemijskih metoda kao i *docking* studija pružilo je mogućnost detaljnije strukturne analize kanala.^{23-25, 62, 68, 73-76}

Disfunkcija K^+ kanala se povezuje sa poremećajima u organizmu koji dovode do oboljenja srca, bubrega, pankreasa, centralnog nernog sistema (CNS) i malignih oboljenja^{16-17, 72, 77-78}.

1.3.1.1. Klasifikacija kalijumskih kanala

Posle otkrića brojnih modulatora K^+ kanala, objavljena je i prva klasifikacija kanala prema elektrofiziološkim i farmakološkim kriterijumima⁷⁹. Prema ovoj klasifikaciji, K^+ kanali se svrstavaju u četiri velike grupe:

- 1) voltažno-zavisni (kasni, ulazni i prolazni ispaljivači);
- 2) Ca^{2+} -zavisni (velike, srednje i male propustljivosti);
- 3) receptorski (vezani za muskarinske receptore i muskarinske receptore u pretkomorama)
- 4) ostali (ATP-zavisni, Na^+ zavisni i 5-HT zavisni).

U periodu od 1988. do 1994. godine objavljena je nova podela K^+ kanala^{16, 79}:

- 1) voltažno-zavisni (K_V i K_A);
- 2) voltažno- i ligand-zavisni (K_{IR} , K_M , BK_{Ca});
- 3) ligand-zavisni (IK_{Ca} , SK_{Ca} i K_{ATP}).

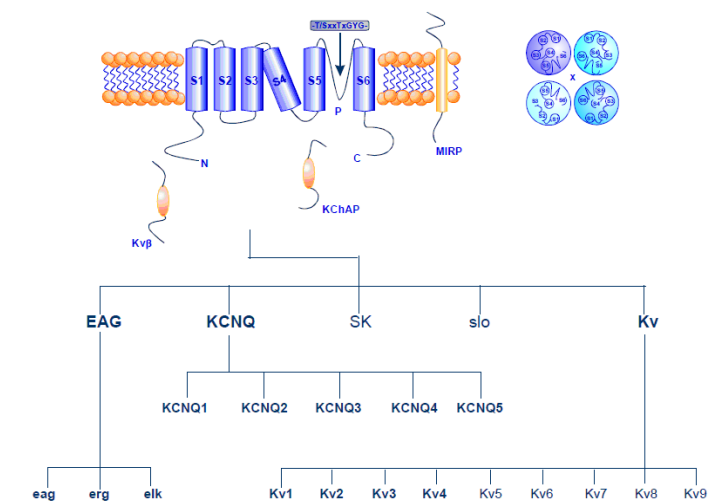
Dalja otkrića na polju molekulske strukture K^+ kanala dala su i novi način klasifikacije zasnovan na morfologiji i primarnoj aminokiselinskoj sekvenci u subjedinicama koje izgrađuju poru kanala⁸⁰. Određene su tri familije K^+ kanala, a svaka sadrži veliki broj tipova i podtipova:

- 1) kanali sa 6 transmembranskih segmenata (S1-S6) i jednim regionom pore;
- 2) kanali sa 2 transmembranska segmenta (M1-M2) i jednim regionom pore;
- 3) kanali sa 4 transmembranska segmenta (M1-M4) i dva regiona pore.

Klasifikacija K^+ kanala predstavlja ozbiljan problem za naučnike i bez detaljnog poznavanja strukture ovih kanala ona je nepotpuna⁸¹⁻⁸².

1.3.1.2. Kalijumski kanali sa šest transmembranskih domena i jednom porom

Kalijumski kanali sa šest transmembranskih domena i jednom porom (6TM/1P) su najbrojnija grupa K^+ kanala, a čine je: voltažno-zavisni K^+ kanali (K_V), kasni ispaljivači, KCNQ ($IK_S K_V LQT1 minK$), humani *ether-a-go-go* (hERG, IK_R) i Ca^{2+} -zavisni K^+ kanali (SI.5)

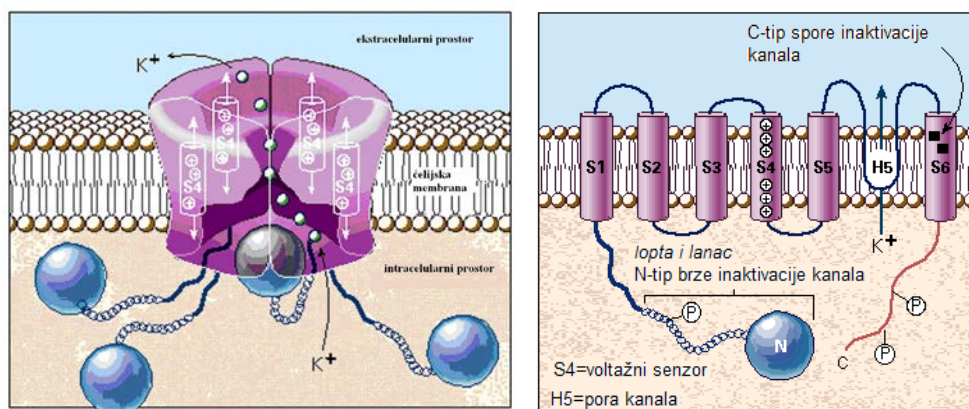


Slika 5. Prikaz glavnih familija K^+ voltažno-zavisnih jonskih kanala
(Preuzeto i prilagođeno iz: <http://www.tocris.com>)

U vreme potencijala mirovanja membrane Kv, KCNQ i *ether-a-go-go*-slični K^+ kanali su zatvoreni. Aktiviraju se u toku depolarizacije i učestvuju u fazi repolarizacije, regulišu ekscitabilnost nerava, mišićnih vlakana i srčanog mišića. Moduliraju sinaptičku transmisiju i sekreciju endokrinih ćelija.

1.3.1.2.1. Voltažno zavisni K^+ kanali

Voltažno zavisni K^+ kanali (Kv) su multimeri koji se sastoje od četiri identične α -subjedinice, u koje je ugrađeno 6 α -helikoidnih, hidrofobnih transmembranskih segmenata, označenih od S1 do S6 (S1.6).



Slika 6. Prikaz građe voltažno-zavisnog K^+ kanala: struktura glavne α subjedinice, položaj voltažnog senzora i tipovi inaktivacije kanala

Pomoćne hidrofilnije β subjedinice su povezane sa α subjedinicama i locirane na citoplazmatičnoj strani membrane⁸³. Velike peptidne petlje (*P-loop* ili H5) se nalaze između S5 i S6 segmenata i okrenute su ka lumenu pore u delu membrane bližem

intracelularnom prostoru⁸³. Petlje četiri subjedinice doprinose formiranju funkcionalne K⁺ provodljive pore⁸⁴. Spoljašnji otvor kanala je uzak, kao i središnji deo (oko 0,26 nm), dok je unutrašnji otvor dosta širi (0,80 nm). Kod Na⁺ kanala je obrnuto. Segment S4 je pozitivno naelektrisan i predstavlja glavni deo **voltažnog senzora** (*voltage sensor*) potrebnog za aktiviranje Kv kanala. Kretanje pozitivnog naelektrisanja duž S4 segmenta za vreme promene membranskog potencijala, dovodi do konformacione promene kanala tj. do njegove aktivacije (otvaranja) ili inaktivacije (zatvaranja) (*gating* mehanizam). Ovom procesu doprinosi i međusobno elektrostatičko delovanje negativnih naelektrisanja na S2 i S3 transmembranskim segmentima⁸⁵⁻⁸⁶ (Sl.6). Inaktivacija predstavlja stanje neprovodljivosti kanala. Za Kv kanale su karakteristična tri tipa inaktivacije: **N-**, **P-** i **C-**tip. Veliki N-terminalni peptid koji se nastavlja na S1 segment α subjedinice (Sl.6) se smatra odgovornim za promene koje dovode do brze inaktivacije⁸⁷, dok C- i P-tipovi inaktivacije uključuju sporije konformacione promene spoljašnjeg ušća kanala i specifičnih aminokiselinskih ostataka u pori⁸⁸.

1.3.1.2.2. KCNQ kanali

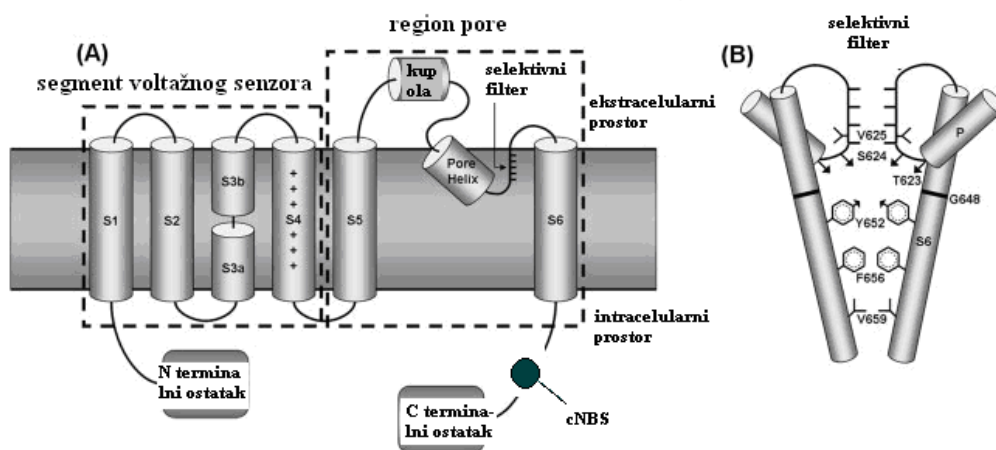
KCNQ kanali su familija K⁺ kanala koja je otkrivena u poslednjoj deceniji prošlog veka i ima značajnu fiziološku ulogu u kardiovaskularnom (KCNQ1)^{16, 82, 89} i nervnom (KCNQ2 i KCNQ3)^{16, 79, 90} sistemu kao prenosilac važnih K⁺ struja. Dokazano je da su mutacije u KCNQ genima odgovorne za pojavu sindroma produženog QT intervala (LQT1), te se otuda u literaturi ova familija kanala često obeležava kao KvLQT. Udružen sa *minK*⁺ kanalom (transmembranski polipeptidni lanac od svega 130 aminokiselina) koji predstavlja sporednu β subjedinicu, KCNQ1 gradi Ks kanal koji u srcu transportuje I_{ks} sporu, odloženu ispaljivačku struju, aktivnu u fazi repolarizacije. *Min K*⁺ određuje farmakološke osobine kanala^{16, 79, 90}. Za razliku od Kv kanala, KCNQ kanali nisu tetrameri. Aktivacija kanala je dvojaka: KCNQ1 aktivira depolarizacija, dok KCNQ2 i KCNQ3 aktivira porast intracelularnog cAMP i protein kinaza. Familiju KCNQ kanala blokira klofilijum, ali ne i antiaritmici III grupe^{16, 91}.

1.3.1.2.3. *Eag*-slični kanali

Postoje tri podtipa *eag*-sličnih kanala: *eag*, *erg* i *elk*⁹³. Godine 1994. izolovan je i elektrofiziološki okarakterisan hERG⁹⁴⁻⁹⁵. Primarna struktura ovog kanala razlikuje se od Kv kanala samo u određenim aminokiselinskim sekvencama u pori kanala i C

terminalnom ostatku α subjedinice⁹⁶. U regionu pore koji grade dva transmembranska segmenta S5 i S6, nalazi se S5-P dugačka, kupolasta spojnica (*turret linker*) koju gradi amfipatičan (kupolast) heliks (SI.7A)⁹⁷⁻⁹⁹.

U aminokiselinskoj sekvenci S6 hERG kanala nedostaju prolinski (*Pro*) ostaci koji ograničavaju obim unutrašnje šupljine kanala, pa je S6 segment u hERG kanalu fleksibilniji. Otvor pore kanala samim tim je širi, pa je *ulazak* leka u unutrašnjost kanala olakšan. Unutar segmenta S6 većine Kv kanala nalaze se ostaci karbonilnih grupa alifatičnih izoleucinskih (*Ile*) i valinskih (*Val*) aminokiselinskih ostataka. Kod S6 segmenta u hERG kanalu na tim mestima se nalaze aromatični ostaci tirozina (*Tyr*) i fenilalanina (*Phe*). Mesto vezivanja lekova nalazi se u centralnom delu pore, ispod selektivnog filtra, koje okružuju S6 segmenti sve četiri subjedinice¹⁰⁰⁻¹⁰² (SI.7B). Studijama mutageneze (*Scanning alanine mutagenesis studies*) u ovom regionu identifikovani su aminokiselinski ostaci sa kojima lek ostvaruje interakcije: *Thr 623*, *Ser 624* i *Val 625*¹⁰⁰, kojima u selektivnom filtru prethodi tzv. *konzervisana* aminokiselinska sekvenca *Gly/Tyr(Phe)/Gly* kao i ostaci *Gly 648*¹⁰¹, *Tyr 652*, *Phe656* i *Val659*¹⁰¹⁻¹⁰².



Slika 7 A) Transmembranska subjedinica hERG kanala, **B)** aminokiselinski ostaci odgovorni za interakciju sa lekom

(Preuzeto i prilagođeno iz: Stansfeld PJ., Gedeck P, Gosling M, et al., *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 2007, 68:568–580)

Svi navedeni aminokiselinski ostaci leže na istoj strani S6 segmenta (SI.7B). Studija mutageneze je ukazala na to da su ovi ostaci jedinstveni za hERG i odgovorni za povećanje afiniteta vezivanja leka za kanal, kao i za tip interakcije lek-kanal koji od elektrostatičkih, sada vodi ka π - π i π -katjon dominantnim interakcijama. Lek ostvaruje interakcije sa kanalom kada se kanal nalazi u otvorenom tj. aktivnom stanju¹⁰³, što je

značajno u izvođenju *in silico* metoda, koje su poslednjih godina u razvoju¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Razlika u strukturi hERG i K_V kanala uočljiva je i na C-terminalnom ostatku na kome se kod hERG kanala nalazi vezujuće mesto za ciklični-nukleotid (cNBS) (S1.7A). Aktivacija ovih kanala je spora (depolarizacija veća od -50 mV), ali se jako brzo inaktiviraju kada vrednost potencijala dostigne -10 mV. Tada protok jona kroz ove kanale slabi i započinje njihova inaktivacija koja je slična C-tipu inaktivacije kod K_V kanala, ali je brža¹⁰⁶. Jedina K⁺ struja (*I_{kr}*) koja protiče kroz hERG utiče na izlazak K⁺ jona u ekstracelularni prostor, iako je u tom prostoru koncentracija K⁺ jona veća nego u ćeliji. Ovo se smatra paradoksalnom pojavom.

1.3.1.2.4. Ca²⁺ zavisni K⁺ kanali

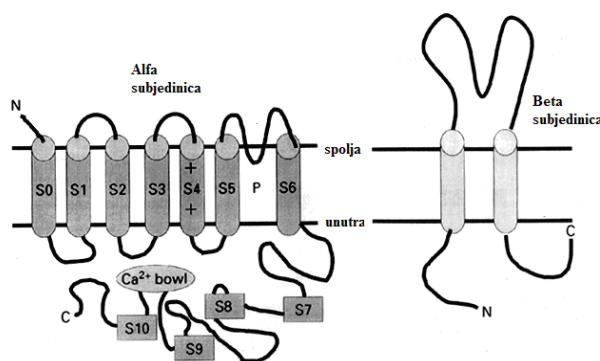
Za Ca²⁺-zavisni tip K⁺ kanala (K_{Ca}) je karakteristično da je osim depolarizacije, za njihovo otvaranje neophodna i povećana koncentracija Ca²⁺ jona u citoplazmi^{16, 93}. Postoje tri podtipa ovih kanala koji se razlikuju prema kinetici, sprovodljivosti i farmakološkim osobinama: kanali sa malom, intermedijernom i velikom provodljivošću.

▪ *Kanali sa malom provodljivošću* (SK_{Ca}) se mogu aktivirati samo porastom koncentracije intracelularnog Ca²⁺ koja se javlja u vreme kada je membranski potencijal blizak potencijalu mirovanja. Ovi kanali imaju važnu ulogu u regulisanju frekvencije akcionog potencijala^{16,70,93}. Njihovo prisustvo u srcu i vaskularnim glatkim mišićima nije dokazano. Otkriveni su u terminalnom ileumu i bešici, a pretpostavlja se da imaju ulogu u regulaciji spontane aktivnosti ovih organa¹⁶.

▪ *Kanali sa intermedijernom provodljivošću* (IK_{Ca}) su otkriveni u vaskularnim mišićima⁹³, ljudskim eritrocitima¹⁰⁷. Podaci o ulozi koju ovaj podtip K⁺ kanala ima su vrlo oskudni.

▪ *Kanali sa velikom provodljivošću* (BK_{Ca}) su zastupljeni u glatkim mišićima, mozgu, nervnim završecima, unutrašnjem uhu, bubrezima i endo/egzokrinom epitelu. Gustina ovih kanala u membrani je velika, što je ujedno i pokazatelj njihove izuzetne važnosti u regulaciji MP-a. Uključeni su u hiperpolarizaciju i doprinose repolarizaciji. Fiziološka uloga BK_{Ca} je vezana za kontrakciju glatkog mišića, oslobađanje neurotransmitera, neuronalnu ekscitabilnost. Za vreme potencijala mirovanja ovi kanali su zatvoreni, ali ih može aktivirati porast intracelularnog Ca²⁺. Ovakvi uslovi postoje posle delovanja vazokonstriktora na vaskularne mišiće, pa se može reći da ovi kanali

ostvaruju neki vid negativne povratne sprege kojom se ograničava depolarizacija i dalje nagomilavanje Ca^{2+} u ćeliji. Molekularno ispitivanje BK_{Ca} kanala je pokazalo da je sastavljen od voltažno-zavisnog kanala kome je dodat deo sa četiri nove hidrofobne subjedinice S7-S10¹⁰⁸ (Sl.8). Wei i saradnici¹⁰⁹ su opisali kanal kao strukturu čiji središnji region zahvata segmente od S1 do S8, *repni* region S9 i S10, a povezani su *čuvanim linkerom* smeštenim između S8 i S9. Noviji modeli BK_{Ca} strukture uključuju i novi ekstracelularni transmembranski segment S0¹¹⁰ smešten na N-terminalnom ostatku, za koji se smatra da igra važnu ulogu u regulaciji β subjedinica. Pretpostavlja se da su voltažna zavisnost, otvorenost kanala i provodljivost funkcije regiona S1-S6¹⁰⁹, dok se osetljivost na Ca^{2+} jon pripisuje β subjedinicama (Sl.8) i nizu negativno naelektrisanih ostataka aspartata (*Asp*) koji čine Ca^{2+} udubljenje (*bowl*). Ovo udubljenje je smešteno između segmenata S9 i S10 u regionu *repa* α subjedinice¹¹¹, u citoplazmi¹¹⁰. Kalcijumovi joni se vezuju za kanal slično agonistima i pojačavaju njegovu aktivnost. Faktori koji utiču na aktivnost ovih kanala su pH, G-protein i GMP.



Slika 8. Prikaz građe $\text{BK}_{\text{Ca}}^{2+}$ kanala

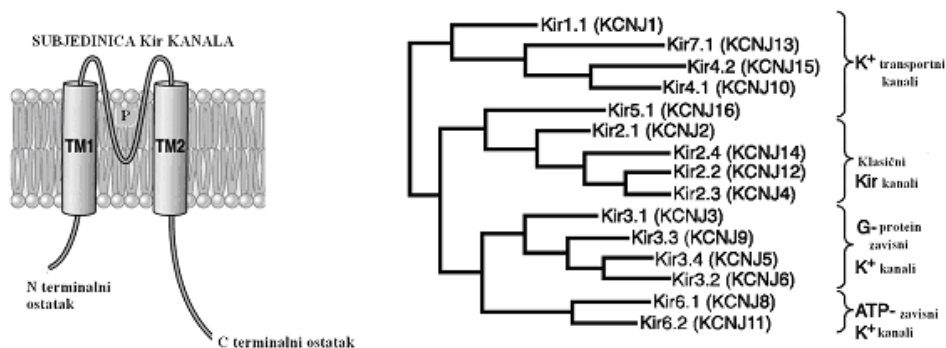
(Preuzeto i prilagođeno iz: Warmke JW, Ganetzky B, Proc Natl Acad Sci U S A.1994;91(8):3438-3442).

1.3.1.3. K^+ kanali sa dva transmembranska segmenta i jednom porom (2TM/1P)

Ovom tipu K^+ kanala pripadaju ulazno-ispravljački K^+ kanali (Kir), ATP-zavisni kanali (K_{ATP}), kao i bakterijski KcsA kanal. 2TM/1P su organizovani u tetramere kao i Kv kanali¹¹², mada je opisan i kompleksniji oktamerni raspored, kao u slučaju K_{ATP} . Kanali koji pripadaju ovom podtipu imaju 4 unutrašnja ispravljača koji doprinose provođenju jona kroz poru i 4 periferna sulfonilurea receptora kao regulatorne subjedinice¹¹³.

1.3.1.3.1. Ulazno- ispravljački K⁺ kanali

Ulazno ispravljački K⁺ kanali (Kir kanali) pripadaju tipu kanala sa 4 subjedinice od kojih svaka sadrži 2 transmembranska segmenta (TM1 i TM2) i petlju pore između njih (S1.9)¹¹⁴⁻¹¹⁵.



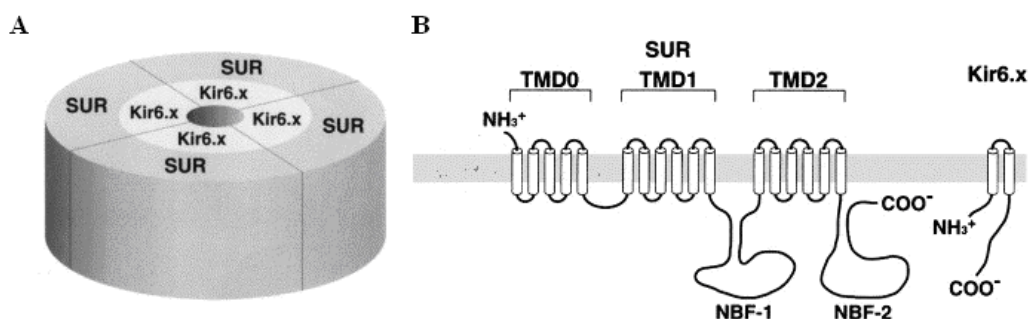
Slika 9. Osnovna struktura i filogenetsko stablo Kir kanala.

(Preuzeto i prilagođeno iz: Hibino H, Inanobe A, Furutani K et al, *Physiol Rev.* 2010,90: 291–366.)

Segmenti S5 i S6 su iste strukture kao kod Kv kanala. Postojanje β subjedinica nije utvrđeno. Postoji 6 familija Kir kanala (Kir1 – Kir6). Gustina Kir u srcu je različita, najveća je u pretkomorama, pa u Purkinjeovim ćelijama i komorama, dok ih u SA i AV čvoru nema. Ovi kanali se aktiviraju u toku maksimalne hiperpolarizacije (faza 4), tj. u toku repolarizacije i obezbeđuju povratak K⁺ jona u ćeliju, igrajući bitnu ulogu u uspostavljanju PM⁹³. Ovo tzv. ulazno ispravljanje se pripisuje "gating" mehanizmu koji uz pomoć intraćelijskog Mg²⁺ i poliamina (spermina, spermidina, itd.) onemogućava pristup unutrašnjem otvoru (*vestibulum*) pore K⁺ jonima iz citoplazme¹¹⁶⁻¹¹⁷. Neki podtipovi Kir kanala mogu se aktivirati posredstvom G proteina, KirACh (KACh)¹¹⁸. Oni se nalaze u SA i AV čvoru, Purkinjeovom sistemu i pretkomorama. U ćelijama mišića pretkomora i komora oslobođeni acetilholin (ACh) se vezuje za muskarinske receptore tipa 2 koji su u vezi sa G proteinom, a ne za Kir. Posle direktnog vezivanja za β i γ subjedinice G proteina (G $\beta\gamma$) aktivira se struja I_{KACh} ¹¹⁹. I_{KACh} smanjuje spontanu depolarizaciju (*pacemaker* aktivnost) u srcu i usporava srčani ritam¹²⁰. Muskarinska stimulacija I_{KACh} može da suprimira aritmije i delimično tahikardije.

1.3.1.3.2. ATP-zavisni K⁺ kanali

ATP-zavisni Kv kanali (K_{ATP}) prvi put su otkriveni u miokardu¹²¹, a zatim i u β ćelijama endokrinog pankreasa u kojima su odgovorni za lučenje insulina. Kasnije su otkriveni i u glatkim i skeletnim mišićima, mozgu i nervnim završecima¹²²⁻¹²³.

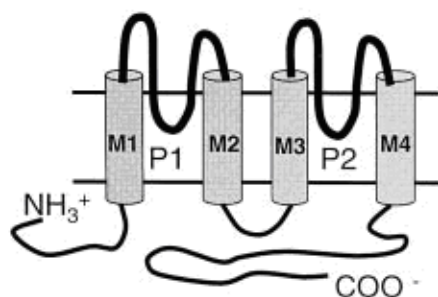


Slika 10. Molekulska struktura K_{ATP} kanala. **A)** raspored regulatornih sulfonilurea subjedinica (SUR1 ili SUR2) i Kir6.x tetramera koji okružuju poru kanala u membrani **B)** Stehiometrija membranskih subjedinica u K_{ATP} kanalu
(Preuzeto i prilagođeno iz: Seino S, Miki T, Prog Biophys Mol Biol. 2003; 81(2):133-76)

K_{ATP} kanali su Ca²⁺- i voltažno-nezavisni i njihova uloga u tkivu glatkih mišića još uvek u potpunosti nije objašnjena. U zavisnosti od topologije tkiva, detektovano je više podtipova ovih kanala¹²⁴ koji su označeni brojevima od 1 do 5¹²⁵. Kanal je strukturno gledano oktamer (Sl.10) koji čine 4 Kir6.x jedinice (Kir6.1 ili Kir6.2 jedinice) i 4 tzv. operativne jedinice sulfonilurea receptora (SUR: SUR1, SUR2A i SUR2B). SUR jedinica je odgovorna za aktivaciju kanala i njegovu osetljivost na endogene i farmakološke agense. Kir6.2 jedinica predstavlja poru za koju se vezuje anjon ATP⁴⁻ i blokira kanal. Postoji više podtipova K_{ATP} kanala: srčani (Kir6.2/SUR2A), vaskularni (Kir6.1/SUR2B), pankreasni, neuronski (Kir6.2/SUR1) i glatkomišićni (Kir6.2/SUR2B). Funkcije ovih kanala su brojne: deluju kardioprotektivno za vreme ishemijske, neuroprotektivno za vreme hipoksije, učestvuju u inhibiciji oslobađanja neurotransmitera sa perifernih i centralnih neurona, regulišu vaskularni i glatkomišićni tonus i sekreciju insulina¹²⁶.

1.3.1.4. K⁺ kanali sa četiri transmembranska segmenta i dve pore

Kanali sa četiri transmembranska segmenta (kasno ispaljivački Kv kanali) su skorije otkrivena familija Kv kanala (Sl.11)¹²⁷.

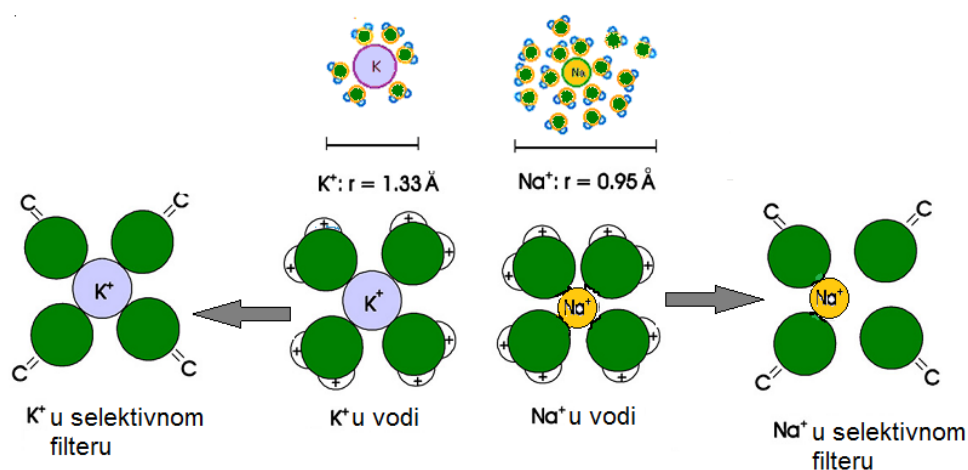


Slika 11. Prikaz građe K^+ kanala sa četiri transmembranska segmenta i dve pore (Preuzeto i prilagođeno iz: Shieh CC, Coghlan M., Sullivan JP et al., *Pharmacol Rev* 2000, 52:557–593.)

Kasno ispravljački K_V kanali detektovani su u koronarnoj i pulmonalnoj arteriji, veni porti kunića¹²⁸ i psećoj traheji¹²⁹. Ovi kanali se brzo otvaraju posle depolarizacije i igraju bitnu ulogu u njenoj reverziji. Kažić i saradnici navode da se ova struja sastoji iz dve komponente: IK_S - koja se sporo aktivira i pojačava pri stimulaciji simpatikusa i IK_R - koja se brzo aktivira i ne menja pri stimulaciji simpatikusa¹³⁰. Prolazno ispravljački kanali (K_A) se aktiviraju posle depolarizacije, ali se brzo inaktiviraju na početku hiperpolarizacije pa verovatno nemaju značajnu ulogu u reverziji AP-a¹³¹. Pretpostavlja se da oni snižavaju prag za nastanak depolarizacije i tako usporavaju frekvenciju AP-a. Nađeni su u pulmonalnoj arteriji¹³² i veni porti kunića¹³³.

1.3.2. Selektivnost i provodljivost

Dve bitne karakteristike svakog jonskog kanala su selektivnost i provodljivost. U zavisnosti od toga da li provode katjone ili anjone, jonski kanali se dele na katjonske i anjonske. Na tzv. ulaznim vratima (*gate*) katjonskih kanala nalaze se negativno naelektrisani aminokiselinski ostaci koji povećavaju koncentraciju katjona iz ekstracelularne tečnosti (prvenstveno Na^+ , Ca^{2+} , K^+). Na samom ulazu svi joni slobodno difunduju iz ekstracelularnog prostora zadržavajući svoju hidratacionu sferu. K^+ kanal nasuprot gradijentu koncentracije ubacuje K^+ jon u ćeliju. Joni čiji je poluprečnik veći od K^+ su isuviše veliki da prođu kroz kanal. Međutim, joni koji se u najvećoj koncentraciji nalaze u vanćelijskoj tečnosti, a koje treba sprečiti da uđu u ćeliju su joni Na^+ . U ćelijskim tečnostima joni su okruženi molekulima vode i oko njih se formira tzv. **hidrataciona sfera** (vodeni omotač). Veličina hidratacione sfere zavisi od energije solvatacije kao i koordinacionog broja jona metala.

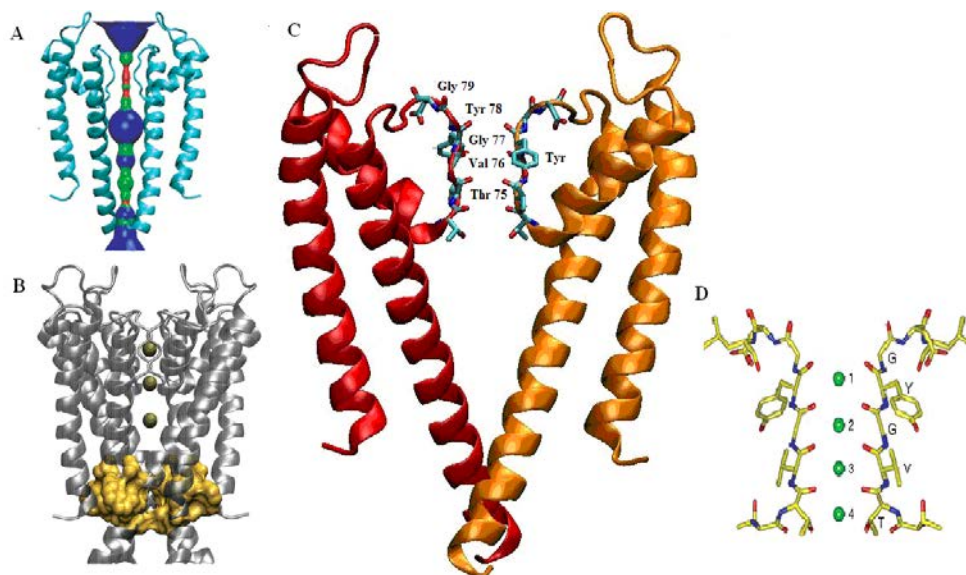


Slika 12. Joni K^+ i Na^+ u njihovim hidratacionim sferama u ekstracelularnom i intracelularnom prostoru i delu selektivnog filtera K^+ kanala

Natrijumov jon je manji od kalijumovog (jonski radijus K^+ je 1,33 Å, a Na^+ 0,95 Å, Sl.12), ali njegova energija solvatacije je daleko veća (Na^+ -105 kJ/mol, K^+ -85 kJ/mol), pa jače privlači molekule vode oko sebe gradeći veću hidratacionu sferu iz koje ga je teže izvući¹³⁴. Četiri identične α subjedinice K^+ kanala prolaze kroz membranu formirajući dvostruki konus koji je sa spoljašnje i unutrašnje strane membrane proširen tako da kanal strukturno podseća na peščani sat (Sl.13A)¹³⁴. Svaka subjedinica ima dva duža transmembranska dela i jedan kraći. Spoljašnji deo konusa formira po jedan duži deo svake subjedinice, dok preostali delovi prave unutrašnji konus, okružujući kanal i praveći jonski filter. Kraći α heliksi na oko 2/3 puta kroz membranu polako sužavaju kanal za oko 3 Å u prečniku, što obezbeđuje čvrstu interakciju između proteina i jona koji prolaze. Ovaj najuži region pore kanala naziva se **selektivni filter** (*selectivity filter*). Kako selektivnost filtera praktično određuje tip kanala, on mora da sadrži *konzervisanu* aminokiselinsku sekvencu. Sekvenca u regionu pore KcsA je sledeća:

...*Ala-Phe-Trp-Trp-Ala-Val-Val-Thr-Met-Thr-Thr-Val-Gly-Tyr-Gly-Asp-Met-Thr...*¹³⁵

(zadebljana slova označavaju konzervisane aminokiseline).



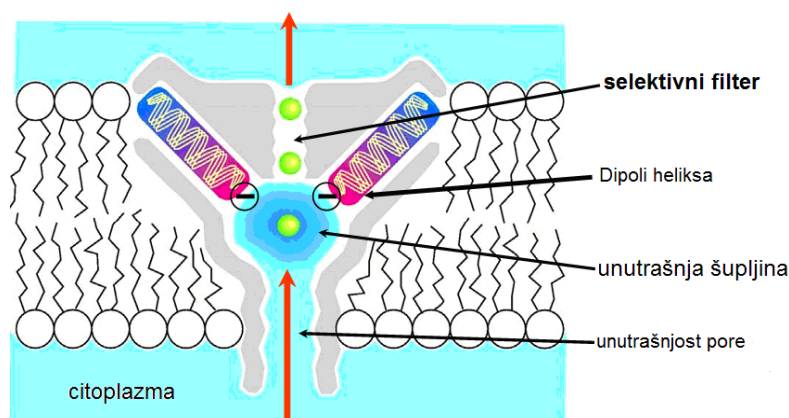
Slika 13. A) Izgled K^+ kanala kao pešćanog sata, B) trodimenzionalna struktura kanala, položaj jona u kanalu, C) selektivni filter KcsA kanala sa konzervisanom aminokiselinskom sekvencom D) Mesta vezivanja K^+ jona u kanalu.

(Preuzeto i prilagođeno iz: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/channels.pdf>)

U ovoj sekvenci uočljivo je da prevladaju aminokiseline sa hidrofobnim bočnim ostatkom, što je pomalo neočekivano za jedan katjonski kanal. Takođe je interesantan veliki broj *konzervisanih* aromatičnih aminokiselina (*Phe*, *Tyr* i *Trp*) u regionu pore. Mak Kinon i saradnici su prepostavili da su privlačne interakcije između katjona i aromatičnog prstena (katjon- π interakcije) odgovorne za selektivnost K^+ kanala¹³⁶. U prilog njihovim tvrdnjama išla je činjenica da je deo koji je najodgovorniji za selektivnost kanala upravo *konzervisana* sekvenca... *Gly-Tyr-Gly*... (*GYG*). Ukoliko se tirozin (*Tyr*) zameni nekom drugom aminokiselinom kanal gubi svoju selektivnost. Pretpostavljeno je da se na ulazu u kanal nalaze četiri fenil grupe iz četiri *Tyr* svake subjedinice koje katjon- π interakcijama izvlače jon K^+ iz svoje hidratacione sfere i *ubacuju* ga u unutrašnjost kanala. Međutim, kada je određena struktura K^+ kanala, ovaj mehanizam je odbačen.

Druga pretpostavka u vezi sa selektivnošću K^+ kanala je da karboksilni kiseonikovi atomi iz peptidnog lanca formiraju prsten tačno određenih dimenzija za kompleksiranje K^+ jona²³. Iako se u izolovanoj kristalografskoj strukturi KcsA kanala pojedini atomi peptidnog lanca ne mogu jasno uočiti, vidljivo je da je *Tyr* bočni ostatak usmeren od lumena kanala ka proteinu i nije u mogućnosti da ostvaruje π -katjon interakciju sa jonima K^+ koji prolaze kroz kanal (Sl.13C). Međutim, karbonilne grupe aminokiselinskih ostataka iz heliksa pore (iz svake podjedinice) obrazuju prsten od

kiseonikovih atoma koji definiše mesto za vezivanje katjona. Karbonilne grupe, čiji je dipolni momenat veći od dipolnog momenta vode, zamenjuju molekule vode iz sfere i zatvaraju K^+ jon u prsten. Joni Na^+ su isuviše mali za kontakt sa kiseoničnim ligandom, te zbog nepovoljne interakcije karbonilne grupe nisu u stanju da savladaju energetska barijeru $Na^+/voda$. Natrijumov jon i dalje ostaje delom hidratisan pa je njegova energija za interakciju manja (Sl.12). Natapanje kristala sa Rb^+ jonima (čija se propustljivost kroz membranu može meriti) i izračunavanje razlike elektronskih gustina omogućilo je identifikaciju mesta gde se joni nalaze (Sl.13A, B, C). Pretpostavka da ostatak proteina ima ulogu da održava **Gly-Tyr-Gly** karbonilne grupe u optimalnom položaju za vezivanje K^+ jona i da sprečava strukturu da se prilagodi za vezivanje Na^+ jona, teško je ostvariva za jedan tetramerni protein koji se nalazi uronjen u ćelijsku membranu. Za to je zadužen upravo *Tyr*. On se vodonično vezuje za treonin (*Thr*) iz heliksa pore i stupa u povoljne *van der-Wals*-ove interakcije sa drugim *Thr* iz heliksa pore susedne podjedinice. Ovakvo uređivanje preneseno na sve četiri podjedinice daje jedan veliki *prsten aromatičnih aminokiselina*. Ovaj tzv. *sloj opruga* drži karbonilne kiseonikove atome na optimalnom rastojanju za vezivanje K^+ jona. To ukazuje na činjenicu da je *Thr* u heliksu pore takođe konzervisana amino kiselina u svim K^+ kanalima (Sl.13C). Elektrostatička izračunavanja pokazala su da kada se jon kreće kroz membranu, on mora da prođe kroz energetska barijeru koja je najveća u sredini membrane¹³⁴. Dielektrična konstanta sredine je na tom mestu najmanja i to je vrlo nepovoljna situacija u kojoj jon može da se nađe. Naravno, priroda je našla rešenje i za taj problem. Odmah ispod selektivnog filtra kanal se širi, praveći šupljinu sa hidrofobnim zidovima koja sadrži *bazen* vode (Sl.14).



Slika 14. Mehanizmi stabilizacije katjona u središtu membrane.

(Preizeto i prilagođeno iz: Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, et al Science, 1998, 280:69-77)

Jon koji se nalazi u tom delu kanala solvatisan je molekulima vode koji se nalaze u šupljini. Heliks pore orijentiše negativne krajeve svog dipola ka šupljini u kojoj se nalazi jon i na taj način ga dodatno stabilizuje¹³⁴. Pored toga što je selektivan, K^+ kanal omogućava i veliki fluks K^+ jona (10^8 jona/sek.). Postoje četiri potencijalna mesta vezivanja K^+ jona¹³⁸. Kretanje K^+ i vode kroz poru kanala se odvija između dva energetska stanja: prvo stanje obezbeđuje vezivanje strukture K^+ -voda- K^+ -voda i naziva se 1,3 (brojevi označavaju mesta za koja se vezuju K^+ joni u pori kanala). Drugo stanje obezbeđuje vezivanje strukture voda- K^+ -voda- K^+ i obeležava se kao 2,4.

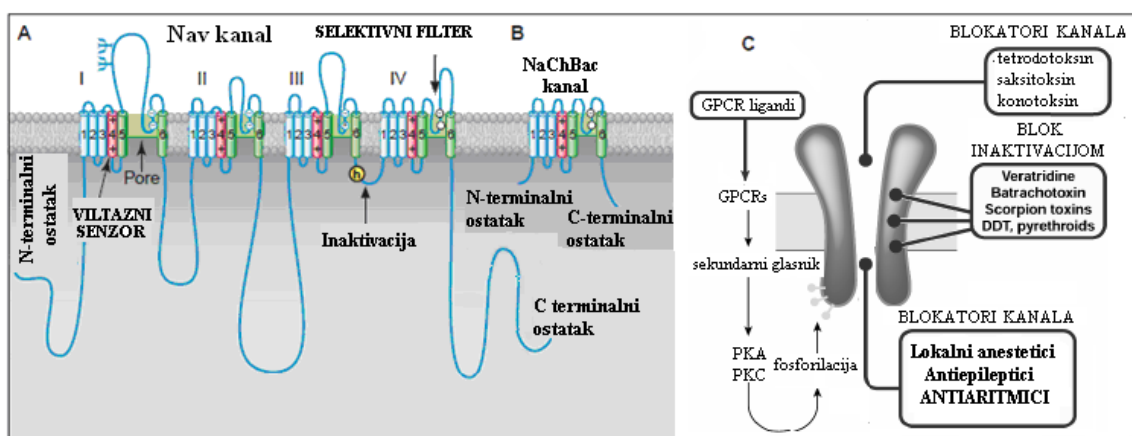
Razlika u slobodnoj energiji između ova dva stanja je veoma mala i iznosi 5 kcal/mol (Sl.13D). Kada je koncentracija K^+ jona u ekstracelularnoj tečnosti veća od 20 mmol/l na selektivnom filtru se nalaze dva jona K^+ koja su razdvojena molekulom vode¹³⁹. Elektrostatičko odbijanje između bilo koja dva jona istoimenog naelektrisanja na susednim mestima je veoma veliko (oko 40 kcal/mol). Prema tome, vezivanje drugog jona destabilizuje prvi jon i gura ga dalje kroz poru. Drugi jon zauzima mesto prvog, a treći jon ulazi u poru kanala. Ovo odbijanje jona istoimenog naelektrisanja sprečava da jedan od njih bude duže vremena vezan za karbonilne grupe (max 10-100 ns), te se time obezbeđuje konstantan tok jona kroz kanal u definisanom pravcu¹³⁹⁻¹⁴⁰. Struktura K^+ kanala poslužila je kao osnov za proučavanje građe drugih jonskih kanala, kao što su natrijumov i kalcijumov kanal.

1.3.3. Natrijumski kanali (Na^+ kanali)

Tokom evolutivnog razvoja transmembranskih proteina koji grade Na^+ jonske kanale izdvojile su se tri grupe ovih kanala: voltažno-zavisni Na^+ kanali (Na_v), voltažno-nezavisni epitelijalni Na^+ kanali i Na^+ kanali uključeni u aktivni transport Na^+/H^+ i $Na^+/glukoze$ ¹⁴¹. Voltažno-zavisni Na^+ kanali imaju važnu ulogu u generisanju i širenju AP-a u ekscitabilnim ćelijama kao što su neuroni, miociti i endokrine ćelije¹⁴². Za vreme membranskog potencijala mirovanja, Na^+ kanali su zatvoreni, ali kada dođe do depolarizacije ćelijske membrane Na_v kanali se otvaraju i joni ulaze u ćeliju u pravcu elektrohemijskog gradijenta. Ulazak Na^+ jona u ćeliju dovodi do stvaranja pozitivnog potencijala sa unutrašnje strane ćelijske membrane, što uslovljava otvaranje drugih jonskih kanala (K^+ i Ca^{2+}). Struja Na^+ jona (I_{Na}) je vrlo brza i snažna (10^7 jon/sek.), te

dovodi do brze depolarizacije pretkomora, His-Purkinjeovog snopa i komora, što je bitno za sinhronizovano funkcionisanje komora za vreme sistole kada se pune krvlju. Kanali su otvoreni 1-2 msek. Depolarizacija koja dovodi do otvaranja Na^+ kanala istovremeno dovodi i do konformacione promene kanala iz aktivnog u inaktivno stanje. U inaktivnom stanju kanal ne može ponovo da se otvori i u tom stanju ostaje dok se repolarizacija ne završi¹⁴¹⁻¹⁴². U stanju mirovanja, kanali su zatvoreni i u tom slučaju može doći do njihove aktivacije. Strukture Na^+ kanala u sva tri konformaciona stanja su analogne strukturama K^+ kanala dobijenih kristalografskom analizom^{23, 142}. U daljim istraživanjima to je omogućilo pravljenje homologih kompjuterskih modela i verodostojniju simulaciju procesa koji se dešavaju tokom interakcija lek-kanal^{141,143}.

Voltažno-zavisni Na^+ kanali su makromolekularni, polipeptidni kompleksi koje čini α subjednica i jedna ili više manjih β subjednica¹⁴⁴(Sl.15).



Slika 15. Strukture voltažno-zavisnog Na_v i NaChBac kanala: A) struktura α -subjedinice, B) struktura NaChBac , bakterijskog voltažno-zavisnog Na^+ kanala, C) grafički prikaz ciljnih mesta vezivanja lekova u pori kanala

(Preuzeto i prilagođeno iz: Catterall WA. Physiology. Science. 2001;294(5550):2306-2308)

Alfa subjednica (260 kDa) je odgovorna za transport jona kroz membranu, jer se na njoj nalaze sva tri funkcionalna elementa kanala: pora sa selektivnim filtrom, voltažni senzor i inaktivaciona vrata, kao i mesta za vezivanje odgovarajućih liganada¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. Biohemijskim i elektrofiziološkim ispitivanjima, kao i strukturnom analizom potvrđeno je da α subjednicu čine četiri domena povezana intracelularnim, uvijenim petljama kvazi simetrično raspoređena oko osmougaone pore¹⁴⁶. Svi domeni su slične građe i sadrže šest spiralno uvijenih transmembranskih segmenata (S1-S6), region pore, N- i C-terminalne ostatke¹⁴⁷(Sl.15). Voltažni senzor se nalazi na S4 segmentu sva četiri domena i čine ga naelektrisane aminokiseline (lizin (*Lys*), arginin

(Arg), aspartat (Asp) i glutamat (Glu)) i dva hidrofobna ostatka¹⁴². Pomeranje heliksa S4 uslovljava otvaranje kanala. Kompleksna proteinska građa Na_v kanala otežava identifikaciju njegove trodimenzionalne strukture u celini, ali u novije vreme izolovani su i primenom NMR spektroskopije okarakterisani pojedini delovi kanala¹⁴⁸. Na taj način je rešena struktura *inaktivacione čestice* ili *kapije* (*inactivation particle or gate*) koja specifičnim mehanizmom zatvara kanal. Inaktivaciona čestica ili kapija¹⁴⁹ nalazi se na intracelularnom delu kanala i predstavlja jedan loptasti protein koji kratkim polipeptidnim lancem povezuje III i IV domen¹⁵⁰ (Sl.15). Od dužine polipeptidnog lanca zavisi koliko dugo će kanal biti otvoren. Inaktivacionu kapiju grade hidrofobni aminokiselinski ostaci (izoleucin (*Ile*), fenilalanin (*Phe*) i metionin (*Met*)), odgovorni za brzu inaktivaciju Na⁺ kanala. Inaktivacija takođe zavisi i od aminokiselinskih ostataka (valin (*Val*), izoleucin (*Ile*) i leucin (*Leu*)) S6 segmenta IV domena za koji se inaktivaciona kapija vezuje kada je zatvorena¹⁴².

Između S5 i S6 segmenta svakoga domena aminokiselinski lanac pravi ekstracelularnu petlju. Ove četiri petlje formiraju osmougaonu poru kroz koju ulaze joni Na⁺. Na ekstracelularnom delu pore, gde se petlja uvija i uvlači u transmembranski region, nalazi se jon selektivni filter (Sl.15) sa konzervisanom aminokiselinskom sekvencom **DEKA** (*Asp-Glu-Lys-Ala*), tzv. *DEKA locus*¹⁵¹⁻¹⁵². Rezultati dobijeni u mutagenim studijama pokazuju da ove četiri aminokiseline moraju biti međusobno različite kako bi jon selektivni filter bio asimetričan i na taj način propustljiviji za jone Na⁺ pored drugih katjona¹⁵³. Selektivni filter razdvaja užu ekstracelularni deo pore (ciljno mesto za vezivanje toksina) od šireg intracelularnog dela pore (ciljno mesto za vezivanje lokalnih anestetika i antiaritmika I grupe)¹⁵⁴ (Sl.15C). Mutacijama u *konzervisanoj* aminokiselinskoj sekvenci selektivnog filtra Heineman i saradnici¹⁵⁵ su dobili Ca²⁺-zavisni Na⁺ kanal u kome konzervisanu aminokiselinsku sekvencu čine četiri identična aminokiselinska ostatka (*EEEE* tj. *Glu-Glu-Glu-Glu*, glutamatni ostaci). Ovo saznanje potvrdilo je činjenicu da bakterijski NaChBac kanal (Sl.15B) upravo u selektivnom filtru ima *EEEE* aminokiselinsku sekvencu i da ga blokiraju dvovalentni katjoni, ali ne i tetradotoksin (TTX)¹⁵⁶. Otkriće bakterijskog Na⁺ kanala koji se sastoji od jednog domena sa šest transmembranskih segmenata potencijalno obezbeđuje novi model za proučavanje strukture i funkcije Na_v kod sisara. Jednostavna struktura kanala pruža mogućnost kristalografske analize kao što je to bio slučaj sa strukturom

bakterijskog KcsA kanala²³. Treba imati u vidu činjenicu da je NaChBac voltažno-zavisan homotetramer koji se 100 puta sporije inaktivira u odnosu na Na_v, jer nema strukturni element koji bi odgovarao inaktivacionoj kapiji kod Na_v kanala¹⁵⁷. Do sada je funkcionalno okarakterisano devet α subjedinica (Na_v1.1-Na_v1.9) i deseta srodna izoformna struktura Na_x kanala, koja takođe može da provodi struju Na⁺ jona. Subjedinica β_1 je kovalentnom vezom vezana za α subjedinicu i znatno je manja od nje (33-36 kDa). Smatra se da β_1 subjedinica na neki način doprinosi normalnom funkcionisanju α subjedinice, ali kao takva ne učestvuje u transportu jona¹⁵⁸.

Za razliku od Na⁺ kanala u CNS koje čine α , β_1 i β_2 subjedinice¹⁴⁴ u srcu se nalaze Na_v kanali (Na_v1.5 i Na_x)^{145, 159}. Primena TTX koji se vezuje za α subjedinicu na ekstracelularnom delu kanala i tako blokira sprovođenje Na⁺ jona kroz kanal (SI.15C) pomogla je da se razdvoje dva podtipa Na⁺ kanala u sarkolemi srca. Dominanti podtip Na⁺ kanala odgovoran za 0 fazu AP-a je TTX-nezavisan i inaktivira se u fazi 2. Drugi podtip Na⁺ kanala, TTX-zavisan, ne inaktivira se u fazi 2, već kroz njega i dalje sporo ulaze joni Na⁺ u srčanu ćeliju u pravcu gradijenta koncentracije¹⁵⁹. Antiaritmici blokiraju Na⁺ kanale u stanju aktivacije, ređe u inaktivnom stanju, a ne mogu da blokiraju kanal u stanju mirovanja^{143, 145, 160}. Najveća osetljivost Na⁺ kanala na dejstvo antiaritmika je u trajno depolarizovanom tkivu zahvaćenom ishemijom. Zato u terapijskim koncentracijama antiaritmici I grupe prevashodno deluju samo na one delove miokarda u kojima se generiše povećan broj impulsa, pa je zbog toga u njima veći broj kanala otvoren. Lek se vezuje u fazi 0 AP-a, a disocira sa mesta vezivanja do pojave novog AP-a. Ekstrasistola koja se javlja između dva normalna AP-a biće inhibirana jer je kanal blokiran i ne može da se aktivira. Antiaritmici Ic klase blokiraju Na⁺ kanale u aktivnom stanju, tako da nisu specifični za ishemičan miokard. Oni prouzrokuju opštu supresiju ekscitabilnosti ćelije, što predstavlja povoljan efekat u terapiji aberantnih i *re-entry* fenomena⁹³. Ib grupa prevashodno blokira Na⁺ kanale u inaktivnom stanju odnosno za vreme ćelijske repolarizacije što se dešava u ishemiji, te se zato ova grupa antiaritmika koristi u kontroli ventrikularnih aritmija koje su posledica infarkta miokarda⁹³. Supstance koje aktiviraju Na_v kanale su biljni otrovi (veratridin i akonitin) ili toksini životinjskog porekla koji imaju toksikološki značaj ili se koriste u eksperimentalnom radu. Oni produžavaju vreme aktivacije Na⁺ kanala i do 100 puta, što dovodi do nekontrolisanog nakupljanja Na⁺ jona u ćelijima i fatalne fibrilacije srčanih

komora¹⁶¹. Akonitin je diterpenski alkaloidi, filokladenskog tipa izolovan iz jedića (*Aconiti tuber*, *Aconitum pentheri* Hayek, *Ranunculaceae*). Može biti u slobodnom obliku kao amino alkoholi ili kao bis ester sa sirćetnom i benzojevom kiselinom. Iako prouzrokuje slično analgetsko dejstvo kao i lokalni anestetici (kokain, prokain, benzokain) sam mehanizam dejstva akonitina je drugačiji. Akonitin se vezuje za neurotoksinsko receptorsko mesto na α subjednici Na_v u blizini ekstracelularnog dela kanala (Sl. 15C). i sprečava konformacione promene koje aktivni kanal vode u inaktivno stanje. Usled konstantnog priliva Na^+ jona membrana ostaje depolarizovana (nije u mogućnosti da se repolarizuje). Vezivanje akonitina za kanal dovodi i do konformacione promene kojom kanal pri negativnom membranskom potencijalu iz inaktivnog prelazi u aktivno stanje. Za ove receptore vezuju se mnogi neurotoksini koji deluju slično akonitinu: TTX (moćni paralitički otrov Fugu ribe), batrahotoksin (nalazi se u koži jedne vrste kolumbijske žabe), otrovi škorpijona. Delujući na Na^+ kanale presinaptičkih neurona akonitin povećava oslobađanje, a time i koncentraciju Ach koji doprinosi aritmogenim efektima akonitina. Koncentracioni opseg od 0,16-0,25 $\mu\text{mol/l}$ dovodi do pojave polimorfne ventrikularne tahikardije (nađi rad Akonitin u referencama). Akonitin deluje i na respiratorni sistem dovodeći vremenom do otežanog disanja i paralize muskulature respiratornog sistema. Doza akonitina kojom se uobičajeno indukuje aritmija u ekperimentalnim modelima u zavisnosti od vrste i soja životinje varira od 10-50 $\mu\text{g/kg}$. Veće doze uglavnom dovode do brzih tahikardičnih napada, paralize disanja, povećanje salivacije i fatalnog ishoda. Smrtna doza akonitina za pacove je 120 $\mu\text{g/kg}$.

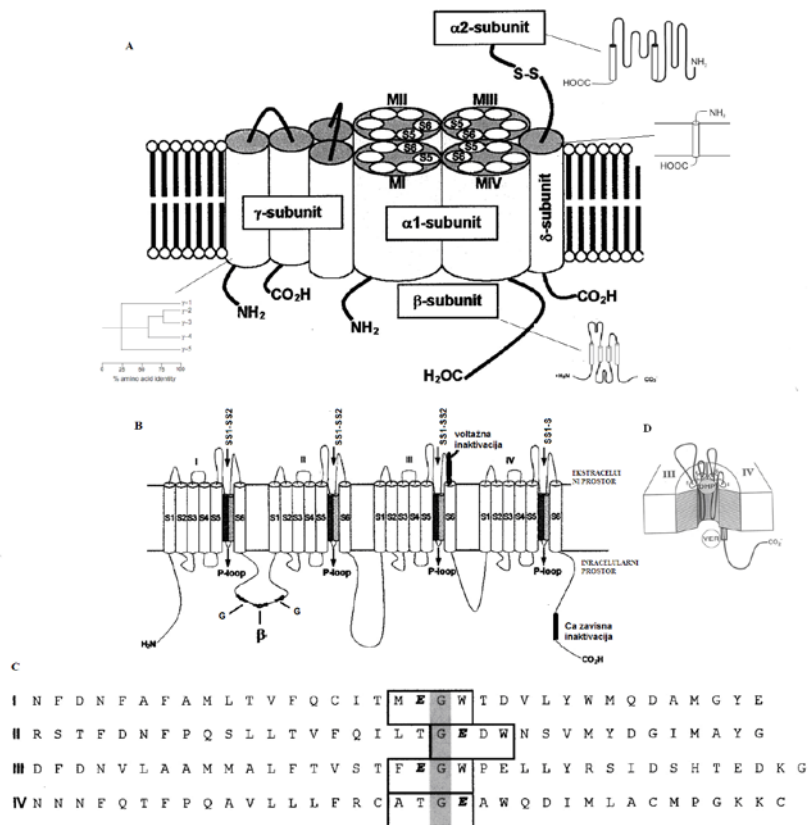
1.3.4. Kalcijumski kanali

Joni Ca^{2+} imaju ključnu ulogu u regulaciji mnogih ćelijskih funkcija: iniciraju kontrakciju mišića, omogućavaju oslobađanje neurotransmitera iz nervnih završetaka kao i hormona iz sekretornih ćelija, regulišu ekspresiju gena, uključeni su u regulaciju ćelijskog ciklusa^{93, 162-163}. Intracelularna koncentracija jona Ca^{2+} je znatno niža od ekstracelularne, kada se ćelijska membrana nalazi u stanju mirovanja. Tokom depolarizacije ćelijske membrane dolazi do influksa Ca^{2+} jona u ćeliju iz ćelijskih depoa preko voltažno-zavisnih i receptorskih kanala u ćelijskoj membrani, kao i ligand-

zavisnih kanala¹⁶³. Koncentraciju intracelularnog Ca^{2+} regulišu dva procesa. Prvi proces predstavlja razmena $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ kojom se tri Na^+ jona zamenjuju jednim Ca^{2+} jonom i stvara se hiperpolarišuća struja. Energija za uklanjanje jona Ca^{2+} dobija se iz elektrohemijskog gradijenta za Na^+ . To znači da će smanjenje gradijenta koncentracije za Na^+ smanjiti izlazak Ca^{2+} i dovesti do porasta koncentracije intracelularnog Ca^{2+} (posebno značajno za srčani mišić). Drugi proces uključuje tzv. Ca^{2+} pumpu (Ca^{2+} -zavisnu ATPazu) i predstavlja aktivni proces koji troši ATP¹⁶⁴.

1.3.4.1. Voltažno zavisni kalcijumski kanali

Voltažno zavisni Ca^{2+} kanali (Ca_v) prvi put su identifikovani pedesetih godina prošlog veka od strane Fatta i Katza¹⁶⁵. Kasnije su otkriveni i različiti podtipovi kanala u ekscitabilnim ćelijama, da bi osamdesetih godina prošlog veka proteinski kompleks Ca^{2+} kanala bio izolovan, prečišćen i strukturno okarakterisan¹⁶⁶. Glavna subjedinica proteinskog kompleksa Ca_v kanala je označena kao α_1 subjedinica. Ostale subjedinice su označene kao β , α_2 , δ i γ (Sl.16) i predstavljaju sekundarne subjedinice koje nisu uvek prisutne u svakom podtipu Ca^{2+} kanala (npr. γ subjedinica je prisutna i identifikovana samo u $\text{Ca}_v1.1$. podtipu kanala). Nakon toga je usledila faza kloniranja gena koji kodiraju pojedine subjedinice Ca^{2+} kanala¹⁶⁶. Analizom rezultata koji su dobijeni genskom mutacijom tokom devedesetih godina prošlog veka, precizno su identifikovana mesta vezivanja jedinjenja iz grupe dihidropiridina (DHP), fenilalkilamina (FAA) i benzotiazepina (BTZ), kao i mesta fosforilacije i mesta odgovorna za voltažnu i kalcijum-zavisnu aktivaciju i inaktivaciju kanala¹⁶⁷⁻¹⁶⁸.



Slika 16. **A)** Molekulska struktura proteinskog kompleksa Ca_v , **B)** prikaz građe transmembranskog dela α_1 subjedinice **C)** primarna aminokiselinska sekvenca P regiona, **D)** mesta vezivanja blokatora Ca kanala
 (Preuzeto i prilagođeno iz: A) Varadi,G., Strobeck,M., Koch,S.,et al. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*,1999,34: 181–214, B i C) Catterall,W.A. *Science*,1988,242: 50–61) D), Hitoshi N, Yasumaru H, Motohiko T et al. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 707, issue 1 *Molecular Bas*, pp. 349-351)

1.3.4.1.1. Klasifikacija voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala

Prva klasifikacija kanala bila je zasnovana na elektrofiziološkim i farmakološkim osobinama. Na osnovu ove klasifikacije razlikuju se dva tipa ili šest podtipova Ca^{2+} kanala. Prvom tipu kanala je potrebna mala depolarizacija membrane (-70 mV) da bi se kanali aktivirali. To su **niskim naponom aktivirani kanali** (*low-voltage-activated*, **LVA**). Uzimajući u obzir malu amplitudu provodljivosti i njeno brzo nestajanje, ovi kanali se brzo i potpuno inaktiviraju kada je MP pozitivan, te se zbog toga nazivaju i **T kanali** (mali (*tiny*) i prolazan (*transient*)¹⁶⁹. Lokalizovani su u miocitima srčanih komora, mozgu, plućima, bubrezima, endokrinim žlezdama, aorti i uključeni su u regulaciju pejsmejker aktivnosti ćelija SA čvora. Ovaj tip kanala je relativno neosetljiv na jedinjenja iz grupe kalcijumskih antagonista (derivati DHP).

Smatra se da ovi Ca^{2+} kanali imaju značajnu ulogu u nekim bolestima KVS-a kao što je hipertenzija¹⁷⁰.

Za aktivaciju drugog tipa kanala potreban je visok membranski potencijal (-20 mV). To su **visokim naponom aktivirani kanali** (*high-voltage-activated, HVA*)¹⁷¹. Aktivacija HVA kanala je spora, a amplituda provodljivosti velika i dugotrajna pa otuda i naziv **L kanali** (veliki (*large*) i dugotrajan (*long-lasting*)). Zajednička farmakološka karakteristika L kanala je da su svi osjetljivi na derivate 1,4-DHP koji blokiraju kanal, ali i na jedinjenja koja aktiviraju kanal (BayK 8644)¹⁷².

Osamdesetih godina prošlog veka identifikovani su i Ca^{2+} kanali koji se uglavnom nalaze u tkivima nervnog sistema. Prvi među njima su označeni kao **N kanali** (neuronski (*neuronal*)). Dalja podela N kanala na podtipove zasniva se na njihovoj osjetljivosti prema peptidima koji su izolovani iz toksičnih izlučevina puževa i paukova. Kanal osjetljiv na ω -konotoksin (GVIA) zadržao je svoju oznaku N kanal, dok kanal osjetljiv na ω -Aga IV A toksin nazvan je **P/Q tip Ca^{2+} kanala** (P po Purkinjeovim ćelijama iz kojih je ovaj kanal prvi put izolovan od strane Llinása i saradnika)¹⁷³. Kanali koji su rezistentni na ovaj toksin označeni su kao **R tipovi Ca^{2+} kanala** (rezistentan (*resistant*)).

Druga klasifikacija voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala uzima u obzir različito gensko kodiranje pojedinih tipova Ca^{2+} kanala tj. glavne α_1 subjedinice. Istraživanja su pokazala da su ove dve klasifikacije međusobno povezane.

1.3.4.1.2. HVA kalcijumovi kanali ili L- Ca^{2+} kanali

U fiziološkim uslovima L- Ca^{2+} kanali su selektivno propustljivi (1000:1) za dvovalentne katjone Ca^{2+} , Ba^{2+} i Sr^{2+} za razliku od jednovalentnih. L-kanali su heterooligomerni kompleksi u čiji sastav ulazi pet proteinskih subjedinica kodiranih od strane četiri gena (Sl.16A). Glavna α_1 subjedinica je lokalizovana u ćelijskoj membrani i formira poru kanala (Sl.16A i 16B). Za nju su preko određenih aminokiselinskih ostataka vezane sporedne subjedinice β , kompleksna α_2/δ i γ subjedinice¹⁶⁶⁻¹⁶⁷. α_1 subjedinica Ca_v je veliki protein mase od 212 do 273 kDa. Ona pripada istoj multigenskoj porodici koja kodira α subjedinice Na_v i Kv kanala¹⁶⁷.

Hidrofobnom analizom potvrđena je primarna proteinska struktura transmembranskog dela α_1 subjedinice sa četiri homologa transmembranska domena (I-IV) od kojih svaki sadrži šest segmenata (S1-S6) (Sl.16B). Segment S4 sadrži 5-6

pozitivno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka *Lys* i *Arg* (*K* i *R*) i tokom aktivacije Ca^{2+} kanala se pokreće, slično S4 segmentu kod *Kv* i *Na_v* kanala¹⁷⁴. Na osnovu strukturne analogije voltažno-zavisnih kanala, može se pretpostaviti da će i kod *Ca_v* S4 segment imati istu ulogu voltažnog senzora koji kontroliše jonsku sprovodljivost.

Četiri transmembranske petlje koje povezuju S5 i S6 segmente svakog domena formiraju poru kanala (P ili SS1-SS2 region, Sl.16B). Segmente SS1 sva četiri domena grade aminokiselinski ostaci karakteristični za α heliks, dok se za SS2 segment smatra da ima drugačiju sekundarnu strukturu i da ga grade nasumično raspoređene aminokiseline koje nisu zastupljene u α heliksu (*β -strand structure*). Na SS2 segmentu sva četiri domena nalaze se aminokiselinske sekvence *MEGW* (metionin-**glutamat**-glicin- triptofan), *GEDW* (glicin-**glutamat**-aspartat-triptofan), *FEGW* (fenilalanin-**glutamat**-glicin-triptofan) i *ATGE* (alanin-treonin-glicin-**glutamat**)) koje u vidu petlje povezuju SS2 sa SS1segmentom (Sl. 16B). Četiri blisko povezana glutamatna ostatka (*Glu* ili *E*) (Sl.16C, boldirano) se nalaze na odgovarajućim mestima i ponavljaju se u sva četiri domena pravilno. Njihovi negativno naelektrisani bočni lanci formiraju visoko afinitetno mesto za vezivanje jona Ca^{2+} tj. selektivni filter¹⁷⁵⁻¹⁷⁶. Ova struktura je potvrđena u mutagenim studijama u kojima su navedeni *Glu* ostaci zamenjivani *Lys*, *Asp* ili *Ala*, čime se gubila selektivnost kanala za dvovalentne jone¹⁷⁶. Neki strukturni i eksperimentalni dokazi idu u prolog činjenici da je *KcsA* kanal evoluciono prethodio L- Ca^{2+} kanalima. Koristeći potvrđenu strukturu *KcsA* kanala, Lipkin i Fozzard¹⁷⁷ su predložili molekularni model selektivnog filtra L- Ca^{2+} kanala. Ipak, značajne razlike između K^+ i Ca^{2+} kanala ukazuju na to da je građa njihovih selektivnih filtra potpuno drugačija i da *KcsA* kanal ne može biti dobar model za L- Ca^{2+} kanal.

Inaktivacija *Ca_v* kanala je voltažno- i Ca^{2+} -zavisna. Za Ca^{2+} -zavisnu inaktivaciju se zna da je odgovoran C-terminalni ostatak α_1 subjedinice (Sl.16B), dok se za voltažno-zavisnu inaktivaciju pretpostavlja da je odgovoran ekstracelularni deo petlje koja povezuje S5 i S6 transmembranske segmente¹⁶⁸(Sl. 16B). Na α_1 subjedinici nalaze se i mesta za vezivanje pojedinih aktivatora i blokatora kanala, G-proteina, protein kinaze C, protein kinaze A, Ca-kalmodulin zavisne kinaze i nekoliko mesta na kojima se vrši fosforilacija.

β subjedinica je intracelularna sporedna subjedinica koja je zastupljena zajedno sa α_1 subjedinicom u svim HVA kanalima što kod LVA kanala nije dokazano.

Identifikovane su četiri izoforme β subjedinice (β_1 - β_4) koje se razlikuju po građi N- i C-terminalnog ostatka¹⁶⁶.

Disulfidnom vezom ekstracelularna α_2 subjedinica povezana je sa transmembranskom δ subjedinicom i gradi kompleks $\alpha_2\delta$ ¹⁶⁷(Sl.16A). Preko δ subjedinice ovaj kompleks ostvaruje vezu sa ostalim subjedinicama u transmembranskom delu kanala. Strukturnom analizom je potvrđeno da ekstracelularni deo α_2 subjedinice obezbeđuje strukturne elemente potrebne za stimulaciju kanala¹⁶⁷, dok je δ subjedinica odgovorna za *prebacivanje* kanala iz voltažno-zavisnog aktivnog stanja u inaktivno stanje mirovanja (*steady-state inactivation*) kao i za modulaciju brzine inaktivacije kanala¹⁶⁷. Danas su poznata i klonirana tri podtipa α_2/δ kompleksne subjedinice.

γ subjedinica je protein koji se nalazi unutar ćelijske membrane. Devedesetih godina prošloga veka, dve nezavisne laboratorije izolovale su i prečistile γ subjedinicu iz skeletnog mišića kunića¹⁷⁸. Hidrofobnom analizom došlo se do zaključka da γ subjedinicu čine četiri transmembranska heliksa sa intracelularnim C- i N-terminalnim ostatcima (Sl.16A).

Ligandi za $L\text{-Ca}^{2+}$ kanal predstavljaju klinički značajna jedinjenja kako blokatora, tako i agonista. Blokatori Ca^{2+} kanala predstavljaju derivate 1,4-DHP, FAA i BTZ¹⁷⁹. Eksperimentalni rezultati dobijeni metodom fotoafinitetnog obeležavanja kao i studije mapiranja proteina jonskih kanala u skeletnim mišićima, potvrdile su da se sva tri tipa blokatora vezuju za transmembranski region kanala tj. IV domen α_1 subjedinice, a da se dodatna mesta vezivanja za DHP derivate nalaze na III i I domenu¹⁷⁹(Sl 16D). Ova mesta su veoma bliska i verovatno alosterički povezana, jer vezivanje diltiazema za α subjedinicu kanala povećava mogućnost vezivanja nifedipina za istu, dok vezivanje verapamila daje obrnuti efekat. U neposrednoj blizini mesta za vezivanje nifedipina nalazi se i mesto za vezivanje Ca^{2+} jona pa uklanjanje Ca^{2+} jona smanjuje afinitete za vezivanja nifedipina¹⁷⁹. Novija istraživanja pokazuju da S5 i S6 segment II domena i S6 segment IV domena čine mesto za vezivanje ova tri leka⁹³. Antagonisti kalcijuma su visoko lipofilne supstance i do mesta vezivanja na α subjedinici dolaze tzv. zaobilaznim putem. Slično lokalnim anestheticima difunduju kroz ćelijsku membranu, a zatim se sa unutrašnje strane vezuju za kanal. Blokatori Ca_v kanala blokiraju ove kanale u mnogo nižim koncentracijama nego receptor-zavisne Ca^{2+} kanale i time dovode do

vazodilatacije koja je izraženija u arteriolama nego u venama. Inluks Ca^{2+} jona u ćeliju mogu na indirektan ili direktan način da moduliraju i otvarači K^+ kanala (pinacidil, kromakalin, minoksidil, diazoksid i dr.), β -agonisti, kao i joni Mg^{2+} i Mg-ATP koji su važni modulatori funkcije L- Ca^{2+} kanala u srcu¹⁸⁰. Svi oni dovode do hiperpolarizacije membrane i inhibicije inluksa Ca^{2+} kroz L- Ca^{2+} kanale. Funkciju Ca^{2+} kanala u srcu značajno modifikuju i neurotransmiteri, hormoni, enzimi kao i lekovi koji deluju preko cAMP kao sekundarnog glasnika. Ova jedinjenja povećavaju broj Ca^{2+} kanala koji se tokom depolarizacije otvaraju, što za posledicu ima produženje plato faze AP-a, povećanje snage kontrakcije srčanog mišića i skraćenje njenog trajanja¹⁸¹.

U krvnim sudovima depolarizacija glatkih mišića zavisi od ulaska jona Ca^{2+} više nego od Na^+ jona, a kontrakciju reguliše koncentracija intracelularnog Ca^{2+} . Aktivacija L- Ca^{2+} kanala ne zavisi od cAMP kao u srcu, već od inozitol trifosfata (IP3) i diacetilglicerola (DAG), proizvoda aktivnosti sistema fosforilaze C koji mobilise Ca^{2+} jone.

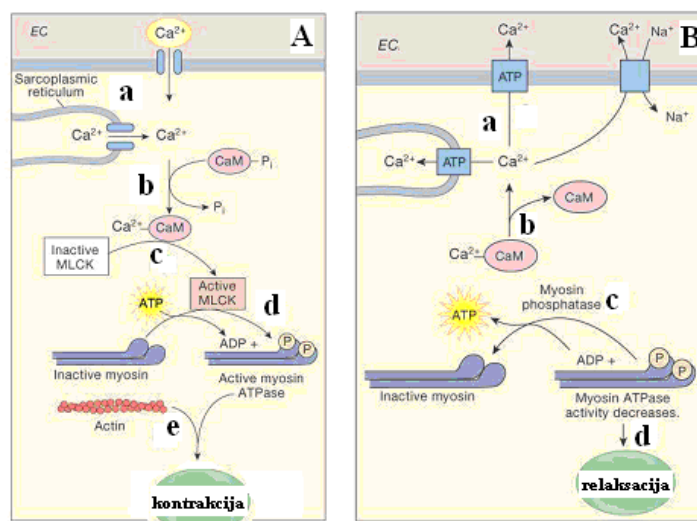
1.3.4.1.3. Biohemijski put kontrakcije glatkog mišića krvnog suda

Mišićna kontrakcija započinje povećanjem koncentracije intraćelijskog Ca^{2+} (Sl. 17Aa) nakon čega se formira kompleks Ca^{2+} -kaldmodulin (Sl.17Ab), aktivira kinaza lakog lanca miozina (MLCK) (Sl.17Ac) i fosforiliše laki lanac miozina (MLC) (Sl. 17Ad) koji interaguje sa aktinom i hidrolizuje ATP, oslobađajući energiju za kontrakciju (Sl.17Ae). Istezanje, neuralni i humoralni agensi dovode do depolarizacije sarkoleme i povećanja intracelularnog Ca^{2+} ulaskom ekstracelularnog Ca^{2+} i oslobađanjem vezanog intracelularnog Ca^{2+} . Četiri Ca^{2+} jona se vezuju za C-terminalni ostatak kaldmodulina gradeći kompleks koji aktivira MLCK, a zatim MLCK fosforiliše *Ser* na poziciji 19P MLC. Ova fosforilacija povećava brzinu interakcije aktin-miozin i pokreće inicijalnu fazu kontrakcije. Moguća je i fosforilacija *Thr* P lanca koja još više ubrzava kontrakciju. U odsustvu Ca^{2+} ova kinaza nije aktivna¹⁸²⁻¹⁸³. Fosforilacija MLC se povećava u toku inicijalne faze kontrakcije, a smanjuje u vreme održavanja izometrijske sile kontrakcije¹⁸²⁻¹⁸³.

1.3.4.1.4. Biohemijski put relaksacije glatkog mišića krvnog suda

Smanjenje koncentracije Ca^{2+} jona u ćeliji se dešava kombinacijom nekoliko procesa: inhibicijom IP3 kompleksa i inhibicijom oslobađanja Ca^{2+} iz IP3 senzitivnih

depoa, stimulacijom ATP-aze Ca^{2+} pumpe u sarkoplazmatičnom retikulumu i redukcijom oslobađanja Ca^{2+} iz njega, smanjenom osetljivošću kontraktilnih elemenata za Ca^{2+} , povećanjem frakcije Ca^{2+} vezanog za membranu, aktivacijom $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpe¹⁸²⁻¹⁸³. Kada se koncentracija intraćelijskog Ca^{2+} smanji (Sl.17Ba), smanjuje se i Ca^{2+} -kaldmodulin aktivacija. Odvajanje Ca^{2+} od kaldmodulina (Sl.17Bb) zaustavlja aktivnost MLCK (Sl.17Bc). Fosforilisane MLC, fosfataza defosforiliše i nastupa relaksacija¹⁸²⁻¹⁸³ (Sl.17Bd).



Slika 17. Biohemijski putevi kontrakcije (A) i relaksacije (B) u glatkom mišiću krvnog suda

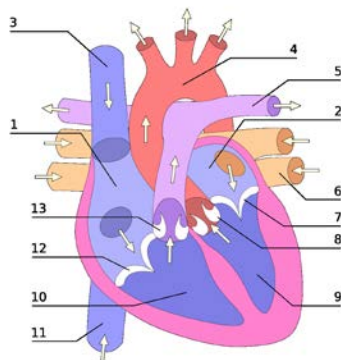
1.4. Srčane aritmije, elektrofiziologija, dijagnostika, lečenje

Svaki poremećaj normalnog sinusnog ritma srca (60 do 100 otkucaja/min. sa jednakim vremenskim razmacima) definiše se kao srčana aritmija. Srčane aritmije su vrlo čest problem u kliničkoj i lecarskoj praksi. One se mogu javiti povremeno kao asimptomatske ili mogu biti simptomatske i prouzrokovati klinički jasne hemodinamske promene koje mogu biti uzrok naprasne srčane smrti. Lečenje aritmija ima dva cilja: prekidanje postojećih aritmija i ublažavanje ozbiljnih simptoma, prevenciju novih epizoda aritmija i produžavanje života. U lečenju antiaritmicima, pored poznavanja farmakokinetike i mehanizma dejstva lekova, neophodno je i dobro poznavanje elektrofizioloških karakteristika i mehanizama nastajanja i održavanja srčane aritmije. U terapiji srčanih aritmija lekovi još uvek imaju važno mesto, iako se njihov značaj realno smanjuje. Za to postoje tri osnovna razloga: 1) negativni rezultati CAST (*Cardiac Arrhythmia Suppression Trial*) studije i saznanja da antiaritmici mogu delovati proaritmijski, naročito lekovi Ic grupe^{15,184}; 2) povećan rizik profilaktičke primene antiaritmika kod pacijenata posle infarkta miokarda; 3) usavršavanje nefarmakoloških metoda lečenja: elektrokonverzija, ugrađivanje elektrostimulatora (pejsmejкера i defibrilatora), radiofrekventna ablacija i operativno lečenje¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

1.4.1. Anatomska građa srca

Od početka svoje istorije ljudi smatraju srce plemenitim organom i za njega vezuju brojna magična i mitska verovanja. Najstarije naučne rasprave o srcu potiču iz staroegipatskog Eberskog rukopisa oko 1550. godine *p.n.e.* Antički grčki lekari su srce smatrali središtem *prirodne toplote* organizma u kome se krv prečišćava i greje. Napredak u poznavanju građe i funkcije srca učinili su sandrijski anatomi od IV do III veka *p.n.e.* Aleksandrijski anatomi su prvi opisali zaliske aorte i plućne arterije i donekle objasnili funkcije papilarnih snopova. Galen (129.-199.god.) je došao do zaključka da je srce pokretač krvi kroz krvne sudove. Preokret u poznavanju uloge srca nastao je otkrićem velikog krvotoka od strane engleskog lekara Vilijama Harvija (1578.-1657.god.)¹⁸⁸ koji je eksperimentalno dokazao da je srce pumpa koja po principu termodinamike pumpa krv. Velike arterije prihvataju krv koja se u srce vraća venama i tako srce svojim ritmičkim stezanjem i rastezanjem održava stalnu cirkulaciju krvi u organizmu¹⁸⁹.

Srce je šupalj poprečno-prugasti mišićni organ, konusnog oblika, smešten u sredogruđu između dva plućna krila. Srce leži u srčanoj kesi (*pericardium*) koja se sastoji iz **1.** spoljašnjeg dela (*pericardium fibrosum*) i **2.** unutrašnjeg dela (*pericardium serosum*). Na preseku kroz zid srca i srčanu kesu vide se tri sloja: 1. epikard (*epicardium*), spoljačni sloj 2. miokard (*myocardium*) srednji sloj izgrađen od poprečno-prugastih mišićnih vlakna i 3. endokard (*endocardium*) unutrašnji sloj izgrađen od tanke endotelne opne.



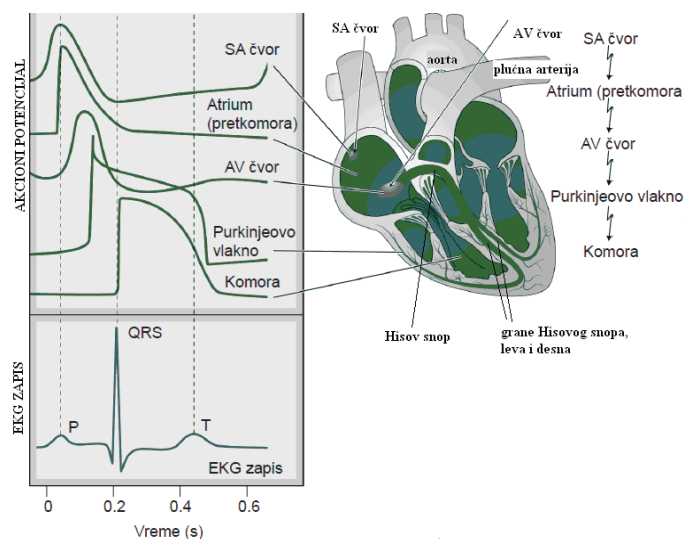
Slika 18. Anatomski građa ljudskog srca: **1.** desna pretkomora, **2.** leva pretkomora, **3.** gornja šuplja vena, **4.** aorta, **5.** plućna arterija, **6.** plućna vena, **7.** mitralni zalistak, **8.** aortni zalistak, **9.** leva komora, **10.** desna komora, **11.** donja šuplja vena, **12.** trolistni zalistak, **13.** plućni zalistak.

Na poprečnom preseku srca (Sl.18) uočavaju se četiri dela. Dve desne šupljine, pretkomore i komore (lat. *atrium dextrum et ventriculum dextrum*) sačinjavaju desno ili vensko srce. Leva pretkomora i komora (lat. *atrium sinistrum et ventriculum sinister*) čine levo ili arterijsko srce. Levo i desno srce u potpunosti razdvaja srčana pregrada (lat. *septum cordis*) i na taj način sprečava mešanje venske i arterijske krvi. Pretkomore i komore su odvojene fibroznom tkivom koje se nalazi oko valvularnih otvora. Otvori na arterijskim ušćima imaju ulogu da spreče vraćanje krvi iz arterija u komore. Na gornjoj i donjoj strani desne pretkomore nalaze se ušća gornje i donje šuplje vene (lat. *ostium v. cavae superioris et inferioris*). Na zadnjem zidu leve pretkomore nalaze se četiri ušća plućnih vena (lat. *v. pulmonales sinistra et vv.pulmonales dextra*). Srce je dvostruka mišićna pumpa koja nakon oksigenacije u plućima pumpa krv po celom organizmu pokrećući na cirkulaciju u krvnim sudovima dva odvojena i posebno zatvorena sistema sudova malog i velikog krvotoka (lat. *circulus sanguinis minor et circulus sanguinis major*). Kako je srce pumpa koja neprestano radi od velike je važnosti da bude stalno snabdeveno dovoljnom količinom krvi. Zato mišićni sistem srca poseduje poseban

krvotok tzv. *koronarnu cirkulaciju* koja se sastoji od arterija, arteriola, kapilara, venula i vena. Kada koronarni protok padne ispod onog koji je potreban da zadovolji metaboličke potrebe miokarda nastaje srčana ishemija praćena insuficijencijom srca, promenama u električnoj aktivnosti sprovodnog sistema srca, infarktom miokarda, anginom pectoris¹⁹⁰. Rad srca je regulisan na dva načina: autoregulacijom srčanog rada i putem autonomnog nervnog sistema¹⁹⁰. Stimulacijom *nervusa vagusa* oslobađa se Ach koji smanjuje frekvencu u SA čvoru, kao i nadražljivost vlakana koja povezuju mišiće pretkomora sa AV čvorom što za posledicu ima usporen prenos impulsa sa pretkomora na komore. Stimulacija simpatikusa povećava ukupnu aktivnost srca.

1.4.2. Elektrofiziološke karakteristike srca

Kontrakcijama miofibrila pretkomora i komora upravljaju bioelektrične struje koje spontano nastaju u ćelijama sprovodnog sistema srca. Sprovodni sistem srca čine: sinoatrijalni čvor (SA), atrioventrikularni čvor (AV), Hisov snop, intraventrikularne grane i Purkinjeove ćelije (Sl.19).

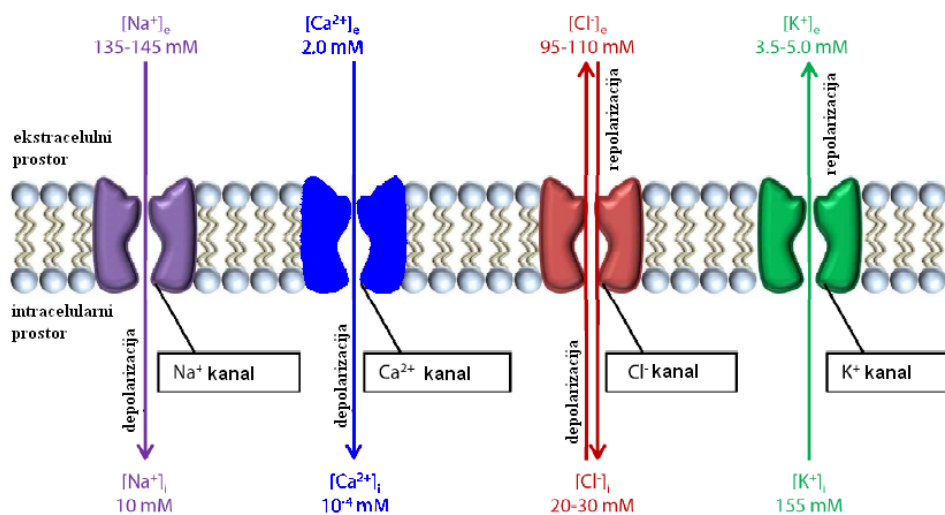


Slika 19. Sprovodni sistem srca i elektrokardiogram sa prikazom AP sprovodnog sistema miofibrila, pretkomora i komora

Električni fenomeni koji se odvijaju u miokardu označavaju se kao elektrofiziološki. Spособnost električnog pobuđivanja srčane mišićne ćelije duguju voltažno-zavisnim jonskim kanalima, selektivnim za različite jone (Na^+ , K^+ i Ca^{2+}).

1.4.2.1. Akcioni potencijal i osnovna celularna elektrofiziologija

Membranski potencijal (MP) se stvara usled različite propustljivosti ćelijske membrane za pojedine jone i za srčane ćelije je određen kretanjem jona Na^+ , K^+ i Ca^{2+} . Membrana mišićne ćelije srca u mirovanju relativno je propustljiva za K^+ , koji je prisutan u velikoj koncentraciji u ćeliji, ali je znatno manje propustljiva za Na^+ i Ca^{2+} , koji su u značajno većoj koncentraciji izvan ćelije (Sl.20). Unutrašnji ispravljački K^+ kanali otvoreni su u stanju mirovanja i omogućavaju K^+ jonima da prolaze kroz membranu, sve dok se ne izjednače električni i gradijent koncentracije.



Slika 20. Elektrohemijski gradijenti K^+ , Na^+ , Ca^{2+} i Cl^- jona u srčanoj mišićnoj ćeliji (Preuzeto i prilagođeno iz: Mihic A., Interaction of hERG Channels and Syntaxin 1A, Master of Science Graduate Department of Physiology, University of Toronto 2009, Chapter 1: Introduction p.4)

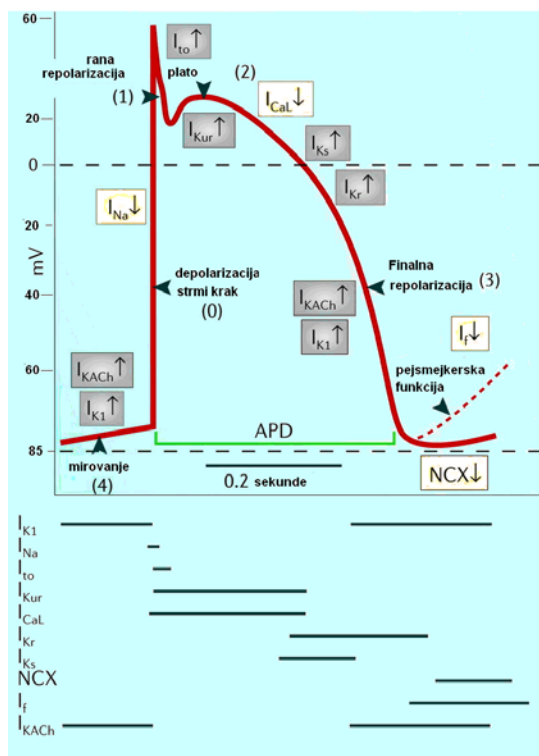
Potencijal membrane u tom trenutku je **ravnotežni potencijal** za K^+ i iznosi -94 mV. S druge strane, gradijenti “vuku” Na^+ u unutrašnjost ćelije, ali su Na^+ kanali zatvoreni u stanju mirovanja. Zato je **transmembranski potencijal mirovanja (MPM)** približan ravnotežnom potencijalu za K^+ i kreće se od -50 do -95 mV, zavisno od tipa ćelije. Za svaki pojedinačni jon postoji elektrohemijski ravnotežni potencijal E_x pri kome ne postoji sila koja vuče jon kroz membranu, a koji se izračunava prema *Nernst*-ovoj jednačini:

$$E_x = - 61 \log ([x]_i/[x]_o) \quad (5)$$

gde $[x]_i$ označava intracelularnu koncentraciju jona, a $[x]_o$ ekstracelularnu koncentraciju jona.

Ukoliko dođe do nagle izmene MP nastaje tzv. AP. Ovaj proces se zove depolarizacija i obično kratko traje. Posledica AP-a je kontrakcija miokarda. Jon Ca^{2+}

koji tokom AP-a ulazi u ćeliju ima vrlo značajnu ulogu u kretanju aktinskih i miozinskih vlakana. Akcioni potencijal se sastoji iz pet faza (faza 0-4) (Sl.21), koje su radi lakšeg razumevanja elektrofizioloških dešavanja grupisane u tri glavne faze: fazu depolarizacije, fazu repolarizacije i fazu mirovanja.



Slika 21. Faze akcionog potencijala

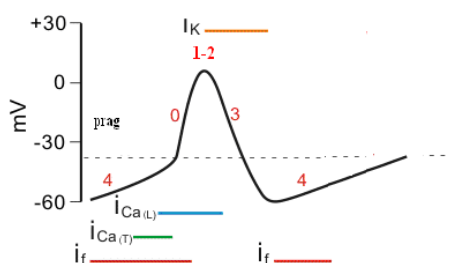
(Preuzeto i prilagođeno iz: Nattel S, Carlsson L. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:1034–1049)

Depolarizacija je prva faza AP-a i označava se kao **nulta faza** (Sl.21). Karakteriše je otvaranje brzih Na^+ kanala i sporih Ca^{2+} kanala, dok se K^+ kanali zatvaraju. U ovoj fazi membrana postaje oko 5000 puta propustljivija za jone Na^+ nego za K^+ jone. Aktivacija brzih Na^+ kanala (kada MP padne na -60 mV) putem depolarizacije je prolazna i kratko traje, svega 1-2 msek. Nagli ulazak pozitivnih jona uzrokuje brzu pozitivnu promenu membranskog potencijala (sa oko -90 mV na oko $+15$ - 20 mV), odnosno depolarizaciju ćelije. Brzina kojom se ćelija depolarizuje izražena je nagibom faze 0, tj maksimalnom brzinom (V_{\max}) i predstavlja determinantu brzine sprovođenja električnog impulsa kroz srčano tkivo¹⁹¹. Pri dovoljnoj intracelularnoj koncentraciji Na^+ , odnosno kada je dostignut elektrohemijski ravnotežni potencijal za Na^+ (E_{Na}), automatski dolazi do inaktivacije brzih Na^+ kanala. Ovi kanali ostaju zatvoreni sve dok se membrana ne repolarizuje i time onemogućavaju stvaranje novog AP-a.

Repolarizacija. Proces kojim se membranski potencijal vraća u stanje polarizacije je **repolarizacija**. Repolarizacija obuhvata faze 1, 2 i 3 AP (Sl.21) i stoga je odgovorna za gotovo celokupno trajanje AP. Proces repolarizacije nije u potpunosti razjašnjen. Počinje zatvaranjem Na^+ kanala (**faza 1**, *brza ili delimična repolarizacija*) čime se naglo usporava ulazak Na^+ u ćeliju (inaktivacija ulazne Na^+ struje), počinje izlazak K^+ jona (kratkotrajna aktivacija izlazne struje K^+) iz ćelije i ulazak Cl^- u ćeliju (Sl.21). Nakon toga, proces repolarizacije se usporava uspostavljanjem **plato faze (faza 2)** koja je specifična kod srčane ćelije. U fazi 2 su aktivni „spori“ Ca^{2+} kanali koji omogućuju Ca^{2+} jonima da sporo ulaze u ćeliju i time uspore repolarizaciju. U fazi 2 se javlja i slaba struja K^+ jona. MP se praktično ne menja i ova faza se na krivoj AP-a prikazuje kao plato, pa se zato i naziva *plato faza*¹⁹¹. Proces izlaska K^+ jona iz ćelije postepeno se ubrzava aktivacijom brze izlazne struje K^+ jona, uz istovremenu inaktivaciju spore ulazne struje Ca^{2+} (**faza 3** ili *brza repolarizacija*) (Sl.21). Do sada je identifikovano najmanje šest različitih K^+ struja koje funkcionišu tokom svih pet faza AP-a (Sl.21), a koje su kontrolisane različitim faktorima. Ovakvo kretanje jona postepeno dovodi do stvaranja pozitivnog naelektrisanja na spoljašnjem delu membrane što rezultuje vraćanjem transmembranskog potencijala na bazične, negativne vrednosti (MPM). Iako je nakon završene repolarizacije uspostavljen električni balans (negativnost MPM), još uvek postoji hemijski disbalans na nivou membrane. Na^+ joni su ušli, a K^+ joni izašli iz ćelije. Ovaj disbalans se naknadno koriguje aktivacijom Na^+/K^+ ATP–zavisne jonske pumpe, koja aktivnim transportom višak Na^+ jona *izbacuje* iz ćelije u zamenu za jone K^+ koji su izašli iz ćelije tokom faza 1, 2 i 3 faze¹⁹¹. Završetkom faze 3 nastaje period u kome dolazi do potpune repolarizacije. To je **faza 4** koja koreliše sa fazom mirovanja (Sl. 21). U mišićnim ćelijama pretkomora i komora faza 4 je stabilna tokom dijastole (MPM od -80 do -90 mV), pa se često naziva i *električna dijastola*. U ćelijama SA čvora i sprovodnog sistema faza 4 nije stabilna i karakteriše se postepenim i spontanom porastom transmembranskog potencijala što dovodi do postupne depolarizacije, tzv. *spontane dijastolne depolarizacije* (Sl.21). Prema tome u srcu postoje dva osnovna tipa AP-a. Jedan je tzv. *tip brzog odgovora* koji je svojstven mišićnim ćelijama pretkomora i komora i Purkinjeovim ćelijama. Drugi je tzv. *tip sporog odgovora* karakterističan za ćelije SA i AV čvora. Ukupno trajanje AP u mišićnim ćelijama komora je oko 300

msek., pretkomora 150, a najduži AP u miokardu imaju Purkinjeove ćelije, oko 375 msek.

Automatizam. Ćelije SA čvora imaju sposobnost da spontano generišu AP, tj. imaju pejsmejkersku aktivnost. U trenutku kada transmembranski potencijal dostigne određeni *voltažni prag*, otvaraju se odgovarajući Na^+ kanali i dolazi do spontane depolarizacije ćelije, što je označeno pojmom *spontanog automatizma*¹⁹¹. Faza spontane dijastoličke depolarizacije (Faza 4) (Sl.22) razlikuje se od faze 4 miofibrila komora i pretkomora¹⁹².



Slika 22. Akcioni potencijal nodalnih ćelija

Razlike potiču otuda što u membrani ovih ćelija postoje voltažno-zavisni jonski kanali kroz koje pored K^+ protiče i Na^+ struja tzv. I_f struja, kao i Na^+ kanali koji su otvoreni i u stanju mirovanja, a kroz koje protiče spora Na^+ struja. Time se elektronegativnost intracelularnog prostora smanjuje na -55 do -60 mV (MPM u SA čvoru). Pri ovoj vrednosti MP brzi Na^+ kanali su inaktivirani. Uvek kada se membranski potencijal duže od nekoliko msek. zadržava na vrednosti manjoj od -60 mV, zatvaraju se inaktivaciona vrata brzih Na^+ kanala sa unutrašnje strane ćelijske membrane. Preostaje da se otvore samo spori Ca^{2+} kanali L- i T-tipa, što izaziva pojavu AP-a. Kao rezultat toga, AP-a nastaje sporije nego u mišićnim vlaknima komora, a polako i nestaje u poređenju sa naglim oporavkom koji se događa kod ćelija mišićnog vlakna komora. To znači da su ćelije SA čvora u kontinuiranoj aktivnosti, bez mirovanja, pa se i ne može doslovno govoriti o MPM. Ako je MP ovih ćelija manji u odnosu na mišićne, postavlja se pitanje zašto depolarizacija ovih ćelija nije trajna? Tokom AP-a dešavaju se dva *dogadjaja* koji to sprečavaju: 1. spori $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ kanali se zatvaraju za oko 100-150 msek. nakon otvaranja, a tada upravo počinje otvaranje K^+ kanala; 2. velika količina K^+ jona difunduje iz vlakna vraćajući unutarćelijski potencijal na njegovu negativnu vrednost od -55 do -60 mV. Ali, K^+ kanali ostaju otvoreni još nekoliko desetih delova

sek. omogućavajući izlazak *dodatne* količine K^+ jona iz ćelija, a to privremeno izaziva značajnu elektronegativnost sa unutrašnje strane membrane, tj. *hiperpolarizaciju*. Potom sledi zatvaranje K^+ kanala, ali velika elektronegativnost istovremeno dovodi do aktivacije *If* struje kojom započinje ulazak Na^+ jona. Elektronegativnost membranskog potencijala postaje sve manja, dostižući vrednost od -40 mV što je okidač za otvaranje sporih Ca^{2+} kanala T- i L-tipa. Tada čitav proces kreće iz početka i neprekidno se ponavlja. Postavlja se pitanje zašto baš SA čvor upravlja srčanim ritmom? Frekvencija kojom SA čvor šalje impulse znatno je veća od one koju stvaraju AV čvor i Purkinjeova vlakna. Svaki put kada SA čvor pošalje impuls, AV čvor i Purkinjeova vlakna se depolarizuju, posle čega sledi repolarizacija, a potom i hiperpolarizacija. Međutim, u SA čvoru hiperpolarizacija se *brže gubi* nego u ostala dva tkiva. SA čvor šalje novi impuls pre nego što se membranski potencijal u ostala dva tkiva vrati na vrednost njihovog samopobuđivanja. Zato se i kaže da je sinusni čvor normalni predvodnik srčanog ritma. Potencijalni (ektopički) pejsmejkeri nalaze se u svakom delu srca uključujući pretkomore, komore, AV čvor i Purkinjeova vlakna. U fiziološkim uslovima ovi pejsmejkeri su električno mirni i ne funkcionišu. Aktiviraju se u slučaju da normalni pejsmejkerov mehanizam otkáže i imaju sposobnost da šalju impuls svojim tempom. Ćelije mišića pretkomora imaju frekvencu oko 75, ćelije AV čvora 40-60, Hisovog snopa 30-50, a Purkinjeove ćelije 20-40 otkucaja/min.

1.4.2.2. Srčani ciklus i sprovodni sistem srca

Srčani ciklus je period između dve srčane kontrakcije. Sincicijalna građa miokarda omogućava da se započeta depolarizacija lančano prenosi velikom brzinom sa ćelije na ćeliju. Depolarizacija nastala u SA čvoru prenosi se na perinodalno tkivo, zatim kroz desnu i levu pretkomoru, praćena kontrakcijom pretkomora. Zatim impuls stimuliše pejsmejker i specijalizovano provodno tkivo u područjima AV čvora. Impuls stiže do AV čvora za oko 1/10 sek. i tada se komore pune krvlju iz pretkomora (**dijastola komora**). Srčani impulsi se dalje šire kroz Hisov snop koji se deli na dve glavne grane, desnu i levu. Grane Hisovog snopa brzo prenose talase depolarizacije koji putem Purkinjeovih vlakana dospevaju u desnu i levu komoru. Purkinjeova vlakna su veoma debela i provode AP 150 puta brže nego vlakna AV čvora. Zahvaljujući ovim vlaknima komore se kontrahuju gotovo istovremeno.

Otpornost ćelije na nove nadražaje (refraktarnost). Od trenutka kada je započet proces depolarizacije miokardna ćelija ulazi u stanje kada ne reaguje ili reaguju izmenjeno na nove nadražaje. S obzirom da je ćelija **refraktarna** na ponovnu depolarizaciju, vreme od faze 0 do kasnog dela faze 3 označava se kao **efektivni refraktarni period ćelije (ERP)**. Zbog toga dužinu AP-a određuje trajanje ERP¹⁹¹. U prvom delu ERP ćelija ne reaguje ni na impuls koji je po intenzitetu jači od onog koji je izazvao AP, pa se kaže da je ćelija u **apsolutnom refraktarnom periodu (ARP)**. U drugom delu ERP moguće je jačim stimulusima izazvati lokalno kretanje jona, bez pojave tipičnog AP-a. Posle ERP može da dođe do ponovnog stimulisanja ćelije, odnosno do izazivanja AP-a, ali samo impulsom jačeg intenziteta u odnosu na normalni. Ovaj period se označava kao **relativni refraktarni period (RRP)** i obuhvata manji deo faze 3 AP-a. Potom sledi tzv **supernormalni period (SNP)** u nadražljivosti ćelije, kada se AP može izazvati i impulsom slabijeg intenziteta i kraćeg trajanja od normalnog. U trenutku SNP, električni MP je blizu praga nadražaja ćelije, tako da je dovoljan i nadražaj manje jačine za pokretanje ćelije na generisanje AP¹⁹².

1.4.3. Mehanizmi nastajanja srčanih aritmija

Za nastajanje srčanih aritmija, odgovorna su dva osnovna elektrofiziološka mehanizma :

1. poremećaj u stvaranju električnog impulsa (promena automatizma srčanog rada, sekundarne depolarizacije) i/ili
2. poremećaj u sprovođenju impulsa izazvan kružnim kretanjem impulsa (*re-entry*) ili srčanim blokom (veoma otežano sprovođenje impulsa, često u AV čvoru)

1.4.3.1. Poremećaj u stvaranju električnog impulsa

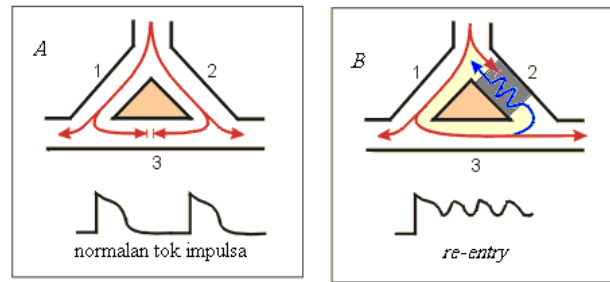
Promena automatizma srčanog rada. U patofiziološkim uslovima može doći do poremećaja u automatizmu i ritmičnosti obnavljanja AP-a u ćelijama sprovodnog sistema srca. Ovi poremećaji mogu biti razlog usporenog (bradikardija i bradiaritmija) ili ubrzanog rada srca (tahikardija i tahiaritmija). Ćelije sprovodnog sistema u patofiziološkim uslovima mogu da steknu sposobnost ubrzanog obnavljanja spontane depolarizacije. Stalno povećanje automatizma SA čvora uspostavlja stalnu sinusnu tahikardiju (100 otkucaja/min.), dok povećan automatizan AV čvora i Hisovog snopa

uspostavlja tzv. automatsku tahikardiju atrioventrikularne regije (60-200 otkucaja/min.). Ubrzavanje srčanog ritma favorizuje aktivacija simpatikusa, acidoza, hipokalijemija i pozitivni inotropni lekovi, a usporavanje aktivacija vagusa, β -blokatori.

Sekundarne depolarizacije i stvaranje ektopičkih žarišta. Oštećene ćelije, (hipokalijemija, intoksikacija digitalisom, davanje atropina, ishemija, hipoksija, povećan nivo kateholamina u plazmi) mogu da steknu sposobnost ubranog obnavljanja AP-a i poprime osobine slične osobinama ćelija SA čvora. Tada ćelija sa najbržom spontanom depolarizacijom postaje predvodnik srčanog ritma (ektopički fokus ili žarište). Ukoliko je ciklus obnavljanja AP-a brži od SA, dolazi do pojave aritmije. U objašnjenju mehanizma nepravilnog obnavljanja AP-a ukazuje se i na spontanu pojavu naknadnog ili ponovnog potencijala (*afterpotential*) koji dovodi do pojava ranih i kasnih post-depolarizacija (sekundarne depolarizacije). Rane sekundarne depolarizacije nastaju u fazi 3 AP-a tokom procesa repolarizacije, kada se nenormalno pojavljuje novi AP, jer dolazi do ponovnog otvaranja Ca^{2+} kanala. Kasne sekundarne depolarizacije nastaju nakon završenog AP-a posle procesa repolarizacije (faza 4 AP-a), kada zbog akumulacije Ca^{2+} u ćeliji ponovno može nastati AP (kod duže upotrebe kardioprotektivnih glikozida). Ukoliko ponovni potencijal dosegne prag nadražaja ćelije, on pokreće tzv. *trigger* mehanizam, tj. miofibrila stiče automatizam. Nastajanje ranog prevremenog potencijala može biti pokretač specifičnih komorskih tahikardija tipa srčanog uvijanja (*torsade de pointes*), koje mogu biti uzrokovane antiaritmikima¹⁹³.

1.4.3.2. Poremećaj u sprovođenju električnog impulsa

Oštećene ćelije sprovodnog sistema ili delovi miokarda mogu izmeniti elektrofiziološke osobine i impuls sprovesti usporeno. S druge strane, može nastati prekid u sprovođenju električnog impulsa, što podrazumeva nastanak dvosmernog ili jednosmernog bloka, a klinički se manifestuje različitim tipovima sinoatrijalnih, atrioventrikularnih ili intraventrikularnih blokova. U tim uslovima, jedan isti električni nadražaj može ponovo da izazove depolarizaciju dela miokarda koji je prethodno već bio nadražen. Uspostavlja se mehanizam kružnog kretanja električnog impulsa (*re-entry* fenomen) koji je najčešći mehanizam paroksizmalnih tahikardija (S.23).



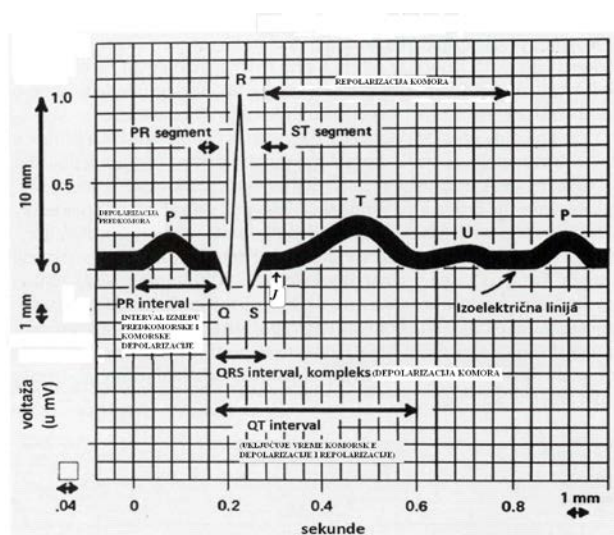
Slika 23. Prikaz teorijskog modela kružnog kretanja električnog impulsa:
 A) normalan tok impulsa, B) jednosmerni blok i retrogradno usporeno sprovođenje

(Preuzeto i prilagođeno iz: Tomaselli GF. Principles of Electrophysiology. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL et al., eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2008.p. 1410-1416)

Da bi se ostvario fenomen kružnog kretanja impulsa pored postojanja jednosmernog bloka, moraju biti ispunjena još dva uslova: postojanje anatomskog ili fiziološkog kruga za prolaz impulsa i dovoljno spora provodljivost u oštećenom segmentu. Vreme sprovođenja impulsa u krug mora biti duže od refraktarnog perioda, da bi omogućilo oporavak zdravog tkiva za prolaz novog impulsa. Kao što je prikazano na Sl.23, talas depolarizacije se širi kroz zdravo tkivo (krak 1), dok se u *blokiranom tkivu* brzo gasi (krak 2). Kada talas depolarizacije zaobiđe blokirano mesto, on počinje da se širi kroz njega u suprotnom smeru (AP prođe kroz krak 1, nastavlja kroz krak 3 i ulazi u krak 2 ali u suprotnom smeru). Ako je širenje talasa depolarizacije u suprotnom smeru dovoljno sporo on će po izlasku iz *mesta bloka* zateći zdrav miokard sposoban da se ponovo depolarizuje (impuls ulazi ponovo u krak 1 samo ako se u njemu završio refraktarni period). Tada nastaje prevremeni impuls tj. *ekstrasistola*. Ceo ciklus se zatim ponavlja da bi nastala nova ekstrasistola ili produžena tahikardija. Takav mehanizam nastanka aritmije naziva se **fenomen ponovnog ulaska** (*re-entry fenomen*) ili **fenomen kružnog kretanja impulsa**. Kružno kretanje se može sprečiti inhibicijom Na^+ ili Ca^{2+} kanala ili produženjem refraktarnog perioda u zdravom tkivu (krak 1) koje je blizu mesta bloka¹⁹³.

1.4.4. Dijagnostika srčanih aritmija

Elektrokardiogram. Zapis električnih potencijala koji nastaju u srcu, a registruju se sa površine kože naziva se elektrokardiogram (EKG). Snimanje električne aktivnosti srca omogućio je, lekar i fizičar Einthoven konstruisanjem aparata elektrokardiografa 1901.godine¹⁹⁴. Na normalnom elektrokardiogramu (Sl.24) uočavaju se: a) 5 osnovnih talasa: **P-**, **Q-**, **R-**, **S-**, **T-**¹⁹⁵ kao i **U**-talas koji je vidljiv u 50-75 % EKG zapisa; b) 4 glavna intervala: **PR-**, **QRS-** (poznat kao **QRS-kompleks**), **QT-** i **RR-**interval; c) 2 segmenta: **PR-** i **ST-**segment.



Slika 24. Prikaz normalnog elektrokardiograma (EKG) na milimetarskom papiru, pri brzini snimanja od 25 mm/sek sa osnovnim EKG talasima, intervalma i segmentima.

Direktna električna aktivnost sinusnog čvora ne beleži se na EKG-u. Električni impuls koji je potekao iz sinusnog čvora i izazvao depolarizaciju miokarda pretkomora predstavljen je na EKG-u talasom P. Repolarizacija miokarda pretkomora obično se ne uočava na EKG-u, a ako je vidljiva, beleži se u vidu malog talasa posle P-talasa, označenog kao Tp. Kada električni impuls iz SA dospe u AV čvor on se usporeno sprovodi i zadržava, a na EKG-u se ispisuje PQ (PR)-interval. Trajanje PQ-intervalu (120-200 msec) varira i zavisi od frekvence SA, produžava se sa usporenjem frekvence. U patološkim uslovima produžen PQ-interval sreće se kod ishemijskih bolesti srca, zapaljenskih procesa, degenerativnih promena, hipotireoze, dok se skraćenje PQ-intervalu sreće kod sindroma preekscitacije komora (WPW sindrom), ponekad u arterijskoj hipertenziji, feohromocitomu i sl. Nakon prolaska kroz AV čvor, električni impuls ide kroz sprovodni sistem srca i izaziva depolarizaciju komora. Kao rezultat

depolarizacije, na EKG-u se pojavljuje QRS-kompleks koji označava tok električnih impulsa kroz miokard komora od endokarda do epikarda (50-100 msek). Proširenje QRS-kompleksa ukazuje na usporavanje ili blokadu sprovođenja u intraventrikularnom sprovodnom sistemu. Izgled QRS-kompleksa takođe može da ukaže na poremećaje srčanog ritma (intraventrikularni blokovi, sindrom preekscitacije komora ili komorske aritmije). ST-T-U-kompleks (ST-segment, T-talas i U-talas) predstavlja komorsku repolarizaciju. Na kraju elektrokardiografskog zapisa vidi se komorski T-talas koji definiše period u kojem počinje relaksacija miokarda komora. T-talas nastaje pre nego što se završi kontrakcija komora. Celokupna električna aktivnost komora na EKG predstavljena je QT-intervalom i u normalnim uslovima vreme trajanja QT-intervala ne prelazi 440 msek.

Brzina srčanog rada u minuti označava **srčanu frekvencu koja se može izračunati EKG merenjem R-R intervala**. Elektrokardiogram se uobičajeno beleži na posebnoj milimetarskoj hartiji izdvojenoj na kvadratiće površine 1 mm² koji sačinjavaju mrežu, brzinom od 25 mm/sek, što znači da jednom kvadratiću (1mm) odgovara 0,04 sek. Da bi se bolje uočili i definisali pojedini talasi i intervali prema potrebi može se koristiti i brzina snimanja od 50 mm/sek. Vertikalno na EKG hartiji se meri amplituda datog talasa. EKG se svakodnevno koristi u dijagnostici jer predstavlja neinvazivno, brzo i jednostavno beleženje niza pouzdanih podataka o depolarizaciji pretkomora, toku električnog impulsa kroz sprovodni sistem i depolarizaciji i repolarizaciji komora. EKG se koristi i u dijagnostici nekih nekardijalnih oboljenja (plućna embolija, hipotermija, poremećaj elektrolita, virusna oboljenja, hormonski disbalans, metabolički poremećaji)¹⁹⁵. Klinička iskustva su pokazala da kod ishemijskih bolesti srca ili u kardiomiopatijama, primenom standardne metode snimanja EKG-a te poremećaje često nije moguće uočiti. Zbog toga se u dijagnostici poremećaja srčanog ritma koriste i drugi, dugotrajniji načini beleženja EKG-a, kao što je dinamička, dugotrajna, kontinuirana elektrokardiografija (*holter monitoring*)¹⁹⁶. Primenom ove metode može se pratiti srčani ritam u vanbolničkim uslovima i na taj način lako registrovati retki i prolazni poremećaji ritma.

1.4.5. Klasifikacija srčanih aritmija

Klinički se aritmije mogu klasifikovati u dve grupe:

- 1) prema mestu nastanka: supraventrikularne (pretkomorske aritmije i aritmije atrioventrikularnog spoja) i ventrikularne (komorske) aritmije
- 2) prema brzini srčanog rada: tahiaritmije i bradiaritmije

1.4.5.1. Tahikardni poremećaji srčanog ritma

Ovi poremećaji nastaju kao rezultat ubrzanog automatizma, stvaranja ektopičkih žarišta, naknadnih depolarizacija i najčešće kružnog kretanja impulsa. Tahikardije mogu biti poreklom iz pretkomora ili komora.

U pretkomorne tahikardije ubrajaju se:

1. Sinusna tahikardija;
2. Supraventrikularna ekstrasistola (SVES);
3. Supraventrikularna tahikardija (SVT) ili paroksizmalna supraventrikularna tahikardija (PSVT);
4. Lepršanje pretkomora (atrijalni flater, AF);
5. Treperenje pretkomora (fibrilacija atrija, FA).

U tahikardije poreklom iz komora ubrajaju se:

1. Komorske ekstrasistole (ventrikularne ekstrasistole, VES);
2. Komorske tahikardije (ventrikularne tahikardije, VT);
3. Komorska fibrilacija (ventrikularna fibrilacija, VF).

1.4.5.2. Bradikardni poremećaji srčanog ritma

Najčešći uzroci bradikardije srčanog porekla su poremećaji koji nastaju u SA i AV čvoru.

U poremećaje funkcije SA čvora ubrajaju se:

1. Sinusna bradikardija;
2. Sindrom bolesnog sinusnog čvora (*sick sinus sindrom*) SSS);
3. SA blokovi: SA blok I stepena, SA blok II stepena, SA blok III stepena (*sinus arrest*).

Poremećaji funkcije AV čvor- AV blokovi

1. AV blok I stepena;
2. AV blok II stepena: progresivno kašnjenje provođenja (*Wenckebach*), *Mobitz II*;
3. AV blok III stepena.

Smetnje provođenja ispod AV čvora-infra Hisni blok

Hisov snop se grana na levu i desnu granu. Ako se kod organske bolesti srca ošteti neka od grana ili fascikulisa gubi se sinhronizacija rada komora, pa u nekim slučajevima dolazi i do pada minutnog volumena srca.

1.4.6. Principi lečenja srčanih aritmija

Srčane aritmije se mogu lečiti na dva načina:

1. Palijativno lečenje podrazumeva privremenu izmenu elektrofizioloških osobina patološkog procesa koji je uzrok aritmije. Ovaj vid lečenja se postiže primenom antiaritmika, programiranom elektrostimulacijom ili DC šokom.
2. Radikalno lečenje podrazumeva trajno uklanjanje patoanatomskog supstrata hiruškim putem ili ablacijom.

1.4.6.1. Antiaritmici

1.4.6.1.1. Mehanizmi delovanja i klasifikacija antiaritmika

Antiaritmici su lekovi koji se koriste u prevenciji i lečenju srčanih aritmija. Osnovna mesta dejstva antiaritmika su jonski kanali i receptori, pa zato antiaritmici deluju na pojedine faze AP-a i druge karakteristike srčanog mišića i u fiziološkim uslovima. Međutim, njihovo dejstvo je naročito jasno izraženo u patološkim stanjima. Blokirajući jonske kanale antiaritmici mogu *popraviti* postojeće poremećaje u stvaranju ili sprovođenju impulsa. U obolelom tkivu, veliki broj kanala je u stanju aktivacije ili inaktivacije i za njih lekovi imaju značajno veći afinitet nego za kanale u stanju mirovanja. Povećani automatizam lekovi eliminišu: a) sniženjem nagiba faze 4 AP-a (β -blokatori), b) podizanjem praga za okidanje (blokatori Na^+ i Ca^{2+} kanala), c) povećanjem maksimalnog dijasolnog potencijala (adenozin i *vagus*) i d) produžavanjem trajanja AP-a (blokatori K^+ kanala).

Klasifikacija lekova koji se koriste u terapiji srčanih aritmija. Brojnost, raznovrsnost hemijske strukture, razlike u mehanizmu delovanja i različitost

farmakodinamskog profila lekova čine klasifikaciju antiaritmika nedoslednom i kompleksnom. Uvedena 1971.god. i pored mnogobrojnih nedostataka, *Vaughan-Williams*-ova klasifikacija antiaritmjskih lekova¹⁹⁷ se u širokoj upotrebi održala do danas. Prema ovoj klasifikaciji, lekovi su grupisani na osnovu njihovog dominantnog mehanizma delovanja, odnosno prema tome koje jonske kanale i/ili receptore na ćelijskoj membrani kardiomiocita blokiraju¹⁹⁸.

U prvoj grupi su blokatori Na^+ kanala koji otežavaju nastanak depolarizacije (stabilizuju ćelijsku membranu), jer primarno smanjuju influks jona Na^+ iz ekstracelularne tečnosti. Blokatori se za kanal vezuju reverzibilno i prolazno ih *onesposobljavaju* da provode Na^+ struju. Iako deluju na Na^+ kanale u svim delovima srca, veći afinitet pokazuju za kanale u delovima srca koji se lakše i češće depolarizuju, a to su upravo oni zahvaćeni patološkim procesima. Najveći afinitet lekovi pokazuju za kanale u fazi aktivacije (otvoren kanal) ili inaktivacije (refraktarnost), a u mnogo manjoj meri deluju na kanale u fazi mirovanja. U zavisnosti od toga kako deluju na dužinu trajanja AP-a dele se na tri podgrupe:

Ia – lekovi koji produžavaju AP i refraktarni period. Oni usporavaju 0 fazu AP-a, spontanu depolarizaciju u fazi 4 i sprovođenje u srcu (hinidin, prokainamid, diizopiramid). Lekovi ove grupe su vrlo efikasni, ali imaju dosta neželjenih dejstava. Svi deluju negativno inotropno i mogu prouzrokovati aritmiju ako se neadekvatno doziraju.

Ib – lekovi koji skraćuju AP i refraktarni period (lidokain, meksiletin, takainid i fenitoin). Od antiaritmika prve grupe, lekovi Ib grupe su najbezbedniji za primenu (nemaju negativno inotropno dejstvo na miokard). Ako se predoziraju, mogu izazvati ekscitaciju CNS-a (konfuziju, konvulziju) i aritmije.

Ic – lekovi koji ne utiču na dužinu trajanja AP-a i refraktarni period (propafenon, flekainid i enkainid). Oni sporo disosuju sa Na^+ kanala i dovode do opšte redukcije ekscitabilnosti koja se odražava čak i na zdravom tkivu. Treba ih izbegavati nakon infarkta miokarda ili kod srčane insuficijencije zbog povećanog mortaliteta¹⁵.

U drugoj grupi antiaritmika nalaze se β -blokatori (propranolol, metoprolol, atenolol, esmolol) koji redukuju povećani automatizam srca smanjenjem dejstva simpatikusa na miokard.

Treća grupa antiaritmika antagonizuje izlazak jona K^+ iz ćelije, produžava trajanje AP-a i refraktarnost miokarda (amjodaron, bretilijum, sotalol, dofetilid).

Četvrta grupa antiaritmika blokira spore Ca^{2+} kanale L-tipa u SA i AV čvoru, usporava srčani rad, smanjuje kontraktilnost srca i aktivnost ektopičkih žarišta (verapamil).

Pored pobrojanih lekova u terapiji aritmija mesto su našli i adenozin, kardiotionični glikozidi, kalijum, magnezijum.

Pored standardne klasifikacije antiaritmika postoji i alternativna klasifikacija Evropskog društva za kardiologiju. Ova klasifikacija je farmakološki preciznija, obuhvata i adenozin i kardiotionične glikozide, važne lekove u terapiji supraventrikularnih aritmija (Tabela 1). Ovom klasifikacijom se zadržavaju svi bitni elementi standardne klasifikacije, uključujući i subklasifikaciju antiaritmika I grupe¹⁹⁹.

Tabela 1. Alternativna klasifikacija antiaritmijskih lekova Evropskog društva za kardiologiju.

Mesto dejstva	Grupa	Lek prototip
Jonski kanali	Blokatori Na^+ kanala	Hinidin, Lidokain
	Blokatori K^+ kanala-čisti	Ibutilid, Dofetilid
	Blokatori K^+ kanala-mešoviti	Amjodaron, Sotalol
	Blokatori Ca^{2+} kanala	Verapamil
Receptori	Beta blokatori	Propranolol
	Adenozin	Adenozin
Jonske pumpe	Digitalis	Digoksin

Iako su detaljno proučena dejstva ovih lekova na elektrofiziologiju srca, teško ih je pouzdano dovesti u vezu sa terapijskom efikasnošću kod raznih vrsta aritmija. Molekularne osnove interakcija na nivou receptora i jonskih kanala još uvek su u domenu hipoteza. Mnoga pitanja iz farmakologije antiaritmijskih lekova su ostala bez odgovora koji bi zadovoljio stručnu i naučnu javnost, pogotovu posle CAST studije²⁰⁰. Tokom akutne ili hronične terapije antiaritmikima uočeni su i neželjeni efekti ovih lekova na druge sisteme organa kao što su: GIT, CNS, koža i dr. Postojanje negativnog inotropnog efekta (smanjenje jačine kontraktilnosti miokarda) često ograničava mogućnost primene nekih od antiaritmika, ako je miokard oštećen. Menjajući elektrofiziološke karakteristike miokarda, ovi lekovi mogu da pogoršaju postojeće

stanje pacijenta i provociraju novu aritmiju. Jedan od najvećih problema u terapiji srčanih aritmija je proaritmogeni efekat lekova, zbog nedovoljne selektivnosti za ishemično tkivo miokarda. S druge strane, sva pretklinička ispitivanja se uglavnom vrše na zdravom srcu, što ne daje potpuno realnu sliku, jer je u obolelom srcu ekspresija jonskih kanala drugačija. U pogledu proaritmogenosti najrizičnija je Ic grupa antiaritmika. Ovo potvrđuju i rezultati CAST studije sprovedene na pacijentima sa asimptomskim benignim aritmijama koji su preležali infarkt miokarda. Posle primene antiaritmika Ic grupe zabeležen je povećan mortalitet ovih bolesnika^{15, 200}.

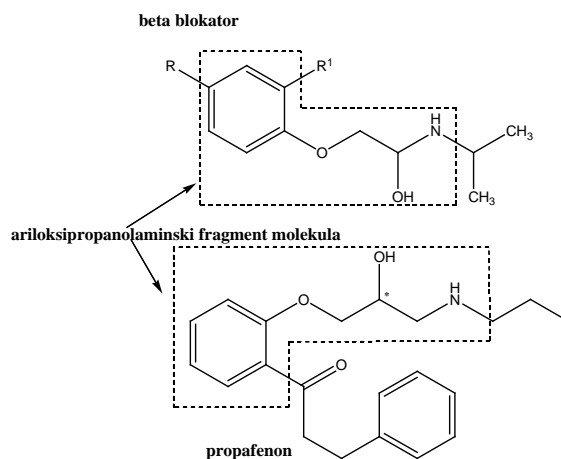
Odgovor na pitanje koliko je lek efikasan i bezbedan u terapiji aritmija ili koji je mehanizam njegovog delovanja, mogao bi se dobiti samo kod selektivnih blokatora jonskih kanala. Međutim, mala selektivnost antiaritmijских lekova za jonske kanale i još uvek nedovoljno poznavanje kinetike interakcije lek-jonski kanal onemogućava svođenje proaritmogenog delovanja na minimum. Zato je u terapiji i dalje zastupljen empirijski pristup (tzv. *trial and error*) kojim se mnogo sporije stiže do željenih odgovora. Iako se pokazalo da su implantabilni defibrilatori efikasniji od farmakoterapije to rešava samo neke od problema, jer je mali broj bolesnika u visokorizičnim grupama. Istraživanja sa ciljem da se dobiju bezbedni i efikasni lekovi protiv aritmije ostaju prioritet za sve osnovne nauke, medicinu, farmaceutsku industriju i društvo u celini.

1.5. SAR i QSAR studije propafenona

Propafenon, kao visoko potentni blokator brzih Na_v kanala ($\text{Na}_{1.5}$) pokazuje sve odlike antiaritmika Ic grupe²⁰¹⁻²⁰³. U kliničkoj praksi se primenjuje u profilaksi i lečenju ventrikularnih tahikardija (VT) uključujući i perzistentne ventrikularne tahikardije (PVT), supraventrikularnih tahikardija (SVT), uključujući i WPW sindrom, kao i u konverziji atrijalne fibrilacije samo u slučaju kada ne postoje strukturna oštećenja miokarda²⁰¹⁻²⁰⁴.

Elektrofiziološkim metodama dokazano je da propafenon u terapijskim, kao i dozama većim od njih, usporava intrakardijalne brze Na^+ struje, što je posledica vezivanja ovog leka za Na_v kanale koji se nalaze u aktivnom stanju^{203, 205-206}. Propafenon pokazuje oko 700 puta manji afinitet za kanale u inaktivnom stanju^{203, 207}, dok je njegov afinitet za kanale u stanju mirovanja oko 4000 puta manji u poređenju sa kanalima koji su aktivni^{203, 208}. Na taj način, propafenon smanjuje brzinu depolarizacije u nultoj fazi AP-a (ne utičući na MPM)²⁰⁹, usporava provođenje kroz sve strukture srca, uključujući tu i akscesorske puteve, produžava refraktarni period i suprimira automatizam u ektopičkim fokusima, usporavanjem dijastolne depolarizacije komora. U terapijskim koncentracijama, propafenon inhibira i nekoliko K^+ struja u srcu: I_{TO} , I_{kur} , I_{ks} , I_{kl} , I_{KATP} ²¹⁰⁻²¹¹, kao i I_{kr} u čijem prenošenju posreduje humani hERG kanal²¹²⁻²¹⁴. Efekti blokade K^+ kanala odražavaju se na fazu 2 (plato fazu), kao i fazu 3 (završnu repolarizaciju), dovodeći do produžetka trajanja AP-a, što mu ujedno daje i odliku antiaritmika III grupe^{201,215}. Farmakološki gledano rezultat blokade I_{kr} struje je produženi QT-interval koji može dovesti do sinkope i iznenadne smrti usled pojave VT tipa *torsades de pointes*, kao i VF. Elektrofiziološkom analizom kao i *docking* studijama pokazano je da propafenon blokira sva tri konformaciona stanja hERG kanala²¹⁶⁻²¹⁷. Pri većim dozama, propafenon gubi selektivnost, pored Na_v blokira i L-Ca^{2+} kanale. Propafenon redukuje postojeću I_{Ca} struju, ali ne utiče na njenu aktivaciju²¹⁸. Ovaj efekat u miocitima pretkomora i komora dovodi do produženog trajanja AP-a i refraktarnog perioda, dok u glatkim mišićima krvnih sudova dovodi do vazodilatacije²¹⁹⁻²²².

Strukturna sličnost sa blokatorima β -receptora (ariloksipropanolaminski deo molekula (Sl.25) uslovljava manju β -blokatorsku aktivnost propafenona²²³.



Slika 25. Ariloksipropanolaminski fragment (obeleženo isprekidanom linijom) zajednički deo u strukturi propafenona i β -blokatora

Kao i drugi antiaritmici I klase i propafenon pokazuje manju antiholinergičku aktivnost, te blago usporava provođenje kroz SA i AV čvor²⁰¹.

Prisustvo hiralnog ugljenikovog atoma u bočnom propanolaminskom nizu (Sl. 25) čini propafenon optički aktivnim jedinjenjem. U terapiji se koristi racemska smeša jer su oba enantiomera podjednako potentni blokatori Na_v kanala. Međutim, samo *S* enantiomer pokazuje betablokatorsku aktivnost²²⁴. Pored razlika u farmakodinamskim osobinama, enantiomeri propafenona imaju i različitu farmakokinetiku²²⁴. Farmakokinetiku propafenona odlikuje skoro potpuna resorpcija, ali mala biološka raspoloživost zbog brzog metabolizma pri prvom prolasku kroz jetru (Sl.26). Metabolizam propafenona (Sl.26) zavisi od stepena saturacije enzima jetre, što dovodi do nelinearnog odnosa između doze i srednje koncentracije leka u krvi. Pri višekratnoj primeni ili većim dozama leka bioraspoloživost se povećava zbog zasićenja metaboličkih puteva. Maksimalna koncentracija propafenona u serumu ostvaruje se nakon 2-3 h, ali u zavisnosti od doze to vreme može da bude i 3-10 h²²⁵. U krvi se nalazi vezan za α -1-acetil glikoprotein u visokom procentu. Poluvreme eliminacije propafenona je između 5 i 8 h. U biotransformaciju propafenona uključeni su CYP 450 enzimski sistemi: CYP1A2 i CYP3A4 koji katalizuju oksidativnu N-dealkilaciju, CYP2D6 koji katalizuje aromatičnu hidroksilaciju položaja 5 u centralnom benzenovom prstenu i uridin-5-difosfatglukuroniltransferaza (UGT) koja katalizuje reakciju glukuronidacije²²⁶.

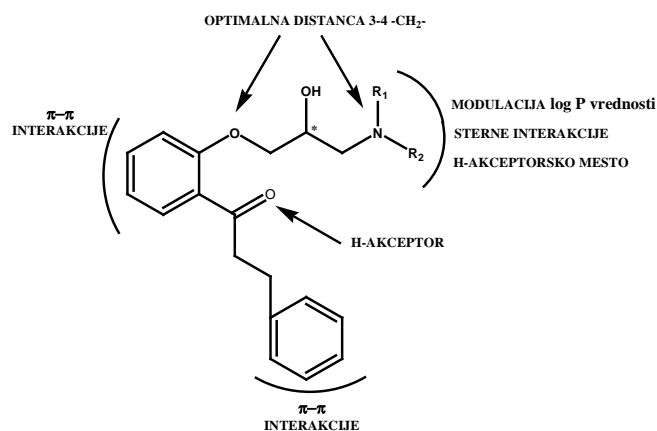
Dva glavna metabolita propafenona, 5-hidroksipropafenon (5-OHP) i *N*-depropilpropafenon (NDPP) (Sl.26) blokiraju Na_v kanale i u mnogo manjoj meri β -

receptore. Smatra se da je 5-OHP terapijski aktivniji od NDPP²⁰². Pored 5-OHP metabolita, nastaje i 4,5-DOHP tj. katehol (Sl.26) u znatno manjem procentu. Katehol podleže dejstvu enzima katehol-O metiltransferaze (COMT) i daje O-metilkatehol koji se izlučuje kao glukuronid²²⁷. Antiaritmijska aktivnost O-metilkatehola daleko je manja u poređenju sa 5-OHP i NDPP. Metabolički profil propafenona kod čoveka razlikuje se od metaboličkog profila kod eksperimentalnih životinja²²⁸. U populaciji glodara glavni eksketorni metabolit je 4'-OHP-glukuronid (Sl.26). Kod čoveka je njegov procenat zanemarljiv (oko 8 %)²²⁸. Ovo se mora uzeti u obzir pri izboru *in vivo* animalnog modela u pretkliničkim studijama.

Metabolizam propafenona je i stereoselektivan. U većim koncentracijama (*S*) enantiomer metaboliše u prisustvu CYP1A2 i CYP3A4 i daje *N*-dealkil (*S*)-propafenon, dok u manjim koncentracijama ovu reakciju katalizuje CYP450s²²⁶. Dosadašnja klinička istraživanja su pokazala da se (*R*)-enantiomer brže izlučuje nego (*S*)-enantiomer²²⁹. Enzimski sistem CYP3A4 pokazuje značajan stepen preklapanja sa P-glikoprotein (PgP) u pogledu supstratne specifičnosti, pa su naučnici odabrali propafenon kao model molekul za sintezu modulatora PgP aktivnosti. PgP je transmembranski protein koji ima nekoliko značajnih fizioloških funkcija: transport endogenih supstrata (faktora aktivacije trombocita, fosfatidilholina, endogenih steroida, sfingomijelina), zaštita tkiva od ksenobiotika, učešće u regulaciji ćelijske diferencijacije i apoptoze²³⁰.

Danas je poznato da ovaj transporter značajno doprinosi intrinzičkoj i stečenoj rezistenciji tumora na više klinički važnih antikancerskih lekova²³¹, pošto je dokazana njegova prekomerna ekspresija u određenim tumorskim tkivima²³². U fiziološkim uslovima PgP može uticati na farmakokinetiku lekova i biti uzrok neadekvatne apsorpcije, slabije oralne bioraspoloživosti, kao i ograničene distribucije lekova u pojedina tkiva²³³. Ove činjenice ukazuju, da prilikom sinteze novih lekova postoji potreba za pravovremenom identifikacijom jedinjenja koja intereaguju sa PgP.

Tokom višegodišnjih istraživanja, Chiba i Ecker sa saradnicima su izvršili sintezu i karakterizaciju, kao i SAR i QSAR analizu oko 250 derivata propafenona sa strukturnim modifikacijama u aminskom i oksifenonskom delu molekula^{3, 234-240}. Odnos strukture i aktivnosti za ovu klasu jedinjenja prikazan je na Sl. 27.



Slika 27. SAR studija propafenonskih inhibitora PgP

(Preuzeto i prilagođeno iz: Pleban K, Ecker GF. Mini Rev Med Chem. 2005,5(2):153-163)

Kao mera modulatorne aktivnosti, u ovim studijama korišćen je stepen povećanja osetljivosti rezistentnih ćelija na vinkristin u prisustvu i odsustvu modulatora²⁴⁰, dok su u kasnijim studijama korišćene IC_{50} vrednosti dobijene iz studije efluksa rodamina 123 i daunorubicina²³⁴. Variranjem supstituenata na azotovom atomu aminskog dela molekula kao i udaljenosti između centralnog aromatičnog prstena i azota, autori su razvili niz QSAR modela koristeći logP kao i molarnu refraktivnost (MR), kao parametre koji značajno utiču na aktivnost²³⁹. U zavisnosti od stepena sličnosti između razmatranih struktura, konstruisani modeli su mogli da razjasne oko 50 % razlika u aktivnosti zbog čega su autori uključili deskriptore koji su definisali samo osobine pojedinih delova molekula, a ne i molekula u celini. Variranjem položaja i okruženja karbonilne grupe, ustanovljeno je da gustine naelektrisanje na kiseonikovom atomu znatno utiče na modulatornu aktivnost³. U okviru različitih aminskih, amidskih i anilinskih derivata, jačina azota kao akceptora vodonične veze korelisana je sa aktivnošću, čime je jasno pokazano da korišćenje 2D QSAR deskriptora u okviru kongeneričkih struktura može dati visoko interpretabilne QSAR modele, koji mogu poslužiti kao smernica za dalju modifikaciju strukture. U novijim studijama autori su korelisali i hologram QSAR metodologiju kao i 3D QSAR metode koje su omogućile bolje razumevanje i vizuelizaciju uticaja sternih i elektronskih faktora na aktivnost²³⁷.

Kao model molekula propafenon je poslužio i u sintezi potencijalnih antimalarijskih lekova^{2, 241-243}. Chiba i saradnici su izdvojili jedinjenja koja pokazuju afinitet za proteine bogate u histidinskim i alaninskim ostacima. Tokom ranijih istraživanja histidinom bogat protein 2 (HRP2) je dokazan kao protein ključan u životnom ciklusu *P. falciparum*. Ovaj protein je prisutan u svim parazitskim sojevima, bez obzira na fenotip, ali i u citoplazmi eritrocita domaćina kao i na membrani zaraženih eritrocita. Na analogima propafenona koji sadrže arilkarbonil substrukture izvedene su studije fotosenzitivnosti. Nakon fotoaktivacije jedinjenja kod kojih je fenilpropiofenonski deo strukture zamenjen benzofenonskim dokazana je bolja inhibitorna aktivnost. Dalja istraživanja vezana su za radove američkih naučnika koji su u *in vitro* uslovima ispitivali kardiotoksične efekte, bioraspoloživost i gastričnu podnošljivost propafenonskih analoga u cilju optimizacije strukture potencijalnih antimalarika^{2,243}.

Efekte propafenona na jonskim kanalima do skora su se zasnivali samo na elektrofiziološkim ili *in vitro* animalnim modelima^{21-22,219-222,228}. Poslednjih godina QSAR studije sve više dobijaju na značaju i uglavnom su vezane za interakciju sa hERG kanalom^{212, 214, 244-245}. *In silico* metode takođe dobijaju na značaju u ispitivanju interakcija propafenona i jonskih kanala^{20, 244-245}. Zhorov i saradnici su na osnovu kristalografskog modela K_{1,2} kanala konstruisali homologi model K_{2,1} kanala koji se nalazi u srcu. Propafenon i flekainid pokazuju veći afinitet za ovaj kanal u odnosu na druge antiaritmike I grupe²⁰.

1.5.1. Doziranje i način primene propafenona

Propafenon se u terapiju uvodi u hospitalnim uslovima pod EKG kontrolom. Primenjuje se peroralno u dozi od 150 do 300 mg dva do tri puta dnevno. Po potrebi se doza može povećati na 300 mg dva puta dnevno do maksimalno 300 mg četiri puta dnevno i to u intervalima od 3 do 4 dana. Parenteralna primena podrazumeva intravensku primenu u dozi od 1 do 2mg/kg tokom 3-6 minuta, što se može ponoviti posle 1,5 do 2 sata. Nekoliko minuta posle *i.v.* injekcije može se nastaviti sa infuzionim davanjem doze za održavanje od 3 mg/kg/h uz konstantno praćenje EKG-a^{17, 201}.

Neželjena dejstva propafenona mogu biti ozbiljna zbog proaritmogenog potencijala. Postojeće aritmije se mogu pogoršati ili pak razviti nove, supraventrikularne

ili fatalne ventrikularne aritmije. Negativno inotropno dejstvo, bradikardija, SA i AV blok, srčana insuficijencija kao i hipotenzija pripisuju se njegovoj betablokatorskoj aktivnosti i blokadi kalcijumskih kanala²⁰¹. Propafenon je kontraindikovano kod pacijenata sa SA i AV blokom, kod bradikardnih srčanih poremećaja, bolesti SA čvora, kardiogenog šoka, infarkta miokarda, kongestivne insuficijencije srca, hipotenzije i preosetljivosti na lek. Ekstrakardijalna neželjena dejstva manifestuju se u blažim centralnim i gastrointestinalnim i respiratornim poremećajima. Zbog betablokatorske aktivnosti propafenon se ne preporučuje kod pacijenata sa bronhijalnom astmom i drugim bronhospazmatičnim stanjima.

Interakcije propafenona su brojne s obzirom na njegovu farmakodinamsku neselektivnost i intenzivan metabolizam u jetri: usporava eliminaciju digoksina potencira dejstvo varfarina, ciklosporina, teofilina, metoprolola i propranolola. Induktori enzima jetre ubrzavaju metabolizam i smanjuju efikasnost propafenona²⁰¹.

2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije sistematizovani su u nekoliko celina:

- ❖ Sinteza novih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona.
 - ✓ Izračunavanje molekulskih deskriptora primenom računarskog programa *ChemOffice* i programskog paketa *Molinspiration Cheminformatics Software package*.
 - ✓ Izbor polaznih *orto-*, *para-* monosupstituisanih benzaldehida na osnovu sternih i elektronskih osobina i stepena lipofilnosti. Optimizacija uslova za izvođenje aldolne kondenzacije.
 - ✓ Definisanje uslova za sintezu flavanona, prečišćavanje i kristalizaciju.
 - ✓ Izbor katalizatora i optimizacija uslova za selektivnu redukciju dvostruke veze u enonskom sistemu.
 - ✓ Sinteza epoksida reakcijom nukleofilne supstitucije sa epihlorhidrinom; definisanje i izbor optimalnijih uslova u cilju korišćenja dobijenog proizvoda u sledećoj fazi sinteze kao polaznog jedinjenja.
 - ✓ Definisanje optimalnijih uslova za dobijanje i prečišćavanje aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona.
 - ✓ Karakterizacija novosintetisanih jedinjenja primenom hromatografskih i spektroskopskih metoda (TLC, HPLC, UV, FT-IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS).
- ❖ *In vitro* ispitivanje vazorelaksantne aktivnosti sintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona na izolovanom krvnom sudu (aorti) pacova kao i uloge pojedinih tipova jonskih kanala u vazorelaksantnom dejstvu.
 - ✓ Ispitivanje uloge endotela u vazorelaksantnom dejstvu propafenona i sintetisanih derivata.
 - ✓ Ispitivanje uloga pojedinih tipova jonskih kanala u vazorelaksantnom dejstvu propafenona i sintetisanih derivata.
 - ✓ Pretraživanje baze podataka *Protein data Bank* u cilju potraživanja kristalografske ili NMR strukture jonskog kanala kao osnove za izvođenje *docking* eksperimenata.
 - ✓ Primena kompjuterskih programa: *ChemOffice* i *Gaussian* za optimizaciju struktura: sintetisanih jedinjenja, propafenona i blokatora jonskih kanala i programa *AutoDock 4.0.1* za izvođenje *docking* eksperimenata i proračuna.

- ❖ *In vivo* ispitivanje antiaritmijskog potencijala sintetisanih jedinjenja
 - ✓ Primena kompjuterskih programa: *ChemOffice*, *Gaussian* za optimizaciju struktura sintetisanih jedinjenja; *Modeler* za konstrukciju homologog modela hERG kanala i *AutoDock 4.0.1* za izvođenje *docking* eksperimenata i proračuna.
 - ✓ Izbor adekvatnog animalnog modela za ispitivanje antiaritmijske aktivnosti.
 - ✓ Definisanje protokola eksperimenta na odabranom modelu.
 - ✓ Izbor parametara za praćenje antiaritmijske aktivnosti sintetisanih derivata u cilju procene uticaja strukturne modifikacije na dobijene efekte.
- ❖ Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti sintetisanih derivata fenilpropiofenona i njihovih intermedijera.
 - ✓ Izbor humanih maligno transformisanih ćelijskih linija za *in vitro* ispitivanja antiproliferativne aktivnosti primenom MTT testa.
 - ✓ Određivanje intenziteta antiproliferativnog delovanja sintetisanih jedinjenja na humanim malignim ćelijama u kulturi.
 - ✓ Određivanje indeksa selektivnosti antitumorskog dejstva sintetisanih jedinjenja.
 - ✓ Primena kompjuterskih programa (*ChemOffice*, *Gaussian*, *MarvinSketch*, *Dragon*, *Pentacle*) za izračunavanje različitih 2D i 3D deskriptora u cilju objašnjenja korelacije struktura-dobijeni efekat; razvoj i validacija *QSAR* modela za predviđanje antiproliferativne aktivnosti.

**3. SINTEZA AMINOALKOKSI DERIVATA
FENILPROPIOFENONA I NJIHOVIH
INTERMEDIJERA**

3.1. Eksperimentalni deo

3.1.1. Oprema i uređaji

- FT-IR spektrofotometar Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD),
- NMR VARIAN GEMINI 200 (Varian, Palo Alto, CA, SAD),
- Tečni hromatograf spregnut sa masenim detektorom preciznih masa Agilent 6210, Time-of-Flight (Agilent Technologies, Palo Alto, CA SAD),
- UHPLC-MS-MS aparat – tečni hromatograf spregnut sa triplkvadripolskim masenim detektorom (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD),
- Analitička vaga, Adventurer™-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD),
- Magnetna mešalica, Tehtnica Rotamix SHP-10 (Zelesniki, Slovenia),
- Rotacioni vakuum uparivač, ROTAVAPOR-R (Büchi, Švajcarska),
- Vakuum pumpa, KifLab, Laboport (KNF NeubergerGmb, Nemačka),
- Aparat za određivanje temperature topljenja, Boetius PHMK 05 (Nemačka),
- UV lampa, UV-CABINET II (Camag, Švajcarska),
- Difraktometar, Oxford Diffraction Xcalibur Sapphire3 Gemini (Agilent Technologies, Palo Alto, CA SAD).

3.1.2. Hemikalije

- 2-fluorobenzaldehid, *o*-FC₆H₄CHO (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- 4-fluorobenzaldehid, *p*- FC₆H₄CHO (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- 2- metilbenzaldehyd, *o*-CH₃C₆H₄CHO (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- 4-metilbenzaldehyd, *p*-CH₃C₆H₄CHO (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- 2-trifluorometilbenzaldehyd, *o*-CF₃C₆H₄CHO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- 2- hlorobenzaldehid, *o*-ClC₆H₄CHO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- 2-hidroksiacetofenon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- hlorovodonična kiselina 35%, HCl p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- natrijum-hidroksid p.a. NaOH, (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- metanol, CH₃OH Chromasolv, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH),
- metanol, CH₃OH, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- dihlormetan, CH₂Cl₂, p.a. (Carlo Erba, Rodano, Italija),

- dietiletar, (C₂H₅)₂O, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- hloroform, CHCl₃, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- acetonitril, CH₃CN, MS čistoće, ACN (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- acetonitril, CH₃CN, HPLC čistoće, ACN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD),
- mravlja kiselina 98%, HCOOH, (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka),
- etanol 96%, C₂H₅OH (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- destilovana voda, H₂O (Farmaceutski fakultet, Beograd),
- toluen p.a., *o*-CH₃C₆H₅ (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- cikloheksan p.a. C₆H₁₂, (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- *n*-heksan, p.a. C₆H₁₂ (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- amonijak 25%, p.a. NH₃ (Carlo Erba, Rodano, Italija),
- natrijum-hlorid p.a., NaCl (ZorkaPharm, Šabac, Srbija),
- magnezijum-sulfat, anhidrovani p.a., MgSO₄ (Merck, Darmstadt, Germany),
- sumporna kiselina 98%, p.a., H₂SO₄ (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- vodonik, H₂ (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija),
- azot, N₂ (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija),
- 5% paladijum na ugljeniku p.a., 5%Pd/C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- natrijum-sulfat, anhidrovani, Na₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Germany),
- epihlorhidrin, p.a. C₂H₂OCH₂Cl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- propilamin, p.a. C₃H₇NH₂ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- deuterisani hloroform, CDCl₃ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- tetrametilsilan, TMS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- silikagel 60 za hromatografiju na koloni (veličina čestica 0,063-0,200 mm (70-230 mesch), veličina pore 100 Å) (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- silikagel 60 za *dry flash* hromatografiju na koloni (veličina čestica 0,035-0,075 mm (220-440 mesch), veličina pore 60 Å) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- whatman[®] indikatorski papir, pH opseg 0-14 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- fosfor-pentoksid, P₂O₅, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- filter papir (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),

3.1.3. *Kompjuterski programi*

Molinspiration Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>)

Chem Office Ultra 7.0. (<http://www.cambridgesoft.com/>).

3.1.4. *Metode izračunavanja molekulskih deskriptora*

Vrednosti logP za propafenon i novosintetisana jedinjenja su izračunate primenom programskog paketa *Molinspiration Cheminformatics* i računarskog programa *Chem Office Ultra 7.0.* Vrednosti parametra koji definiše hidrofobne efekte supstituenata izračunate su primenom programskog paketa *Molinspiration Cheminformatics.* Vrednosti za elektronske i sterne efekte supstituenata preuzete su iz literature²⁴⁶⁻²⁴⁷.

3.1.5. *Postupci sinteze*

Priprema 30% rastvora natrijum- hidroksida u vodi

Odmeri se 30,0 g natrijum-hidroksida *p.a.*, preneses u suv erlenmejer zapremine 250 ml, postepeno se dodaje 60 ml destilovane vode, uz hlađenje meša staklenim štapićem do rastvaranja i zatim doda preostalih 10 ml vode. Reagens se priprema *ex tempore.*

Priprema 0,1mol/l rastvora natrijum-hidroksida

Odmeri se 0,4 g natrijum-hidroksida *p.a.*, prenese u suv odmerni sud zapremine 100 ml, postepeno se u porcijama dodaje 60 ml vode uz hlađenje do rastvaranja, a zatim sud dopuni vodom do oznake. Dobijeni rastvor je bistar i bezbojan; čuva se u dobro zatvorenoj boci sa gumenim ili plastičnim zaptivačem.

Priprema 1M rastvora hlorovodonične kiseline

U odmerni sud od 100 ml prenese se oko 50 ml vode, doda 0,85 ml 35 % HCl i vodom dopuni do oznake.

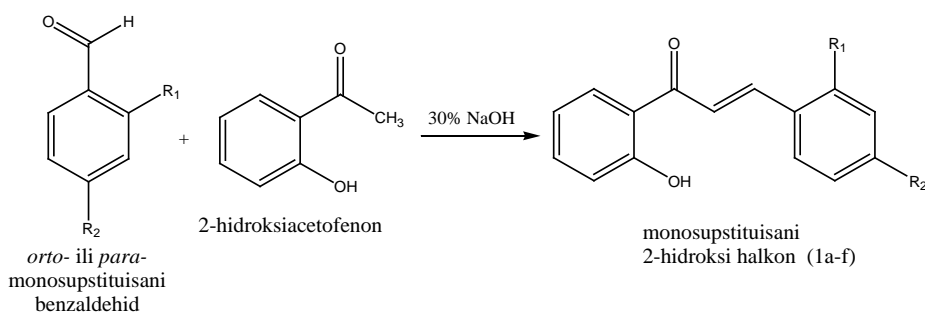
Priprema rastvora hlorovodonične kiseline u dietiletru

U erlenmejeru sa šlifom, koji je prethodno uronjen u ledeno kupatilo pomešaju se 4 dela sveže predestilovanog suvog etra i 1 deo koncentrovane 35 % HCl, erlenmejer zatvori plastičnim zaptivačem i kružnim pokretima smeša blago promućka. Zatim se doda 2 puta po 2 g anhidrovanog MgSO₄, posuda ponovo zatvori i kružnim pokretima blago promućka. Eterski sloj iznad taloga se dekantuje u suv erlenmejer u kome se

nalazi 4 g anhidrovanog MgSO_4 i ostavi da stoji preko noći na hladnom mestu, dobro zatvoren i zaštićen od vlage. Etarski sloj se filtrira preko filter papira koji je obložen slojem pamučne vate u suvu i čistu bocu prethodno sušenu na visokom vakuumu uz zagrevanje plamenikom radi uklanjanja tragova vlage.

Opšti postupak sinteze orto- ili para-monosupstituisanih 1-(2-hidroksifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona (halkona, 1a-f)

Reakcija je u literaturi poznata kao *Claisen-Schmidt*-ova kondenzacija²⁴⁸⁻²⁴⁹ i predstavlja bazno katalizovanu kondenzaciju 2-hidroksiacetofenona i orto- ili para-monosupstituisanog benzaldehida (Shema 1).



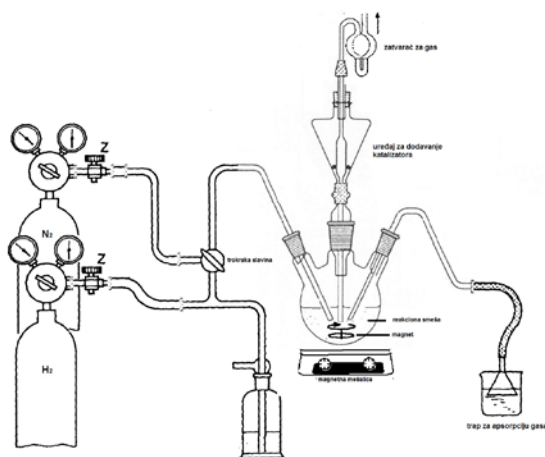
Shema 1. Sinteza α, β -nezasićenih ketona (halkona)

U suv balon sa okruglim dnom zapremine 100 ml u kome se nalazi magnet za mešanje odmeri se i prenese 10 ml 96 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ i uz neprekidno mešanje doda 1,40 g (0,012 mol) 2-hidroksiacetofenona i ona količina orto- ili para-monosupstituisanog benzaldehida koja odgovara 0,01 molu istog. U reakcionu smešu se uz neprekidno mešanje u malim porcijama doda 20 g 30 % rastvora NaOH. Tokom dodavanja rastvora NaOH u početku bezbojna reakciona smeša dobija nepostojanu žutu boju koja prelazi u narandžastu, sve dok se ne doda i poslednje količine rastvora NaOH kada reakciona smeša dobija postojanu krv-crvenu boju. Pošto postane homogena, ostavi se na sobnoj temperaturi da se meša preko noći. Nastaje natrijumova so monosupstituisanog 2-hidroksi halkona koja se izdvaja kao narandžasti talog ili suspenzija u vodeno-alkoholnoj smeši. Reakciona smeša se ostavi da stoji u frižideru na 4-8 °C 24 h, uz povremeno mešanje snažnim protresanjem. Smeša se razblaži dodatkom ledene vode i zakiseli hladnom 1mol/l HCl do pH smeše oko 3, što se proverava univerzalnom lakmus hartijom. Izdvaja se talog žute boje koji se procedi na vakuumu i ispira ledenom vodom do neutralne reakcije (na lakmusu), a zatim prelije sa 5 ml ohlađenog 96 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Sirovi halkon se ostavi da se suši na vazduhu, na tamnom mestu. Prečišćava se *dry flash*

hromatografijom na silikagelu sa toluenom kao eluentom. Nakon uklanjanja toluena pod sniženim pritiskom, dobija se čisti *trans* izomer halkona u obliku žutog kristalnog praška (potvrđeno ^1H NMR; $J_{\text{vinil H}} = 15\text{-}16$ Hz). Dobijeni proizvod se prekrystalise iz etanola.

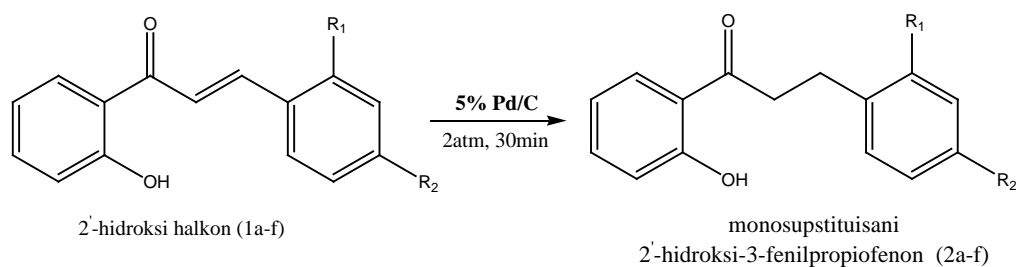
Opšti postupak za sintezu monosupstituisanih 2'-hidroksi-3-fenilpropiofenona (2a-f)

Sinteza *orto*-hidroksifenil propiofenona izvodi se u modifikovanoj aparaturi za katalitičku hidrogenizaciju na sobnoj temperaturi (Sl.28). Aparatura se montira u posebnom delu laboratorije po pravilu na metalnoj rešetci. Aparaturu čini trogrli balon zapremine 250 ml, sigurnosni trap (ispiralica za gasove), prijemnik za gasove, boca za vodonik sa manometrom i sigurnosnim ventilom (regulatorom brzine isticanja gasa), boca za azot sa manometrom i sigurnosnim ventilom (regulatorom brzine isticanja gasa), teflonska creva, aluminijumske šelne, staklene šlifovane cevčice za uvođenje gasova, trokraka slavina, zatvarač za gasove, magnet i magnetna mešalica. U bočni otvor balona postavi se staklena cev za dotok gasa, koja je uronjena u reakcionu smešu. Preko teflonskog creva cev je povezana sa sigurnosnim trapom, trokrakom slavinom, bocom za vodonik i bocom za azot. Na drugom bočnom otvoru balona nalazi se staklena cev koja je teflonskim crevom povezana za odvod gasova uronjen u prijemnik sa vodom. Na centralnom otvoru balona nalazi se deo za dodavanje čvrstih supstanci na čijem je vrhu zatvarač za gasove. Mesta spojeva na aparaturi dodatno su obezbeđena aluminijumskim šelnama.



Slika 28. Prikaz modifikovane aparature za katalitičku hidrogenizaciju

Hidrogenizacija se izvodi prema postupku prikazanom na Shemi 2.

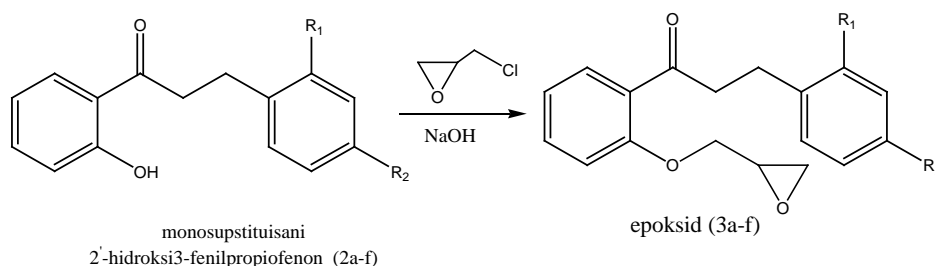


Shema 2. Sinteza *orto*- ili *para*- monosupstituisanih 2'-hidroksi-3-fenilpropiofenona

U reakcionom balonu u koji je stavljen magnet za mešanje sipa se metanolni rastvor halkona (1a-f) (3,39 mmol/150 ml CH₃OH). Pomoću trokrake slavine sistem se poveže sa bocom za azot i bocom za vodonik zatim se ventil na boci za azot otvori tako da pritisak bude oko 1-2 atm, slavina usmeri tako da omogući protok gasa u aparaturu sve dok ne počnu da izlaze mehurovi gasa kroz staklenu cev u prijemnik sa vodom. Reakciona smeša se neprekidno meša. Pusti se da azot protiče kroz sistem u trajanju od 10 min., a zatim kroz uređaj za dodavanje čvrstih supstanci doda katalizator (5% Pd/C) u količini od 200 mg uz neprekidno mešanje reakcione smeše i konstantno proticanje azota još narednih 15 min. Na ovaj način se odstranjuje vazduh iz reakcione smeše i sistema. Potom se zatvori ventil na boci za azot, otvori ventil na boci za vodonik tako da pritisak bude 1 atm, a trokraka slavina usmeri tako da vodonik ulazi u reakcionu smešu sve dok ne počnu da izlaze mehurovi gasa kroz staklenu cevčicu u prijemnik sa vodom. Zatim se pomoću sigurnosnog ventila na boci za vodonik reguliše protok gasa tako da pritisak bude 2 atm. Vodonik se uvodi u reakcionu smešu koja se neprekidno meša u trajanju od 30 min. Kada se hidrogenizacija završi ventil na boci za vodonik se zatvori, otvori se ventil na boci sa azotom, trokraka slavina usmeri tako da azot ulazi u reakcionu smešu sve dok ne počnu da izlaze mehurovi gasa u prijemnik sa vodom uz neprekidno mešanje reakcione smeše u trajanju od još 15 min. Aparatura se zatim pažljivo rasklopi, a reakciona smeša cedi preko filter papira na kome se nalazi sloj pamučne vate kako bi se adsorbovao katalizator. Pri ceđenju smeše posle hidrogenizacije ne sme se dozvoliti da katalizator na vati i filter papiru bude suv, jer može doći do njegovog paljenja na vazduhu. Nakon filtracije bezbojan metanolni rastvor se upari na vakuum uparivaču. Dobija se bela do slabo žuta čvrsta masa koja se po potrebi prečišćava hromatografijom na koloni na silikagelu (eluent: toluen/n-heksan 50:50 v/v). Dobijeni proizvodi su praškovi bele boje.

Opšti postupak sinteze epoksida (3a-f)

Opšti postupak za sintezu epoksida prikazan je na Shemi 3.

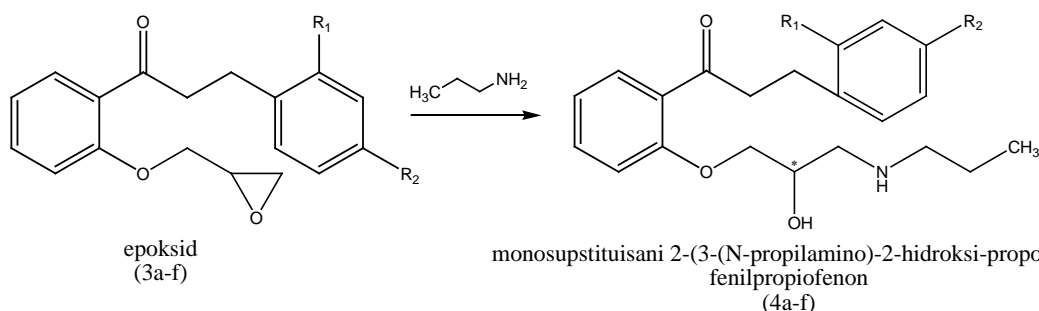


Shema 3. Sinteza epoksida

U suv balon sa okruglim dnom zapremine 150 ml sa povratnim kondenzatorom u kome se nalazi magnet za mešanje, prenese se ona količina *orto*-hidroksifenilpropiofenona (2a-f) koja odgovara 45,8 mmola istog, pažljivo pomoću pipete doda dva puta po 50 ml (\pm) epihlorhidrina i meša dok se ne rastvori. U reakcionu smešu se potom doda spraseni NaOH u količini koja odgovara 60 mmola istog, uz neprekidno mešanje. Reakciona smeša se zagreva uz refluks tokom 7 h, ohladi do sobne temperature, a zatim na vakuumu upari do suva, kako bi se uklonio višak epihlorhidrina. Dobija se uljasta tečnost oker boje koja se rastvori u 20 ml sveže predestilovanog dietiletra i ekstrahuje 2-3 puta sa po 10 ml vode kako bi se odstranio zaostali NaOH. Etarski sloj se suši filtracijom preko anhidrovanog Na_2SO_4 , a zatim rastvarač ukloni uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču do suva. Nakon uparavanja dobija se 45,5 mmola proizvoda u obliku žute uljaste tečnosti. Dobijeni proizvod se bez dodatnog prečišćavanja koristi u sledećoj fazi sinteze.

Opšti postupak za sintezu *orto*- ili *para*-monosupstisuanih 2-(3-(N-propilamino)-2-hidroksi-propoksi)-fenilpropiofenona (4a-f)

Opšti postupak za sintezu monosupstisuanih 2-(3-(N-propilamino)-2-hidroksi-propoksi)-fenilpropiofenona prikazan je na Shemi 4

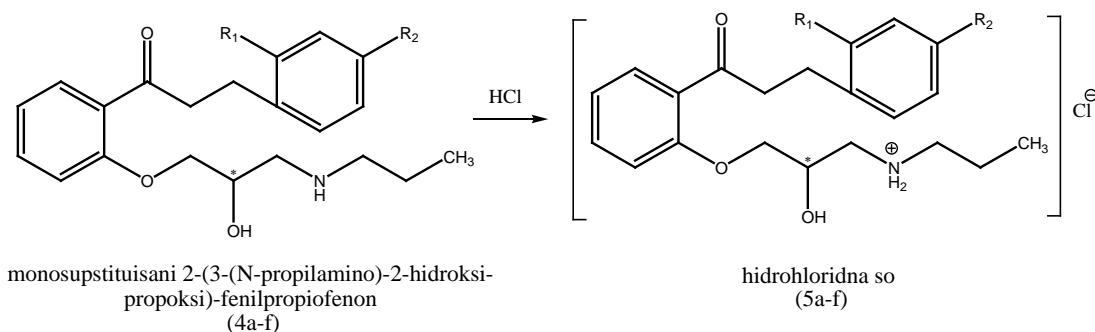


Shema 4. Sinteza *orto* ili *para* monosupstisuanih 2-(3-(N-propilamino)-2-hidroksi-propoksi)-fenilpropiofenona

U suv dvogrli balon sa okruglim dnom zapremine 150 ml opremljenim sa povratnim kondenzatorom, septumom i magnetom za mešanje prenese se ona količina epoksida (3a-f) koja odgovara 17 mmola istog. Pažljivo pomoću pipete doda se 30 ml *n*-propilamina i uz neprekidno mešanje zagreva uz refluks oko 6 h (tok reakcije se prati metodom TLC na silikagelu sa mobilnom fazom CH₂Cl₂/CH₃OH/25%NH₃ (20:1:0,15 v/v/v). Nakon završetka reakcije smeša se ostavi da se ohladi do sobne temperature, a višak *n*-propilamina upari na rotacionom vakuum uparivaču. Sirovi proizvod u obliku uljasto-smolastog ostatka braon boje prečišćava se hromatografijom na koloni na silikagelu sa eluentom CH₂Cl₂/CH₃OH/25%NH₃ (20:1:0,15 v/v/v).

Opšti postupak sinteze hidrohloridnih soli orto- ili para- monosupstituisanih 2-(3-(N-propilamino)-2-hidroksi-propoksi)-fenilpropiofenona (5a-f)

Opšti postupci za sintezu hidrohloridnih soli 2-(3-(N-propilamino)-2-hidroksi-propoksi)-fenilpropiofenona prikazan je na Shemi 5.



Shema 5. Sinteza hidrohloridnih soli monosupstituisanih 2-(3-(N-propilamino)-2-hidroksi-propoksi)-fenilpropiofenona

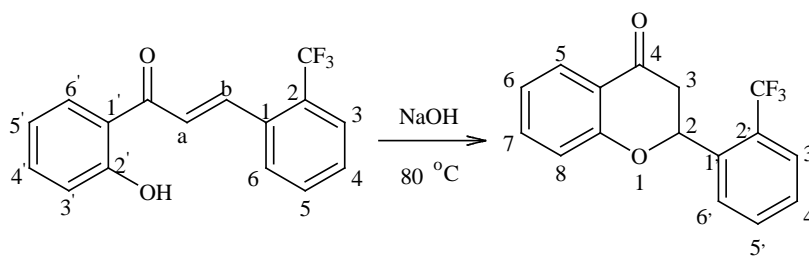
Postupak 1. Nakon prečišćavanja na koloni i uklanjanja rastvarača na rotacionom vakuum uparivaču zaostali čvrsti bleđožučkasti ostatak amina (4a-f) rastvori se u 10-15 ml sveže predestilovanog suvog etra. Pomoću cevi za uvođenje gasova balon se poveže sa aparaturom u kojoj se generiše HCl gas. Aparatura se sastoji od šlifovanog erlenmejera u kome se nalazi NaCl ili anhidrovani Na₂SO₄ i cilindrične graduisane kapalice u kojoj se nalazi 85 % H₂SO₄. Reakcija je egzotermna pa je potrebno hladiti erlenmejer u kome se nalazi so. Razvijeni gas se pomoću staklene cevi uvodi u rastvor amina (4a-f) u suvom etru koji se neprekidno meša, sve dok se izdvaja beli talog nastale hidrohloridne soli. Po završenoj reakciji rastvor iznad taloga se odlije, a zaostali talog

procedi na vakuumu i prečisti prekrizacijom iz smeše aceton : metanol 50:50 (v/v). Dobija se beo kristalan prašak koji se suši u vakuum sušnici iznad P₂O₅.

Postupak 2. Nakon prečišćavanja na koloni i uklanjanja rastvarača na rotacionom vakuum uparivaču zaostali čvrsti bleđožučkasti ostatak amina (4a-f) rastvori se u 10-15 ml sveže predestilovanog suvog etra. U smešu se uz neprekidno mešanje dodaje u porcijama HCl pripremljena u suvom dietiletru sve dok se izdvaja beli talog i još 2 ml u višku. Beli talog nastale hidrohloridne soli se procedi na vakuumu i prečisti prekrizacijom iz smeše aceton : metanol 50: 50 (v/v). Dobija se beo kristalan prašak koji se suši u vakuum sušnici iznad P₂O₅.

Sinteza 2-[2-(trifluorometil)fenil]-2H-1-benzopiran-4(3H)-ona

Sinteza flavanona prikazana je na Shemi 6



Shema 6. Sinteza flavanona

U suv dvogrli balon zapremine 150 ml sa povratnim kondenzatorom i termometrom u kome se nalazi magnet za mešanje, odmeri se i prenese 1,0 g halkona **1CF3**, doda 50 ml smeše 96 % etanol:voda 50:50 (v/v) i meša do potpunog rastvaranja halkona (rastvor žute boje). Pripremljenom rastvoru halkona podesi se pH vrednost na 9 korišćenjem 0,1 mol/l NaOH. Balon sa reakcionom smešom se zatim zagreva uz refluks na vodenom kupatilu uz neprekidno mešanje tako da se temperatura reakcione smeše održava na 80 ± 2 °C tokom 2 h. Reakciona smeša se ostavi da se ohladi do sobne temperature. Prilikom hlađenja izdvajaju se beličasti, igličasti kristali koji intenzivno rastu kada stoje preko noći u rastvoru. Kristali se iz rastvora izdvajaju dekantovanjem viška rastvarača, pažljivo prenesu na filter papir i isperu 2 puta sa po 2 ml hladnog 96 % etanola, a zatim suše prvo nad vakuumom, pa u vakuum sušnici na 50 °C iznad P₂O₅. Prinos je 76 %.

3.1.6. Strukturna analiza sintetisanih supstanci

Temperature topljenja novosintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona određene su metodom trenutnog topljenja.

IR spektri snimljeni su primenom FT-IR aparata Nicolet iS10. Spektri su snimljeni metodom atenuisane refleksije uz primenu ATR modula SMART iTR opremljenog dijamantskim kristalom. Spektri su obrađivani primenom računarskog programa OMNIC 8.0.

NMR spektri (^1H , ^{13}C) snimljeni su na aparatu NMR VARIAN GEMINI 200. Uzorci sintetisanih supstanci rastvoreni su u CDCl_3 , a hemijska pomeranja određena su u odnosu na TMS kao interni standard.

Tačne mase sintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona kao i njihovih intermedijera, halkona određene su na masenom detektoru preciznih masa Agilent 6210 Time-of-Flight kuplovanim sa tečnim hromatografom Agilent Technologies 1210. Maseni spektri obrađeni su primenom računarskih programa Agilent MassHunter Workstation Software i Analyst QS.

MS-MS fragmentacija izvršena je na UHPLC-MS-MS sistemu opremljenim UHPLC tečnim hromatografom ACCELA i triplkvadripolskim MS-MS detektorom. Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitril : 0,1 % mravlja kiselina (80:20 v/v). Masena spektrometrija izvršena je primenom elektron sprej jonizacije u pozitivnom ili negativnom modu. Nakon optimizacije metode napon u detektoru podešen je na 5000 V, temperatura u izvoru na 378 °C, a u kapilari na 152 °C. Pritisak azota kao nosača podešen je na 30 bara. Prvi kvadripol korišćen je za izolovanje molekuskog jona $[\text{M}+\text{H}]$ ili $[\text{M}-\text{H}]$, drugi kvadripol (koliziona ćelija) za fragmentaciju, dok je treći kvadripol korišćen za detekciju fragmenata. Koliziona energija je povećavana od 0 do 60 eV u 10 koraka.

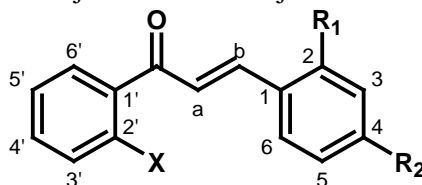
Kristalografski podaci su prikupljeni na Oxford Diffraction Xcalibur Sapphire3 Gemini difraktometru sa CCD detektorom na 293 K. Za snimanje monokristala korišćeno je zračenje $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) i multi-sken korekcija za apsorpciju. Strukture su rešene *SHELXS97* i utačnjavane *SHELXL97* i *WinGX* metodama²⁵⁰⁻²⁵¹. Za prikazivanje molekula korišćen je *ORTEP-3*²⁵². Parametri pomeranja svih atoma osim atoma vodonika utačnjeni su anizotropno. Atomi vodonika su smešteni u geometrijski izračunate položaje i utačnjeni korišćenjem modela *jašućeg atoma*.

3.2. Rezultati

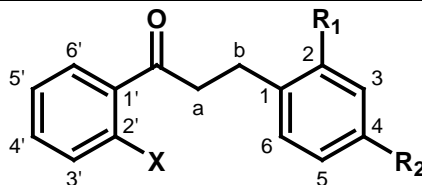
3.2.1. Hemijske strukture sintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona i njihovih intermedijera

Hemijske strukture novosintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona i njihovih intermedijera prikazane su u Tabeli 2.

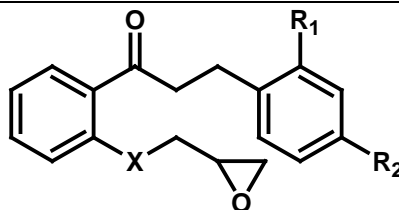
Tabela 2. Strukturne formule sintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona i njihovih intermedijera



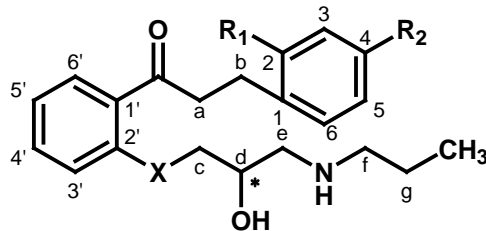
Redni jedinjenj	1a 1CF3	1b 1OCH3	1c 1OF	1d 1OCl	1e 1PF	1f 1PCH3
<i>X</i>	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH
<i>R</i> ₁	-CF ₃	-CH ₃	-F	-Cl	-H	-H
<i>R</i> ₂	-H	-H	-H	-H	-F	-CH ₃



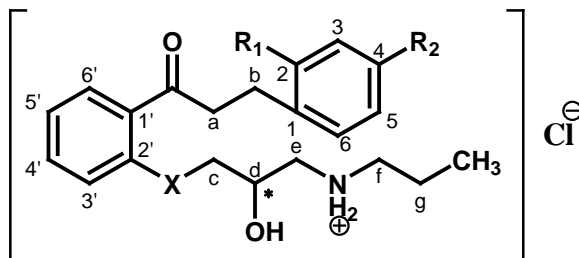
Redni jedinjenj	2a 2CF3	2b 2OCH3	2c 2OF	2d 2OCl	2e 2PF	2f 2PCH3
<i>X</i>	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH
<i>R</i> ₁	-CF ₃	-CH ₃	-F	-Cl	-H	-H
<i>R</i> ₂	-H	-H	-H	-H	-F	-CH ₃



Redni jedinjenj	3a 3CF3	3b 3OCH3	3c 3OF	3d 3OCl	3e 3PF	3f 3PCH3
<i>X</i>	-O-	-O-	-O-	-O-	-O-	-O-
<i>R</i> ₁	-CF ₃	-CH ₃	-F	-Cl	-H	-H
<i>R</i> ₂	-H	-H	-H	-H	-F	-CH ₃



Redni jedinjenj	4a	4b	4c	4d	4e	4f
	4CF3	4OCH3	4OF	4OCl	4PF	4PCH3
X	-O-	-O-	-O-	-O-	-O-	-O-
R ₁	-CF ₃	-CH ₃	-F	-Cl	-H	-H
R ₂	-H	-H	-H	-H	-F	-CH ₃



Redni jedinjenj	5a	5b	5c	5d	5e	5f
	5CF3	5OCH3	5OF	5OCl	5PF	5PCH3
X	-O-	-O-	-O-	-O-	-O-	-O-
R ₁	-CF ₃	-CH ₃	-F	-Cl	-H	-H
R ₂	-H	-H	-H	-H	-F	-CH ₃

3.2.2. Određivanje lipofilnosti sintetisanih jedinjenja i izračunavanje parametara koji definišu hidrofobne, sterne i elektronske efekte supstituenata primenom računarskih programa

Lipofilnost sintetisanih jedinjenja procenjena je izračunavanjem vrednosti logP primenom računarskih programa *Molinspiration Cheminformatics* i *ChemOffice Ultra 7.0* (Tabela 3). Uticaj supstituenata na fizičko-hemijske osobine ispitivanih jedinjenja definisana je korišćenjem:

1) parametra hidrofobnosti (π), koji je određen računskim putem primene jednačine:

$$\pi_x = \text{milog}P_x - \text{milog}P_{\text{propafenon}} \quad (6)$$

gde **X** označava supstituent u *orto*- ili *para*-položaju terminalnog benzenovog prstena propafenona; π_x je parametar hidrofobnosti supstituenta, **milogP_x** je logP vrednost za sintetisani derivat sa supstituentom **X** u *orto* ili *para*- položaju (*Molinspiration*

Cheminformatics), **milogP**_{propafenon} je logP vrednost za propafenon (Molinspiration Cheminformatics). Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 3.

2) induktivne sigma konstante (σ_I) koja definiše elektronska svojstva supstituenta (Tabela 3)

3) *Van der Waalsovog* radijusa (V_r) ili *Van der Waalsovog* volumena (V_v) koji definišu sterne efekte supstituenta (Tabela 3)

Tabela 3. Fizičko-hemijske osobine propafenona i novosintetisanih derivata

jedinjenje	5CF3	5OCH3	5OF	5OCl	5PF	5PCH3	PRO
logP							
milogP	4,31	3,68	3,58	4,09	3,62	3,91	3,46
ClogP	4,52	4,09	3,78	4,35	3,78	4,14	3,64
substituent	π_{Xorto}	π_{Xpara}	σ_I^i	V_r^{ii} (Å)	V_v^{iii} (Å ³)		
-H	0,000	0,000	0,000	1,200	-		
-CF3	0,847	-	0,420	-	39,800		
-CH3	0,401	0,449	0,040	-	21,300		
-F	0,116	0,164	0,520	1,470	-		
-Cl	0,630	-	0,470	1,750	-		

i-podaci preuzeti iz (<http://www.wiredchemist.com/chemistry/data>);

ii-podaci preuzeti iz: Smart BE, J Fluorine Chem 2001; 109:3–11);

iii- podaci preuzeti iz: Leroux F .Chembiochem , 2004; 5: 644 – 649)

3.2.3. Strukturna analiza sintetisanih jedinjenja

1a.(E)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-(trifluorometil)fenil)-prop-2-en-1-on. **1CF3**

C₁₆H₁₁F₃O₂. Žut kristalan prašak; prinos: 88,6 %; temperatura topljenja 111-114 °C (etanol). **IR (ATR) (cm⁻¹):** 3438,9; 1645,1; 1586,1; 1205,6; 1154,7; 1487,1; 1443,4; 1341,9; 1315,5; 1287; 1119,2; 1037,1; 971,7; 864,8; 757,4; 648,3; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,66 (s, 1H, -OH), 8,31 (d, 1H, *J*=15.72, b), 7,93-7,73 (m, 4H, ArH: 6', 4', 3, 5), 7,63-7,37 (m, 5H, a, ArH: 3', 5', 4, 6); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,29, 163,70, 140,71, 136,76, 133,70, 132,15, 130,04, 129,78, 128,04, 126,43, 126,63, 126,32, 124,45, 119,77, 118,73, 118,97; **HRMS: [M-H]⁻** izračunato za C₁₆H₁₀F₃O₂ = 291,06384, određeno = 291,06321.

1b. (E)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-metilfenil)-prop-2-en-1-on. **1OCH3 (C₁₆H₁₄O₂)**. Žut kristalan prašak; prinos: 90.8%; temperatura topljenja 153-156 °C (etanol). **IR (ATR) (cm⁻¹):** 3015,3; 1636,5; 1575,5; 1258,2; 2919,4; 1481,6; 1320,8; 1195,9; 1155,2; 1016,2; 865,1; 805,2; 819; 741,2; 661,1; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,84 (s, 1H, -OH), 8,27 (d, 1H, *J* = 15,60, b), 7,94 (dd, 1H, *J*₁ = 8,20, *J*₂ = 1,40, ArH 6'), 7,73-7,56 (m, 3H, a, *J* = 15,2, a, ArH: 4', 6), 7,38-7,23 (m, 3H, ArH: 3, 4, 5), 7,05-7,69 (m, 2H, ArH: 3', 5'), 2,50

(s, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (δ, ppm):193,80, 163,65, 143,07, 138,65, 136,39, 133,63, 131,04, 130,66, 129,69, 126,54, 126,42, 120,02, 121,19, 120,02, 118,86, 118,62, 19,81; **HRMS**: [M-H]⁻ izračunato za C₁₆H₁₃O₂ = 237,09210, određeno 237,09267.

1c. (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-fluorofenil)-prop-2-en-1-on **10F** (C₁₅H₁₁FO₂). Žut kristalan prašak;. prinos: 83,3 %; temperatura topljenja: 82-83 °C (etanol). **IR (ATR) (cm⁻¹)**: 3438,0; 1642,9; 1576; 1203,2; 1155; 1485,3; 1456,2; 1440,5; 1366,3; 1340,4; 1320; 1296,1; 1264,2; 1227,5; 1091,6; 1018,5; 984,9; 865,8; 814,7; 748,9; 662,1; ¹H NMR (δ, ppm):12,77 (s, 1H, -OH), 8,04 (d, 1H, *J* = 15,72, b), 7,94 (dd, 1H, *J*₁ = 8,14, *J*₂ = 1,68, ArH 6'), 7,82 (d, 1H, *J* = 15,73, a), 7,70 (td, 1H, *J*₁ = 7,58, *J*₂ = 1,69, ArH 4'), 7,55-7,36 (m, 2H, ArH: 5', 6'), 7,26-6,91 (m, 4H, ArH: 3, 4, 5, 3'); ¹³C NMR (δ, ppm): 193,84, 164,45, 163,65, 159,37, 138,25, 136,54, 132,31, 132,15, 130,20, 130,15, 129,75, 124,63, 124,58, 122,94, 122,79, 119,97, 118,91, 118,64, 116,62, 116,18; **HRMS**: [M-H]⁻ izračunato za C₁₅H₁₀FO₂ = 241,06703, određeno = 241,06615.

1d. (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(2-hlorofenil)-prop-2-en-1-on **10Cl** (C₁₅H₁₁ClO₂). Žut kristalan prašak; prinos: 82,5 %; temperatura topljenja: 50-53 °C (etanol). **IR (ATR) (cm⁻¹)**: 1637,8; 1574,3; 1203,4; 1019,9; 1484,6; 1439,9; 1338,9; 1152,7; 973,6; 745,3; 658,4; ¹H NMR (δ, ppm): 12,75 (s, 1H, -OH), 8,34 (d, 1H, *J* = 15,17, b), 7,93 (dd, 1H, *J*₁ = 7,76, *J*₂ = 1,68, ArH 6'), 7,79-7,74 (m, 1H, ArH 4'), 7,67 (d, 1H, *J* = 15,73, a), 7,55-7,42 (m, 2H, ArH: 3, 6), 7,39-7,26 (m, 2H, ArH: 4, 5), 7,05-6,90 (m, 2H, ArH: 3', 5'); ¹³C NMR (δ, ppm):193,49, 163,63, 141,14, 136,59, 135,72, 132,88, 131,53, 130,40, 129,71, 127,89, 127,13, 122,65, 119,84, 118,91, 118,66; **HRMS**: [M-H]⁻ izračunato za C₁₅H₁₀ClO₂ = 257,03748, određeno = 257,03784.

1e. (*E*)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-fluorofenil)-prop-2-en-1-one **1PF** (C₁₅H₁₁FO₂). Žut kristalan prašak; prinos: 56,0 %; temperatura topljenja: 84-88 °C. **IR (ATR) (cm⁻¹)**: 1635,7; 1570,6; 1203,2; 1155,3; 1441,4; 1416,9; 1364,7; 1339,5; 1299,1; 1268; 1227,9; 1023; 982,7; 868,7; 826,2; 751,4; 659,8; ¹H NMR (δ, ppm): 12,79 (s, 1H, -OH), 7,94 (dd, 1H, *J*₁ = 7,80, *J*₂ = 1,68, ArH 6'), 7,93 (d, 1H, *J* = 15,45, b), 7,70-7,46 (m, 4H, a, ArH: 2, 6, 4'), 7,26-6,91 (m, 4H, ArH: 3, 5, 3', 5'); ¹³C NMR data (δ, ppm):193,56, 166,82, 163,63, 161,79, 144,15, 136,48, 130,91, 130,71, 130,53, 129,60, 119,95, 119,84, 119,81, 118,88, 118,68, 116,47, 116,04, **HRMS**: [M-H]⁻ izračunato za C₁₅H₁₀FO₂ = 241,06703, određeno = 241,06636.

1f. *(E)*-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-metilfenil)-prop-2-en-1-on **1PCH3** (C₁₆H₁₄O₂). Žut kristalan prašak; prinos: 93,8%; temperatura topljenja: 117-118 °C (etanol). **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1634,1; 1563,3; 1199,2; 3029,9; 2919,2; 1485,5; 1440; 1341,8; 1305,7; 1268,2; 1156,3; 1023,9; 982,4; 862,7; 811; 740,6; 660,7; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,86 (s, 1H, -OH), 7,95-7,87 (m, 2H, ArH: 4', 6'), 7,65-7,45 (m, 4H, a, b, ArH: 4, 6), 7,26 (d, 2H, *J* = 7,8, ArH: 3, 5), 7,05-6,90 (m, 2H, ArH: 3', 5'), 2,40 (s, 3H, -CH₃); **¹³C NMR (δ, ppm):** 193,84, 163,61, 145,59, 141,60, 136,27, 131,91, 129,80, 129,62, 128,73, 120,08, 119,06, 118,79, 118,60, 21,52; **HRMS:** [M-H]⁻ izračunata za C₁₆H₁₃O₂ = 237,09210, određena = 237,09312.

2a. *1*-(2-hidroksifenil)-3-(2-trifluorometilfenil)-propan-1-on **2CF3** (C₁₆H₁₃F₃O₂). Prašak bele boje; prinos: 98,6 %; **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1638,9; 1640,9; 1577,3; 1484,9; 1283,5; 1150,2; 1115,0; 752,7; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,27 (s, 1H, -OH), 7,73 (dd, 1H, *J*₁ = 7,80, *J*₂ = 1,60, ArH 6'), 7,67 (d, 1H, *J* = 7,80, ArH 3), 7,53-7,25 (m, 4H, ArH: 4, 5, 6, 4'), 7,01 (dd, 1H, *J*₁ = 8,40, *J*₂ = 1,00, ArH 5'), 6,91-6,83 (m, 1H, ArH 3'), 3,37-3,19 (m, 4H, a, b); **¹³C NMR (δ, ppm):** 204,74, 162,45, 139,49, 136,45, 132,04, 131,24, 129,71, 127,29, 126,52, 126,21, 126,11, 121,85, 119,11, 118,95, 118,53, 40,02, 26,84.

2b. *1*-(2-hidroksifenil)-3-(2-metilfenil)-propan-1-on **2OCH3** (C₁₆H₁₆O₂): Prašak bele boje; prinos: 90,6 %; **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1630,4; 1581,2; 1483,2; 1442,9; 1193,8; 1153,2; 979,1; 862,7; 814,6; 748,6; 652,6; **¹H NMR (δ, ppm):** 12,32 (s, 1H, -OH), 7,76 (dd, 1H, *J*₁ = 7,80, *J*₂ = 1,68, ArH 6'), 7,51-7,42 (m, 1H, ArH 4'), 7,24-6,91 (m, 5H, ArH: 3, 4, 5, 6, 5'), 6,88 (d, 1H, *J* = 7,40, ArH 3'), 3,32-3,24 (m, 2H, a), 3,08-3,01 (m, 2H, b), 2,35 (s, 3H, -CH₃); **¹³C NMR (δ, ppm):** 205,58, 162,48, 138,80, 136,37, 135,96, 130,42, 129,78, 128,65, 126,49, 126,23, 119,24, 118,91, 118,57, 38,67, 27,35, 19,28.

2c. *1*-(2-hidroksifenil)-3-(2-fluorofenil)-propan-1-on **2OF**(C₁₅H₁₃FO₂). Prašak bele boje; prinos: 93,3 %; **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1634,5; 1566,8; 1442,5; 1203,4; 1153,8; 1020,1; 981,1; 807,3; 750,5; 656,9; **¹H NMR data (δ, ppm):** 12,26 (s, 1H, -OH), 7,77-7,72 (m, 1H, ArH 6'), 7,55-7,39 (m, 1H, ArH 4'), 7,29-6,83 (m, 6H, ArH: 3, 4, 5, 6, 3', 5'), 3,37-3,29 (m, 2H, a), 3,13 (t, 2H, *J* = 7,8, b); **¹³C NMR data (δ, ppm):** 205,18, 162,44, 138,29, 136,37, 132,15, 130,91, 129,82, 128,25, 127,34, 124,21, 122,96, 119,22, 118,95, 118,53, 115,58, 115,14, 38,42, 23,84.

2d. *1*-(2-hidroksifenil)-3-(2-hlorofenil)-propan-1-on **2OCl**(C₁₅H₁₃ClO₂). Prašak bele boje; prinos: 92,5 %. **IR (ATR) (cm⁻¹):** 1638,4; 1480,8; 1441; 1196; 1152,7; 983;

748,4; 654,1; $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 12,28 (s, 1H, -OH), 7,78 (dd, 1H, $J_1 = 7,86$, $J_2 = 1,68$, ArH 6'), 7,50-7,16 (m, 5H, ArH: 3, 4, 5, 6, 4'), 7,01(d, 1H, $J = 8,43$, ArH 5'), 6,91-6,83 (m, 1H, ArH 3'), 3,38-3,30 (m, 2H, a), 3,21-3,13 (m, 2H, b); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , ppm): 205,22, 162,45, 138,27, 136,39, 133,93, 130,77, 129,87, 129,64, 127,94, 127,03, 119,24, 118,95, 118,53, 38,04, 28,20.

2e. *1-(2-hidroksifenil)-3-(4-fluorofenil)-propan-1-on 2PF* ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FO}_2$). Prašak bele boje;. prinos: 96,0 %; **IR (ATR)** (cm^{-1}): 1640,2; 1504,5; 1444,9; 1197,7; 1153,8; 980,7; 823,9; 753,5; $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 12,27 (s, 1H, -OH), 7,76 (dd, 1H, $J_1 = 7,87$, $J_2 = 1,69$, ArH 6'), 7,51-7,42 (m, 1H, ArH 4'), 7,25-7,17 (m, 2H, ArH 2, 6), 7,04-6,84 (m, 1H, ArH 3, 5, 3', 5'), 3,35 (t, 2H, $J = 7,87$, a), 3,08 (t, 2H, $J = 7,86$, b); $^{13}\text{C NMR data}$ (δ , ppm): 205,16, 163,92, 162,45, 159,06, 136,43, 129,89, 129,75, 119,22, 118,95, 118,59, 115,55, 115,13, 39,99, 29,08.

2f. *1-(2-hidroksifenil)-3-(4meti-fenil)-propan-1-on 2PCH3* ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2$). Prašak bele boje; prinos: 93,8 %. **IR (ATR)** (cm^{-1}): 1630,4; 1483,2; 1442,9; 1253,3; 1193,8; 1153,2; 979,1; 784,6; 652,6; $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 12,31 (s, 1H, -OH), 7,76 (dd, 1H, $J_1 = 7,86$, $J_2 = 1,69$, ArH 6'), 7,50-7,41 (m, 1H, ArH 4'), 7,13 (s, 4H, ArH: 2, 3, 5, 6), 7,00 (dd, 1H, $J_1 = 8,42$, $J_2 = 1,12$ ArH 5'), 6,91 (t, 1H, $J = 7,86$, ArH 3'), 3,35-3,27 (m, 2H, a), 3,06-2,99 (t, 2H, $J = 7,80$, b), 2,32 (s, 3H, -CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , ppm): 205,56, 162,50, 137,63, 136,32, 135,86, 129,84, 129,29, 128,27, 119,30, 118,91, 118,57, 40,17, 29,59, 20,58.

4a. *3-(2-trifluorometilfenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on 4CF3* ($\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_3$)-nije karakterisan.

5a. (hidrohlordna so) 5CF3 ($\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{ClNO}_3$). Beo kristalan prašak; prinos: 63,80%, temperatura topljenja 157,4-158,6 °C (acetone:metanol 50:50 (v/v)). **IR (ATR)** (cm^{-1}): 3385,9; 2961,3; 1667,2; 1597,9; 2793,5; 1450,8; 1116,7; 1038,3; 782,2; 706,5; $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 9,25 i 8,98 (bs 1H, -NH), 7,72 (dd, 1H, $J_1 = 7,80$, $J_2 = 1,60$, ArH 6'), 7,63 (d, 1H, $J = 7,80$, ArH 3), 7,55-7,27 (m, 4H, ArH: 4, 5, 6, 4'), 7,04-6,96 (m, 2H, ArH 3', 5'), 5,68 (bs, 1H, -OH), 4,25-4,11 (m, 2H, c), 3,32-3,20 (m, 6H, a, b, e, f), 2,99-2,91 (m, 2H, f), 1,99-1,84 (m, 2H, g), 1,02 (t, 3H, $J = 7,40$, h); $^{13}\text{C NMR data}$ (δ , ppm): 200,76, 157,24, 139,89, 134,38, 132,17, 131,22, 130,68, 126,65, 126,31, 126,07, 125,96, 121,24, 113,18, 71,32, 64,77, 51,44, 50,45, 43,83,

26,89, 19,27, 11,04; **HRMS**: $[M-H]^-$ izračunata za $C_{22}H_{25}F_3NO_3 = 408.17920$, određeno = 408,17790.

4b. 3-(2-metilfenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on
4OCH₃ ($C_{22}H_{29}NO_3$)- nije karakterisan

5b. (hidrohloridna so) 5OCH₃ ($C_{22}H_{30}ClNO_3$). Beo kristalan prašak; prinos: 70,80 %; temperatura topljenja 104.9-106.7 °C (aceton:metanol 50:50 (v/v)). **IR (ATR) (cm^{-1})**: 2971,1; 1663,4; 1597,1; 2971,1; 2932,6; 1448,2; 1239,2; 1034,5; 755,2; **¹H NMR (δ , ppm)**: 9,18 i 8,86 (bs 1H, -NH), 7,73 (dd, 1H, $J_1 = 7,80$, $J_2 = 1,80$, ArH 6'), 7,52-7,44 (m, 1H, ArH 4'), 7,13-6,99 (m, 6H, ArH: 3, 4, 5, 6, 3', 5'), 5,65 (bs, 1H, -OH), 4,63 (m, 1H, c), 4,20 (m, 2H, c, d), 3,28-2,87 (m, 8H, a, b, e, f), 2,32 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,96-1,72 (m, 2H, g), 1,03-0,93 (m, 3H, h); **¹³C NMR (δ , ppm)**: 201,52, 157,15, 139,12, 136,01, 134,28, 130,29, 128,45, 126,85, 126,25, 121,21, 113,23, 71,25, 64,71, 51,13, 50,29, 42,55, 41,51, 27,46, 20,89, 19,32, 11,09; **HRMS**: $[M+H]^+$ izračunato za $C_{22}H_{30}NO_3 = 356,22202$, određeno = 355,22061.

4c. 3-(2-fluoro-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on
4OF ($C_{21}H_{26}FNO_3$)-nije karakterisan.

5c. (hidrohloridna so) 5OF ($C_{21}H_{27}FCINO_3$). Beo kristalan prašak; Prinos 73,80 %; temperatura topljenja 153,9-154,6 °C (aceton:metanol 50:50 (v/v)). **IR (ATR) (cm^{-1})**: 2969,4; 1658,7; 1594,2; 1488,6; 1230,6; 1034,3, 766; **¹H NMR (δ , ppm)**: 9,50 i 8,90 (bs 1H, -NH), 7,76 (dd, 1H, $J_1 = 7,80$, $J_2 = 1,60$, ArH 6'), 7,53-7,44 (m, 1H, ArH 4'), 7,26-6,96 (m, 6H, ArH: 3, 4, 5, 6, 3', 5'), 5,58 (bs, 1H, -OH), 4,60-4,57 (m, 1H, c'), 4,20-4,18 (m, 2H, c, d), 3,35-3,26 (m, 3H, a, e'), 3,07-2,99 (m, 5H, b, e, f), 2,04-1,93 (m, 2H, g), 1,05 (t, 3H, $J = 7,20$, h); **¹³C NMR (δ , ppm)**: 201,30, 160,3, 157,20, 134,52, 130,89, 128,09, 127,93, 126,49, 124,27, 121,32, 115,53, 115,07, 113,16, 71,43, 64,77, 51,56, 50,62, 42,02, 23,94, 19,36, 11,14; **HRMS**: $[M+H]^+$ izračunato za $C_{21}H_{27}FNO_3 = 360,19695$, određeno = 360,19695.

4d. 3-(2-hloro-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on
4OCl ($C_{21}H_{26}ClNO_3$) - nije karakterisan.

5d. (hidrohloridna so) 5OCl ($C_{21}H_{27}Cl_2NO_3$). Beo kristalan prašak; prinos 62,80 % temperatura topljenja 145.8-146.9 °C (aceton:metanol 50:50 (v/v)). **IR (ATR) (cm^{-1})**: 2934,7; 1659,2; 1593,5; 1447,3; 1109,3; 1033,9; 757,2; **¹H NMR (δ , ppm)**: 8,89 (bs 1H, -NH), 7,79 (dd, 1H, $J_1 = 7,80$, $J_2 = 1,60$, ArH 6'), 7,57-7,48 (m, 1H, ArH 4'), 7,38-7,02

(m, 6H, ArH: 3, 4, 5, 6, 3', 5'), 4,53-4,43 (m, 1H, c'), 4,27-4,10 (m, 2H, d, c), 3,54 (bs, 1H, -OH), 3,37-3,29 (m, 3H, a, e'), 3,22-2,95 (m, 5H, b, e, f), 2,01-1,81 (m, 2H, g), 1,07 (t, 3H, $J = 7,40$, h); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , ppm): 201,32, 157,02, 138,27, 134,54, 133,66, 130,78, 130,35, 129,36, 128,38, 127,67, 126,91, 126,03, 121,13, 112,92, 71,28, 64,11, 51,00, 50,11, 41,30, 28,11, 19,03, 10,80; **HRMS**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{NO}_3 = 376,16740$, određeno = 376,16709.

4e. 3-(4-fluoro-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on
4PF ($\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{FNO}_3$) - nije karakterisan.

5e. (hidrohloridna so) 5PF ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClFNO}_3$) Beo kristalan prašak; prinos 66,30 %; temperatura topljenja 138,9-140,7 °C (aceton:metanol 50:50 (v/v)). **IR (ATR)** (cm^{-1}): 2971,7; 1662,1; 1594,2; 1447,7; 1227,7; 1031,4; 765; $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 7,75 (dd, 1H, $J_1 = 7,80$, $J_2 = 1,60$, ArH 6'), 7,53-7,48 (m, 1H, ArH 4'), 7,23-6,93 (m, 6H, ArH: 2, 3, 5, 6, 3', 5'), 5,89 (bs, 1H, -OH), 4,50-4,41 (m, 1H, c'), 4,26-4,10 (m, 2H, c, d), 3,35-3,26 (m, 3H, a, e'), 3,02-2,92 (m, 5H, b, e, f), 1,97-1,78 (m, 2H, g), 1,06 (t, 3H, $J = 7,40$, h); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , ppm): 201,00, 163,56, 156,88, 136,43, 134,34, 130,51, 129,62, 128,95, 127,91, 126,31, 121,08, 115,16, 114,74, 112,77, 71,12, 64,15, 50,75, 49,94, 43,46, 29,10, 18,92, 10,60; **HRMS**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{FNO}_3 = 360,19695$, određeno = 360,19678.

4f. 3-(4-metil-fenil)-1-[2-(2-hidroksi-3-propilamino-propoksi)-fenil]-propan-1-on
4PCH3 ($\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_3$)- nije karakterisan.

5f. (hidrohloridna so). 5PCH3 ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{ClNO}_3$). Beo kristalan prašak; prinos 73,70%; temperatura topljenja 119,9-121,7 °C (aceton:metanol 50:50 (v/v)). **IR (ATR)** (cm^{-1}): 2968,1(-NH-), 1661,7; 1594,1; 1447,5; 1241,3; 1110,8; 1032,8; 763,3; $^1\text{H NMR}$ (δ , ppm): 8,27 (bs 1H, -NH), 7,70-7,65 (m, 1H, ArH 6'), 7,50-7,41 (m, 1H, ArH 4'), 7,10 (s, 4H, ArH: 2, 3, 4, 5), 7,05-6,97 (m, 2H, ArH: 3', 5'), 5,73 (bs, 1H, -OH), 4,62 (m, 1H, c'), 4,20-4,16 (m, 2H, c, d), 3,26-3,19 (m, 3H, a, e'), 2,99-2,87 (m, 5H, e, b, f), 2,30 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,96-1,74 (m, 2H, g), 1,00 (t, 3H, $J = 7,4$, h); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , ppm): 201,72, 157,06, 137,90, 135,54, 134,21, 130,58, 129,18, 128,20, 126,94, 121,17, 113,16, 71,21, 64,73, 51,11, 50,29, 44,05, 29,70, 20,83, 19,17, 11,05; **HRMS**: $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_3 = 356,22202$, određeno = 356,22145.

3.2.4. Spektroskopska i kristalografska analiza novosintetisanog flavanona

2-[2-(trifluorometilfenil)-2H-1-benzopiran-4(3H)-on **FCF3**. Beličasti, igličasti kristali; temperatura topljenja 153,9-154,6 °C (etanol:voda 50:50 (v/v)).**IR (ATR) (cm⁻¹)**: 1686; 1603, 7; 1462,7; 1307,1; 1105,7; 1061,3; 1036,4; 957; 763, 9; 673,2; **¹H NMR (δ, ppm)**: 7,99 (d, 1H, *J* = 8,00, Ar-H 5), 7,74-7,66 (m, 2H, ArH: 7, 3'), 7,58-7.47 (m, 3H, ArH: 6', 4', 5'), 7.13-7,03 (m, 2H, ArH: 6, 8), 5,92 (d, 1H, *J* = 11,80, H2), 2,99 (d, 2H, *J* = 12,40, H3); **¹³C NMR (δ, ppm)**: 191,14, 161,48, 137,73, 136,30, 132,61, 128,75, 127,96, 127,19, 126,76, 125,94, 125,83, 121,97, 120,81, 118,09, 45,43.

Bezbojni, igličasti kristali supstance **FCF3** (C₁₆H₁₁F₃O₂, *Mr* = 292,25) dimenzija 0,18 x 0,02 x 0,02 mm su korišćeni za difrakcije X zraka na difraktometru. Kristalografski podaci prikazani su u Tabeli 4., a geometrija vodoničnih veza u Tabeli 5.

Tabela 4. Kristalografski podaci za jedinjenje **FCF3**

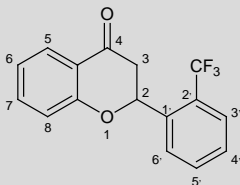
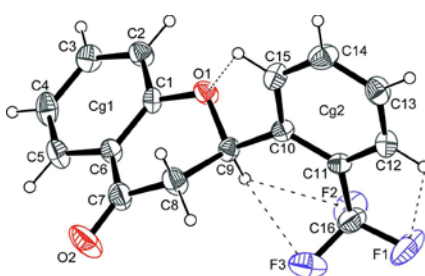
Jedinjenje FCF3 strukturalna formula			
Hemijska formula <i>Mr</i> Izgled kristala	C ₁₆ H ₁₁ F ₃ O ₂ 292.25 igličast, bezbojan	<i>F</i> (000) μ (MoK α)(mm ⁻¹) Granični Milerovi indeksi	600 0,12 -11 ≤ <i>h</i> ≤ 10 -28 ≤ <i>k</i> ≤ 29 -9 ≤ <i>l</i> ≤ 9
Kristalni sistem Prostorna grupa	ortorombičan, <i>Pna</i> 2 ₁ <i>P2c</i> -2 <i>n</i>	Refleksije izmerene/nezavisne primećene refleksije /ograničenja//parametri utačnjavanja refleksije sa [<i>I</i> >2σ(<i>I</i>)]	4585/2558 2558/1/190 1462
<i>a</i> (Å)	8,2291 (9)	<i>R</i> _{int} <i>S</i>	0,049 1,12
<i>b</i> (Å)	22.020 (3)	<i>R</i> [<i>F</i> ² >2σ(<i>F</i> ²)]	0,087
<i>c</i> (Å)	7,3355 (11)	<i>wR</i> (<i>F</i> ²)	0,109
<i>V</i> (Å ³)	1329,2 (3)	$\Delta\rho_{\max}$ (e Å ⁻³)	0,16
<i>Z</i>	4	$\Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	-0,15
<i>D</i> _x (Mgm ⁻³)	1,460		

Tabela 5. Geometrija vodoničnih veza jedinjenja FCF3

$D-H\cdots A$	$D-H(\text{Å})$	$H\cdots A(\text{Å})$	$D\cdots A(\text{Å})$	$D-H\cdots A(^{\circ})$
$C3-H3\cdots O2^i$	0,93	2,54	3,311 (5)	140
$C5-H5\cdots F3^{ii}$	0,93	2,54	3,313 (5)	141

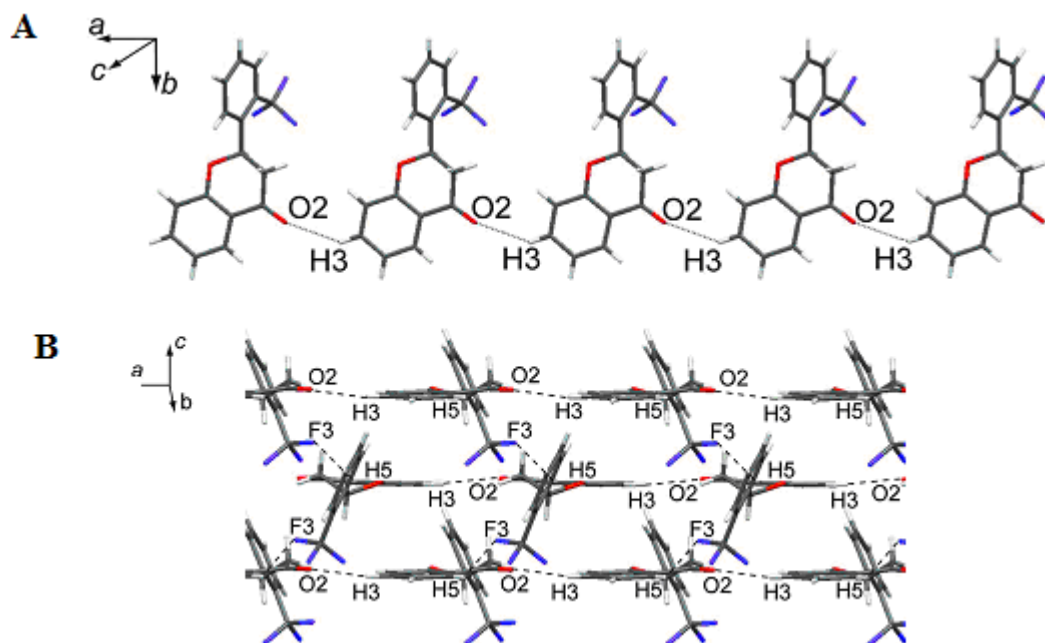
simetrijski ekvivalentni položaji: (i) $x+1, y, z$; (ii) $-x, -y+2, z+1/2$

Molekulska struktura jedinjenja **FCF3** sa oznakama atoma i termalnim elipsama sa 30 % verovatnoće za atome različite od vodonika prikazana je na Slici 29. H-atomi su predstavljeni kao male sfere proizvoljnog prečnika. Intramolekulske interakcije su prikazane isprekidanim linijama. Na slici 29 predstavljene su i π - π interakcije između dva susedna Cg1 prstena.



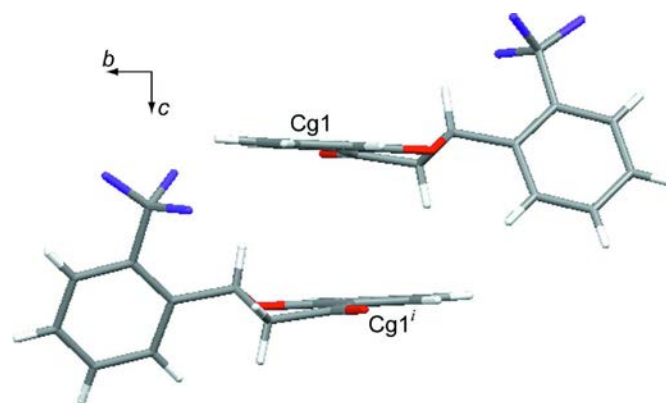
Slika 29. Molekulska struktura jedinjenja **FCF3**.

Pakovanje molekula sintetisanog flavanona i inermolekulske interakcije duž kristalografskih a - i c -osa predstavljene su na Slici 30a i b.



Slika 30. A. Kristalno pakovanje jedinjenja FCF3 i intermolekulske interakcije duž kristalografske a -ose, B. kristalno pakovanje jedinjenja FCF3 i intermolekulske interakcije duž kristalografske c -ose.

Na Slici 31 su predstavljene π - π interakcije između dva susedna Cg1 prstena.



Slika 31. Prikaz π - π interakcije između dva susedna Cg1 prstena.
Simetrijski kod: (i) 1 - x, 2 - y, 1/2 + z.

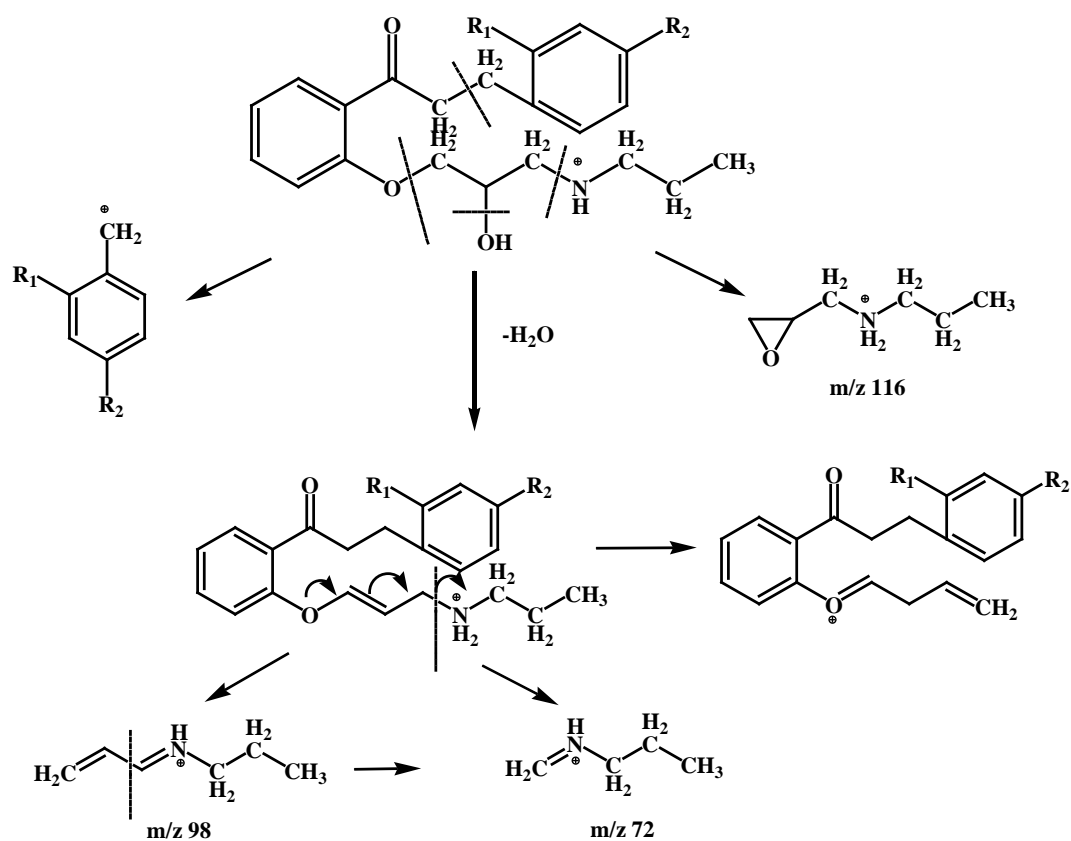
3.2.5. MS-MS analiza propafenona, sintetisanih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona i halkona 1CF3

U Tabeli 6 prikazani su glavni fragmenti sa relativnim intenzitetima dobijeni MS-MS analizom propafenona, aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona (derivata propafenona) i 1CF3 halkona.

Tabela 6. MS-MS fragmentacija propafenona, derivata propafenona, halkona 1CF3

Supstanca	Fragment (m/z)	Relativni intenzitet (%)	Supstanca	Fragment (m/z)	Relativni intenzitet (%)
propafenon m/z 342,14	116,13	100	5POCl m/z 376,11	116,13	100
	324,17	31		358,15	31
	72,26	26		98,12	26
	98,14	27		72,25	25
	91,11	15		299,05	17
	265,04	12		125,01	17
5PCH ₃ m/z 356,161	116,13	100	5OF m/z 360,135	116,14	100
	338,20	33		342,19	31
	105,11	26		98,14	27
	72,25	28		283,06	16
	98,15	32		72,25	26
	279,05	7		109,08	14
5PF m/z 360,15	116,13	100	5OCH ₃ m/z 356,162	116,14	100
	342,17	23		338,20	27
	98,13	13		98,16	21
	109,09	7		72,27	23
	283,08	11		105,13	18
	72,26	21		279,16	6
5CF3 m/z 410,149	116,12	100	1CF3 m/z 293,064	133,17	100
	392,18	30		159,95	74
	333,05	23		273,11	20
	98,11	35		232,60	12
	72,26	31		197,03	3
	173,00	7		151,13	3

Na slici 32. je prikazan opšti mehanizam fragmentacije molekulskog jona propafenona i sintetisanih derivata.



Slika 32. Mehanizam nastajanja glavnih MS-MS fragmenata

**4. *IN VITRO* ISPITIVANJE VAZORELAKSANTE
AKTIVNOSTI SINTETISANIH DERIVATA
PROPAFENONA**

4.1. Eksperimentalni deo

4.1.1. Oprema

- Analitička vaga Adventurer™-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD),
- Transdjuser (Hugo Sachs, K30, Freiburg, Nemačka),
- Amplifajer (Amplifier, 2-Channel-brige, Hugo Sachs, Elektronik, Nemačka),
- Dvokanalni pisac (Multi-pen recorder, Rikadenki, Japan),
- Kupatilo za izolovane organe (organsko kupatilo), zapremine 10 ml.

4.1.2. Hemikalije

- R(-)-fenilefrin-hidrohlorid (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka),
- acetilholin-jodid (Serva, Feinbiochemica, Heideberg, Nemačka),
- 4-aminopiridin (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- nifedipin (Hemofarm, Vršac, Srbija),
- lidokain-hidrohlorid (Galenika a.d., Beograd, Srbija),
- propafenon-hidrohlorid (Hemofarm, Vršac, Srbija),
- dimetilsulfoksid (DMSO) za biološka ispitivanja, čistoća $\geq 99,5$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka),
- etanol 96%, C₂H₅OH (Zorka Pharm, Šabac, Srbija),
- natrijum-hlorid, NaCl (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- kalijum-hlorid, KCl, (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- natrijum-hidrogenkarbonat, NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- magnezijum-sulfat, MgSO₄, 7H₂O (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- kalijum-dihidrogenfosfat, KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Nemačka),
- destilovana voda (Institut za farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet, Beograd).

4.1.3. Materijal

- krvni sud pacova (izolovana aorta) soja Wistar gajenih u vivarijumu Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu,
- hiruška oprema (makaze, pincete, skalpeli),
- mikrolitarski špricevi 100 μ l (Hamilton, Australija) i automatske pipete (Hirschmann laborgerate, Nemačka).

4.1.4. Računarski programi

Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, SAD)

SigmaPlot 9.0 (<http://sigmaplot.en.softonic.com>)

Chem3D Ultra 7.0.0 programa (<http://www.cambridgesoft.com>).

CS Gaussian 98 (Gaussian 98 (Revision A.7), Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB et al. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.)

Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>)

AutoDock v 4.0.1. (<http://autodock.scripps.edu>)

4.1.5. Statistička obrada rezultata

Vrednosti srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) su računane za svaki eksperiment linearnom interpolacijom između dve koncentracije koje su prouzrokovale efekte najbliže efektima 50 % od maksimuma. EC_{50} vrednosti su u radu predstavljene njihovim negativnim logaritmom pEC_{50} ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Za propafenon i derivat 5OCl računane su i vrednosti koncentracije pri kojoj se postiže 25% od željenog efekta (EC_{25}). Odnos koncentracija tzv. vrednost CR (*concentration ratio*) predstavlja relativni odnos EC_{50}/EC_{50}' gde je EC_{50}' srednja efektivna koncentracija u prisustvu antagoniste, a EC_{50} srednja efektivna koncentracija u odsustvu antagoniste. CR vrednost je signifikantna kada je veća od $3^{253-254}$. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. Poređenje većeg broja eksperimentalnih grupa izvršeno je parametarskom analizom varijanse (ANOVA), a poređenje dve grupe Student *t*-testom. Verovatnoća (*p* vrednost) manja od 0,05 se smatrana statistički značajnom. Sva izračunavanja vršena su u programima *Graph Pad Prism*. Grafici su crtani u programima *SigmaPlot 9.0* i *Microsoft Office Excel 2003*.

4.1.6. Priprema rastvora

Za pripremu rastvora korišćena je sveže destilovana voda (pH 6), DMSO u koncentraciji 20% (v/v) i 96% C_2H_5OH . Nijedan od korišćenih rastvarača nije menjao tonus krvnih sudova nakon dodavanja u kupatilo u zapremini od 100 μ l. Rastvori korišćeni u eksperimentima su uvek pripremani sveži.

Priprema Krebs-Ringer bikarbonatnog rastvora

U odmerni sud od 1000 ml prenese se izmerena masa koja odgovara 120 mmol NaCl, 5 mmol KCl, 2,5 mmol CaCl₂, 1,2 mmol MgSO₄, 25 mmola NaHCO₃, 1,2 mmola KH₂PO₄ i 11 mmola glukoze, doda 500 ml vode, mućka do rastvaranja i dopuni istim rastvaračem do oznake.

Priprema osnovnog rastvora nifedipina (700 µg/ml)

Odmeri se 7,0 mg nifedipina, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 10 ml, doda 7 ml 96% etanola i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake. Rastvor se priprema i čuva u posuđu od tamnog stakla, zaštićeno od svetlosti.

Priprema radnog rastvora nifedipina (100 µmol/l)

U odmerni sud od 100 ml prenese se 5 ml koncentrovanog rastvora nifedipina i destilovanom vodom dopuni do oznake. Rastvor se priprema u posuđu od tamnog stakla, zaštićeno od svetlosti.

Priprema osnovnog rastvora 4-aminopiridina (280 µg/ml)

Odmeri se 7,0 mg 4-aminopiridina, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 25 ml, doda 7 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema radnog rastvora 4-aminopiridina (300 mmol/l)

U odmerni sud od 100 ml prenese se 1 ml osnovnog rastvora 4-aminopiridina i destilovanom vodom dopuni do oznake.

Priprema osnovnog rastvora lidokain-hidrohlorida (800 µg/ml)

Odmeri se 8,0 mg lidokain-hidrohlorida, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 10 ml, doda 7 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema radnog rastvora lidokain-hidrohlorida (80 µg/ml)

U odmerni sud od 10 ml prenese se 1 ml osnovnog rastvora lidokain-hidrohlorida i destilovanom vodom dopuni do crte.

Priprema rastvora fenilefrina (1 mmol/l)

Odmeri se 5,1 mg fenilefrin-hidrohlorida, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 25 ml, doda 17 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora acetilholina (2 mmol/l)

Odmeri se 13,6 mg acetilholin-iodida, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 25 ml, doda 17 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora papaverin-hidrohlorida (10 mmol/l)

Odmeri se 37,5 mg papaverin-hidrohlorida, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 10 ml, doda 7 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora propafenon-hidrohlorida (100 µmol/l)

Odmeri se 3,5 mg propafenon-hidrohlorida, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 75 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora derivata 5CF3 (100 µmol/l)

Odmeri se 4 mg 5CF3, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 75 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora derivata 5OCH3 (100 µmol/l)

Odmeri se 3-4 mg 5OCH3, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 75 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora derivata 5OF (100 µmol/l)

Odmeri se 3-4 mg 5OF, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 75 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora derivata 5OCl (100 µmol/l)

Odmeri se 4 mg 5OCl, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 75 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora derivata 5PF (100 $\mu\text{mol/l}$)

Odmeri se 3-4 mg 5PF, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 75 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake

Priprema rastvora derivata 5PCH3 (100 $\mu\text{mol/l}$)

Odmeri se 3-4 mg 5PCH3, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 75 ml vode i mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake

4.1.7. Izolovanje i priprema preparata

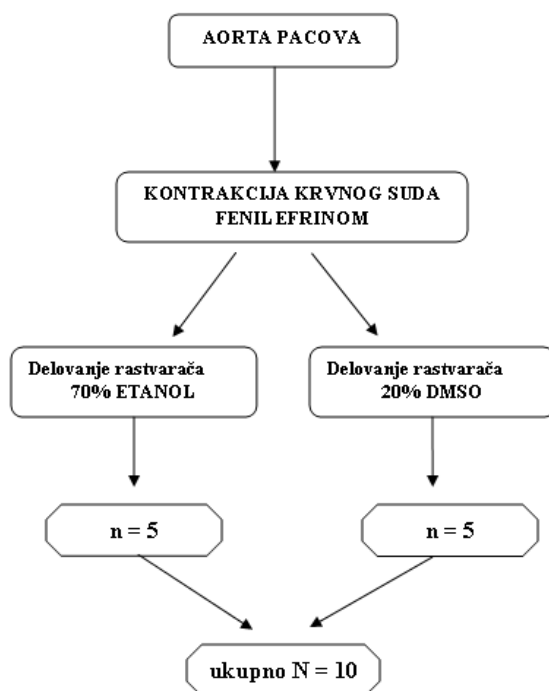
Vazodilatatorna aktivnost je ispitivana na izolovanom krvnom sudu (aorti) pacova modifikovanom metodom koju su predložili De Mey i Vanhoutte²⁵⁵. U eksperimentima su korišćeni pacovi soja Wistar, telesne mase 260-320 g. Životinje su držane u individualnim kavezima standardnih dimenzija. Za prostirku je korišćena sterilna drvena šuška, debljine 2-3 cm, koja je menjana svaki dan. U prostoriji u kojoj su boravile životinje zoohigijenski i mikroklimatski uslovi su odgovarali propisanim standardima (12h/12h svetlo/tamno, 30-70 % vlažnost, 22-25 °C temperatura prostorije). Sve životinje su hranjene briketiranom potpuno krmnom smešom za ishranu laboratorijskih životinja, standardnog higijenskog i sirovinskog sastava. Životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi tokom celog perioda ispitivanja.

Pre početka eksperimenta životinje su žrtvovane fizičkim načinom eutanazije, kontuzijom lobanje i iskrvarenjem (presecanjem karotidnih arterija). Ispreparisana aorta je pažljivo očišćena od vezivnog tkiva i isečena u prstenove širine 3 mm, bez dodirivanja unutrašnje površine kako ne bi došlo do oštećenja endotela. Tako dobijeni segmenti stavljeni su odmah u *Krebs-Ringerov bikarbonatni* rastvor. U posebnoj seriji eksperimenti su izvođeni na krvnom sudu bez endotela koji je uklonjen mehanički na filter hartiji natopljenom *Krebs-Ringer bikarbonatnim* rastvorom pažljivim okretanjem prstena izolovane aorte oko žice od nerđajućeg čelika provučene kroz njen lumen u toku 15-30 sek.²⁵⁵. Ovom procedurom se efikasno uklanja endotel, bez oštećenja glatkog mišića aorte. Pažljivo odvojeni prstenovi aorte postavljaju se u organsko kupatilo (zapremine 10 ml) prethodno napunjeno *Krebs-Ringerovim bikarbonatnim* rastvorom (pH=7,4) koji je oksigeniran gasnom smešom od 95% O₂ i 5% CO₂ i zagrejan na 37 °C. Ovakvi uslovi se održavaju konstantnim tokom trajanja eksperimenata. Prstenovi se postavljaju na sledeći način: kroz lumen prstena provlače se dva držača trouglastog

oblika od nerđajućeg čelika, promera 200 nm, a zatim se prstenovi uranjaju u kupatilo za izolovane organe. Donji držač se fiksira za staklenu kanilu, a gornji je koncem vezan za transdjuser. Preko mikrometarskog zavrtnja se vrši njegovo pomeranje i tako reguliše rastojanje između dva držača i opterećenje preparata. Izometrijska tenzija aorte se registruje pomoću transdjusera i beleži dvokanalnim pisačem. Nakon postavljanja, preparati se ekvilibrišu 40-45 minuta, tako da se na svakih 15 min. ispiraju svežim *Krebs-Ringer bikarbonatnim* rastvorom i postepeno zatežu do optimalne tačke zatezanja koja za izolovanu aortu pacova iznosi 2 g. Ekvilibracija predstavlja proces prilagođavanja preparata uslovima u eksperimentalnom sistemu u cilju minimizacije efekata prethodno postojeće traume u toku uzimanja uzorka i postizanja fiziološkog, stabilnog tonusa.

4.1.8. Ispitivanje uticaja rastvarača na tonus izolovane aorte pacova

Uticaj rastvarača na tonus izolovane aorte pacova ispitivan je korišćenjem iste metodologije opisane u poglavlju **4.1.9**. U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar, starosti 10-12 nedelja, telesne mase 260-320 g. Životinje su podeljene metodom slučajnog izbora u dve grupe od po pet životinja. Šema protokola eksperimentalnog ispitivanja uticaja rastvarača korišćenih u pripremi osnovnih rastvora dat je na Sllici 33.



Slika 33. Protokol ispitivanja uticaja rastvarača na tonus izolovane aorte (n-broj životinja u okviru grupe, N-ukupan broj životinja)

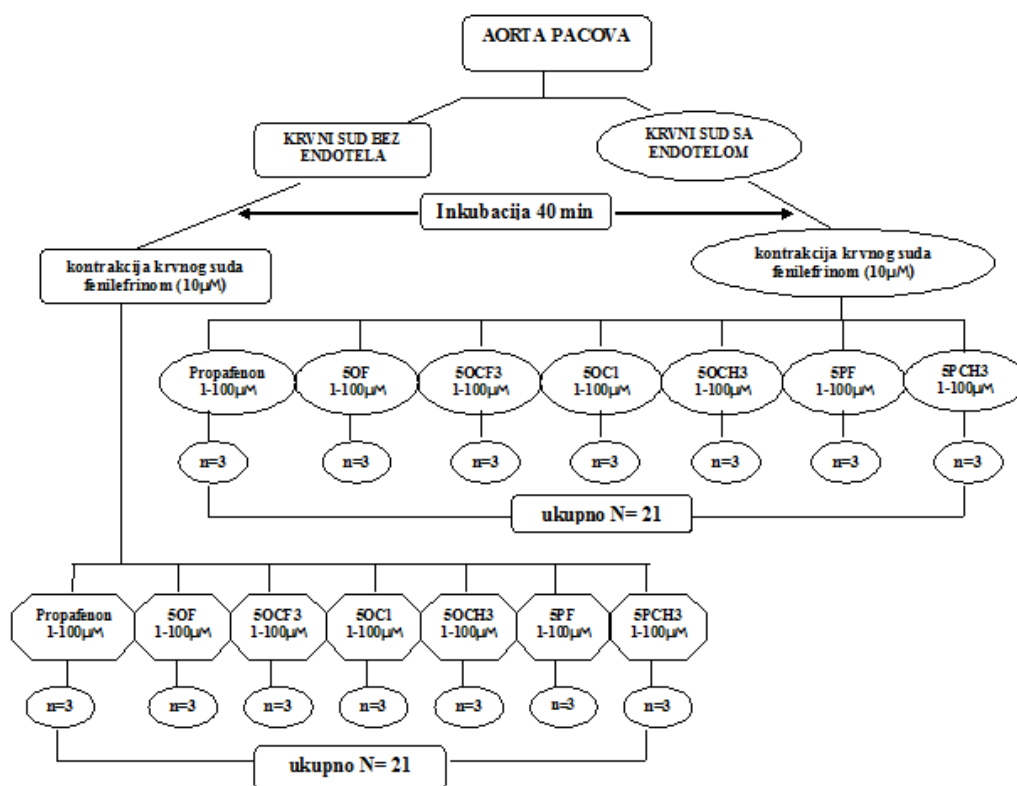
4.1.9. Ispitivanje prisustva funkcionalnog endotela

Pripremljeni preparat (poglavljje **4.1.6**) se prekontrahuje dodatkom 100 μ l rastvora fenilefrina (FE) (1mmol/l) u organsko kupatilo (zapremina 10 ml). Koncentracija FE u kupatilu iznosi 10 μ mol/l što dovodi do kontrakcije koja se registruje pomoću transdjusera i amplifajera i na kraju beleži pisačem. Koncentracija FE koja dovodi do kontrakcije zavisi od krvnog suda koji se u eksperimentu koristi i obično se kreće u rasponu od 10^{-8} do 10^{-4} mol/l²⁵⁶. U organsko kupatilo se zatim dodaje 100 μ l rastvor Ach (c=2mmol/l). Endotel je prisutan kada je maksimalni vazorelaksantni efekat veći od 80% inicijalne kontrakcije²⁵⁷.

4.1.10. Ispitivanje vazorelaksantnog efekta propafenona i novosintetisanih derivata na segmentima izolovane aorte pacova

Vazorelaksantni efekat propafenona i sintetisanih derivata je ispitivan na prstenovima isečenim od iste aorte pacova sa i bez endotela (poglavljje **4.1.6**). Nakon ekvibracije od 40-45 min. preparati su kontrahovani pomoću FE (poglavljje **4.1.8**). Nakon uspostavljanja stabilnog tonusa propafenon kao i šest sintetisanih derivata

dodavani su u kupatilo na kumulativan način (tzv. *zidanje koncentracija*). Dodavanje novih koncentracija ispitivanih jedinjenja podrazumeva dodatak naredne koncentracije, bez ispiranja preparata od prethodne. Viša koncentracija se dodaje tek kada je efekat postignut sa prethodnom, nižom koncentracijom stabilan, što se na zapisu beleži kao pad tonusa nakon koga sledi stabilan *plato*. Ukoliko primenjena koncentracija nije izazvala pad tonusa, naredna, viša koncentracija dodaje se nakon 10 min. Relaksacija prstenova aorte izazvana propafenonom ili njegovim derivatima se izražava kao procenat od maksimalne moguće relaksacije koja se u eksperimentu postiže dodatkom 100 µl rastvora papaverin-hidrohlorida koncentracije 100 µmol/l u kupatilo. Na osnovu dobijenih vrednosti konstruišu se kumulativne (koncentracijski zavisne) krive. Izračunavanje EC₅₀ kao -logEC₅₀ izvršeno je primenom programa *Graph Pad Prisma*. Prikaz protokola ispitivanja vazorelaksantne aktivnosti propafenona i šest sintetisanih derivata dat je na Slici 34.

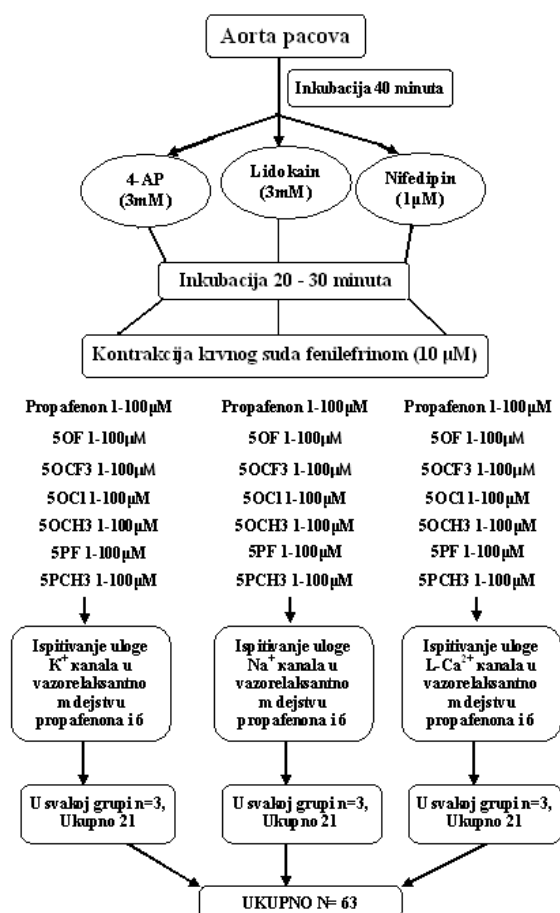


Slika 34. Protokol ispitivanja prisustva funkcionalnog endotela na izolovanoj aorti pacova (n-broj životinja u okviru grupe, N-ukupan broj životinja)

4.1.11. Ispitivanje uloge pojedinih tipova jonskih kanala u vazorelaksantnom dejstvu propafenona i sintetisanih derivata

U eksperimentima su korišćeni selektivni i neselektivni blokatori voltažno-zavisnih K^+ , Na^+ i $L-Ca^{2+}$ kanala: 4-aminopiridin (4-AP, 3mmol/l, K^+ kanali), lidokain (3mmol/l, Na^+ kanali) i nifedipin (1 μ mol/l, $L-Ca^{2+}$ kanali). Ispitivanja su izvođena na prstenovima isećenim od istog segmenta aorte bez endotela, po tačno definisanom protokolu koji je prikazan na Slici 35.

U organsko kupatilo se dodaje 100 μ l blokatora jonskog kanala tako da koncentracija za 4-AP i lidokain-hidrohlorid 3mmol/l, a za nifedipin kao selektivni blokator $L-Ca^{2+}$ kanala 1 μ mol/l. Preparat se potom ekvilibrira u trajanju od 20-30 min. tokom kojih se postiže stabilan tonus. Krvni sud se prekontrahuje dodatkom FE (poglavlje 4.1.8.), a zatim sledi kumulativno dodavanje propafenona ili sintetisanih derivata po protokolu koji je opisan u poglavlju 4.1.9.



Slika 35. Protokol ispitivanja uloge pojedinih jonskih kanala u vazorelaksantnom efektu propafenona i sintetisanih derivata. (n-broj životinja u okviru grupe, N-ukupan broj životinja)

Efekti su praćeni pomoću transdjusera i beleženi pisačem. Na osnovu dobijenih vrednosti konstruisane su kumulativne (koncentracijski zavisne) krive. Izračunavanje EC_{50} kao i $-\log EC_{50}$ izvršeno je primenom programa *Graph Pad Prism*.

4.1.12. Priprema ispitivanih jedinjenja za docking simulaciju kana-ligand interakcija

Strukture ispitivanih jedinjenja pripremljene su korišćenjem programskog paketa *Chem Office v 7.0 Ultra Software* i optimizovane MM1 metodom. Ovako dobijena struktura je dalje optimizovana programskim paketom *Gaussian 03*, B3LYP *ab initio* metodom sa baznim setom 6-311++G. Na osnovu pKa vrednosti propafenona (pKa =9,63) azotovi atomi propafenona i njegovih šest derivata su pre optimizacije protonovani, kao i azotovi atomi u molekulima blokatora Na^+ kanala, lidokaina i blokatora K^+ kanala 4-AP.

4.1.13. Modelovanje KcsA kanala

U modelovanju ligand-kanal interakcije korišćena je kristalografska struktura K^+ kanala deponovana u bazi *Protein Data Bank* pod šifrom **1J95**. K^+ kanal je kokristalisao sa tetrabutilamonijumom (TBA) i 4 K^+ jona u centralnoj pori, kao ligandima²⁵⁸.

Korišćenjem programa *Chimera* ligandi su izdvojeni iz kanala i na taj način je dobijen *slobodan* kanal. Struktura TBA je optimizovana istim postupkom kao i ispitivana jedinjenja (poglavlje **4.1.12**).

4.1.14. Modelovanje L- Ca^{2+} kanala

Za *docking* simulaciju interakcije propafenona i sintetisanih derivata sa L- Ca^{2+} kanalom korišćena je kristalografska struktura peptida proteinskog kompleksa koji spaja β i α_1 subjedinice deponovanog u bazi *Protein Data Bank* pod šifrom **1T0J**⁷⁵.

4.1.15. . Docking simulacija interakcija sintetisanih derivata (5a-5f), propafenona, 4-AP i amjodarona sa KcsA kanalom

Za simulaciju interakcija ligand-kanal program *AutoDock v 4.0.1*. koristi Lamarck-ov genetski algoritam (LGA) u cilju ispitivanja stabilnosti konformacija sa brzom evaluacijom energije putem mreže (*grid*). To se postiže izračunavanjem afiniteta atomskog potencijala za svaki od tipova atoma u ligandu, metodom koju je opisao Gudford²⁵⁹. Pored LGA, *AutoDock* koristi i *Monte carlo simulated annealing* (MCSA)

metodu kao i metodu modifikovanog genetskog algoritma (GA). U *docking* simulaciji korišćen je rigidan model kanala sa fleksibilnim ligandom. U definisanoj aminokiselinskoj sekvenci S6 transmembranskih segmenata sva četiri domena koja se nalazi sa citoplazmatske strane centralne šupljine u pori kanala, centrirana je trodimenzionalna rešetka u tački čije su koordinate 77,328 Å, 26,866 Å i 33,157 Å za x, y i z osu (definisano u 1J95 pdb strukturi). Ova tačka se uzima kao mrežni, geometrijski centar rešetke veličine 40 x 40 x 40. Verodostojnost lokacije definisane aminokiselinske sekvence, kao mesta vezivanja, testirana je sa optimizovanom strukturom liganda TBA (poglavlje 4.1.12) sa kojim je kanal kokristalisao. Nakon toga se pristupilo izvođenju *docking* eksperimenata sa 4-AP, propafenonom, amjodaronom i sintetisanim jedinjenjima (5a-5f). Broj LGA preračuna je bio 100 sa nasumičnim početnim položajem ispitivanog jedinjenja. Veličina populacije je bila 200, a maksimalan broj energetskih provera $2,5 \times 10^6$. Na osnovu 50 slučajnih pokušaja u *docking* eksperimentima dobijena je najverovatnija konformacija i orijentacija ispitivanog jedinjenja u vezivnom mestu pore kanala.

4.1.16. . Docking simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), propafenona i nifedipina sa peptidom proteinskog kompleksa koji povezuje β i α_1 subjedinice L-Ca²⁺ kanala

Potupak izvođenja *docking* simulacije identičan je postupku koji je opisan u poglavlju 4.1.15. Koordinate centra trodimenzionalne rešetke su 70,326 Å, 22,815 Å i 30,121 Å, veličina rešetke 35 x 35 x 35. Broj LGA preračuna je bio 100 sa nasumičnim početnim položajem ispitivanog jedinjenja. Veličina populacije je bila 200, a maksimalan broj energetskih provera $2,5 \times 10^6$. Na osnovu 50 *docking* pokušaja (*runova*) dobijena je najverovatnija konformacija i orijentacija ispitivanog jedinjenja u vezivnom mestu kanala.

4.2. Rezultati

4.2.1. Ispitivanje vazorelaksantnog efekta sintetisanih derivata i propafenona na izolovanoj aorti pacova sa i bez endotela

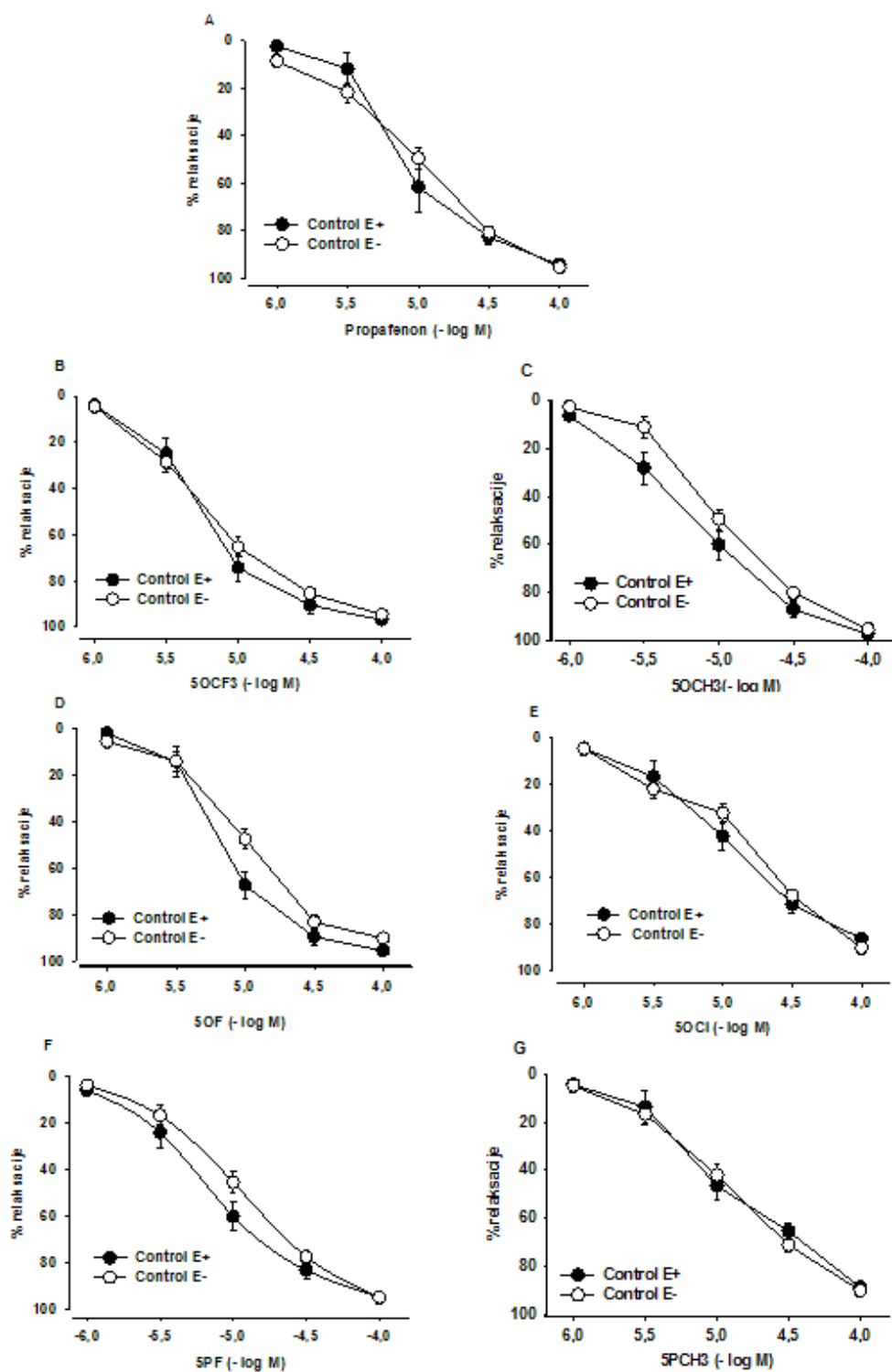
U oba slučaja sintetisani derivati (1–100 $\mu\text{mol/l}$) i propafenon (1–100 $\mu\text{mol/l}$) su koncentracijski- zavisno inhibirali kontrakciju aorte izazvanu FE (10 $\mu\text{mol/L}$) (Sl. 36).

Srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) za $N=42$, gde je N ukupan broj životinja korišćen u eksperimentu) izračunate su primenom računarskog programa *Graph Pad Prism* iz jednačine linearne regresione analize i prikazane su kao $-\log\text{EC}_{50} \pm \text{S.E.M}$ ($\text{pEC}_{50} \pm \text{S.E.M}$) u Tabeli 7. Značajnost razlika između rezultata izračunata je primenom *ANOVA* ili *Student t*-testa sa nivoom značajnosti $p < 0,05$. Efekti ($\text{Emax} \pm \text{S.E.M}$) su izraženi kao procenat inhibicije kontrolne kontrakcije koja predstavlja 100% i prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Vazorelaksantni efekat sintetisanih derivata i propafenoba na toničku kontrakciju aorte sa i bez endotela.

jedinjenje	pEC_{50}		Emax (%)	
	sa endotelom	bez endotelom	sa endotelom	bez endotelom
5OCF₃	5,25 \pm 0,09 ^a	5,20 \pm 0,10 ^b	97,0 \pm 2,2 ^c	94,6 \pm 3,0
5OCH₃	5,16 \pm 0,09	4,99 \pm 0,10	97,3 \pm 2,8 ^c	95,4 \pm 3,0 ^d
5PF	5,09 \pm 0,07	4,95 \pm 0,10	94,7 \pm 3,6	94,7 \pm 2,9
5OF	5,16 \pm 0,09	4,96 \pm 0,10	95,6 \pm 3,9	91,9 \pm 2,8
PRO	4,95 \pm 0,10	5,01 \pm 0,02	94,5 \pm 3,8	95,6 \pm 1,2 ^d
5OCI	4,84 \pm 0,09	4,75 \pm 0,09	86,1 \pm 3,9 ^c	90,1 \pm 2,8 ^d
5PCH₃	4,87 \pm 0,09 ^a	4,86 \pm 0,10 ^b	88,8 \pm 5,9 ^c	90,1 \pm 3,8 ^d

^{a,b,c,d} $p < 0,05$



Slika 36. Kumulativne koncentracijski-zavisne krive za propafenon (A) i sintetisane derivate (5OCF3 (B), 5OCH3 (C), 5OF (D), 5OCl (E), 5PF (F) i 5PCH3(G)) dobijene na izolovanoj aorti pacova prekontrahovanoj FE-om u koncentracije od 10 μ mol/l.

4.2.2. Uticaj blokatora K kanala (4-AP) na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata

U posebnoj seriji eksperimenata ispitan je uticaj neselektivnog blokatora Kv kanala, 4-AP (3 mM) na inhibiciju tonične kontrakcije aorte bez endotela prouzrokovane propafenonom ili derivatima. Blokator 4-AP poseduje određenu selektivnost za pojedine (pod)tipove K⁺ kanala kada se primeni u opsegu koncentracija 1-3 mM i korišćen je kako bi se ispitalo da li se preko Kv kanala na membrani glatke mišićne ćelije ostvaruje vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata. Rezultati su kao srednje vrednosti $-\log EC_{50} \pm S.E.M.$ izračunati primenom računarskog programa *Graph Pad Prism* iz jednačine linearne regresione analize i prikazani tabelarno (Tabela 8) i grafički (Sl. 37).

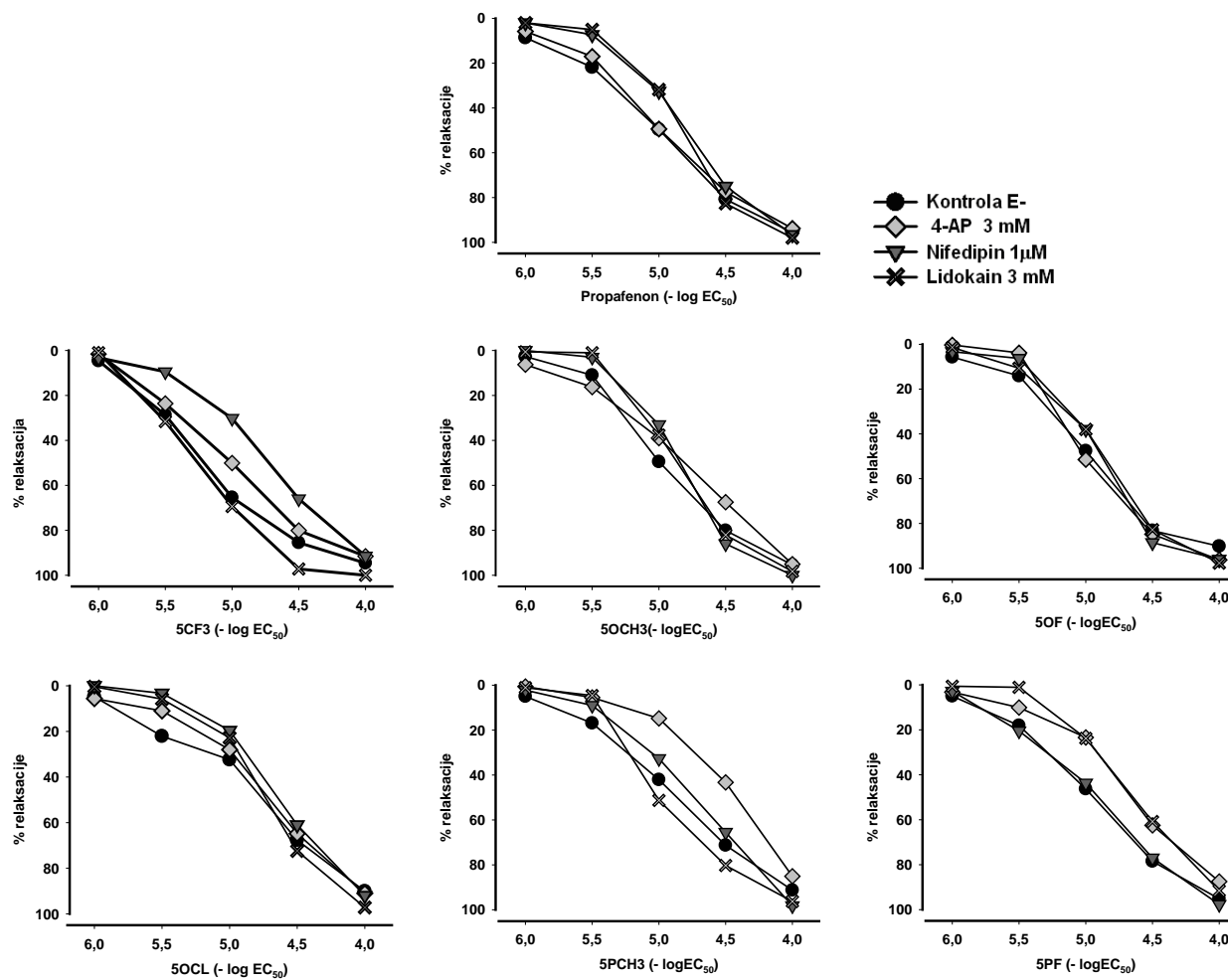
Tabela 8. Uticaj blokatora K⁺ kanala na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata na aorti pacova bez endotela

jedinjenje	5CF3	5OCH3	5OF	5OCl	5PF	5PCH3	PRO
n	7	7	6	7	7	7	9
pEC ₅₀	4,99±0,10	4,89±0,10	4,95±0,05	4,78±0,10	4,71±0,10	4,41±0,1*	4,97±0,20
E _{max} (%)	91,6±4,50	95,1±4,70	96,3±3,00	91,1±3,50	90,1±5,10	85,1±5,1*	93,8±2,00
CR	1,36	1,17	0,11	1,17	1,74	3,1	1,13
pEC ₂₅				5,07±0,14 ¹			

n-broj eksperimenata po grupi; *p<0,05, ¹pEC₂₅ kontrola=5,34±0,11

4.2.3. Uticaj blokatora Na⁺ kanala (lidokaina) na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata

U posebnoj seriji eksperimenata korišćen je selektivni blokator Na⁺ kanala, lidokain (3mmol/l) kako bi se ispitalo da li se preko Na⁺ kanala na membrani glatke mišićne ćelije ostvaruje vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata. Rezultati su kao srednje vrednosti $-\log EC_{50} \pm S.E.M.$ izračunate primenom računarskog programa *Graph Pad Prism* iz jednačine linearne regresione analize i prikazani tabelarno (Tabela 9) i grafički (Sl. 37).



Slika 37. Koncentracijski zavisne krive za propafenon i sintetisane derivate

Tabela 9 Uticaj blokatora Na⁺ kanala na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata na aorti pacova bez endotela

jedinjenje	5CF3	5OCH3	5OF	5OCl	5PF	5PCH3	PRO
n	6	6	7	6	6	6	7
pEC ₅₀	5,19±0,08	4,89±0,08	4,93±0,10	4,86±0,11	4,69±0,08*	4,95±0,08	4,89±0,20
E _{max} (%)	100,0±0,1	98,3±1,50	96,0±3,9	97,2±2,5	91,1±3,5*	97,5±3,50	98,0±1,90
CR	0,86	1,16	1,08	0,98	2,00	0,86	1,37
pEC ₂₅	-	-	-	4,99±0,18	-	-	5,14±0,22 ^J

n-broj eksperimenata po grupi; *p~0,05, ^IpEC₂₅ kontrola=5,34±0,11, ^JpEC₂₅ kontrola=5,44±0,10

4.2.4. Uticaj blokatora Ca⁺ kanala (nifedipina) na vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata

U posebnoj seriji eksperimenata korišćen je selektivni blokator L-Ca²⁺ kanala, nifedipin (1 µmol/l) kako bi se ispitalo da li se preko L-Ca²⁺ kanala u membrani glatke mišićne ćelije ostvaruje vazorelaksantno dejstvo propafenona i sintetisanih derivata. Rezultati su dobijeni iz jednačine linearne regresione analize primenom računarskog programa *Graph Pad Prism* i prikazani kao srednje vrednosti -log EC₅₀ ± S.E.M. (Tabela 10, Sl.37).

NAPOMENA: Eksperimenti u kojima se koristi nifedipin izvode se u mračnoj prostoriji (zaštićeno od svetlosti)

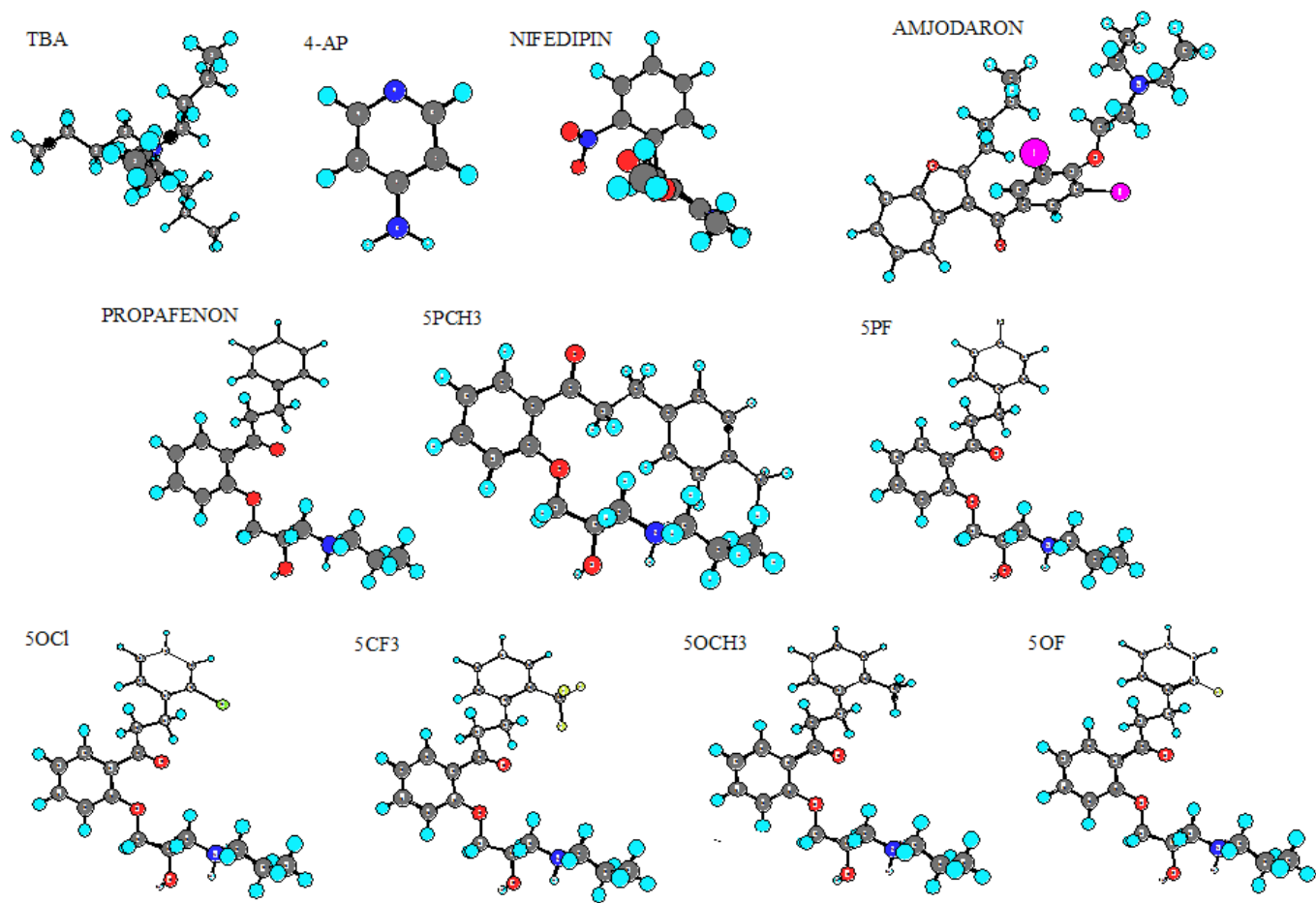
Tabela 10. Uticaj blokatora L-Ca²⁺ kanala na vazorelaksantno dejstvo propafenona i novosintetisanih derivata na aorti pacova bez endotela

jedinjenje	5CF3	5OCH3	5OF	5OCl	5PF	5PCH3	PRO
n	5	5	7	4	5	5	7
pEC ₅₀	4,55±0,30*	4,90±0,30	4,93±0,10	4,70±0,30	4,97±0,28	4,83±0,30	4,90±0,09
E _{max} (%)	91,51±3,9*	100±0,10	96,0±3,9	92,0±4,5	97,7±2,4	98,2±2,00	96,6±2,10
CR	3,15	1,13	1,07	1,43	0,97	1,15	1,34
pEC ₂₅	-	-	-	^I 4,93±0,1	-	-	^J 5,15±0,19

n-broj eksperimenata po grupi; *p< 0,05, ^IpEC₂₅ kontrola=5,34±0,11, ^JpEC₂₅ kontrola=5,44±0,10

4.2.5. Priprema ispitivanih jedinjenja za docking simulaciju kanal-ligand interakcija

Najpovoljnije, konformacije ispitivanih jedinjenja, sa minimalnim sadržajem potencijalne energije predstavljene su na Sl. 38.



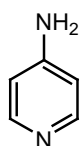
Slika 38. Molekulske strukture najpovoljnijih, niskoenergetskih konformacija ispitivanih jedinjenja

4.2.6. Docking simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), propafenona, 4-AP i amjodarona sa KcsA kanalom

Najverovatnije konformacije i orijentacije ispitivanih jedinjenja u vezivnom mestu pore kanala predstavljene su na Sl. 39.

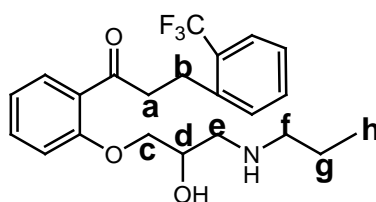
Energije vezivanja protonovanih jedinjenja dobijene u *docking* eksperimentima kao i interakcije sa aminokiselinama u izdvojenoj aminokiselinskoj sekvenci pore KcsA kanala prikazane su u Tabeli 11.

Tabela 11. Energije vezivanja i interakcije ispitivanih jedinjenja i ključnih aminokiselina iz definisane aminokiselinske sekvence u pori kanala



$E_v = -4,10$ kcal/mol

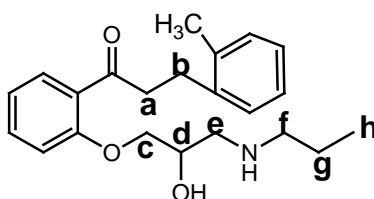
	THR107			ALA108			ALA111		
	S	L	I	S	L	I	S	L	I
TM1	PhN	3,63	hbf	PhN	3,32	hbf	PhN	3,35	hbf
TM2	NH ₂	1,85	vv	PhN	4,13	hbf	PhN	3,73	hbf
TM3	PhN	3,36	hbf	PhN	4,29	hbf	PhN	3,38	hbf
TM4	N-	2,13	vv	PhN	3,34	hbf	PhN	3,44	hbf



$E_v = +7,90$ kcal/mol

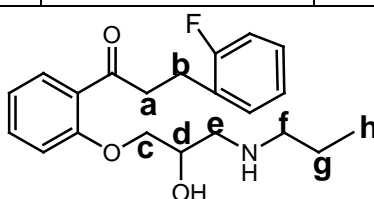
	THR107			ALA108	ALA111		
	S	L	I		S	L	I
TM1	Ce	2,80	hbf	n.d.			
	CPh	4,19	hbf				
	-O-	2,89	dd				
TM2	Ce	2,98	hbf				
TM3	Cd	3,51	hbf				
TM4	Cd	3,25	hbf				
	Cfgh	3,03	hbf				

nastavak Tabele 11



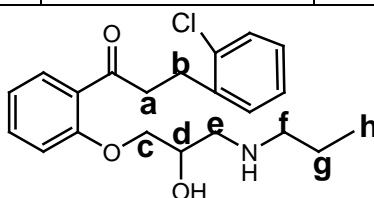
$E_v = +1,25$ kcal/mol

	THR107			ALA108	ALA111
	S	L	I		
TM1	-NH-	1,71	vv	n.d.	n.d.
	-O-	1,57	vv		
TM2					
TM3	TPh	3,29	hbf		
TM4	CPh	3,66	hbf		



$E_v = -2,91$ kcal/mol

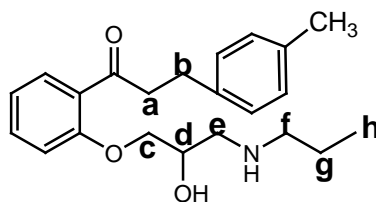
	THR107			ALA108			ALA111		
	S	L	I	S	L	I	S	L	I
TM1	Cb	2,70	hbf	TPh	4,32	hbf	TPh	3,59	hbf
	CPh	3,31	hbf				<i>o</i> -F	3,61	hbf
TM2	Cb	2,76	hbf				TPh	3,40	hbf
	TPh	3,65	hbf						
TM3	Ca	3,35	hbf	TPh	2,74	hbf			
	TPh	3,11	hbf						
TM4	-NH-	2,05	vv	TPh	3,03	hbf	TPh	2,89	hbf
	TPh	3,02	hbf						
	Ca	3,11							



$E_v = +4,10$ kcal/mol

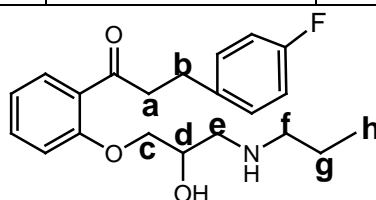
	THR107			ALA108	ALA111					
	S	L	I		S	L	I			
TM1	Cc	2,76	hbf	n.d.	Cfgh	2,90	hbf			
	-NH-	2,83	dd							
TM2	Cfgh	3,64	hbf					Cfgh	2,81	hbf
	Ca	4,28	hbf							
TM3	Cd	2,78	hbf							
	Ck	3,80	hbf							
TM4	Cc	2,61	hbf							
	CPh	4,21	hbf							

nastavak Tabele 11.



$E_v = -0,73$ kcal/mol

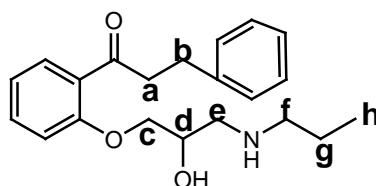
	THR107			ALA108	ALA111		
	S	L	I		S	L	I
TM1	TPh	3,70	hbf	n.d.	pCH ₃	3,28	hbf
	Cb	3,10	hbf		TPh	3,23	hbf
	Ca	2,54	dd				
TM2	Cb	2,71	hbf		pCH ₃	3,47	hbf
	TPh	3,78	hbf		TPh	3,16	hbf
TM3	Ca	2,57	hbf		pCH ₃	3,11	hbf
	CPh	3,34	hbf		TPh	3,15	hbf
	TPh	3,55	hbf				
TM4	Ca	2,88	hbf				
	TPh	3,89	hbf				
	CPh	4,00	hbf				



$E_v = -1,14$ kcal/mol

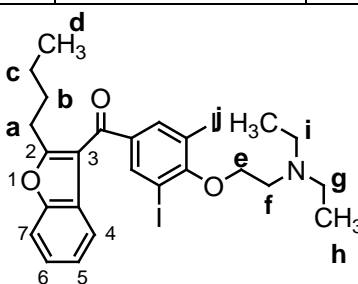
	THR107			ALA108	ALA111		
	S	L	I		S	L	I
TM1	-O-	2,13	vv	n.d.			
	Cb	2,98	hbf				
TM2	TPh	2,83	hbf		CPh	3,33	hbf
	Cb	2,63	hbf				
	CPh	3,66	hbf				
TM3	TPh	3,35	hbf		TPh	3,18	hbf
	Ca	3,27	hbf				
TM4	TPh	2,75	hbf		TPh	3,31	hbf
	Ca	2,97	hbf				

nastavak Tabele 11.



$$E_v = -1,53 \text{ kcal/mol}$$

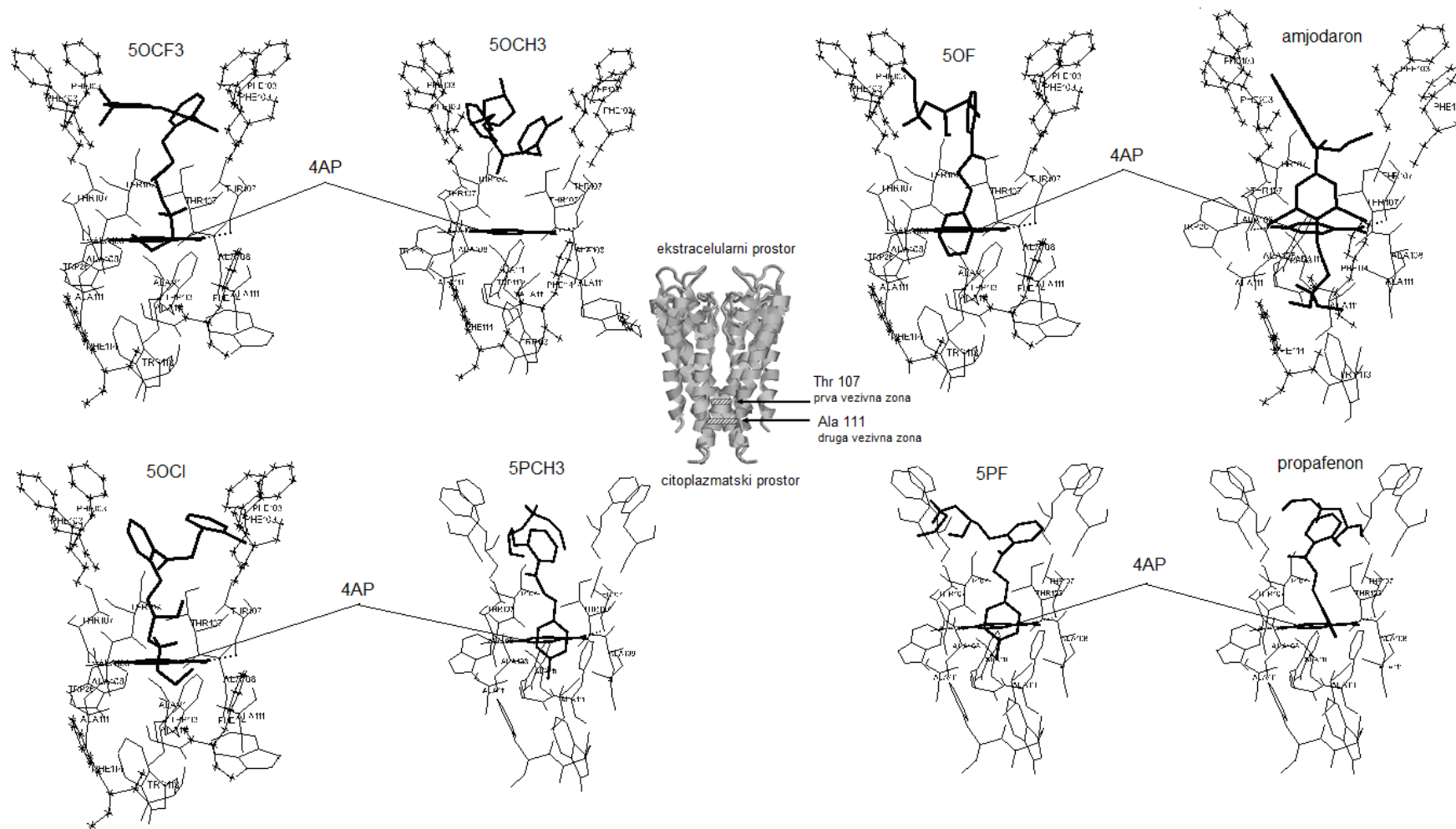
	THR107			ALA108			ALA111		
	S	L	I	S	L	I	S	L	I
TM1	Ca	2,97	hbf	TPh	3,49	hbf	TPh	3,40	hbf
TM2	TPh	3,43	hbf				TPh	2,63	hbf
	Ca	3,50	hbf						
TM3	Cb	2,71	hbf				TPh	3,06	hbf
	TPh	3,10	hbf						
	CPh	4,24	hbf						
TM4	Cb	2,66	hbf						
	TPh	3,58	hbf						



$$E_v = -7,59 \text{ kcal/mol}$$

	THR107			ALA108			ALA111		
	S	L	V	S	L	V	S	L	V
TM1	-C=O	2,07	vv	J	2,61	hg	Ce	2,96	hg
TM2	J	2,65	hg	n.d.			Cij	2,91	hbf
	Ph	2,41	hbf				Cef	2,69	hbf
	Cabcd	3,82	hbf						
TM3	J	3,59	hg	J	3,10	hg	Cij	2,52	hbf
	Ph	3,22	hbf	Cef	2,82	hbf			
	Cabcd	2,69	hbf						
TM4	J	3,06	hg	J	4,51	hbf	Cij	2,48	hbf
	Ph	2,31	hbf						
	Cabcd	3,82	hbf						

S-deo strukture koji ostvaruje interakciju sa izdvojenom aminokiselinskom sekvencom u pori Kanala, L-rastojanje (Å), I-tip interakcije: vv-vodonična veza, hbf-hidrofobna interakcija, hg-halogenena interakcija, dd-dipol-dipol interakcija, n.d. nije detektovano



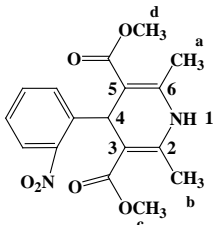
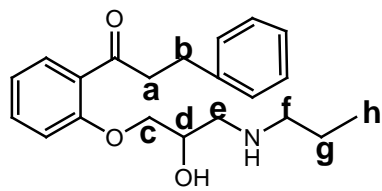
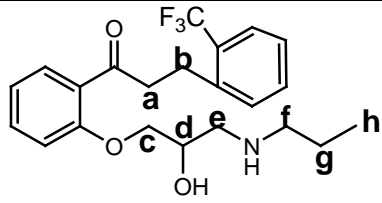
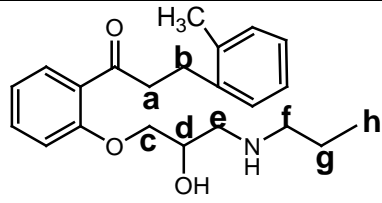
Slika 39. Trodimenzionalna struktura kompleksa ispitivanih jedinjenja i vezivnog mesta u pori KcsA kanala

4.2.7. *Docking simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), propafenona i nifedipina sa peptidnim kompleksom koji spaja β i α_1 subjedinice L-Ca²⁺ kanala*

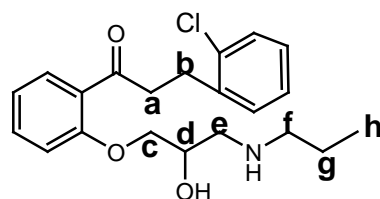
Najverovatnija konformacija i orijentacija ispitivanih jedinjenja u vezivnom mestu peptida koji spaja α_1 i β subjedinice L-Ca²⁺ kanala predstavljene su na Sl. 40.

Energije vezivanja protonovanih jedinjenja dobijene u *docking* eksperimentima kao i interakcije sa aminokiselinama u izdvojenoj aminokiselinskoj sekvenci peptidnog kompleksa prikazane su u Tabeli 12.

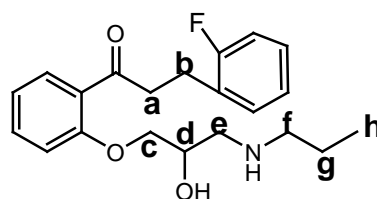
Tabela 12. Energije vezivanja i interakcije ispitivanih jedinjenja i ključnih aminokiselina iz definisane aminokiselinske sekvence peptidnog kompleksa koji spaja α i β subjedinice L-Ca²⁺ kanala .

 <p>Ev=-6,32 kcal/mol</p>				 <p>Ev=-5,21 kcal/mol</p>		
AK	S	L	I	S	L	I
TYR239	cCH3	3,22	hbf	n.d.		
GLU240	cCH3	3,17	hbf	TPh	3,46	hbf
ILE353	Ph	4,07	hbf	TPh	3,67	hbf
LYS354	Ph	3,36	hbf	CPh	3,33	Hbf
				Cc	3,84	hbf
ARG356	n.d.			CPh	3,52	hbf
HIS363	-NO2	1,82	vv	-C=O	2,53	vv
LEU364	Ph	4,94	hbf	n.d.		
	bCH3	3,40	hbf			
GLN367	-C=O	1,82	vv	n.d.		
 <p>Ev=-5,26 kcal/mol</p>				 <p>Ev=-4,82 kcal/mol</p>		
AK	S	L	I	S	L	I
GLY238	n.d.			-NH-	1,80	vv
TYR239	TPh	3,20	hbf	Cd	3,36	hbf
GLU240	TPh	4,16	hbf	-C=O	1,93	vv
ILE353	CPh	3,55	hbf	-CH3	3,69	hbf
LYS354	-NH-	2,09	vv	n.d.		
ARG356	TPh	3,18	hbf	CPh	3,26	hbf
	Ckab	3,91	hbf			
HIS363	CPh	3,70	hbf	TPh	3,35	hbf
LEU364	CPh	3,43	hbf			
GLN367	TPh	3,53	hbf	Cab	4,13	hbf

nastavak Tabele 12

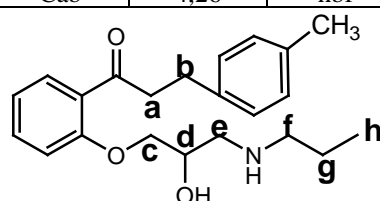


Ev=-5,08 kcal/mol

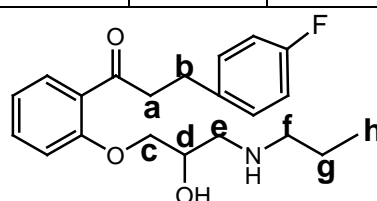


Ev=-4,82 kcal/mol

AK	S	L	I	S	L	I
GLU240	TPh	3,19	hbf	TPh	3,19	hbf
ILE353	CPh	3,90	hbf	Cab	3,40	hbf
LYS354	-OH	1,88	vv	CPh	3,11	hbf
ARG356	TPh	3,47	hbf	Cc	4,35	hbf
				TPh	3,57	hbf
HIS363	-C=O	1,99	vv	Cc	4,00	hbf
				-C=O	1,86	vv
LEU364	Ce	3,16	hbf	CPh	3,10	hbf
GLN367	TPh	4,00	hbf	Cab	4,25	hbf
				Cab	4,26	hbf
	TPh	4,16	hbf	TPh	4,16	hbf



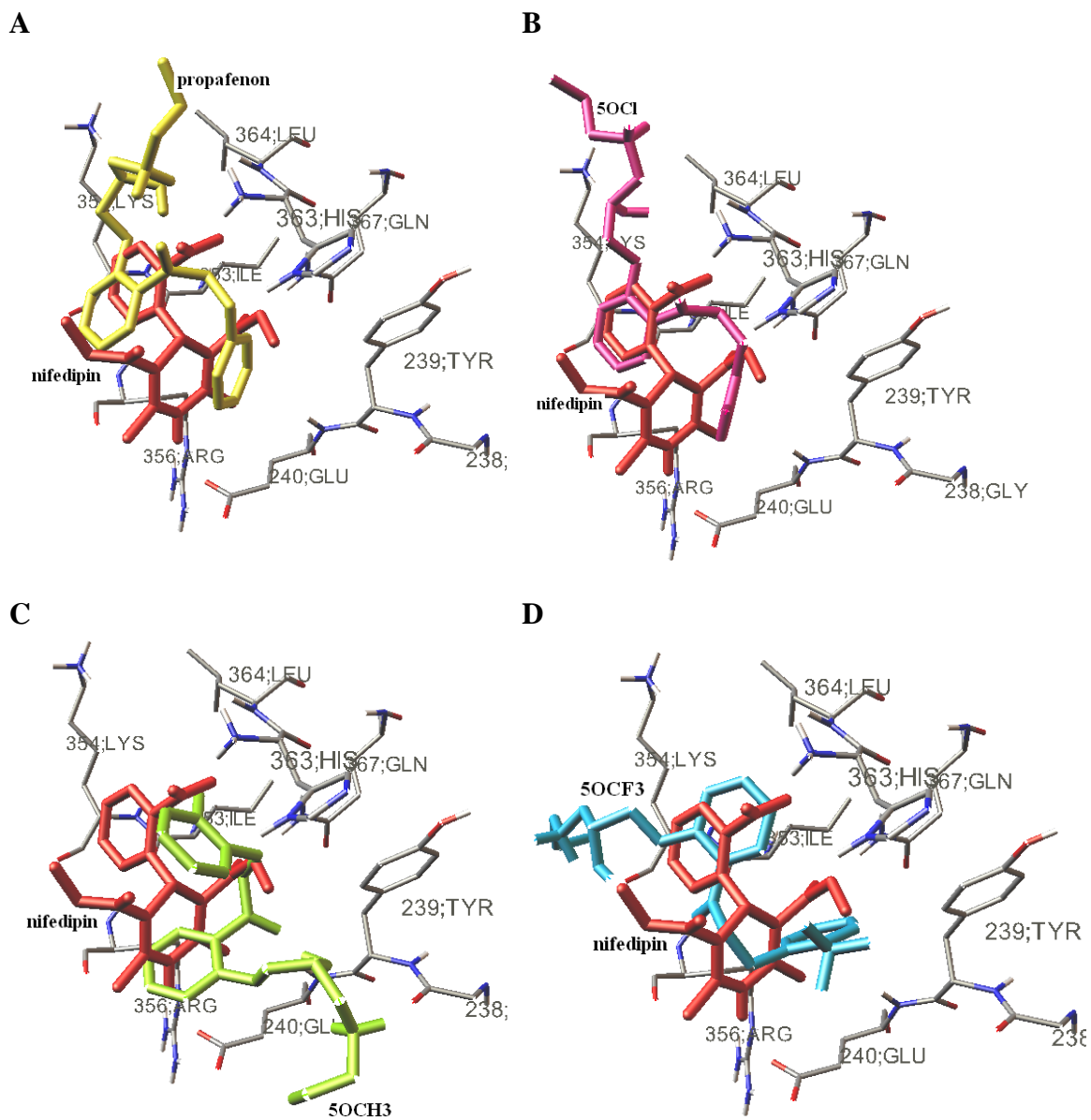
Ev=-4,64 kcal/mol



Ev=-4,62 kcal/mol

AK	S	L	I	S	L	I
TYR239	Cfgh	3,25	hbf	Cfgh	3,75	hbf
GLU240	CPh	3,42	hbf	CPh	4,42	hbf
ILE353	TPh	4,14	hbf	CPh	3,35	hbf
LYS354	-CH3	3,24	hbf	TPh	4,14	hbf
				Cab	3,36	hbf
ARG356	CPh	3,26	hbf	TPh	3,57	hbf
HIS363	Cab	3,72	hbf	CPh	3,30	hbf
				-OH	2,03	vv
LEU364		n.d.		Cfgh	3,46	hbf
GLN367	CPh	3,84	hbf		n.d.	
				Cab	4,43	hbf

S-deo strukture koji ostvaruje interakciju sa peptidnim kompleksom, L-rastojanje (Å), I-tip interakcije: vv-vodonična veza, hbf-hidrofobna interakcija, hg-halogeno interakcija, dd-dipol-dipol interakcija, n.d. nije detektovano, AK-aminokiselina



Slika 40. Preklopljene najpovoljnije konformacije u vezivnom mestu L-Ca²⁺ kanala:

- A)** propafenona i nifedipina,
- B)** 5OCl i nifedipina,
- C)** 5OCH3 i nifedipina i
- D)** 5OCF3 i nifedipina

**5. *IN VIVO* ISPITIVANJE ANTIARITMIJSKE
AKTIVNOSTI SINTETISANIH DERIVATA
PROPAFENONA**

5.1. Eksperimentalni deo

5.1.1. Hemikalije

- Propafenon-hidrochlorid (Hemofarm, Vršac, Srbija),
- Akonitin (Sigma Aldrich, Steinheim, SAD),
- Dimetilsulfoksid, čistoće $\geq 99,5$ DMSO (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka),
- Uretan (etil karbamat), čistoće $\geq 99,0$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka),
- Etanol 96 % (Zorka Pharma, A.D., Srbija),
- 0,9 % Natrijum-hlorid, rastvor za infuziju (Zdravlje A.D., Leskovac, Srbija),
- Voda za injekcije (Velefarm A.D., Beograd, Srbija),
- Heparin[®] (heparin-natrijum) 5000ij/ml (Galenika A.D., Beograd, Srbija),
- Azotna kiselina (sadrži 65% HNO₃), (Merck, Darmstadt, Nemačka).

5.1.2. Eksperimentalne životinje

Albino pacovi soja *Wistar*, muškog pola, telesne mase 210-330 g odgajani u vivarijumu Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

5.1.3. Oprema

Analitička vaga Adventurer[™]-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD),
Transdjuser za krvni pritisak (Ugo Basile Standard pressure transducer, Italija),
Živin manometar (Ugo Basile, Italija),
Jednokanalni pisač (Ugo Basile, Unirecord, One Channel, Italija),
EKG aparat (Hellige Simpliscriptor EK31, Nemačka),
EKG papir za Hellige GOLD EK 100/EK31 pisač, 50 mm x 60 mm (VeleBit d.o.o., Novi Sad, Srbija)
Vortex mešalice sa fiksnom brzinom (AMTAST Vortex (fix speed), SAD)

5.1.4. Kompjuterski programi

Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, SAD)

Chem3D Ultra 7.0.0 programa (<http://www.cambridgesoft.com>).

CS Gaussian 98 (Gaussian 98 (Revision A.7), Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB et al. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.)

Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>)

AutoDock v 4.0.1. (<http://autodock.scripps.edu>)

Modelar (<http://www.salilab.org/modeller>)

ChemAxon, MarvinBeans, (<http://www.chemaxon.com>)

5.1.5. Priprema rastvora

Za pripremu rastvora korišćene su: voda za injekcije (pH 7,2), DMSO i 0,1 mol/l HNO₃. Rastvori su uvek pripremani sveži.

Priprema rastvora 0,1 mol/l HNO₃

U odmerni sud od 100 ml prenese se 50 ml vode za injekcije, doda 0,7 ml koncentrovane HNO₃ i istim rastvaračem sud dopuni do oznake.

Priprema razblaženog rastvora heparina (1:10)

U odmerni sud od 100 ml prenese se sadržaj jedne ampule heparina, doda 70 ml fiziološkog rastvora, promućka i sud istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema razblaženog rastvora heparina (1:100)

U odmerni sud od 500 ml prenese se sadržaj 5 ampula heparina, doda 350 ml destilovane vode, promućka i sud istim rastvaračem dopuni do oznake. Pripremljeni rastvor se koristi za ispiranje aparature i baždarenje manometra.

Priprema osnovnog rastvor akonitina (100 µg/ml)

Odmeri se 10,0 mg akonitina, referentnog standarda, prenese u odmerni sud od 100 ml, doda 70 ml rastvora 0,1 mol/l HNO₃, mućka do rastvaranja, a zatim sud istim rastvaračem dopuni do oznake. Rastvor se čuva u sudovima od tamnog stakla, zaštićeno od svetlosti i na temperaturi 4-8 °C. Rastvor je stabilan 10 dana.

Priprema osnovnog rastvora propafenon- hidrohlorida (10 mg/ml)

Odmeri se 50 mg propafenon-hidrohlorida, radnog standarda, prenese u odmerni sud od 5 ml, doda 1 ml DMSO, mućka na Vortex-u do rastvaranja, a zatim sud do crte dopuni vodom za injekcije.

Priprema radnih razblaženja propafenon-hidrohlorida

U odmerni sud od 5 ml prenese se 1, 2 ili 3 ml osnovnog rastvora propafenon-hidrohlorida, doda 1 ml vode za injekcije, promućka i sud do oznake dopuni istim rastvaračem. Koncentracije pripremljenih rastvora su 2 mg/ml, 4 mg/ml i 6 mg/ml.

Priprema osnovnog rastvora 5OF derivata (10 mg/ml)

Odmeri se 50 mg 5OF derivata, prenese u odmerni sud od 5 ml, doda 1 ml DMSO, mućka na Vortex-u do rastvaranja, a zatim sud do oznake dopuni vodom za injekcije.

Priprema radnih razblaženja 5OF derivata

U odmerni sud od 5 ml prenese se 1, 2 ili 3 ml osnovnog rastvora 5OF derivata, doda 1 ml vode za injekcije, promućka i sud do oznake dopuni istim rastvaračem. Koncentracije pripremljenih rastvora su 2 mg/ml, 4 mg/ml i 6 mg/ml.

Priprema osnovnog rastvora 5PF derivata (10mg/ml)

Odmeri se 50 mg 5PF derivata, prenese u odmerni sud od 5 ml, doda 1 ml DMSO, mućka na Vortex-u do rastvaranja, a zatim sud do oznake dopuni vodom za injekcije.

Priprema radnih razblaženja 5PF derivata

U odmerni sud od 5 ml prenese se 1, 2 ili 3 ml osnovnog rastvora 5PF derivata, doda 1 ml vode za injekcije, promućka i sud do oznake dopuni istim rastvaračem. Koncentracije pripremljenih rastvora su 2 mg/ml, 4 mg/ml i 6 mg/ml.

Priprema osnovnog rastvora 5OCl derivata (10mg/ml)

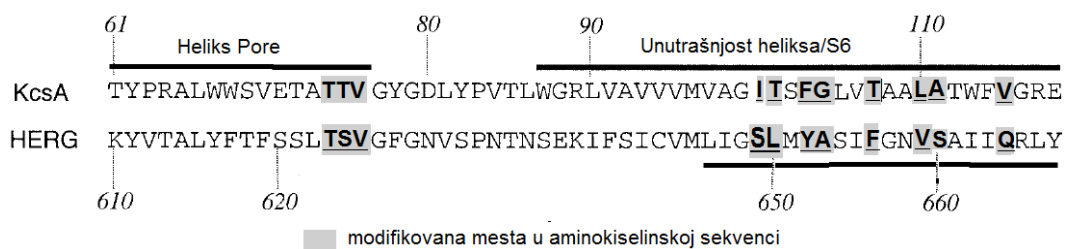
Odmeri se 50 mg 5OCl derivata, prenese u odmerni sud od 5 ml, doda 1 ml DMSO, mućka na Vortex-u do rastvaranja, a zatim sud do oznake dopuni vodom za injekcije.

Priprema radnih razblaženja 5OCl derivata

U odmerni sud od 5 ml prenese se 1, 2 ili 3 ml osnovnog rastvora 5OCl derivata, doda 1 ml vode za injekcije, promućka i sud do oznake dopuni istim rastvaračem. Koncentracije pripremljenih ratvora su 2 mg/ml, 4 mg/ml i 6 mg/ml.

5.1.6. Izgradnja homologih modela hERG kanala

Primenom programa *Modeler, de novo* postupkom konstruisan je homologi model hERG kanala²⁶⁰. Kao *šablon* struktura poslužila je kristalografska struktura KcsA kanala deponovana u bazi *Protein Data Bank* pod šifrom **1BL8**²³. Na osnovu eksperimentalnih podataka iz literature^{23,260} za izgradnju homologog modela hERG kanala modifikovana je aminokiselinska sekvenca u unutrašnjosti pore kanala koja leži na S6 transmembranskom segmentu (Slika 41).



Slika 41. Prikaz aminokiselinskih modifikacija u S6 transmembranskom segmentu KcsA kanala (Preuzeto i prilagođeno iz: Mitcheson JS, Chen J, Lin M, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*2000,97(22):12329–12333).

5.1.7. Docking simulacija interakcija sintetisanih derivata propafenona sa homologim modelom hERG kanala

Potupak izvođenja *docking* simulacije identičan je postupku koji je opisan u poglavlju **4.1.15**. Koordinate centra trodimenzionalne rešetke su 79,282 Å, 28,866 Å i 35,176 Å, veličina rešetke 60x60x60. Broj LGA preračuna je bio 150 sa nasumičnim početnim položajem ispitivanog jedinjenja. Veličina populacije je bila 200, a maksimalan broj energetskih provera $2,5 \cdot 10^6$. Na osnovu 50 *docking* pokušaja (*runova*) dobijena je najverovatnija konformacija i orijentacija ispitivanog jedinjenja u vezivnom mestu pore kanala.

5.1.8. Eksperimentalni in vivo akonitinski model srčane aritmije kod pacova

U *in vivo* eksperimentima korišćeni su albino pacovi soja *Wistar*, muškog pola, telesne mase 210-330 g. Životinje su držane u individualnim kavezima, standardnih dimenzija. Za prostirku je korišćena sterilna drvena šuška, debljine 2-3 cm, koja je menjana svaki dan. U prostoriji u kojoj su boravile životinje zoohigijenski i mikroklimatski uslovi su odgovarali propisanim standardima (12h/12h svetlo/tamno, 30-70 % vlažnost, 22-25 °C temperatura prostorije). Sve životinje su hranjene briketiranom potpuno krmnom smešom za ishranu laboratorijskih životinja, standardnog higijenskog i sirovinskog sastava. Životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi tokom celog perioda ispitivanja (*ad libitum*). Eksperimentalne procedure su izvođene prema Direktivi Evropske Unije (*The European Council Directive of November 24, 1986; 86/609/EEC*).

Eksperimentalna *in vivo* ispitivanja sprovedena su kroz dva odvojena eksperimentalna protokola:

Eksperiment 1. Ispitivanje potencijala halogenovanih derivata (5OCl, 5OF i 5PF) da odlože pojavu poremećaja srčanog ritma indukovanu akonitinom;

Eksperiment 2. Ispitivanje i procena antiaritmijskog potencijala halogenovanih derivata da zaustave akonitinom indukovanu aritmiju kod pacova.

5.1.8.1. Anestezija u in vivo akonitinskom modelu srčane aritmije

Test sa akonitinom izvodi se na pacovima koji su prethodno anestezirani intraperitonealnom (*i.p.*) aplikacijom 20 % rastvora uretana u dozi od 1,0 g/kg, čime se obezbeđuje duboka anestezija sa minimalnim depresornim efektima na KVS i respiratorni sistem²⁶¹⁻²⁶². Pravilna aplikacija *i.p.* injekcije je u donji levi kvadrant prednjeg trbušnog zida, jer se izbegava ubrizgavanje anestetika u donje šuplje organe.

Nakon gubitka refleksa uspravljanja životinja se postavlja na leđa na podlogu sa kontrolisanom temperaturom (37±1 °C). Posle 3-5 min. od aplikacije anestetika životinja ulazi u anesteziju, što se proverava bolnim nadražajem (*Pinch test*), štipanjem ekstremiteta koje dovodi do povlačenja ekstremiteta ili kornealnim refleksom.

5.1.8.2. Hiruške procedure na životinjama u dubokoj anesteziji

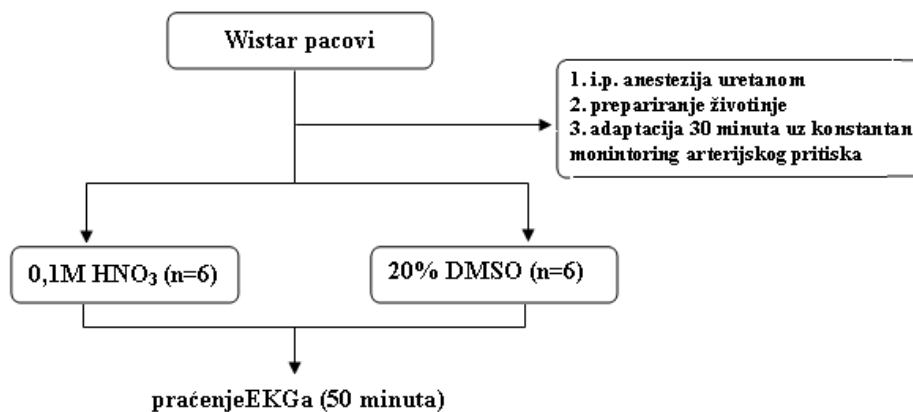
Hiruške intervencije se izvode specijalnim instrumentima namenjenim za rad sa malim životinjama i uključuju sledeće procedure:

1. Medijalni rez na vratu, preparisanje traheje i traheotomiju. U traheju se postavlja staklena kanila da bi se obezbedilo nesmetano disanje i eventualna primena veštačke ventilacije;
2. Preparisanje desne jugularne vene i postavljanje polietilenske venske kanile, kako bi se obezbedila nadoknada tečnosti i aplikacija akonitina i ispitivanih jedinjenja;
3. Preparisanje leve karotidne arterije i postavljanje polietilenske arterijske kanile u cilju kontinuiranog praćenja arterijskog pritiska tokom eksperimenta.

Preko kanile uvedene u jugularnu venu životinji se ubrizga 50 μ l rastvora heparina (1:10) i 50 μ l fiziološkog rastvora. U sva četiri ekstremiteta potkožno se uvuku elektrode koje su povezane sa elektrokardiografom. Hiruška procedura na životinji traje oko 30 min. od ulaska životinje u duboku anesteziju. Pre samog eksperimentalnog izvođenja akonitinskog testa i povezivanja preparisane životinje sa elektrokardiografom i transdjuserom, aparatura se ispere i ispuni rastvorom heparina (1:100) kojim se na taj način kalibriše nivo žive u manometru.

5.1.8.3. Ispitivanje uticaja rastvarača na srčani ritam pacova

Eksperimentalna procedura ispitivanja uticaja rastvarača na srčani ritam pacova obuhvata 12 albino pacova soja *Wistar* podeljenih u dve ispitivane grupe (Sl. 42).



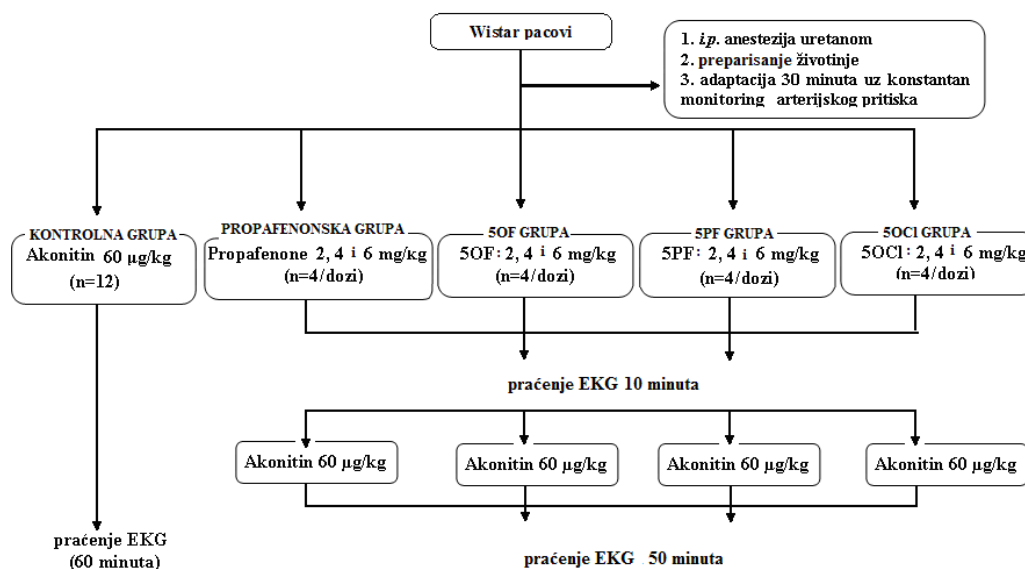
Slika 42. Protokol eksperimentalne procedure ispitivanja uticaja rastvarača na srčani ritam pacova

Tokom perioda adaptacije životinje (30 min) kontinuirano se prati promena krvnog pritiska i na svakih 10 min. registruje produženi EKG zapis (II bipolarni odvod). Neposredno pre aplikacije rastvarača registruje se EKG zapis na kome se određuje frekvencija srčanog rada koja predstavlja kontrolnu frekvencu u datoj grupi.

Preko kanile uvedene u jugularnu venu aplikuje se 50 µl rastvarača, 50 µl fiziološkog rastvora i narednih 50 min pomoću elektrokardiografa na svaki minut prati promena srčanog ritma (II bipolarni odvod). Istovremeno se preko transdjusera za krvni pritisak prati promena arterijskog pritiska.

5.1.8.4. Eksperimentalna procedura ispitivanja uloge sintetisanih derivata u prevenciji poremećaja srčanog ritma koji je indukovani i.v. aplikacijom akonitina

Eksperimentalna procedura ispitivanja uloge propafenona i sintetisanih derivata da odlože pojavu poremećaja srčanog ritma koja je indukovana i.v. aplikacijom akonitina obuhvata 60 albino pacova soja *Wistar* podeljenih u pet ispitivanih grupa (Sl 43).

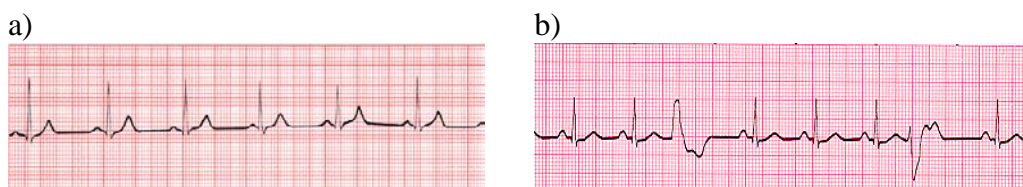


Slika.43. Protokol eksperimentalne procedure ispitivanja potencijala sintetisanih derivata da odlože pojavu poremećaja srčanog ritma indukovanu i.v. aplikacijom akonitina

Tokom perioda adaptacije životinje (30 min) kontinuirano se prati promena krvnog pritiska i na svakih 10 min registruje produženi EKG zapis (II bipolarni odvod). Neposredno pre aplikacije ispitivanog jedinjenja ili akonitina registruje se EKG zapis na

kome se određuje frekvencija srčanog rada koja predstavlja kontrolnu frekvenciju u datoj grupi.

Kod pacova u akonitinskoj grupi preko kanile uvedene u jugularnu venu aplikuje se rastvor akonitina u dozi 60 µg/kg, 50 µl fiziološkog rastvora i prvih 5 min neprekidno prati promena srčani ritam (II bipolarni odvod), a posle 5 min na svaki minut. Beleži se pojava prve ventrikularne ekstrasistole (VES) kao znak da je došlo do promene srčanog ritma (Sl. 44). Istovremeno se preko transdjusera prati promena arterijskog pritiska.

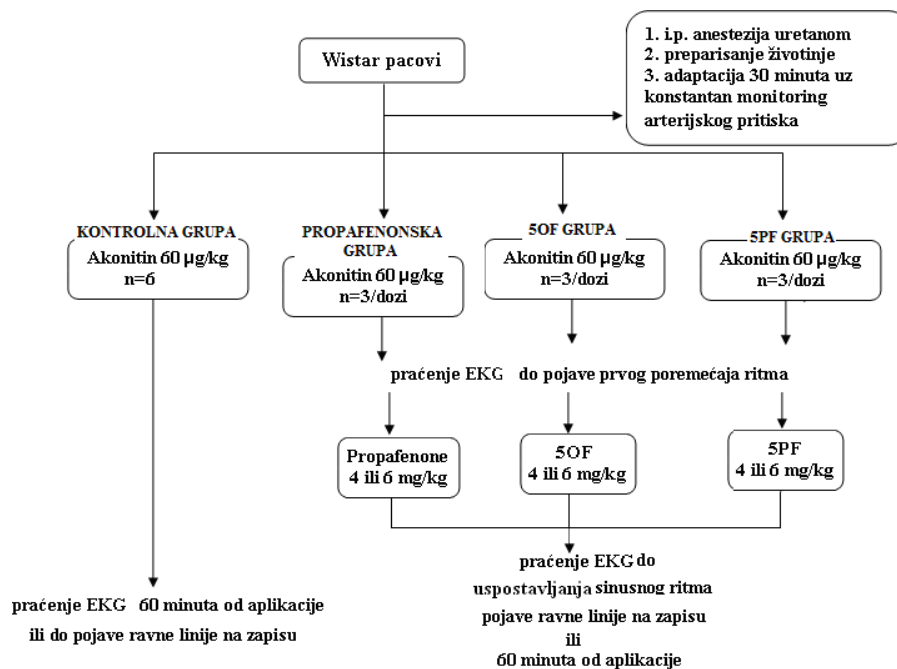


Slika 44. EKG pacova (II odvod) a) normalan sinusni ritam pre aplikacije akonitina; b) pojava ventrikularnih ekstrasistola indukovanih *i.v.* aplikacijom akonitina

Kod pacova u preostale četiri grupe (propafenonska, 5OF, 5PF i 5OCI) posle 10 min od aplikacije ispitivanog jedinjenja preko kanile uvedene u jugularnu venu aplikuje se rastvor akonitina u dozi od 60 µg/kg, 50 µl fiziološkog rastvora i prvih 5 min. neprekidno prati promena srčanog ritma (II bipolarni odvod) i arterijskog pritiska. Posle 5 min od aplikacije akonitina srčani ritam se registruje na svaki minut tokom 50 min od aplikacije akonitina ili do pojave ravne linije na EKG zapisu koja ukazuje da je kod životinje nastupila smrt. Tokom eksperimenta arterijski pritisak se kontinuirano prati pomoću transdjusera i registruje pomoću pisaača.

5.1.8.5. Eksperimentalna procedura ispitivanja uloge sintetisanih derivata da zaustave aritmiju indukovanu *i.v.* aplikacijom akonitina

Eksperimentalna procedura ispitivanja antiaritmijskog potencijala sintetisanih derivata da konvertuju poremećaje srčanoga ritma koji su indukovani *i.v.* aplikacijom akonitina obuhvata 24 albino pacova soja *Wistar* podeljenih u pet ispitivanih grupa (Sl. 45).



Slika 45. Protokol eksperimentalne procedure ispitivanja antiaritmijskog potencijala sintetisanih derivata u poremećajima srčanoga ritma koji su indukovani *i.v.* aplikacijom akonitina

Tokom perioda adaptacije životinje (30 min) kontinuirano se prati promena krvnog pritiska i na svakih 10 minuta registruje na EKG zapis (II bipolarni odvod). Neposredno pre aplikacije akonitina registruje se EKG zapis na kome se određuje frekvencija srčanog rada koja predstavlja kontrolnu frekvencu u datoj grupi.

Preko kanile uvedene u jugularnu venu aplikuje se rastvor akonitina u dozi 60µg/kg, 50 µl fiziološkog rastvora i prvih 5 min neprekidno prati promena srčanog ritam (II bipolarni odvod), a posle 5 min na svaki minut. Beleži se pojava prve ventrikularne ekstrasistole (VES) kao znak da je došlo do promene srčanoga ritma (Sl.44). Istovremeno se preko transdjusera prati promena arterijskog pritiska.

U akonitinskoj grupi EKG zapis se prati 60 min od aplikacije akonitina ili do pojave ravne linije na zapisu koja ukazuje da je nastupila smrt. Arterijski pritisak se neprekidno prati tokom eksperimenta.

U preostale tri grupe životinja (propafenonska, 5OF i 5PF), 10 sek od registrovanja VES, preko kanile uvedene u jugularnu venu aplikuje se odgovarajuća doza ispitivanog jedinjenja (4 ili 6 mg/kg). Promena srčanog ritma prati se neprekidno prvih 5 minuta od aplikacije, a zatim na svaki minut sve do uspostavljanja sinusnog

ritma; 60 min od aplikacije ispitivanog jedinjenja ili do pojave ravne linije na EKG zapisu.

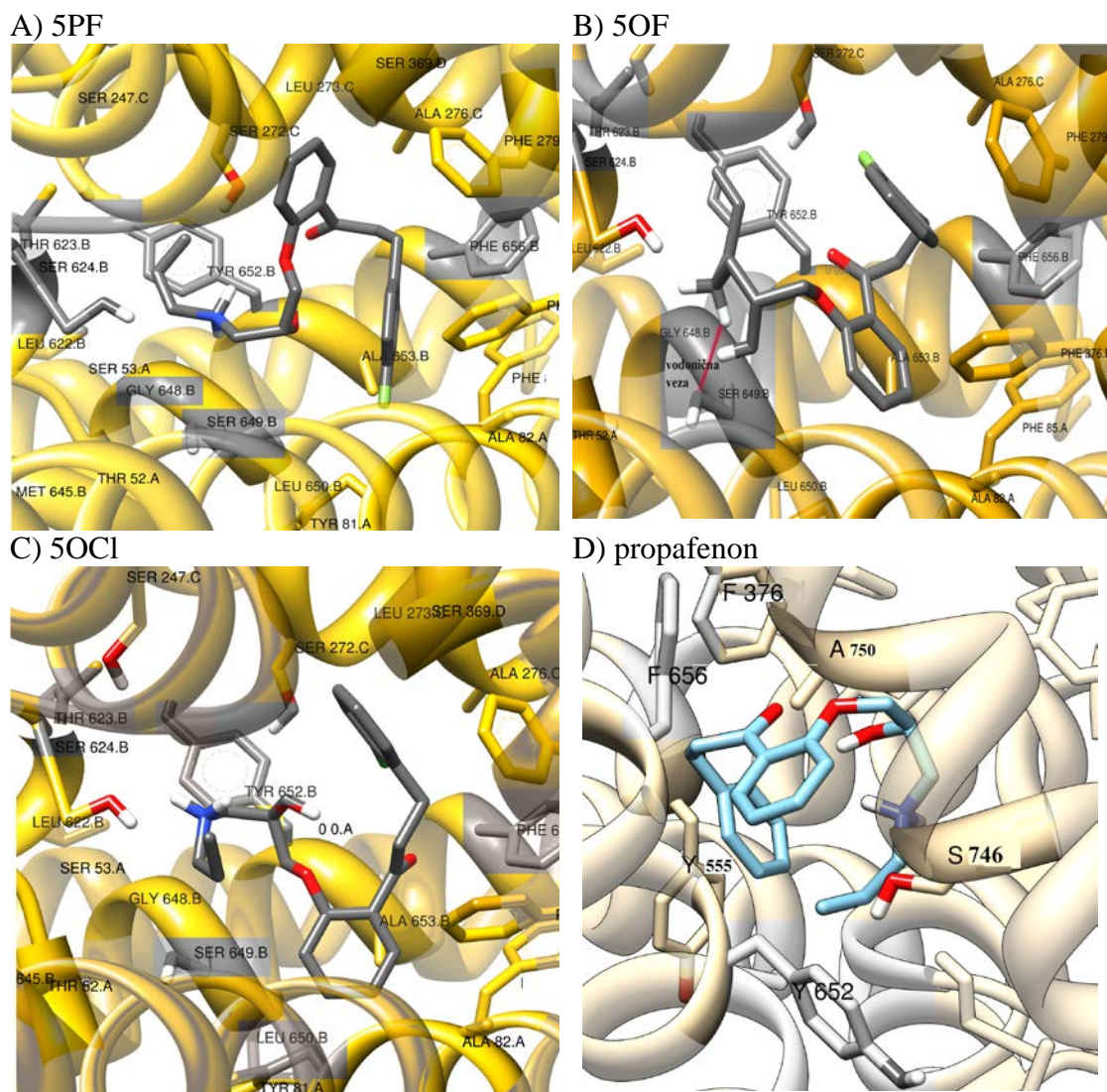
5.1.8.6. *Žrtvovanje životinje po završetku eksperimentalne procedure*

Po okončanju eksperimenta životinje se žrtvuju iskrvarenjem koje se sprovodi presecanjem karotidne arterije, pri čemu se životinja nalazi u dubokoj anesteziji. Nakon iskrvarenja životinje smrt je konstatovana na osnovu prestanka disanja i rada srca. Kod životinje nastupa mrtvačka ukočenost (*rigora mortis*).

5.2. Rezultati

5.2.1. Docking simulacija interakcija sintetisanih jedinjenja (5a-5f), sa homologim modelom hERG kanala

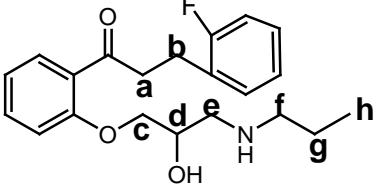
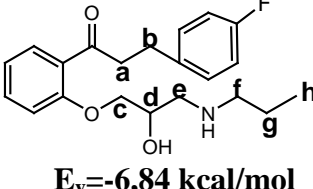
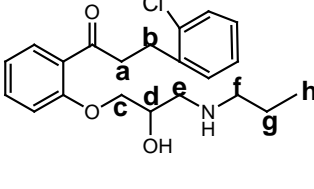
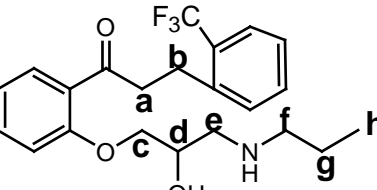
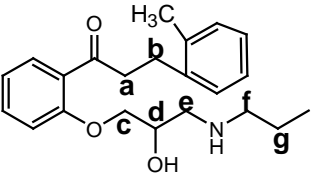
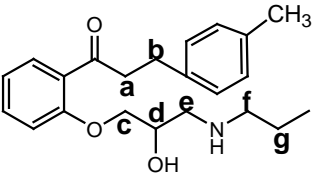
Najverovatnije konformacije i orijentacija ispitivanih jedinjenja u vezivnom mestu pore kanala predstavljene su na Sl.46.



Slika.46. Interakcije ispitivanih jedinjenja sa aminokiselinskom sekvencom u pori hERG kanala: A.5PF, B.5OF, C.5OCl i D.propafenon

Dobijene vrednosti energija vezivanja protonovanih jedinjenja kao i interakcije sa aminokiselinama u izdvojenoj aminokiselinskoj sekvenci pore kanala prikazane su u Tabeli 13.

Tabela 13. Energije vezivanja ispitivanih jedinjenja i interakcije sa ključnim aminokiselinama iz definisane aminokiselinske sekvence u pori kanala

 <p>$E_v = -6,84$ kcal/mol</p>	 <p>$E_v = -6,84$ kcal/mol</p>	 <p>$E_v = -8,07$ kcal/mol</p>	
	S L I	S L I	S L I
THR623	Cfgh 3,50 hbf	Cfgh 3,65 hbf	n.d.
SER624	Cfgh 3,50 hbf	n.d.	n.d.
SER649	-OH 2,01 Vv	-NH ₂ ⁺ 2,49 π-katjon	CPh 3,30 hbf
TYR652	Cfgh 3,50 hbf	Cfgh 3,45 hbf	Ce 3,60 hbf
ALA653	Cph 3,20 hbf	TPh 3,36 hbf	CPh 3,60 hbf
PHE656	Cb 3,25 hbf	n.d.	n.d.
			
	S L I	S L I	S L I
TYR652	Cb 3,56 hbf	Ca 3,59 hbf	Cd 3,38 hbf
PHE656	Ce 3,17 hbf	Cc 3,58 hbf	Cb 3,86 hbf
SER624	n.d.	n.d.	-NH ₂ 2,031 vv
SER 746	n.d.	-NH ₂ 2,08 vv	

S-deo strukture koji ostvaruje interakciju sa izdvojenom aminokiselinskom sekvencom u pori kanala L-rastojanje (Å), I-tip interakcije: vv-vodonična veza, hbf-hidrofobna interakcija, hg-halogeni interakcija, dd-dipol-dipol interakcija, n.d. nije detektovano

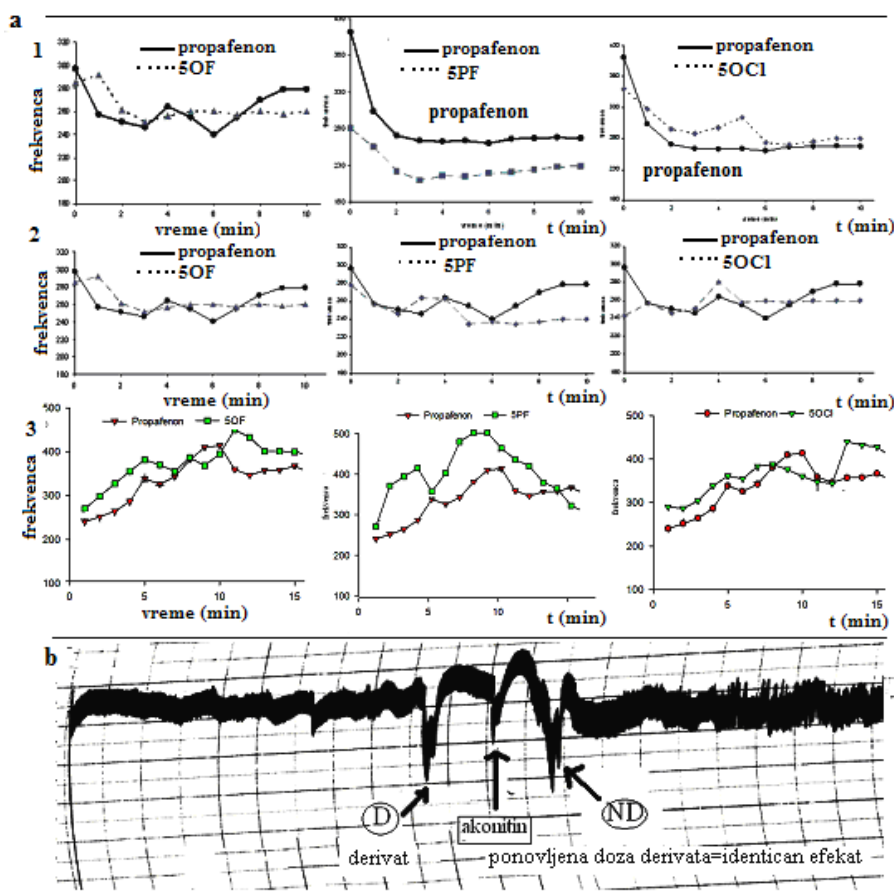
5.2.2. Eksperimentalni in vivo akonitinski model srčane aritmije kod pacova

5.2.2.1. Ispitivanje uticaja rastvarača na srčani ritam pacova

Analize EKG zapisa dobijenih iz dve ispitivane grupe albino pacova ukazuju da rastvarači korišćeni za pripremu rastvora akonitina, propafenona i ispitivanih derivata, aplikovani u zapremini od 100 μ l, nisu uticali na promenu srčanog ritma pacova .

5.2.2.2. Ispitivanje potencijala sintetisanih derivata da odlože pojavu poremećaja srčanog ritma koji su indukovani i.v. aplikacijom akonitina

U ispitivanju potencijala sintetisanih derivata da odlože pojavu poremećaja srčanog ritma koja je indukovana i.v. aplikacijom akonitina praćeni su parametri od vitalnog značaja za srčanu funkciju: krvni pritisak, srčana frekvenca i proaritmogeni potencijal. (Sl.47)



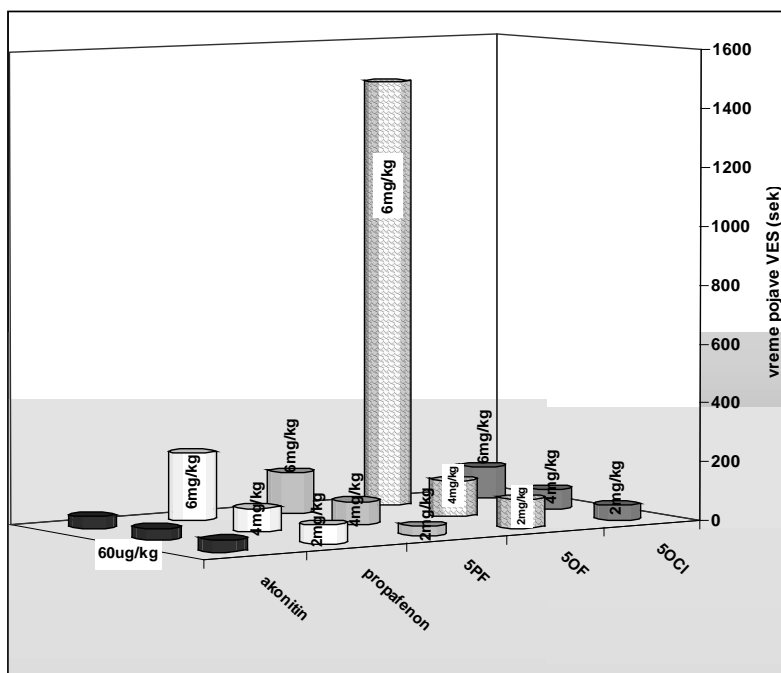
Slika 47. a) Promene srčane frekvence u svakoj od ispitivanih grupa u odnosu na propafenonsku u sve tri ispitivane doze (1)-doza 6 mg/kg; (2)-doza 4 mg/kg i (3)-doza od 2 mg/kg. **b)** zapis krvnog pritiska pacova, pre u toku i posle aplikacije ispitivanog jedinjenja i akonitina.

Posle aplikacije akonitina praćena su dva parametra za procenu antiaritmijskog potencijal derivata:

1. Vremena pojave VES u zavisnosti od aplikovane doze, što je kao srednja vrednost unutar ispitivanih grupa za svaku dozu predstavljena u Tabeli 14. Statistička značajnost vremena u kome se pojavila VES za svaku ispitivanu grupu u odnosu na propafenonsku, testirana je primenom *Student-t* testa. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 15.

2. Preživljavanja životinja tokom eksperimenta izraženog kao procenat, unutar ispitivanih grupa za svaku ispitivanu dozu (Tabela 16).

Tabela 14. Vreme pojave VES (t [sek]) u zavisnosti od aplikovane doze propafenona i sintetisanih derivata i statistička značajnost razlike u odnosu na kontrolnu (akonitinsku) grupu



Kontrolna grupa (akonitin, 60 µg/kg) = 39,7±5,6				
Doza	propafenon (t ± S.E.)	5PF (t ± S.E.)	5OF (t ± S.E.)	5OC1 (t ± S.E.)
2mg/kg	63,2 ± 17,90	33,2 ± 8,3	87,7±19,8*	51 ± 9,5
4mg/kg	79,8 ± 22,2*	77,8 ± 10,1*	122,5 ± 17,2*	69 ± 17,2
6mg/kg	229 ± 116,5*	140 ± 59,9*	1465,7±569,1*	109,7±69,7*

*p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu

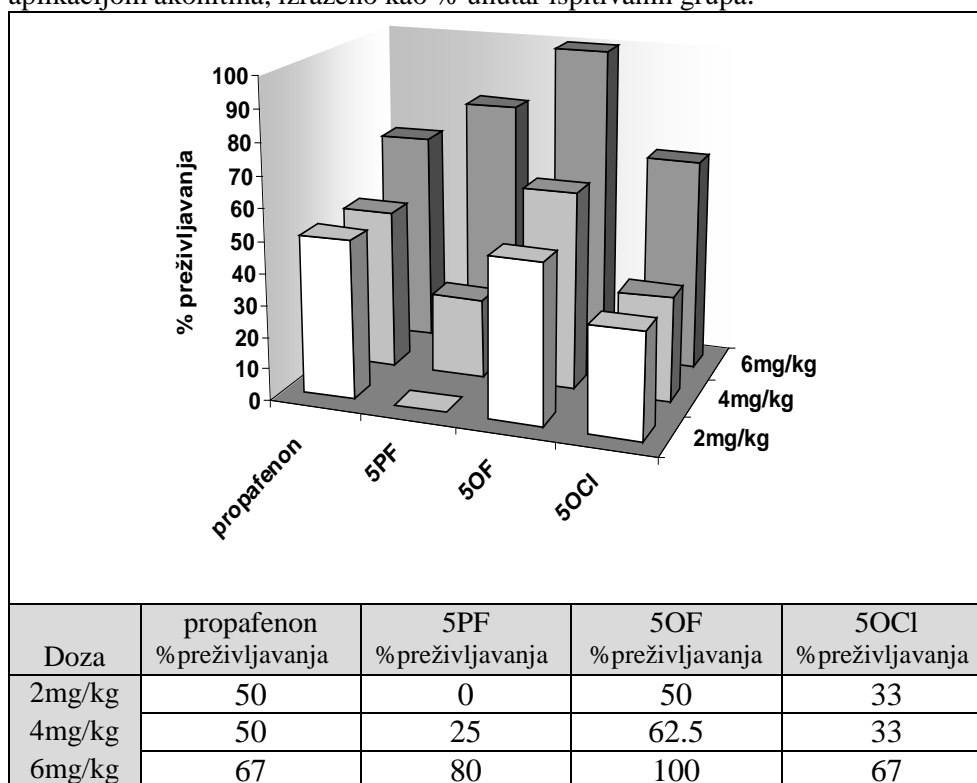
Tabela 15. Statistička značajnost vremenske razlike pojave VES za svaku ispitanu grupu u odnosu na propafenonsku grupu

doza 2mg/kg	propafenon	5PF	5OF	5OCl
propafenon				
5PF	!!		*	!!
5OF	!!	*		!!
5OCl	!!	!!	!!	
doza 4 mg/kg				
propafenon		!!	!!	!!
5PF	!!		*	!!
5OF	!!	*		*
5OCl	!!	!!	*	
doza 6mg/kg				
propafenon		!!	*	!!
5PF	!!		*	!!
5OF	*	*		*
5OCl	!!	!!	*	

*p<0,05, !! p>0,05

Rezultati preživljavanja životinja tokom ispitivanja potencijala sintetisanih derivata da odlože pojavu poremećaja srčanog ritma indukovanu *i.v.* aplikacijom akonitina (60 µg/kg) predstavljani su u Tabeli 16.

Tabela 16. Preživljavanje životinja tokom ispitivanja preventivne uloge sintetisanih derivata da odlože pojavu poremećaja srčanog ritma indukovanu *i.v.* aplikacijom akonitina, izraženo kao % unutar ispitivanih grupa.



5.2.2.3. Ispitivanja efikasnosti sintetisanih derivata da zaustave poremećaje srčanog ritma koji su indukovani i.v. aplikacijom akonitina

Rezultati ispitivanja terapijske uloge propafenona i njegovih fluoriranih derivata (5OF i 5PF) predstavljeni su u Tabeli 17 kao vreme i procenat preživljavanja životinja tokom eksperimenta. (Tabela 17)

Tabela 17. Vreme i procenat preživljavanja životinja tokom ispitivanja terapijske uloge propafenona, 5OF i 5PF derivata.

Doza	propafenon vreme i %preživljavanja	5OF vreme i %preživljavanja	5PF vreme i %preživljavanja
4 mg/kg	690 ± 297 0%	360 ± 97,2 0%	665 ± 416,2 0%
	150 ± 14,1 0%	120 ± 17,3 0%	3000 ± 0 100%

**6. ISPITIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE
AKTIVNOSTI DERIVATA PROPAFENONA I
INTERMEDIJERA**

6.1. Eksperimentalni deo

6.1.1. Oprema

Analitička vaga METLLER (Cirih, Švajcarska),
Centrifuga, Swing-out rotor, 1624 (Andreas Hettich GmbH & Co.KG Tuttingen, Nemačka),
Višekanalni ELISA čitač (CHEMWELL-Awareness Technology inc. SAD),
X-ray akcelerator (VARIAN X-6 MeV, SAD),
Inkubator (Cole-Parmer[®], SAD),
Vodeno kupatilo (Andreas Hettich GmbH & Co.KG Tuttingen, Nemačka),
Laminarna komora (Teistar, Kanada),
Sistem za sterilizaciju membranskom filtracijom (Filter Units -500 ml Capacity, MF75[™] Series, Thermo Scientific, USA),

6.1.2. Materijal

Mikrotitar ploče sa 96 bazenčića (*96-well plates*) (Nunc A/S-Kamstrupvej 90, Roskilde, Holandija),
Posude za gajenje ćelija u kulturi: (*Spinner bottles/flasks* (gajenje ćelija u suspenziji) i *Roller bottles* (plastične boce; ćelije prijanjaju za celu unutrašnju površinu), Petri šolje
Membranski filteri dijametra pora 0,22 μm (Millipore Express[®] PLUS Membrane Filters), (Merck, Darmstadt, Nemačka)
Varijabilna automatska pipeta, Labopette 10-100 μl (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Nemačka)

6.1.3. Hemikalije

- Cisplatin[®] (*Pfizer*, Australija),
- Suplementirani hranljivi medijum (RPMI-1640 Media sa 3 mmol/l L-glutamina) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- Koncentrovan, sterilan rastvor, penicilin-streptomicin, (sadrži 10.000 IJ penicilina i 10 mg streptomicina u 1 ml rastvora, pre upotrebe rastvor se razblažuje 100 puta) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),

- Natrijum-bikarbonatni sterilan rastvor za ćelijske kulture (7.5% SBS sterile suitable for cell culture) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- Serum fetusa govečeta (*Fetal Bovine Serum* (FBS), inaktivisan zagrevanjem na 56 °C u toku 30 min.) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
- Heamaccel (želatinski polimerizat, koloidna zamena za krvnu plazmu koja sadrži: 145 mmol/l Na⁺, 5,1 mmol/l K⁺, 6,2 mmol/l Ca²⁺, 145 mmol/l Cl⁻ i 35g/l želatinskog polimera pH 7,3 ± 0,3),
 - Hemaglutinin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
 - Natrijumdodecil-sulfat (SDS), C₁₂H₂₅NaO₄S (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
 - Hlorovodonična kiselina, HCl (Merck, Darmstadt, Nemačka),
 - MTT reagens, (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il))-2,5-difenil) terazolium bromid, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH),
 - Heparin (Galenika, Srbija),
 - Lymphoprep[®] (gradijent gustine, sterilan viskoznan rastvor koji sadrži natrijumdiatrizoat i polisaharide) (Nycomed, Oslo, Norveška),
 - Dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka),
 - Sterilan koncentrovan rastvor fosfatnog pufera pH 7,4 (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
 - Voda za injekcije (Aqua pro injectione) (Velefarm, Beograd, Srbija)

6.1.4. *Ćelijske linije*

Kolekcije ćelijskih linija Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, odsek za eksperimentalna istraživanja u onkologiji

- Ćelije humanog fatalnog adenokarcinoma grlića materice, HeLa (ATCC N⁰ CCL2)
- Ćelije humanog melanoma, Fem-X
- Ćelije adenokarcinoma kolona, LS174 (ATCC N⁰ CL-188)
- Ćelije humane eritroleukemije, K562 (ATCC N⁰ CCL 243),
- Ćelije humanog karcinoma prostate, PC3 (ATCC N⁰ CRL-14352)
- Ćelije humanog estrogen zavisnog karcinoma dojke, MCF-7 (ATCC N⁰ HTB-22) (ATCC- The American Type Culture Collection, USA)²⁶³.

6.1.5. Računarski programi

Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, SAD)

Marvin Sketch 5.5.1.0 programa (www.chemaxon.com/products.html)

Chem3D Ultra 7.0.0 programa (<http://www.cambridgesoft.com/>).

Dragon 6 programa (<http://www.talete.mi.it>)

CS Gaussian 98 (Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. Frisch at al., Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.)

SIMCA P+ 12.0 programu (Umetrics AB, Umea, Sweden, SIMCA P+ program, Version 12.0.0.0, May 20. 2008, www.umetrics.com).

Pentacle 1.0.6 (Pentacle, Version 1.0.6; Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italy, 2009).

6.1.6. Priprema rastvora

Priprema koncentrovanih rastvora ispitivanih jedinjenja (10 mmol/l)

Odmeri se tačno masa koja odgovara 50 mmol/l ispitivanog jedinjenja, prenese u odmerni sud od 5 ml i rastvori u 3-4 ml DMSO. Odmerni sud dopuni se do oznake istim rastvaračem.

Priprema 0,01 mol/l rastvora hlorovodonične kiseline

U odmerni sud od 100 ml prenese se oko 50 ml vode za injekcije, doda 0,85 ml 35 % HCl i vodom za injekcije dopuni do oznake. Koncentracija pripremljene kiseline je 1 mol/l. U odmerni sud od 1000 ml prenese se 500 ml vode za injekcije, doda 10 ml pripremljenog rastvora i istim rastvaračem dopuni do oznake.

Priprema rastvora fosfatnom puferu

U odmerni sud od 100 ml prenese se oko 50 ml vode za injekcije, doda 10 ml koncentrovanog rastvora fosfatnog pufera pH 7,4 i dopuni do oznake vodom za injekcije

Priprema 10 % rastvora SDS u 0,01 mol/l HCl

Odmeri se 10 g SDS i prenese u odmerni sud od 100 ml, doda oko 50 ml 0,01mol/l HCl, blago se mućka do rastvaranja, vodeći računa da rastvor ne peni. Odmerni sud se dopuni do crte istim rastvaračem.

Priprema rastvora MTT u fosfatnom puferu

Odmeri se 0,5 g MTT i prenese u odmerni sud od 100 ml, doda oko 50 ml fosfatnog pufera i blago se mućka do rastvaranja. Odmerni sud se dopuni do oznake istim rastvaračem.

6.1.7. Hranljivi medijum

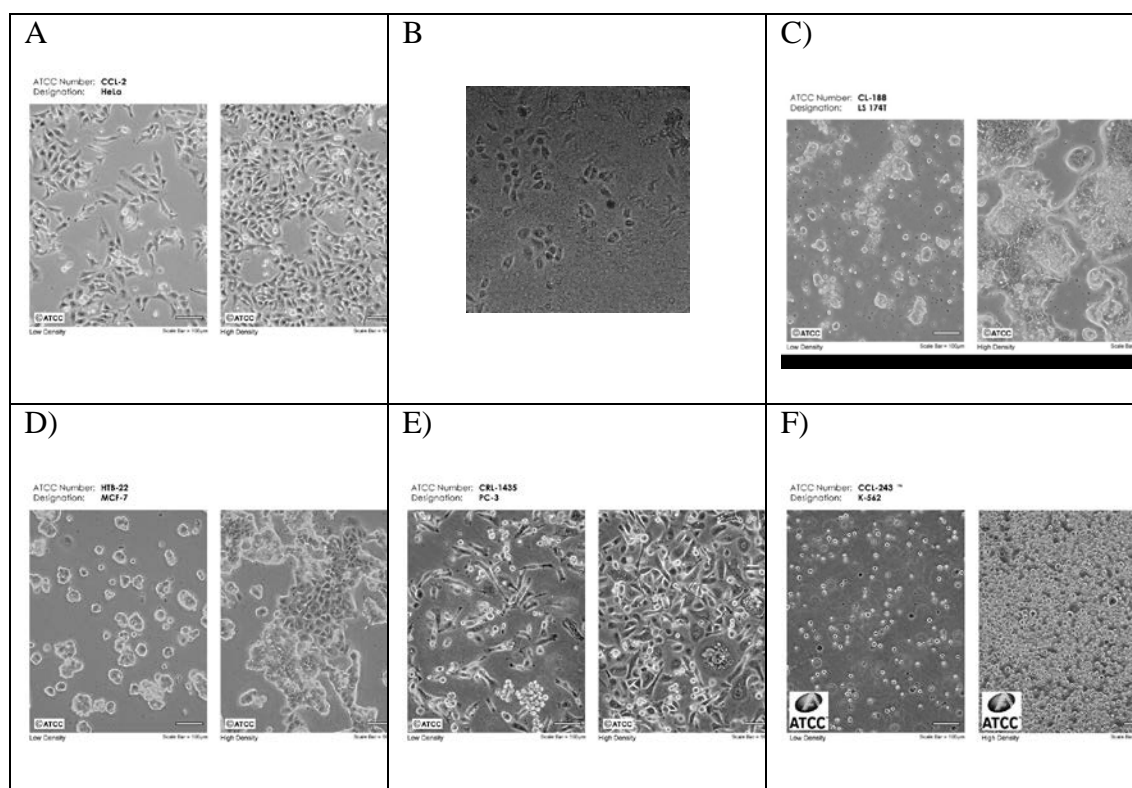
Praškast RPMI 1640 medijum sadrži neorganske soli (bikarbonatni pufer), vitamine, aminokiseline, glukozu, glutation, Na-so fenol crvenog i 3 mmol/l L-glutamina. Nakon suplementacije 10 % FBS, penicilina (100 IU/ml), streptomicina (100 µg/ml) i HEPES-a (25 mmol/l), medijum se rastvara u vodi za injekcije (10,4 g/l) uz mešanje na temperaturi 15-20 °C. Nakon rastvaranja pH vrednost hranljivog medijuma je podešena rastvorom bikarbonatnog pufera na 7,2 što se proverava indikatorom u samom medijumu (Na-so fenol crvenog). Sterilizacija pripremljenog medijuma se vrši membranskom filtracijom kroz filter veličine pora 0,22 µm.

6.1.8. Priprema ćelijskih linija

U *in vitro* eksperimentima ispitivanja antitumorskog delovanja korišćeno je šest malignih, humanih ćelijskih linija koje su se nalazile u kolekciji ćelijskih linija Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Sve ćelijske linije su maligno transformisane i pripadaju imortalizovanim ćelijskim linijama, što znači da imaju osobinu da pri optimalnim uslovima kultivisanja, *in vitro*, neograničeno rastu i dele se. Imortalizovane ćelijske linije se još nazivaju i transformisanim ćelijskim linijama, što znači da imaju izmenjene karakteristike rasta u odnosu na normalne ćelije, ali ne moraju uvek biti tumorske ćelije. U eksperimentima je korišćeno sledećih šest ćelijskih linija:

- *HeLa ćelije humanog fatalnog adenokarcinoma grlića materice transformisane humanim papiloma virusom 18 (HPV18) (Sl.48A)*. Predstavljaju prvu kontinuiranu ćelijsku liniju koja se i danas, pored više hiljada drugih ćelijskih linija smatra *zlatnim standardom* u *in vitro* istraživanjima iz oblasti biologije kancera²⁶⁴.
- *Fem-X ćelije su metastatske ćelije uznapredovalog humanog melanoma, izolovane iz limfnog čvora pacijenta (Sl.47B)*. Ćelije melanoma su u velikom broju slučajeva rezistentne na terapiju antineoplastcima, što je i razlog loše prognoze melanoma u kasnoj fazi.

- *LS174 ćelije adenokarcinoma kolona*, predstavljaju podtip LS-180 ćelija primarnog karcinoma, dobijene primenom tripsina u toku protokola kultivacije (SI 47C). Lakše se kultivišu od LS-180 ćelija, a kao i linija od koje potiču, stvaraju veliku količinu karcinoembrionalnog antigena (CEA). Predstavljaju adherentnu ćelijsku liniju, ali bez kontaktne inhibicije, sa rastom u više slojeva i unakrsno, što pored produkcije CEA, doprinosi neoplastičnom karakteru.
- *MCF-7 ćelije humanog estrogen zavisnog karcinoma dojke (SI.47D)*, zadržavaju svoju estrogen zavisnu funkciju, ali stiču i veliku osetljivost na citokine.
- *PC3 ćelije humanog karcinoma prostate*, uzete iz metastatske lezije kostiju, neosetljive na androgene (SI.47E).
- *K562 ćelije humane eritroleukemije*, poreklom iz pleuralne efuzije pacijentkinje sa hroničnom mijeloidnom leukemijom (SI.47F). K562 blasti su multipotencijalne, hematopoetske maligne ćelije koje spontano diferenciraju u progenitore eritrocitne, granulocitne i monocitne serije²⁶³.



Slika 47. Kulture maligno transformisanih ćelija pri maloj i velikoj gustini sadnja A) HeLa B) Fem-X , C) LS 174T, D) MCF-7, E) PC 3 i F) K562 ćelije (Preuzeto i prilagođeno iz: ATCC kolekcija, <http://www.atcc.org/Attachments/1765.jpg>)

6.1.9. Uslovi gajenja ćelijskih linija

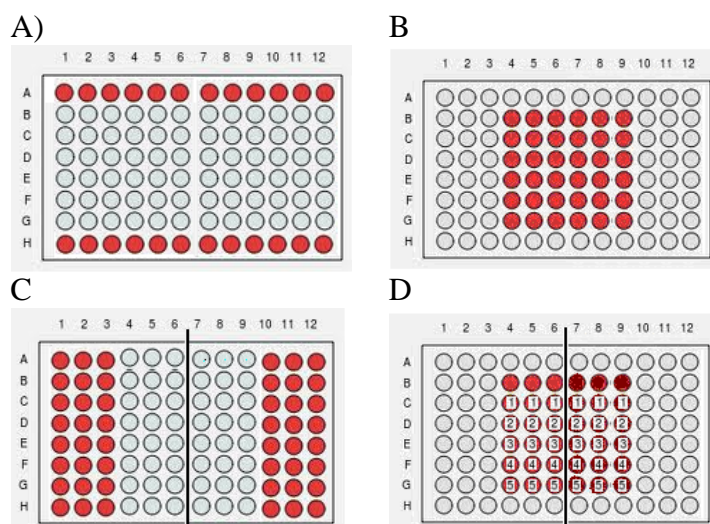
Ćelijske linije se u sudovima za kulturu održavaju u suspenziji (K562) ili monosloju (HeLa, Fem-X, LS174, PC3, MCF-7) u hranljivom medijumu na temperaturi od 37 °C, u atmosferi sa 100 % vlažnosti i 5 % CO₂ zasićenog vodenom parom. Presađuju se dva puta nedeljno u koncentracijama 50000-100000 ćelija/ml.

6.1.9.1. Izolovanje monuklearnih ćelija periferne krvi

Mononuklearne ćelije periferne krvi–PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) predstavljaju primarnu kulturu ćelija izolovanu iz heparinizirane periferne krvi zdravog davaoca dobijene venepunkcijom. Puna periferna krv sa atikoagulansom heparinom se centrifugira 10 min. na 2000 rpm, zatim se naliva na separator i ponovo centrifugira 35 min. na 2000 rpm.. Nakon centrifugiranja u epruveti se uočavaju tri faze. Prva, gornja faza predstavlja izdvojenu plazmu; u drugoj fazi se nalaze mononuklearne ćelije periferne krvi, dok treću fazu čine eritrociti koji imaju najveću masu i pri centrifugiranju padaju na dno. Izolovane PBMC suspenduju se u Hemacelu i suspenzija se centrifugira 10 min. na 2000 rpm pri čemu se PBMC izdvajaju na dnu epruvete. Izdvojene ćelije se nakon odlivanja tečnosti ispiraju još dva puta Hemacelom i na kraju resuspenduju u 1 ml Hemacela. Ovako dobijena frakcija ćelija predstavlja smešu limfocita i monocita, uz mali procenat eritrocita i trombocita. Ćelije se dalje resuspenduju u hranljivoj podlozi i u odgovarajućem broju zasejavaju u mikrotitar ploču sa 96 bazena.

6.1.10. Ispitivanje uticaja fenilpropiofenonskih derivata na preživljavanje malignih ćelija

Za ispitivanje delovanja testiranih jedinjenja, ćelije su nakon tripsinizacije resuspendovane u hranljivoj podlozi i u odgovarajućem broju zasejavane u mikrotitar ploču sa 96 bazena. Protokol zasejavanja prikazan je na Sl. 48.



Slika 48. Protokol zasejavanja

Na jednoj ploči sa 96 bazena moguće je ispitati delovanje dva različita jedinjenja. Mikropipetom se u redove A i H prenese odgovarajuća količina hranljivog medijuma, kako bi se zadržala dovoljna vlažnost u ploči prilikom inkubacije (A). U redove B-G, u kolonama 4-9 zasejava se optimalan broj ćelija (B), određen iz krivih eksponencijalnog rasta i u ovom slučaju on iznosi 2000 za HeLa i Fem-X ćelije, 7000 za PC-3, 3000 za MCF-7 i K562 ćelije i 5000 za LS 174T ćelije.

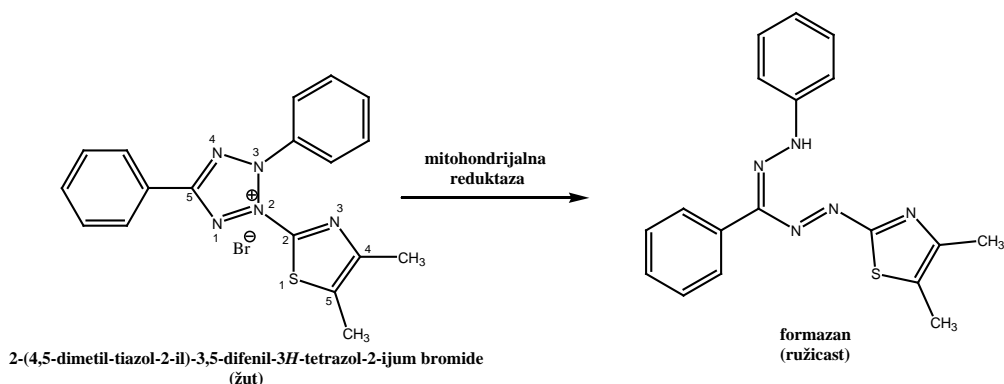
Ćelije su suspendovane u 100 μ l podloge. U sve redove kolona 1-3 i 10-12 (C) sipa se samo podloga (100 μ l). Izmerene apsorbancije u ovim bazenima će se pri izračunavanju koristiti kao slepe probe. Nakon 24 h od zasejavanja ćelija, kada su ćelije adherirale za podlogu i ušle u fazu eksponencijalnog rasta, u redove C-F (u kolonama 1-6 za jednu i 7-12 za drugu supstancu) dodaju se serije razblaženja ispitivanih rastvora, odozgo na dole, od najmanje do najveće koncentracije (D) u ukupnoj zapremini od 50 μ l. Neadherirane K562 ćelije se zasejavaju 2 h pre dodavanja ispitivanih supstanci i dalje tretiraju po navedenom protokolu. Red B je kontrola, tj. u bazene se dodaje samo 50 μ l hranljive podloge. Mikroploča se zatim inkubira 72 h pri temperaturu od 37 °C, u atmosferi vazduha, sa 5 % ugljen dioksida.

6.1.11. Ispitivanje uticaja fenilpropiofenonskih derivata na preživljavanje PBMC ćelija sa i bez hemaglutinina

Protokol ispitivanja odgovara protokolu ispitivanja iz poglavlja 6.1.10 s tom razlikom što se na jednoj ploči ispituje delovanje jedne supstance na PBMC bez prisustva fitohemaglutinina kao mitogena (leva strana ploče) ili u prisustvu mitogena (desna strana ploče). U prvom koraku zasejavaju se PBMC u koncentraciji 150000 ćelija u 50 µl hranljivog medijuma (ćelije u redove 4-9, a samo podloga u redove 1-3 i 10-12), a u drugom koraku se u redove 7-9 dodaje 50 µl rastvora fitohemaglutinina tako da njegova finalna koncentracija u bazenčiću iznosi 5 µg/ml. U redove 4-6 dodaje se 50 µl podloge. PBMC su primarne kulture koje su neadherentne te se iz tog razloga razblaženja ispitivanih jedinjenja dodaju 2 h nakon zasejavanja.

6.1.12. MTT test

Preživljavanje ćelija je određeno metodom Mosmann²⁶⁵, koju su modifikovali Ohno and Abe²⁶⁶. Nakon inkubacije ćelija sa različitim razblaženjima ispitivanih jedinjenja u bazene mikrotitar ploče dodaje se po 20 µl MTT rastvora, koncentracije 5 mg/ml u fosfatnom puferu. Po dodatku MTT rastvora ćelije se inkubiraju 4 h na 37 °C u sredini obogaćenoj sa 5 % CO₂, nakon čega se u bazenčiće dodaje 100 µl 10 % SDS u kome se nastali formazan rastvara preko noći. Narednog dana apsorbancija dobijenog obojenog proizvoda meri se na talasnoj dužini od 570 nm pomoću višekanalnog ELISA čitača, a rezultati se obrađuju *Student-t* testom. Na shemi 7 prikazana je enzimska redukcija MTT.



Shema 7. Mehanizam enzimске redukcije MTT

Indeks preživljavanja vijabilnih ćelija S (*survival*-preživljavanje) je izračunat pri svakoj koncentraciji ispitivanog jedinjenja na osnovu obrasca:

$$S = \frac{A_a - A_{sp}}{A_k - A_{sp}} \quad (7)$$

gde je: A_a - srednja vrednost izmerenih apsorbancija na 570 nm u bazenčićima sa ćelijama koje su tretirane različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja (red C-F, kolone od 4-9)

A_k - srednja vrednost izmerenih apsorbancija na 570 nm u bazenčićima sa netretiranim ćelijama (red B, kolone od 4-9)

A_{sp} - srednja vrednost izmerenih apsorbancija na 570 nm u bazenčićima u kojima se nalazi ispitivana supstanca u podlozi (kolone 1-3 i 10-12)

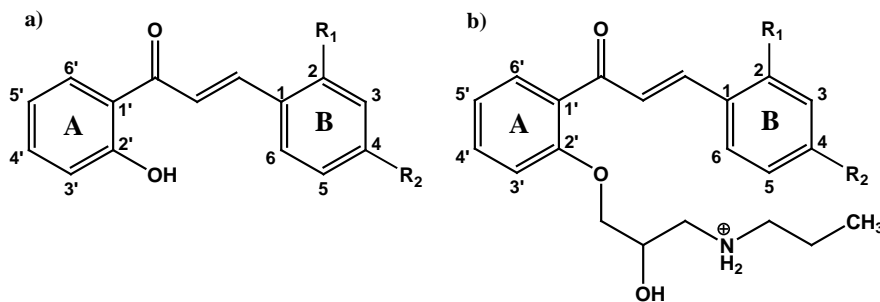
Množenjem indeksa preživljavanja (S) sa 100, dobija se procenat preživljavanja

$$\%S = 100 \times S \quad (8)$$

6.1.13. Računarske metode

6.1.13.1.2D-QSAR studije antitumorskog dejstva ispitivanih jedinjenja (1a-1f i 5a-5f)

Primenom *Marvin Sketch 5.5.1.0* programa određene su pKa vrednosti ispitivanih jedinjenja i za dalju analizu izabrana oblici jedinjenja koji su najzastupljeniji pri fiziološkom pH (Sl 49).



Slika 49. Strukture ispitivanih jedinjenja pri fiziološkom pH 7,4:

- opšta strukturana formula molekulskog oblika ispitivanih halkona,
- opšta strukturana formula protonovanog oblika propafenonskih derivata

Konstruisanje najstabilnijih konformacija izabranih oblika ispitivanih jedinjenja izvedeno je primenom kvantno-mehaničkog programa *MOPAC/PM3* i molekularno-

mehaničkog programa *MM₂*, koji se nalaze u sklopu *Chem3D Ultra 7.0.0* programa. Konstitucioni i geometrijski deskriptori izračunati su primenom *Marvin Sketch 5.5.1.*, *Chem3D Ultra 7.0.0* i *Dragon 6* programa.

Program *CS Gaussian 98* (pomoću *Density Functional Theory* (DFT) koristeći B3LYP hibridnu funkciju sa osnovnim setom 3-21G (B3LYP/3-21G) upotrebljen je za izračunavanje fizičko-hemijski i elektronskih deskriptora kao što su: energija najviše popunjene molekulske orbitale (*Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO)*), energija najniže nepopunjene molekulske orbitale (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO)*), hemijski potencijal, hemijska reaktivnost (*softness*), „otpornost prema transferu elektrona“ (*hardness*), elektrofilnost i dipolni moment.

Modeli su formirani primenom **PLS** metode parcijalnih²⁶⁷ u *SIMCA P+ 12.0* programu. U toku PLS analize na osnovu **VIP parametra** (*Variable Importance in the Projection*) izabrani su najznačajniji deskriptori. Nezavisno promenljive X sa VIP vrednostima većim od 1 imale su najveći uticaj na formirani model, X varijable sa VIP vrednostima između 0,5 i 1,0 pokazale su umeren uticaj, dok X varijable sa VIP vrednostima manjim od 0,5 nisu bile relevantne za model²⁶⁷. Od izračunatih molekulskih deskriptora samo oni sa VIP vrednostima većim od 0,5 su razmatrani u formiranju modela i najrelevantniji deskriptori, sa visokim VIP vrednostima odabrani za PLS modelovanje. Deskriptori sa niskim VIP vrednostima su sukcesivno uklanjani iz modela i sa preostalim deskriptorima primenom PLS konstruisan novi model. Za svaki novi model računati su regresioni parametri R^2 , Q^2 , F parametar, p vrednost, RMSEE i na osnovu njih dobijeni model poređen sa prethodnim. Procedura se ponavlja dok se ne dobije zadovoljavajući model.

Jedan od pokazatelja kvaliteta 2D QSAR modela je i njegova sposobnost da vrši predviđanje. Iz tog razloga je izvršena jedna od jednostavnih metoda unakrsne validacije (*leave-one-out cross-validation LOO*) koja se bazira na isključivanju jedne Y vrednosti iz skupa podataka (x_i, y_i) i formiranju nove regresione funkcije sa preostalih $n-1$ podataka. Zatim se izračunava $e_{(i)}$ -odstupanje isključenog podatka, prema jednačini

$$e_{(i)} = y_{\text{data},i} - \hat{y}_{\text{model}(i)}. \quad (9)$$

Ponavljanjem ovog postupka za svaku Y vrednost iz skupa dolazi se do unakrsno validirane vrednosti R^2 koja se označava kao Q^2 i predstavlja izrazom:

$$Q^2(Y) = 1 - \frac{PRESS}{SSTo} \quad (10)$$

gde je **PRESS** (*Predicted Sum of Squares*) suma kvadrata predviđenih koeficijenata korelacije,

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (11)$$

a **SSTo** (*Sum of Squares Total*) ukupna suma kvadrata

$$SSTo = \sum_{i=1}^n (y_{data,i} - \bar{y}_{data,i})^2 \quad (12)$$

Pored vrednosti $Q^2(Y)$ i *PRESS* za procenu validnosti seta koristi se i vrednost greške *RMSEP* koja se računa iz izraza

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (13)$$

Regresioni modeli sa vrednošću $Q^2_{pre} \geq 0,6$ se smatraju dovoljno pouzdanim za predviđanje i preračunavanje zavisnih promenljivih²⁶⁸.

Dodatna validacija modela izvršena je testom permutacije zavisne varijable (*response permutation test (Y scrambling)*)²⁶⁷, *CV-ANOVA* analizom varijanse (F-vrednost i P-vrednost)²⁶⁹ i eksternom validacijom (*external validation*) na osnovu *RMSEP* i $r^2(\text{Observed vs. Predicted})$ (kvadratna vrednost koeficijenta korelacije eksperimentalno dobijenih u odnosu na predviđene vrednosti).

Test permutacije zavisne varijable (*response permutation test (Y scrambling)*) primenjen je u cilju ispitivanja statističke značajnosti $R^2(Y)$ i $Q^2(Y)$ kao i za testiranje modela na slučajnost korelacije što se izvodi nasumičnim uklapanje podataka²⁶⁷. U ovom testu vrednosti zavisno promenljivih (Y) nasumično se preraspoređuju sto puta dok su vrednosti nezavisno promenljivih (X) konstantne. Model se zatim *fituje* pomoću novih Y podataka i računaju nove vrednosti za VIP parametre. Postupak se ponavlja za svaki model i dobijene vrednosti za $R^2(Y)$ i $Q^2(Y)$ se testiraju preko odsečka. Model je validan ukoliko je vrednost odsečka $R^2(Y)$ manja od 0,4 i vrednost odsečka $Q^2(Y)$ manja od 0,05²⁶⁷. Za procenu modela koristi se i *F-test (Fisherov odnos varijansi)*. Vrednost F se računa iz odnosa varijansi MS (Regresiona)/ MS (Rezidualna) koji zavisi od broja stepeni slobode modela. Sve hipoteze su testirane sa pouzdanošću $\alpha=0,05$ ²⁶⁹.

6.1.13.2. 3D-QSAR studije antitumorskog dejstva ispitivanih jedinjenja (1a-1f i 5a-5f)

3D-QSAR studije ispitivanih jedinjenja izvedene su u programu *Pentacle 1.0.6*. 3D-QSAR analiza polazi od izračunavanja trodimenzionalnih mapa energija (*GRID based Molecular Interaction Fields-MIFs*) koje kvantifikuju četiri moguća tipa interakcija ciljnog mesta dejstva i ispitivanog molekula: DRY (hidrofobne interakcije), O (sp^2 karbonilni kiseonikov atom, kao akceptor vodonične veze), N1 (neutralni planarni NH, kao u amidima, donor vodonične veze), i TIP interakcija (deskriptor koji definiše oblik molekula). Jedinično rastojanje u mreži je podešeno na 0.5 Å, a *MACC2* korekcija geometrije na 1,6 Å. Energija spomenutih interakcija sa ciljnim molekulom je računata u svakoj tački mreže kao zbir Lennard-Jones energije (E_{lj}), energije vodoničnih veza (E_{hb}), energije elektrostatičkih interakcija (E_{el}), i entropije (S):

$$\sum xyz = \sum E_{lj} + \sum E_{el} + \sum E_{hb} + S \quad (14)$$

Program *Pentacle* automatski prevodi mape interakcija u deskriptore nezavisne od preklapanja mapa ispitivanih jedinjenja (*GRID Independent descriptors*, *GRIND* i *GRIND2*)²⁷⁰. *GRIND* pristup ima za cilj da iskoristi podatke sadržane u *MIF* prevodeći ih u novi tip promenljive čije vrednosti ne zavise od orijentacije molekule. Ovo se postiže primenom algoritma za optimizaciju koji kao funkciju procene (*scoring function*) koristi intenzitet polja i uzajamna rastojanja između izabranih čvorova. Dobijene vrednosti promenljive predstavljaju matricu deskriptora koja se može analizirati primenom *PCA* i *PLS* regresione analize. U ovoj studiji, *PCA* je upotrebljena za analizu sličnosti i razlika između ispitivanih jedinjenja, dok je *PLS* korišćena za formiranje 3D QSAR modela²⁶⁷.

Kvalitet 3D modela je procenjen metodom unakrsne validacije (LOO) ($Q^2(Y)$) i metodom eksterne validacije (RMSEP i r^2 Observed vs. Predicted).

6.2. Rezultati

6.2.1. Ispitivanje uticaja derivata fenilpropiofenonskih na preživljavanje malignih ćelija i PBMC ćelija sa i bez hemaglutinina

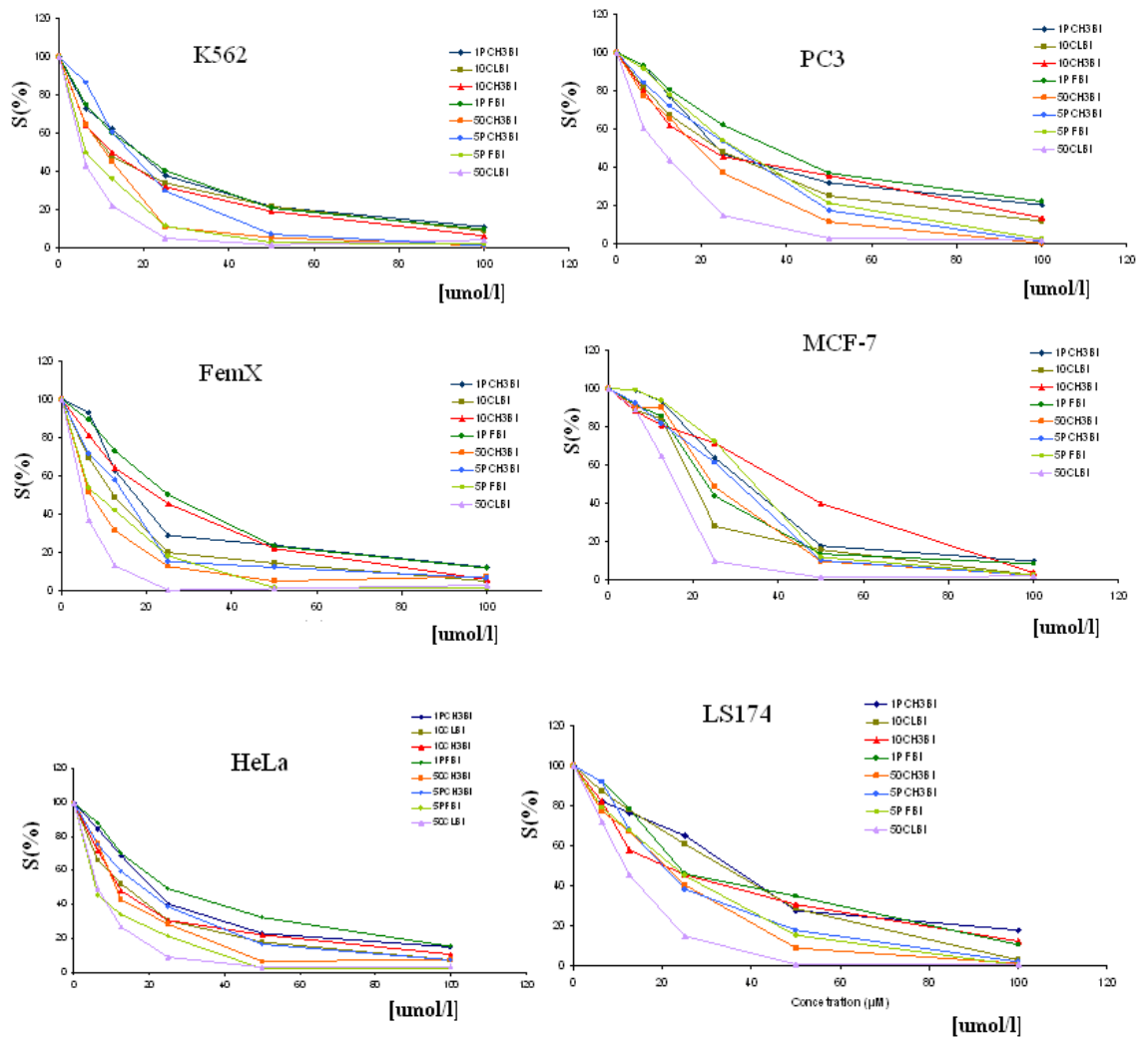
U Tabeli 18. su prikazani rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti halkona i derivata propafenona. Rezultati dobijeni u ispitivanju antiproliferativne aktivnosti šest ispitivanih halkona i šest derivata propafenona na malignim ćelijama (HeLa, Fem-x, K562, MCF-7, PC-3 i LS 174) i mononuklearnim ćelijama periferne krvi sa i bez dodatka hemaglutinina predstavljani su u Tabeli 18. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti inhibitorynih koncentracija ($IC_{50} \pm S.D.$) određene MTT testom pri kontinuiranom delovanju jedinjenja tokom 72 h inkubacije. Ispitivana jedinjenja iz grupe halkona kao i derivati propafenona pokazuju statistički značajnu antiproliferativnu aktivnost prema svih šest malignih ćelijskih linija ($IC_{50} < 100 \mu\text{mol/l}$).

Tabela 18. *In vitro* citotoksičnost halkona (1a-e), derivata propafenona (5a-e) i propafenona

HALKONI	$IC_{50} \pm S.D. (\mu\text{mol/l})$							
	HeLa	Fem-X	K562	MCF-7	PC-3	LS174	PBMC	PBMC+PHA
1CF3	18,1±1,3	10,2±0,6	9,2±1,2	16,9±1,6	33,5±4,1	26,4±1,8	41,9±6,4	25,2±9,7
1OF	8,9±1,7	8,7±1,4	4,8±0,6	14,4±2,2	21,6±3,5	17,4±0,6	17,6±4,5	16,4±3,1
1PF	22,6±2,1	21,8±3,4	17,9±0,8	26,0±2,9	30,4±6,6	35,3±6,1	n.d.*	n.d.*
1OCH3	14,7±2,7	22,4±3,7	18,5±4,4	37,7±4,3	19,2±2,4	48,8±2,4	n.d.*	n.d.*
1PCH3	20,6±0,3	21,2±3,5	18,9±0,1	33,9±1,4	27,6±5,0	41,2±6,1	n.d.*	n.d.*
1OCI	11,2±1,8	10,4±2,8	9,8±1,4	29,8±6,9	20,1±2,8	32,2±1,2	n.d.*	n.d.*
DERIVATI PROPAFENONA								
5CF3	6,78±1,6	16,1±1,1	8,8±0,2	9,7±1,6	23,3±0,9	18,6±0,3	44,4±1,3	35,5±1,2
5OF	16,42±0,5	38,2±3,0	37,6±2,9	18,5±1,2	46,4±1,2	72,2±0,2	47,5±1,0	48,1±4,1
5PF	16,1±3,2	9,6±1,1	27,7±7,5	33,0±1,3	31,9±6,6	23,2±0,9	60,3±5,4	48,8±3,6
5OCH3	8,9±2,1	6,8±0,8	8,1±2,9	23,4±1,1	18,0±1,2	20,3±0,2	52,4±3,5	49,8±5,1
5PCH3	21,7±3,1	12,7±3,0	14,7±4,7	31,7±3,4	24,7±2,8	20,8±0,6	48,7±6,7	41,4±3,2
5OCI	3,0±1,5	4,9±0,0	6,0±1,5	20,2±4,3	12,6±2,4	11,2±0,3	59,5±3,2	52,9±3,2
propafenon	44,1±4,1	>50	40,3±1,7	42,1±2,5	n.d.*	>50	n.d.*	n.d.*
Cisplatin	2,6±0,0	5,7±0,3	4,7±0,3	n.d.*	n.d.*	n.d.*	33,3±0,0	26,6±0,0

n.d.* -nije određeno

Na Sl. 50 prikazani su grafici na kojima se uočava dozna zavisnost antiproliferativnog delovanja ispitivanih jedinjenja.



Slika 50. Preživljavanje (S, %): K562, PC3, Fem-X, MCF-7, HeLa i LS174 u funkciji koncentracije ispitivanih jedinjenja..

6.2.1.1. Određivanje Indeksa selektivnosti (IS) u antiproliferativnom dejstvu ispitivanih fenilpropiofenonskih derivata

Selektivnost u antitumorskom delovanju ispitivanih jedinjenja izražena kao odnos IC₅₀ vrednosti na PBMC sa ili bez fitohemaglutinina i IC₅₀ vrednosti na malignim ćelijskim linijama prikazana je u Tabeli 19.

Tabela 19. Indeksi selektivnosti (IS) ispitivanih jedinjenja

IS	Ispitivana jedinjenja							
	1CF3	1OF	5CF3	5OF	5PF	5OCH3	5PCH3	5OCI
PBMC/HeLa	2,31	1,98	6,55	2,89	3,75	5,89	2,24	19,83
PBMC+FCA /HeLa	1,92	1,84	5,24	2,93	3,03	5,60	1,91	17,63
PBMC/Fem-X	4,10	2,02	2,76	1,24	6,028	7,71	3,83	12,14
PBMC+FCA /Fem-X	3,42	1,88	2,20	1,26	5,08	7,32	3,26	10,80
PBMC/K562	4,55	3,67	5,05	1,26	2,18	6,47	3,31	9,91
PBMC+FCA /K562	3,79	3,41	4,03	1,28	1,76	6,15	2,82	8,82
PBMC/MCF-7	2,48	1,22	4,58	2,57	1,83	2,24	1,54	2,95
PBMC+FCA /MCF-7	2,07	1,14	3,66	2,60	1,48	2,13	1,31	2,62
PBMC/PC3	1,25	0,81	1,91	1,02	3,35	2,91	1,97	4,72
PBMC+FCA /PC3	1,04	0,76	1,52	1,04	1,53	2,77	1,68	4,20
PBMC/LS174	1,59	1,01	2,39	0,66	2,60	2,58	2,34	5,31
PBMC+FCA /LS174	1,32	0,94	1,91	0,67	2,10	2,45	1,99	4,72

6.2.2. QSAR studije antiproliferativnog dejstva ispitivanih jedinjenja (1a-1f i 5a-5f)

Kao nezavisno promenljive vrednosti (X) u formiranju i optimizaciji 2D i 3D QSAR molekulskih modela korišćeni su konstitucionalni, geometrijski, fizičko-hemijski i elektronski deskriptori. Zavisno pomenljiva vrednost (Y) predstavljena je kao negativni dekadni logaritam citotoksične aktivnosti ($pIC_{50} = (\log 1/IC_{50})$).

Za formiranje test seta korišćeni su literaturni podaci za IC_{50} vrednosti jedinjenja koja su strukturno slična ispitivanim jedinjenjima, a čije IC_{50} se nalaze u opsegu IC_{50} vrednosti ispitivanih jedinjenja (Prilog SI.1).

Na osnovu vrednosti statističkih parametara R^2 , F-odnosa, p-vrednosti, RMSEE, ($Q^2(Y)$), r^2 (Obs vs. Pred) i RMSEP (Tabele 20-25 i Prilog Tabele 1-6) odabrani su optimalni 2D i 3D QSAR modeli za svih šest ispitivanih ćelijskih linija.

6.2.2.1. 2D QSAR studije antitumorskog dejstva ispitivanih jedinjenja (1a-1f i 5a-5f)

Na osnovu statističkih parametara R^2 , $Q^2(Y)$, RMSEE, RMSEP, r^2 Obs vs. Pred, F-vrednosti (5,152) i p-vrednosti (0,0296) dobijenih dvoparametarskom korelacijom izabrano je pet najznačajnijih deskriptora (HOMO, BIC4, RDF145m, RDF145v i RDF145s) za konstrukciju 2D QSAR HeLa modela. (Tabela 20, Prilog Tabela 1)

Tabela 20. Statistički parametri izračunati za 2D i 3D QSAR HeLa modele i predviđene pIC_{50} vrednosti dobijene iz eksternog validacionog seta (Prilog SI.1)

Statistički parametri		2D QSAR model	3D QSAR model
R^2		0,853	0,91
$Q^2(Y)$		0,790	0,72
RMSEE (Trenirani set)		0,094	0,055
$r^2_{Obs vs. Pred}$ (Trenirani set)		0,924	0,951
EKSTERNA VALIDACIJA			
Test set	pIC_{50} (HeLa)*	2D QSAR-Predicted pIC_{50} (HeLa)	3D QSAR-Predicted pIC_{50} (HeLa)
HeLa-T1	5,027	4,842	5,067
HeLa-T2	4,782	4,722	4,936
HeLa-T3	5,229	4,879	5,188
HeLa-T4	4,467	4,726	4,966
HeLa-T5	4,828	4,992	5,114
RMSEP (Test set)		0,194	0,172
$r^2_{Obs vs. Pred}$ (Test set)		0,362	0,812

* Citotoksična aktivnost $pIC_{50} = (\log 1/IC_{50})$

Na osnovu statističkih parametara R^2 , $Q^2(Y)$, RMSEE, RMSEP, r^2 Obs vs. Pred F-vrednosti (10,8218) i p-vrednosti (0,0040) dobijenih jednoparametarskom korelacijom selektovano je jedanaest najznačajnijih deskriptora (RDF040s, Mor08u, Mor08e, Mor08i, Mor26i, Mor27i, E3s, T(O...Cl), F09[C-Cl], G(O..Cl) i CMC-50) za konstrukciju 2D QSAR Fem-X modela .(Tabela 21, Prilog Tabela 2).

Tabela 21 . Statistički parametri izračunati za 2D i 3D QSAR Fem-X modele i predviđene pIC_{50} vrednosti dobijene iz eksternog validacionog seta (Prilog Sl.1)

Statistički parametri		2D QSAR model	3D QSAR model
R^2		0,788	0,91
$Q^2(Y)$		0,706	0,55
RMSEE (Trenirani set)		0,112	0,076
$r^2_{Obs vs. Pred}$ (Trenirani set)		0,887	0,902
EKSTERNA VALIDACIJA			
Test set	pIC_{50} (Fem-X)*	2D QSAR-Predicted pIC_{50} (Fem-X)	3D QSAR-Predicted pIC_{50} (Fem-X)
Fem-X-T1	4,663	5,019	4,868
Fem-X -T2	4,622	4,926	4,886
Fem-X -T3	4,613	5,163	4,918
Fem-X -T4	5,009	5,107	4,913
Fem-X -T5	5,284	4,752	4,907
RMSEP(Test set)		0,404	0,267
$r^2_{Obsvs.Pred}$ (Test set)		-0,602	0,397

*Citotoksična aktivnost $pIC_{50} = (\log 1/IC_{50})$

Na osnovu statističkih parametara R^2 , $Q^2(Y)$, RMSEE, RMSEP, r^2 Obs vs. Pred , F-vrednosti (6,802) i p-vrednosti (0,016) dobijenih jednoparametarskom korelacijom selektovana su tri najznačajnijih deskriptora (Mor06e, Mor08e i CMC-50) za konstrukciju 2D QSAR K562 modela .(Tabela 22, Prilog Tabela 3)

Tabela 22. Statistički parametri izračunati za 2D i 3D QSAR K562 modele i predviđene pIC₅₀ vrednosti dobijene iz eksternog validacionog seta (Slika1 prilog)

Statistički parametri	2D QSAR model	3D QSAR model
R ²	0,660	0,94
Q ² (Y)	0,602	0,69
RMSEE (Trenirani set)	0,151	0,061
r ² _{Obs vs. Pred} (Trenirani set)	0,812	0,944
EKSTERNA VALIDACIJA		
Test set	2D QSAR-Predicted pIC ₅₀ (K562)	3D QSAR-Predicted pIC ₅₀ (K562)
K562-T1	4,977	4,908
K562-T2	4,998	5,310
K562-T3	5,081	4,903
K562-T4	5,068	4,590
K562-T5	5,081	4,759
K562-T6	5,023	4,818
K562-T7	4,968	5,031
K562-T8	5,014	4,951
RMSEP(Test set)	0,259	0,081
r ² _{Obsvs.Pred} (Test set)	-0,719	0,933

*Citotoksična aktivnost pIC₅₀= (log1/IC₅₀)

Na osnovu statističkih parametara R², Q²(Y), RMSEE, RMSEP, r² Obs vs. Pred, F-vrednosti (15,236) i p-vrednosti (0,0013) dobijenih jednoparametarskom korelacijom selektovana su tri najznačajnija deskriptora (ATSC6e, Eig02_AEA(dm) i H5s) za konstrukciju 2D QSAR MCF-7 modela. (Tabela23, Prilog Tabela 4).

Tabela 23. Statistički parametri izračunati za 2D i 3D QSAR MCF-7 modele i predviđene pIC₅₀ vrednosti dobijene iz eksternog validacionog seta (Slika1 prilog)

Statistički parametri	2D QSAR model	3D QSAR model
R ²	0,779	0,97
Q ² (Y)	0,772	0,78
RMSEE (Trenirani set)	0,080	0,05
r ² _{Obs vs. Pred} (Trenirani set)	0,882	0,986
EKSTERNA VALIDACIJA		
Test set	2D QSAR-Predicted pIC ₅₀ (MCF-7)	3D QSAR-Predicted pIC ₅₀ (MCF-7)
MCF-7-T1	4,833	4,464
MCF-7-T2	4,989	4,446
MCF-7-T3	4,767	4,451
MCF-7-T4	4,840	4,470
RMSEP(Test set)	0,112	0,413
r ² _{Obsvs.Pred} (Test set)	0,724	0,227

*Citotoksična aktivnost pIC₅₀= (log1/IC₅₀)

Na osnovu statističkih parametara R^2 , $Q^2(Y)$, RMSEE, RMSEP, r^2 Obs vs. Pred, F-vrednosti (11,396) i p-vrednosti (0,0034) dobijenih jednoparametarskom korelacijom selektovana su tri najznačajnijih deskriptora (Mor32s, E2s and G(O..Cl)) za konstrukciju 2D QSAR PC-3 modela. (Tabela 24, Prilog Tabela 5)

Tabela 24. Statistički parametri izračunati za 2D i 3D QSAR PC-3 modele i predviđene pIC_{50} vrednosti dobijene iz eksternog validacionog seta (Slika1 prilog)

Statistički parametri		2D QSAR model	3D QSAR model
R^2		0,916	0,96
$Q^2(Y)$		0,717	0,75
RMSEE (Trenirani set)		0,041	0,018
$r^2_{Obs vs. Pred}$ (Trenirani set)		0,957	0,984
EKSTERNA VALIDACIJA			
Test set	pIC_{50} (PC-3)*	2D QSAR-Predicted pIC_{50} (PC-3)	3D QSAR-Predicted pIC_{50} (PC-3)
PC-3-T1	4,735	4,512	4,842
PC-3-T2	4,475	4,669	4,459
PC-3-T3	4,345	4,524	4,615
PC-3-T4	4,910	4,756	4,584
RMSEP(Test set)		0,189	0,219
$r^2_{Obsvs.Pred}$ (Test set)		0,515	0,328

*Citotoksična aktivnost $pIC_{50} = (\log 1/IC_{50})$

Na osnovu statističkih parametara R^2 , $Q^2(Y)$, RMSEE, RMSEP, r^2 Obs vs. Pred, F-vrednosti (9,754) i p-vrednosti (0,0056) dobijenih jednoparametarskom korelacijom selektovana su tri najznačajnija deskriptora (Mor32s, E2s and G(O..Cl)) za konstrukciju 2D QSAR LS174 modela (Tabela 25, Prilog Tabela 6).

Tabela 25. Statistički parametri izračunati za 2D i 3D QSAR LS174 modele i predviđene pIC₅₀ vrednosti dobijene iz eksternog validacionog seta (Slika 1 prilog)

Statistički parametri		2D QSAR model	3D QSAR model
R ²		0,741	0,94
Q ² (Y)		0,689	0,75
RMSEE (Trenirani set)		0,108	0,057
r ² _{Obs vs. Pred} (Trenirani set)		0,861	0,928
EKSTERNA VALIDACIJA			
Test set	pIC ₅₀ (K562)*	2D QSAR-Predicted pIC ₅₀ (K562)	3D QSAR-Predicted pIC ₅₀ (K562)
LS174-T1	4,342	4,304	4,447
LS174-T2	4,546	4,224	4,477
LS174-T3	4,677	4,233	4,63
LS174-T4	4,591	4,251	4,779
LS174-T5	4,917	4,249	4,430
LS174-T6	4,755	4,483	5,521
LS174-T7	4,908	4,635	4,702
LS174-T8	4,558	4,287	4,453
LS174-T9	4,471	4,419	4,41
LS174-T10	4,543	4,395	4,431
LS174-T11	4,567	4,369	4,420
LS174-T12	4,490	4,256	4,426
LS174-T13	4,463	4,356	4,464
RMSEP(Test set)		0,306	0,274
r ² _{Obsvs.Pred} (Test set)		0,359	0,402

*Citotoksična aktivnost pIC₅₀= (log1/IC₅₀)

6.2.2.2. 3D-QSAR studije antitumorskog dejstva ispitivanih jedinjenja(1a-1f i 5a-5f)

Predloženi dvoparametarski 3D-QSAR HeLa model pokazao je sledeće performanse: R²: 0,91 i Q²(Y): 0,72 (Tabela 20). Sa grafikona koeficijena predloženog 3D-QSAR HeLa modela (Prilog Slika 2A) izabrani su deskriptori od najvećeg značaja za citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji: v366: DRY-N1, V438/v443: DRY-TIP, v301: DRY-O, v43: DRY-DRY, v252: TIP-TIP, V155/v160: N1-N1, v568: O-TIP, i v486: O-N1. Deskriptori kao što su: v366: DRY-N1, v438/v443: DRY-TIP, v301: DRY-O, v43: DRY-DRY, v252: TIP-TIP, i v568: O-TIP pozitivno korelišu sa citotoksičnom aktivnošću, dok deskriptori V155/v160: N1-N1 i v486: O-N1, negativno korelišu sa aktivnošću.

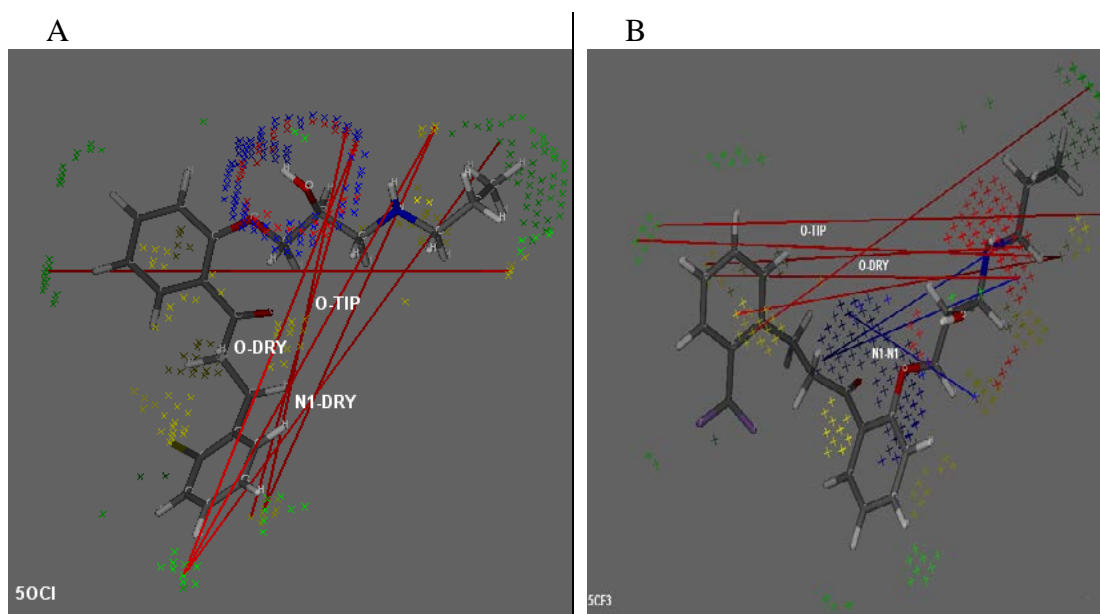
Propafenonski derivati kod kojih je terminalni benzenov prsten *orto* supstituisana (5OC1, 5CF3 i 5OCH3) su najpotentniji prema HeLa ćelijskoj liniji.

Najizraženiji pozitivan uticaj na citotoksičnu aktivnost utvrđen je za :

1. O-TIP deskriptore (v565, v566, v568) izračunate između sekundarne alkoholne ili amino grupe kao donora vodonične veze i topološke površine položaja C4- i C5- u terminalnom benzenovom prstenu B. (Sl. 51A, 51B);

2. O-DRY deskriptor (v301) izračunat između sekundarne alkoholne ili amino grupe kao donora vodonične veze i hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena B (Sl 51A, 51B);

3. N1-DRY deskriptor (v366) izračunat između kiseonikovog atoma sekundarne alkoholne grupe kao akceptora vodonične veze i hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena B (Sl 51A).



Slika 51. 3D-QSAR (HeLa) farmakoforni model A) 50Cl , B) 5CF3. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem na antitumorsku aktivnost, plavim linijama su predstavljeni deskriptori sa negativnim uticajem na antitumorsku aktivnost.

Najizraženiji negativan uticaj na citotoksičnu aktivnost propafenonskih derivate utvrđen je za N1-N1 deskriptor (v155/v160) izračunat između karbonilne i etarske grupe kao akceptora vodonične veze (Sl.51B).

Uspostavljeni troparametarski 3D-QSAR (Fem-X) model pokazao je sledeće performanse: R^2 : 0,91 i $Q^2(Y)$: 0,55 (Tabela 21). Sa grafikona koeficijenata uspostavljenog 3D-QSAR (Fem-X) modela (Prilog Slika 2B) izabrani su deskriptori od najvećeg značaja za citotoksičnu aktivnost prema Fem-X ćelijskoj liniji: v252: TIP-TIP, v405: DRY-TIP, v619: N1-TIP, v412: DRY-TIP, v265: DRY-O, v535: O-TIP, v164:

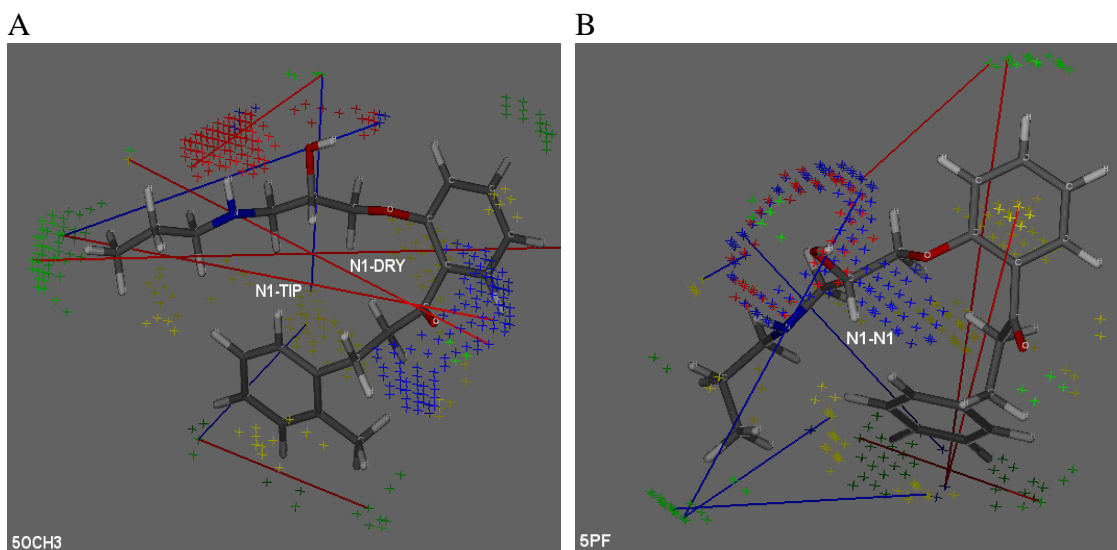
N1-N1, v367: DRY-N1, v631: N1-TYP, v213: TIP-TIP. Deskriptori kao što su: v252: TIP-TIP, v535: O-TIP, v367: DRY-N1, v631: N1-TYP, v213: TIP-TIP pozitivno korelišu sa citotoksičnom aktivnošću, dok deskriptori v405: DRY-TIP, v619: N1-TIP, v412: DRY-TIP, v265: DRY-O, v164: N1-N1, negativno korelišu sa citotoksičnom aktivnošću.

Najpotentnija jedinjenja prema Fem-X ćelijskoj liniji iz propafenonske grupe su derivati 5OCl, 5OCH₃ i 5PF kao i *orto* fluoro supstituisani halkonski derivat 1OF. Pozitivan uticaj na citotoksičnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za :

1. N1-TIP deskriptor (v631) izračunat između karbonilne grupe kao akceptora vodonične veze i topološke površine propil grupe na N-atomu sekundarnog amina (Sl.52A);

2. N1-DRY deskriptor (v367) izračunat između karbonilne grupe kao akceptora vodonične veze i hidrofobne površine propil grupe na N-atomu sekundarnog amina (Fig. 52A) i

3. TIP-TIP deskriptor (v252) izračunat između položaja C4 terminalnog benzenovog prstena B i propil grupe na N-atomu sekundarnog amina (Fig. 52A).



Slika 52. 3D-QSAR (Fem-x) farmakoforni model A) 5OCH₃ and B) 5PF derivati. Crvenim linijama su predstavljeni deskriptori sa pozitivnim uticajem na antitumorsku aktivnost, plavim linijama su predstavljeni deskriptori sa negativnim uticajem na antitumorsku aktivnost.

Najizraženiji negativan uticaj na citotoksičnu aktivnost utvrđen je za N1-N1 deskriptor (v164) izračunat između N-atoma sekundarne amino grupe kao akceptora vodonične veze i atoma F u *para* položaju terminalnog benzenovog prstena (Fig. 52B).

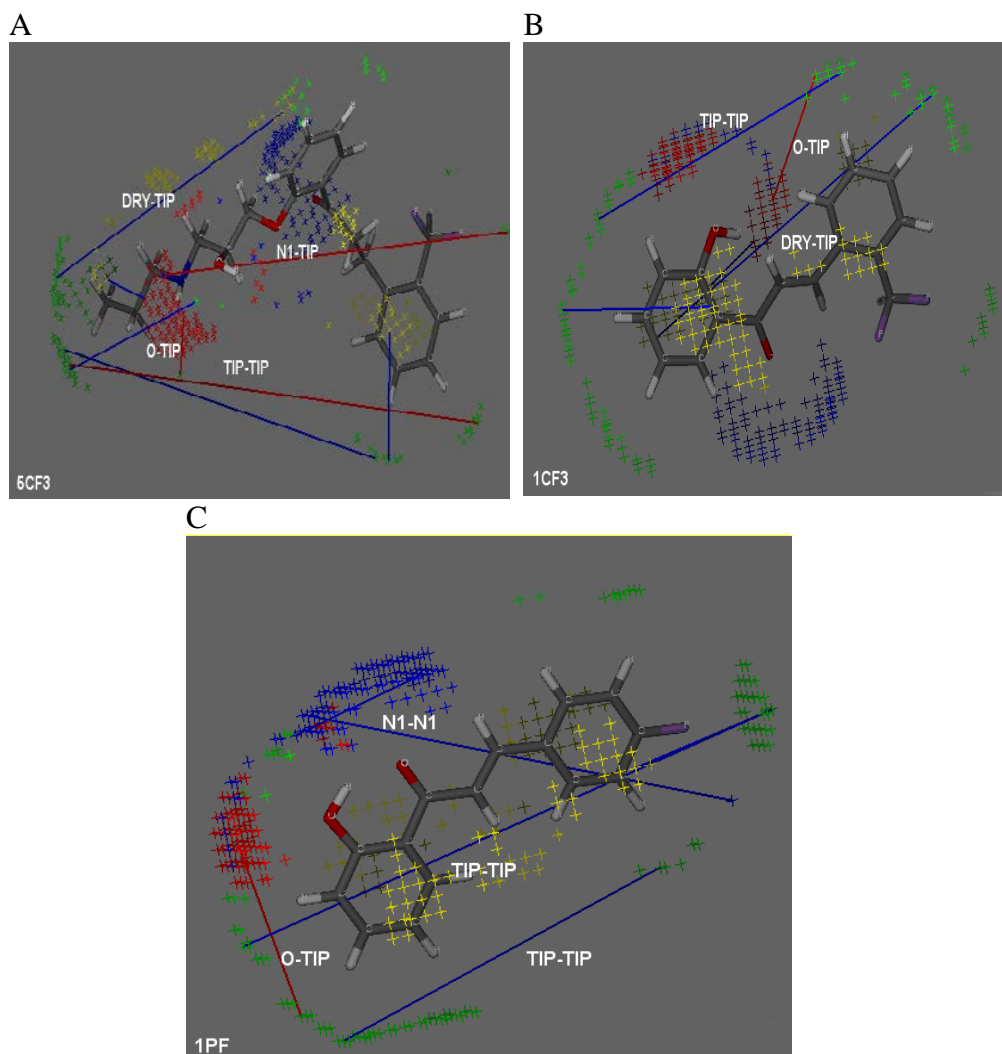
Uspostavljeni dvoparametarski 3D-QSAR (K562) model pokazao je sledeće performanse: R^2 : 0,94 i $Q^2(Y)$: 0,69 (Tabela 22). Sa grafikona koeficijenata uspostavljenog 3D-QSAR (K562) modela (Slika 2C prilog) izabrani su deskriptori od najvećeg značaja za citotoksičnu aktivnost prema K562 ćelijskoj liniji: v405: DRY-TIP, v222: TIP-TIP, v633: N1-TIP, v239: TIP-TIP, v534: O-TIP, v265: DRY-O, v140: N1-N1, v252: TIP-TIP, v164: N1-N1, i v426: DRY-TIP. Deskriptori kao što su: v633: N1-TIP, v534: O-TIP, v252: TIP-TIP pozitivno korelišu sa aktivnošću, dok deskriptori v405: DRY-TIP, v222: TIP-TIP, v239: TIP-TIP, v265: DRY-O, v140: N1-N1, v164: N1-N1 i v426: DRY-TIP, negativno korelišu sa aktivnošću (Sl 53).

Orto supstituisani derivati propafenonske i halkonske grupe jedinjenja: 5OCl, 5OCH₃, 5CF₃, 1OF i 1CF₃ pokazali su najjaču antiproliferativnu aktivnost prema K562 ćelijskoj liniji. Najizraženiji pozitivan uticaj na citotoksičnu aktivnost propafenonskih i halkonskih derivata utvrđen je za :

1. TIP-TIP descriptor (v252) izračunat između terminalnog benzenovog prstena i topološke površine propil grupe na N-atomu sekundarnog amina (Sl. 53A);
2. O-TIP descriptor (v534) izračunat između fenolne grupe i topološke površine položaja C4' halkonskih derivata kao i sekundarne alkoholne grupe i topološke površine propil grupe na N-atomu sekundarnog amina propafenonskih derivata (Sl. 53A, 53B, 53C)
3. N1-TIP descriptor (v633) izračunat između N-atoma sekundarnog amina kao akceptora vodonične veze i topološke površine terminalnog benzenovog prstena u molekulima *orto* supstituisanih propafenonskih derivata (Sl. 53A).

Najizraženiji negativan uticaj na citotoksičnu aktivnost utvrđen je za:

1. N1-N1 deskriptor (v164) izračunat između fenolske grupe kao akceptora vodonične veze i atoma F u *para* položaju halkonskog derivata (Sl 53C),
2. TIP-TIP deskriptora (v239) izračunatog između položaja C4 i C4' dva benzenova prstena u molekulima halkonskih derivata (Sl. 53B i 53C)
3. DRY-TIP descriptor (v426) izračunat između dva benzenova prstena halkonskih derivata (Sl 53B) ili benzenovog prstena i propil grupe na N-atomu sekundarne amino kod propafenonskih derivata (Sl. 53A)



Slika 53. 3D-QSAR (K562) farmakoforni model A) 5CF3, B) 1CF3 i C) 1PF. Crvenim linijama su predstavljene deskriptori sa pozitivnim uticajem na citotoksičnu aktivnost, dok sa plavom linijom predstavljene deskriptori sa negativnim uticajem na citotoksičnu aktivnost.

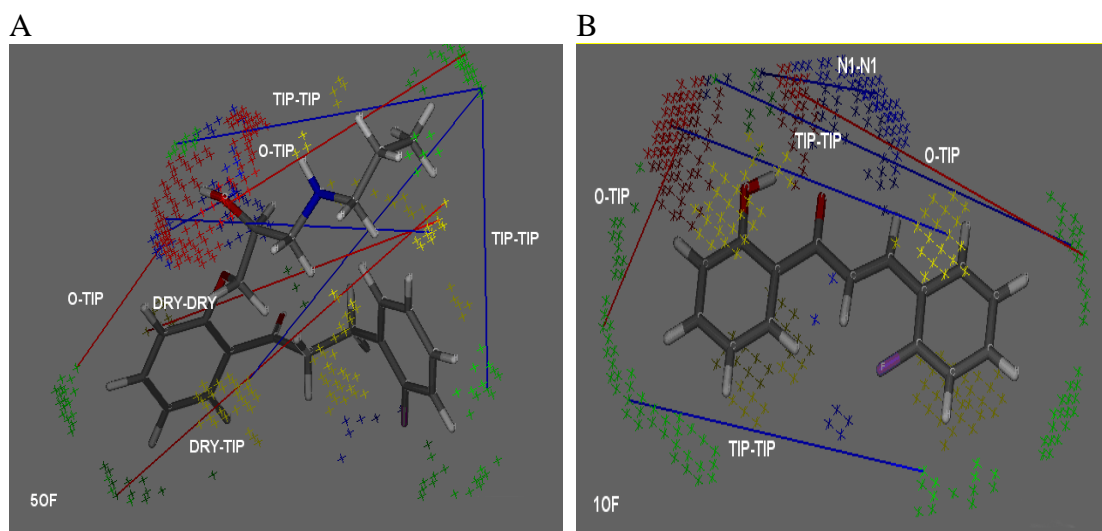
Uspostavljeni dvoparametarski 3D-QSAR (MCF-7) model pokazao je sledeće performanse: R^2 : 0,97 i $Q^2(Y)$: 0,78 (Tabela 23.). Sa grafikona koeficijena uspostavljenog 3D-QSAR (K562) modela (Slika 2D prilog) izabrani su deskriptori od najvećeg značaja za citotoksičnu aktivnost prema MCF-7 ćelijskoj liniji: v548: O-TIP, v425: DRY-TIP, v355: DRY-N1, v534: O-TIP, v41: DRY-DRY, v140: N1-N1, v227: TIP-TIP, v252: TIP-TIP, v439: DRY-TIP i v221: TIP-TIP. Deskriptori kao što su: v548: O-TIP, v534: O-TIP, v41: DRY-DRY, v252: TIP-TIP, v439: DRY-TIP pozitivno korelišu sa aktivnošću, dok deskriptori v425: DRY-TIP, v355: DRY-N1, v140: N1-N1, v227: TIP-TIP, v221: TIP-TIP, negativno korelišu sa aktivnošću (SI 54).

Jedinjenja sa $-F$ i $-CF_3$ grupama u *orto* položaju molekula halkonskih i propafenonskih derivata pokazala su se kao najpotentnija jedinjenja prema MCF-7 ćelijskoj liniji (5OF, 5CF3, 1OF i 1CF3). Najizraženiji pozitivan uticaj na citotoksičnu aktivnost propafenonskih derivata utvrđen je za:

1. TIP-DRY descriptor (v439) izračunat između topološke površine položaja C4' i C5' benzenovog prstena i hidrofobne površine propil grupe na N-atomu sekundarnog amina (Sl. 54A);

2. DRY-DRY descriptor (v41) izračunat između hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena i propil grupe na N-atomu sekundarnog amina (Sl. 54A);

3. O-TIP descriptors (v534, v548) izračunat između fenolske grupe kao donora vodonične veze i topološke površine položaja C4' benzenovog prstena A halkonskih derivata (Sl. 54B) kao i sekundarne alkoholne grupe kao donora vodonične veze i topološke površine propil grupe na N-atomu sekundarnog amina kod propafenonskih derivata (Sl. 54A)



Slika 54. 3D-QSAR (MCF-7) farmakoforni model A) 5OF i B) 1OF. Crvenim linijama su predstavljene deskriptori sa pozitivnim uticajem na citotoksičnu aktivnost, dok su plavom linijom predstavljeni deskriptori sa negativnim uticajem na citotoksičnu aktivnost.

Najizraženiji negativan uticaj na citotoksičnu aktivnost utvrđen je za:

- 1.N1-N1 descriptors (v140) izračunat između karbonilne i fenolske grupe kao akceptora vodonične veze u molekulu halkonskih derivata (Sl. 54B).

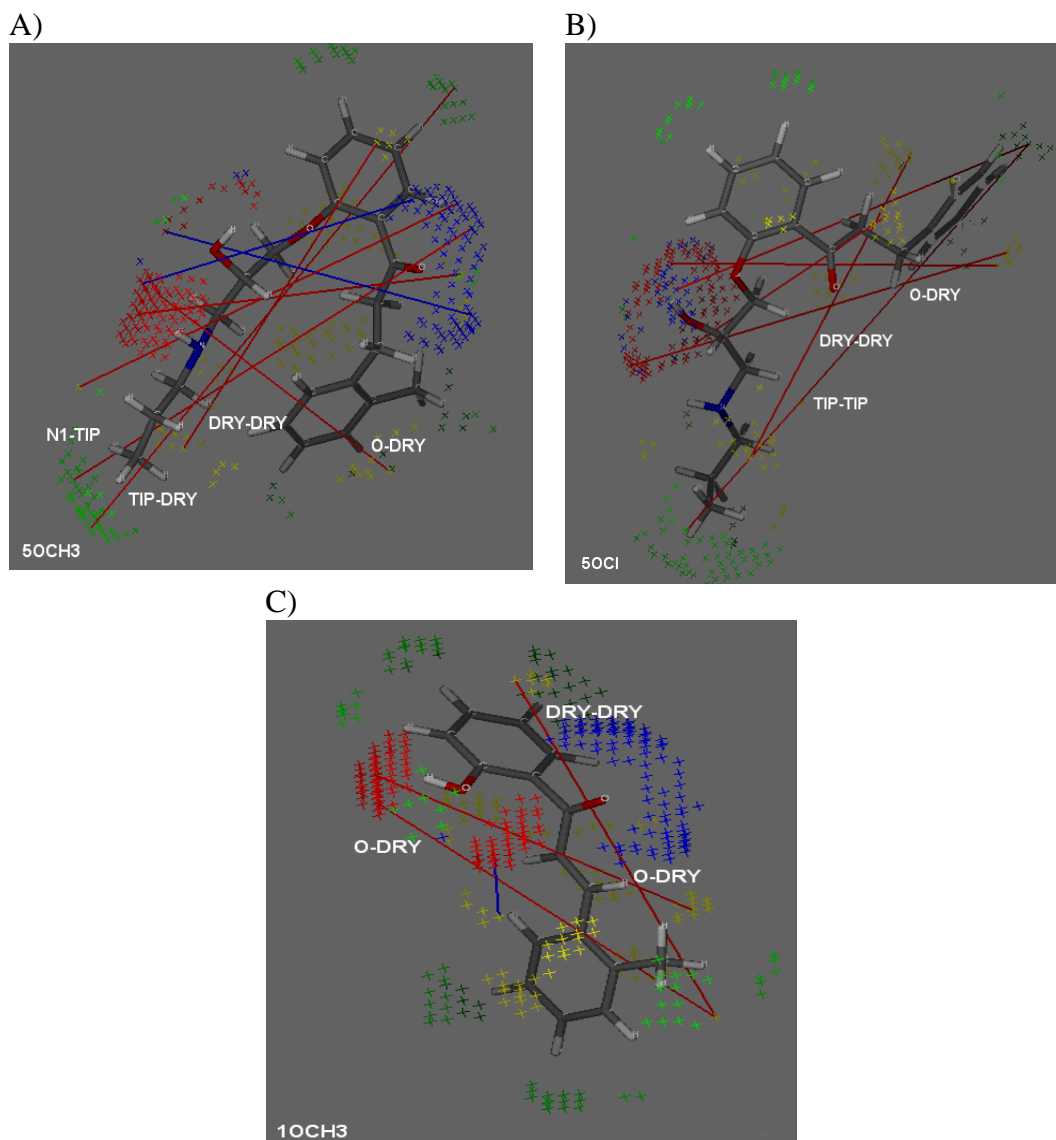
Uspostavljeni dvoparametarski 3D-QSAR (PC-3) model pokazao je sledeće performanse: R^2 : 0,96 i $Q^2(Y)$: 0,75 (Tabela 24). Sa grafikona koeficijenata uspostavljenog 3D-QSAR (PC-3) modela (Prilog Slika 2E) izabrani su deskriptori od najvećeg značaja za citotoksičnu aktivnost prema PC-3 ćelijskoj liniji: v486: O-N1, v265: DRY-O, v366: DRY-N1, v36: DRY-DRY, v294: DRY-O, v252: TIP-TIP, v157: N1-N1, v164: N1-N1, v289: DRY-O i v631: N1-TYP). Deskriptori kao što su: v366: DRY-N1, v36: DRY-DRY, v294: DRY-O, v252: TIP-TIP, v289: DRY-O i v631: N1-TYP pozitivno korelišu sa aktivnošću, dok deskriptori v486: O-N1, v265: DRY-O, v164: N1-N1, v157: N1-N1, negativno korelišu sa aktivnošću (Sl 55).

Jedinjenja sa -CH₃ i -Cl grupama u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena B (5OCl, 5OCH₃, 1OCl i 1OCH₃) pokazala su se kao najpotentnija prema PC-3 ćelijskoj liniji. Najizraženiji pozitivan uticaj na citotoksičnu aktivnost propafenonskih i halkonskih derivata utvrđen je za:

1. DRY-O deskriptor (v294) izračunat između hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena B i sekundarne alkoholne/ fenolske grupe kao donora vodonične veze (Sl. 55A, 55B, 55C);

2. TIP-TIP descriptor (v252) izračunat između topoloških površina plošaja C4', C4, i C5 benzenovih prstenova i propil grupe na N-atomu sekundarnog amina propafenonskih derivata (Fig. 55A, 55B);

3. DRY-DRY descriptor (v36) izračunat između hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena i propil grupe na N-atomu sekundarnog amina (Fig. 55A, 55B).



Slika55 3D-QSAR (PC-3) farmakoforni model A) 50CH3, B) 10CH3 i C) 50Cl. Crvenim linijama su predstavljene deskriptori sa pozitivnim uticajem na antitumorsku aktivnost, dok su plavom linijom predstavljeni deskriptori sa negativnim uticajem na aktivnost.

Najizraženiji negativan uticaj na citotoksičnu aktivnost utvrđen je za N1-N1 deskriptor (v157) izračunat između karbonilne i sekundarne amino grupe propafenonskih derivata (Fig. 55A, 55B).

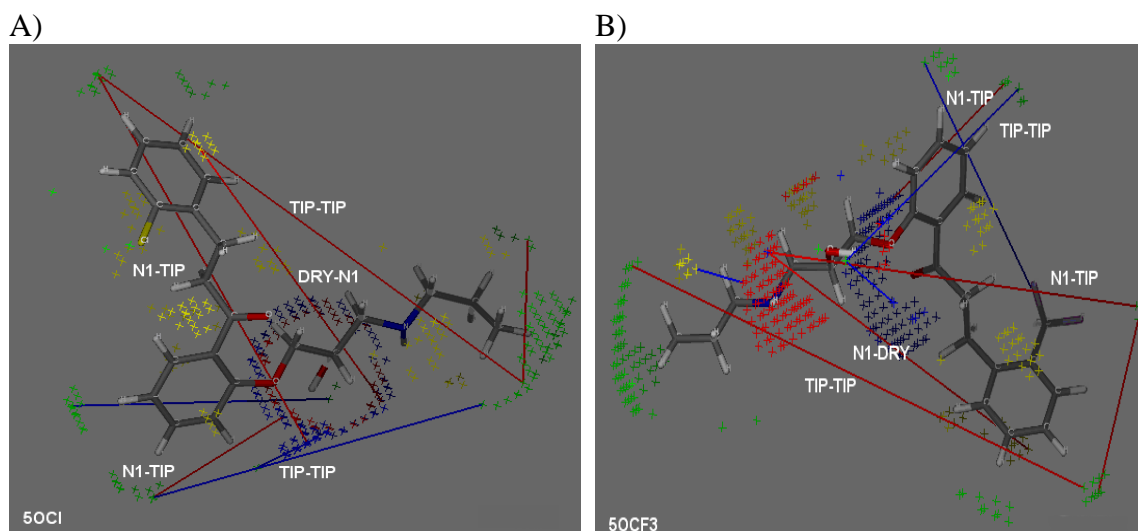
Uspostavljeni dvoparametarski 3D-QSAR (LS174) model pokazao je sledeće performanse: R^2 : 0.94 i $Q^2(Y)$: 0,75 (Tabela 25). Sa grafikona koeficijena uspostavljenog 3D-QSAR (PC-3) modela (Prilog Slika 2G) izabrani su deskriptori od najvećeg značaja za citotoksičnu aktivnost prema LS174 ćelijskoj liniji: v366: DRY-N1, v602: N1-TIP, v594: N1-TIP, v252: TIP-TIP, v164: N1-N1, v632: N1-TIP, v213: TIP-TIP, v265: DRY-O, v226: TIP-TIP i v232: TIP-TIP. Deskriptori kao što su: v366:

DRY-N1, v602: N1-TIP, v252: TIP-TIP, v632: N1-TIP i v213: TIP-TIP pozitivno korelišu sa aktivnošću, dok deskriptori v486: v594: N1-TIP, v164: N1-N1, v265: DRY-O, v226: TIP-TIP, v232: TIP-TIP, negativno korelišu sa aktivnošću (Sl. 56).

Orto (5OCl, 5OCH₃, 5CF₃) i *para* (5PCH₃) supstituisani propafenonski derivati kao i *orto* fluorirani halkonski derivat 1OF pokazala su najbolju antikancersku aktivnost prema LS174 ćelijskoj liniji. Najizraženiji pozitivan uticaj na citotoksičnu aktivnost propafenonskih i halkonskih derivata utvrđen je za:

1. DRY-N1 deskriptor (v366) izračunat između hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena (prsten B) i sekundarne alkoholne grupe kao akceptora vodonične veze (Sl. 56A, 56B);

2. N1-TIP deskriptora (v602, v630) izračunatog između karbonilne/sekundarne alkoholne grupe kao akceptora vodonične veze i topološke površine položaja C5' u benzenovom prstenu A/ C4 u benzenovom prstenu B (Sl. 56A, 56B).



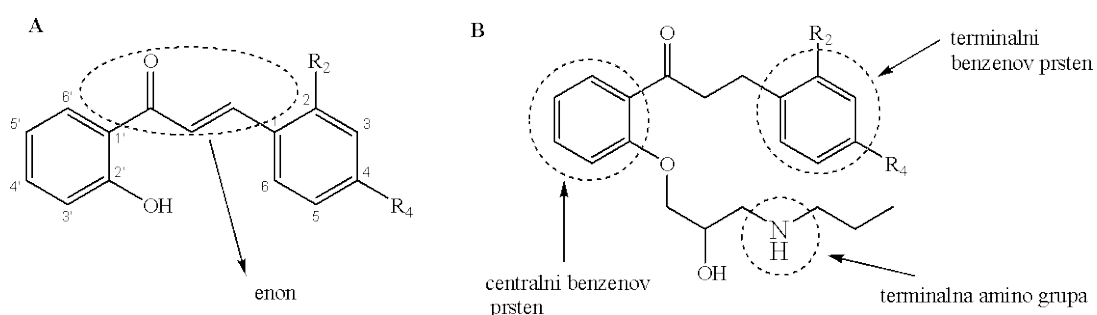
Slika 56 3D-QSAR (LS174) farmakoforni model A) 5OCl i B) 1OCF₃. Crvenim linijama su predstavljene deskriptori sa pozitivnim uticajem na citotoksičnu aktivnost, dok su plavom linijom predstavljeni deskriptori sa negativnim uticajem na citotoksičnu aktivnost.

Najizraženiji negativan uticaj na citotoksičnu aktivnost utvrđen je za TIP-TIP deskriptor (v226) izračunat između topološke površine oko sekundarne alkoholne grupe i položaja C4' i C5' benzenovog prstena A u molekulu propafenonskih derivata (Fig. 56A, 56B).

7. DISKUSIJA

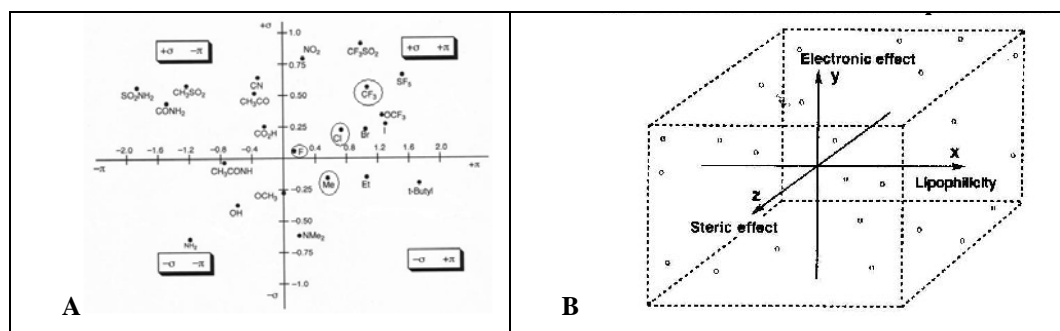
Veliki broj lekovitih supstanci ostvaruju svoje efekte menjajući ponašanje jonskih kanala. U novije vreme modulacija jonskih kanala predstavlja moderan pristup za eksperimentalna i klinička ispitivanja novih molekula u medicinskoj hemiji.

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je sinteza šest novih aminialkoksi derivata fenilpropiofenona (analoga propafenona) sa strukturnim modifikacijama u terminalnom benzenovom prstenu (5CF₃, 5OF, 5OCl, 5OCH₃, 5PF, 5PCH₃), šest halkonskih intermedijera i novog trifluorometil flavanona (FCF₃) koji nastaje ciklizacijom iz trifluorometil halkona (1CF₃). Na predstavljenim opštim formulama (Sl. 57A i 57B) označene su farmakoforne grupe od značaja za biološku aktivnost halkona i derivata propafenona.



Slika 57. A) Opšta struktura intermedijernih halkona B) Mesta strukturnih modifikacija propafenona

U položaje C2- i C4- terminalnog benzenovog prstena uvedeni su supstituenti koji modifikuju hidrofilno/hidrofobne, elektron donor/akceptorske osobine i geometriju molekula u cilju povećanja selektivnosti i potentnosti prema određenom tipu jonskog kanala. Izbor supstituenata vršen je na osnovu Craig-ovog grafika. Iako su dostupne tabele sa vrednostima za hidrofobne (π -vrednost) i Hammett-ove konstante (σ -vrednost), grafički prikaz pruža mogućnost vizuelizacije relativnih odnosa elektronskih i hidrofobnih osobina različitih supstituenata (Sl. 58).



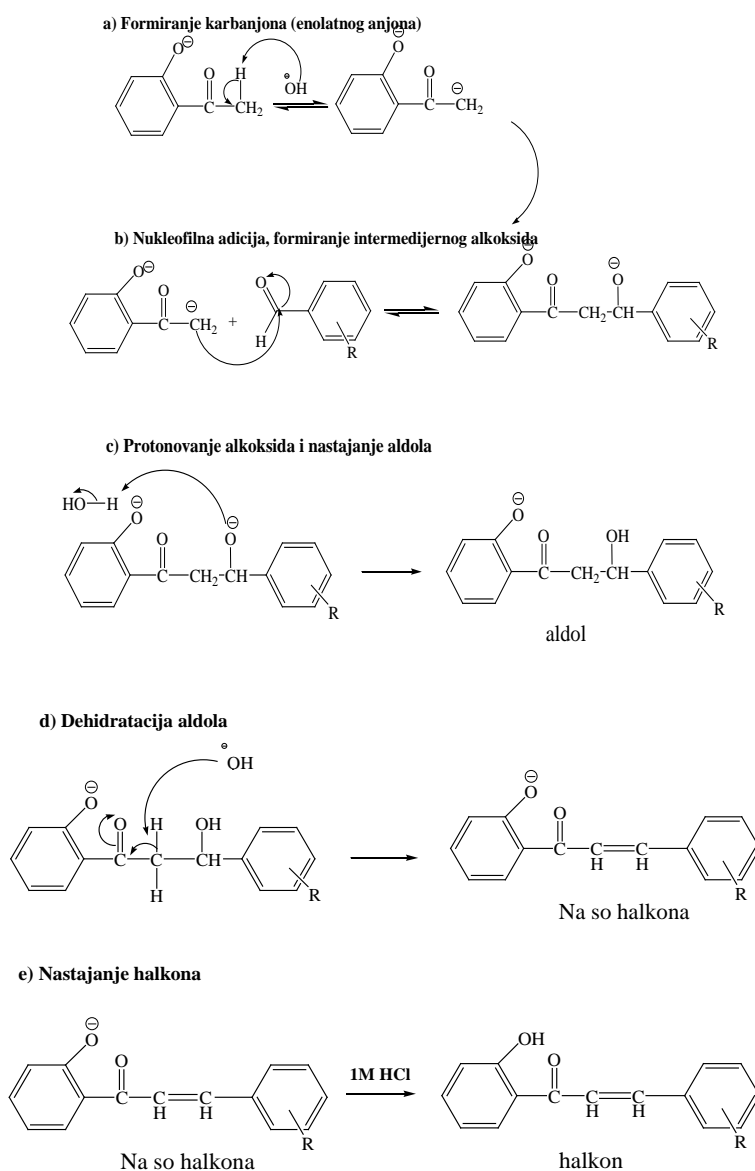
Slika 58. Craig-ov grafik : A) 2D prikaz, B) 3D prikaz

U zavisnosti da li povećavaju ili smanjuju lipofilnost, supstituenti imaju $+\pi$ ili $-\pi$ vrednosti, a u zavisnosti da li su donori ili akceptori elektrona - σ ili $+\sigma$ vrednosti. Craig-ov grafik je koristan u dizajniranju lekova jer se lako, vizuelno može proceniti koji supstituent ima pozitivne, negativne kao i bliske π - ili σ - vrednosti. Na osnovu ovog grafika se vrše planirane i ciljane modifikacije u molekulu koje pozitivno utiču na biološku aktivnost.

Na osnovu poznavanja molekulske strukture jonskih kanala poznato je da unutrašnjost pore jonskog kanala grade u većoj meri hidrofobni i aromatični aminokiselinski ostaci (*Val, Leu, Ile, Phe, Tyr*) i da su pored polarnih interakcija za vezivanje molekula od važnosti i hidrofobne, π - π interakcije. Drugo važno saznanje je da je put kojim propafenon dolazi do vezivnog mesta u kanalu indirektan, jer propafenon pasivnom difuzijom prolazi kroz membranu i sa citoplazmatske strane se vezuje za kanal. Uzimajući u obzir oba podatka, prvi kriterijum u izboru supstituenata je njihova lipofilnost (supstituenti koji povećavaju lipofilnost propafenona). Odabrani su supstituenti sa desne polonine Crag-ovog grafika koji imaju $+\pi$, ali i $+\sigma$ ili $-\sigma$ vrednosti (Sl. 58)²⁹.

Novija istraživanja koja se odnose na interakcije malih molekula i proteina na molekulskom nivou, ukazuju da supstitucija vodonika halogenima ($+\pi$, $+\sigma$), povećava lipofilnost i time povećava brzinu penetracije kroz ćelijsku membranu. Veća polarizabilnost C-F u odnosu na C-H vezu može doprineti novim interakcijama u vezivnom mestu i time uticati kako na afinitet, tako i na selektivnost propafenona prema odgovarajućem pod/tipu jonskog kanala. S obzirom na elektronegativnost F, moglo bi se očekivati da je C-F fragment molekula, slične polarizabilnosti kao C-O ili C-N fragmenti i da je dobar akceptor vodonika, što utiče na građenje intra- ili inter molekulskih vodoničnih veza. Za razliku od drugih C-heteroatom fragmenata C-F fragment organskog molekula je loš akceptor vodonika. Ipak, ne mali broj interakcija C-F -----H-X (X = O, N, S) kao i C-F -----H-C _{α} (C _{α} atom α aminokiselina) fragmenata za koje postaje podaci u PDB bazi ukazuju da je u nekim molekulima moguće favorizovati dipolni moment C-F veze i da u njima zastupljene multipolarne interakcije²⁴⁶⁻²⁴⁷. Dosadašnja istraživanja pokazala su da prisustvo fluora, posebno u *para* položaju supstituisanog aromatičnog ili alifatičnog prstena može umanjiti interakcije sa hERG

1,3-difenil-2-propenoni (halkoni). Uslov za reakciju kondenzacije je postojanje kiselog α -H atoma (H atom metil grupe 2-hidroksiacetofenona) koji *odlazi* u prisustvu baze. Tom prilikom nastaje karbanjon (enolatni anjon) (Shema 10a), koji kao nukleofil reaguje sa elektropozitivnim ugljenikovim atomom karbonilne grupu monosupstituisanog benzaldehida (Shema 10b) i gradi intermedijerni alkoksida. Protonovanjem alkoksida nastaje ketol (Shema 10c) koji kao nečistoća u manjem procentu može da zaostane u reakcionoj smeši i uklanja se *dry flash* hromatografijom. Pošto je nastajanje ketola ravnotežna reakcija, sledećom fazom dehidratacije ketola u baznoj sredini koja je ireverzibilna nastaje α , β -nezasićeni keton (halkon) (Shema 10d).

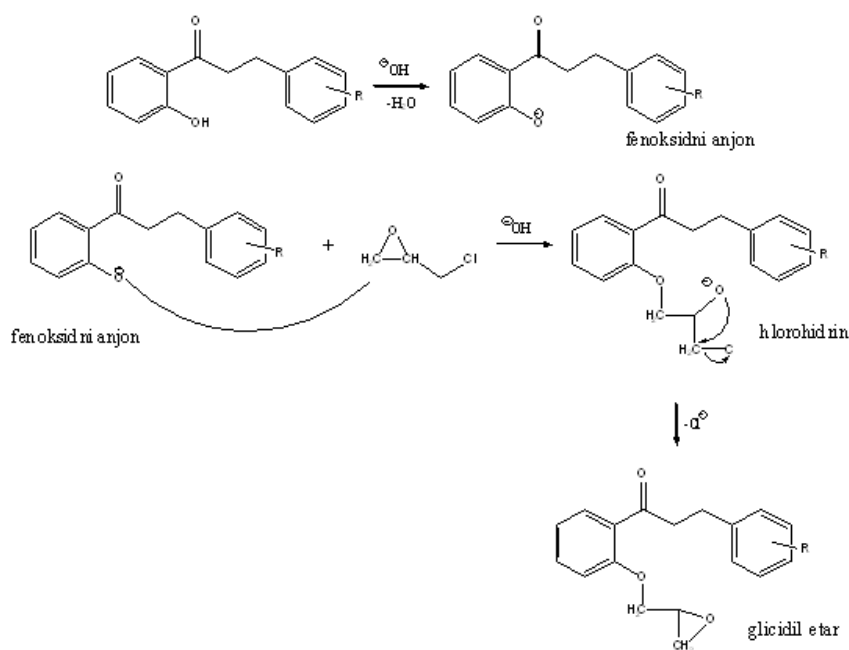


Shema 10. Mehanizam bazno katalizovane aldolne kondenzacije

Elektron akceptorski supstituenti (-F, -Cl, -CF₃) prisutni u molekulu benzaldehida olakšavaju ireverzibilnu dehidraciju ketola u baznoj sredini, što povećava prinos reakcije. Zbog prisutne kisele fenolne grupe nastali proizvod je u obliku natrijumove soli iz koje dodatkom 1mol/l HCl nastaje fenol (Shema 10e). Bazno katalizovana aldolna kondenzacija koja se odvija na sobnoj temperaturi (25 °C) u vodeno-etanolnom rastvoru kao proizvod daje samo *trans* izomer α , β -nezasićenog ketona, što je potvrđeno hromatografskim (TLC, HPLC) i spektroskopskim metodama (¹H NMR $J_{\text{vinil H}} = 15,2-15,6$). Enonska struktura u molekulu halkona (Sl. 57a) koja povezuje dva benzenova prstena predstavlja kombinovanu hromoforu koja uslovljava batohromno pomeranje apsorpcionih maksimuma benzena prema vidljivoj oblasti spektra te su dobijeni halkonski proizvodi žuto obojeni. Enonska struktura u molekulu halkona čini ova jedinjenja hemijski nestabilna pa ih zato nakon sinteze i prečišćavanja treba čuvati zaštićene od svetlosti i kiseonika.

Katalitičkom hidrogenizacijom u drugoj fazi sinteze (Shema 9) iz halkona se dobijaju zasićeni ketoni. U molekulu halkona hidrogenizaciji može podleći kako alkenaska tako i karbonilna grupa. Za selektivnu redukciju alkenaska grupe koristi se paladijum kao katalizator u obliku finog metalnog praha ili češće dispergovan na inertnom nosaču kao što je aktivni ugalj (Pd/C). Aktivni ugalj ima veliku aktivnu površinu te na taj način povećava i aktivnu površinu katalizatora. Pd/C se upotrebljava u koncentracijama 5-20 % u odnosu na inertni nosač (aktivni ugalj). Pd/C je jedan od najviše korišćenih katalizatora u heterogenoj katalitičkoj hidrogenizaciji. Tome doprinosi njegova visoka aktivnost, jednostavno uklanjanje iz reakcione smeše i mogućnost regeneracije. Selektivnost Pd/C se postiže izborom adekvatnih reakcionih uslova: pravilnim izborom rastvarača, temperature, pritiska H₂ ili primenom jedinjenja koja smanjuju aktivnost katalizatora (*trovači* ili deaktivatori katalizatora). Za selektivnu redukciju alkenaska grupe u metanolnom rastvoru halkona na sobnoj temperaturi (25 °C), pritisku H₂ od 2 atm i u prisustvu 5 % Pd/C kao katalizatora, uz neprekidno mešanje reakcione smeše, potrebno je 30 minuta. Prinos reakcije zavisi od elektronskih osobina supstituenata i sternih efekata. U toku reakcije sinteze dobijeni su proizvodi visokog stepena čistoće što je potvrđeno hromatografskim metodama (TLC i HPLC).

Treća faza sinteze je bazno katalizovana nukleofilna supstitucija (Shema 9). između fenolske grupe zasićenog ketona i (\pm) epihlorhidrina na povišenoj temperaturi. U prisustvu NaOH, fenolska grupa C2- ili C4- supstituisanog 2'-hidroksi fenilpropiofenona gradi fenoksidni anjon (Shema 11). Kao nukleofil, fenoksidni anjon reaguje sa epoksidnom grupom epihlorhidrina, epoksid se otvara i nastaje supstituisani hlorohidrin. Eliminacijom hloridnog anjona, kao lako odlazeće grupe iz hlorohidrina nastaje novi epoksid, supstituisani glicidil etar (Shema 11).



Shema 11. Mehanizam sinteze epoksida

Čistoća dobijenog proizvoda je veća od 95 % i kao takav glicidil etar se bez dodatnog prečišćavanja koristi u sledećoj fazi sinteze.

U četvrtoj fazi epoksidni prsten se otvara na povišenoj temperaturi u odsustvu katalizatora dejstvom *n*- propilamina kao nukleofila i nastaje β – aminoalkohol (Shema 9). Sirovi proizvod u obliku uljasto-smolaste mase prečišćava se hromatografijom na koloni na silikagelu sa smešom CH_2Cl_2 - CH_3OH -25% NH_3 (20:1:0,15 v/v/v) kao eluentom. Prisustvo slobodnog elektronskog para na azotovom atomu čini nastali proizvod veoma reaktivnim i nestabilnim. Stabilnost kao i rastvorljivost aminoalkohola povećavaju se građenjem hidrohloridnih soli. Stepem čistoća i struktura sintetisanih

jedinjenja potvrđena je hromatografskim (TLC, HPLC) i spektroskopskim metodama (UV/VIS, FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS TOFF i MS-MS).

Novosintetisani trifluorometil halkon (1CF3) poslužio je i kao polazni proizvod u sintezi flavanona (FCF3). Kao slabije rastvorljiv od halkona iz koga je ciklizacijom dobijen u toku hlađenja prvi kristališe iz reakcione smeše u obliku dugih, igličastih kristala. Stepenn čistoe i struktura sintetisanog flavanona potvrđena je hromatografskim (TLC, HPLC), spektroskopskim metodama (UV/VIS, FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS-MS) i kristalografski, metodom monokristala. U Kembričkoj bazi strukturnih podataka (CSD) nalazi se mali broj struktura flavonoida²⁷². Nedostatak rešenih struktura posledica je problema rasta kristala. Sintetisano jedinjenje zauzima konformaciju tipičnu za flavanone, sa γ -piranonskim prstenom u konformaciji koverte. U ovoj konformaciji atomi ugljenika na pozicijama C1, C6, C7, C8 i atom kiseonika O1 su skoro koplanarni, dok je C9 atom izvan područja ravni, sa atom-ravan rastojanjem od 0,652 (6) Å. Svi uglovi i sve veze sintetisanog flavanona pokazuju uobičajene vrednosti za ovaj tip jedinjenja.²⁷³ U kristalnom pakovanju javljaju se četiri intramolekulske, dve intermolekulske (C-H...O i C-H...F) i jedna π - π interakcija (Sl.30 i 31). Svi atomi fluora učestvuju u građenju slabih intramolekulskih C-H...F interakcija, sa H...F rastojanjima od 2,50 Å ili manjim, što je manje od zbira njihovih *van der Waalsovih* radijusa. Dva atoma fluora interaguju sa atomom vodonika koji je vezan za hiralni ugljenikov atom C2(9), dok treći atom fluora interaguje sa jednim atomom vodonika iz fenil grupe (Tabela 5). Diedarski ugao između Cg1 i Cg2 prstenova u prethodno objavljenim strukturama flavanona²⁷³ ima vrednost od 55° do 75°, dok u sintetisanom flavanonu diedarski ugao iznosi 66,06°.

Molekuli flavanona su povezani u redove preko C3-H3...O2 intermolekulskih interakcija, formirajući lance oko kristalografske *a*-ose (Sl. 30a). Druga intermolekulska interakcija, C5-H5...F3, povezuje molekule u drugi lanac u pravcu kristalografske *c*-ose, formirajući dvodimenzionalnu mrežu molekula (Sl.30b). Lanci molekula duž kristalografske *c*-ose su dalje povezani π - π interakcijama (Sl. 31). Vertikalna rastojanja od centroida Cg1 prstena molekula duž *x*, *y*, *z* osa do ravni centroida Cg1 drugog prstena molekula duž 1 - *x*, 2 - *y*, 1/2 + *z* osa i obrnuto su 3,70 i 3,62 Å. Rastojanje između centroida prstenova je 4,101(3) Å. Ravni Cg1 prstenova molekula duž osa *x*, *y*, *z* i 1 - *x*, 2 - *y*, 1/2 + *z* su skoro paralelni, sa diedarskim uglom od 5,59 (3)°.

Metoda kuplovane tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom preciznih masa (TOF) izvršena je na uzorcima svih 6 sintetisanih derivata propafenona i trifluorometil halkonu 1CF3. MS-MS analiza, uz primenu triplkvadripolskog masenog spektrometra izvršena je da bi se potvrdila struktura sintetisanih jedinjenja. Podaci dobijeni fragmentacijom prikazani su u Tabeli 6. Za propafenon kao i njegove derivate u MS-MS fragmentaciji karakteristična je dehidratacija sekundarne alkoholne grupe (eliminacija vode) i pojava fragmenta $[M+H-H_2O]^+$ koji ima vrednost umanjenu za 18 u odnosu na polazni molekularni jon (propafenon $m/z = 324,17$; 5OCl $m/z = 358,11$; 5PCH3 i 5OCH3 $m/z = 338,20$; 5OF i 5PF $m/z = 342,19$ i $342,17$; 5CF3 $m/z = 392,15$). Fragmenti: $m/z = 91,11$ (za propafenon), $m/z = 125,01$ (za 5OCl), $m/z = 105,13$ i $105,11$ (za 5PCH3 i 5OCH3), $m/z = 109,08$ i $109,09$ (za 5 OFA i 5PF) i $m/z = 173,00$ (za 5CF3) odgovaraju modifikovanom benzilnom delu molekula. Na osnovu m/z vrednosti fragmenta koji potiče od modifikovanog benzilnog ostatka moguće je razlikovati derivate, ali ne i položajne (*orto/para*) izomere derivata. Fragmenti $m/z = 72,25$; $98,14$ i $116,13$ su karakteristični za svih šest derivata i propafenon, a potiču od nedomifikovanog bočnog 3-(propilamino)-2-hidroksi-etoksi niza u položaju C2' centralnog benzenovog prstena. Prilikom MS-MS fragmentacije propafenona i sintetisanih derivata eliminiše se propilamino grupa i nastaju fragmenti koji imaju vrednost umanjenu za 77 u odnosu na polazni molekularni jon $[M+H-NH_2C_3H_7]^+$ (propafenon $m/z = 265,04$; 5OCl $m/z = 299,05$; 5PCH3 i 5OCH3 $m/z = 279,05$ i $279,16$; 5OF i 5PF $m/z = 283,06$ i $283,08$; 5CF3 $m/z = 333,05$). Mehanizam nastajanja glavnih fragmenata propafenona i sintetisanih derivata prikazan je na Sl. 32.

Pošto su sintetisana jedinjenja derivati propafenona, antiaritmika Ic grupe, u prvom segmentu bioloških ispitivanja izvedeni su *in vitro* i *in vivo* eksperimenti koji su obuhvatali ispitivanje efekata sintetisanih derivata na KVS. Dobijeni rezultati poređeni su sa rezultatima dobijenim za propafenon kao referentni standard.

Potvđeno je da pojedine maligno transformisane ćelije eksprimiraju odgovarajuće tipove i podtipove jonskih kanala. Iz tog razloga drugi segment bioloških ispitivanja sintetisanih jedinjenja odnosio se na *in vitro* ispitivanje njihove potencijalne antitumorske aktivnosti.

Smanjenje perifernog vaskularnog otpora od velikog je značaja za optimalan hemodinamski status miokarda jer može da smanji naknadno opterećenje komora i da poveća protok krvi kroz koronarne krvne sudove. Smanjenje perifernog vaskularnog otpora može biti i neželjeni efekat koji se manifestuje hipotenzijom. Pretpostavlja se da je ovaj efekat posledica blokade L-Ca²⁺ kanala u glatkoj muskulaturi krvnih sudova. Mali je broj izvedenih studija u kojima su proučavani efekti antiaritmika Ic klase na glatke mišićne krvne sudove.

Carrón i saradnici²¹⁹ su ispitivali vazorelaksantni efekat propafenona na aorti pacova koja je kontrahovana visokim koncentracijama jona K⁺ (80 mM) i Ca²⁺ (1-5 mmol/l), kao i noradrenalinom (10⁻⁵ mol/l). Kontrakcije indukovane visokim koncentracijama K⁺ i Ca²⁺ jona u depolarizovanoj aorti su zavisne od priliva ekstracelularnih Ca²⁺ jona kroz voltažno-zavisne Ca²⁺ kanale, dok su kontrakcije izazvane noradrenalinom posledica blokade ulaska Ca²⁺ jona preko receptor-zavisnih Ca²⁺ kanala. U prisustvu propafenona u oba slučaja kontrakcije krvnog suda izostaju što ukazuje da vazorelaksantni efekat propafenona potiče od interakcije sa L-Ca²⁺ kanalima kao i sa receptor-zavisnim Ca²⁺ kanalima u glatkoj muskulaturi aorte. S obzirom da blokira faznu komponentru kontrakcije indukovane noradrenalinom za koju su odgovorni Ca²⁺ joni iz membranski vezanih depoa smatra se da propafenon inhibira i njihovu mobilizaciju. Međutim, kao ni DHP ni propafenon ne utiču na tonus aorte u stanju mirovanja što znači da ne utiču na transport jona Ca²⁺ kroz pasivne jonske kanale u membrani. U daljim istraživanjima ova grupa autora pokazala je da propafenon (10 μM) inhibira i Ca²⁺-zavisne K⁺ kanale u glatkim mišićnim ćelijama izolovane vene porte pacova.

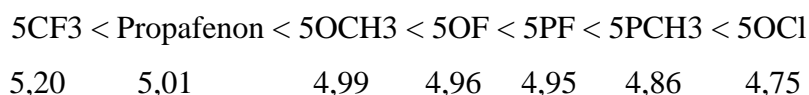
Do sličnih zapažanja došli su Pérez-Vizcaíno i saradnici kada su vazokonstrikciju aorte indukovali visokim koncentracijama KCl²²⁰. Ova grupa autora je dokazala da prisustvo TTX kao blokatora Na⁺ kanala ne utiče na relaksantni efekat propafenona. Ista grupa autora pokazala je da dobijeni efekat nije endotel zavisan.

Nasuprot tome, Cogolludo i saradnici²²¹ su u svojim ispitivanjima pokazali da propafenon blokira vazodilatatorni efekat otvarača K⁺ kanala, levkromakalima na nekompetitivan način. Koncentracije propafenona koje dovede do navedenog efekta su u okviru terapijskih i slične onima koje dovede do inhibicije ATP-zavisnih K⁺ kanala.

Vazorelaksantna aktivnost propafenona i sintetisanih derivata ispitana je na izolovanoj aorti pacova soja Wistar koja je prethodno prekontrahovana rastvorom fenilefrina (FE) koncentracije 10 $\mu\text{mol/l}$. Eksperimentalni model tonične kontrakcije izazvane FE omogućava da se simulira situacija razvijenog spazma krvnog suda i na taj način proceni eventualni vazorelaksantni potencijal sintetisanih derivata

Aktivnost jedinjenja je ispitivana u rasponu koncentracija od 1 do 100 $\mu\text{mol/l}$. Svih šest sintetisanih derivata, uključujući i propafenon, pokazali su dozno-zavisni vazorelaksantni efekat (Sl. 36). Koncentracija propafenona koja je prouzrokovala 50 % vazorelaksantnog efekta ($\text{pEC}_{50} = 5,01$) bila je uporediva sa koncentracijom koju su dobili Pérez-Vizcaíno i saradnici²¹⁹⁻²²⁰ ($\text{pEC}_{50} = 5,64$), ali treba uzeti u obzir činjenicu da osetljivost krvnog suda na vazodilatatorni efekat nekog jedinjenja zavisi i od tipa kontrakcije tj. mehanizma koji do nje dovodi. Dobijeni su rezultati koji pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u vazodilatatornom efektu ispitivanih jedinjenja na krvnom sudu sa i bez endotela, ali postoji statistički značajna razlika u potentnosti između samih derivata (Tabela 7).

Ako se analiziraju dobijene pEC_{50} vrednosti rang potentnosti (opadajući niz potentnosti) derivata može se predstaviti na sledeći način



Derivat koji u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena ima voluminoznu trifluorometil grupu je potentniji u poređenju sa propafenonom i ostalim derivatima. Ako se analiziraju fizičko-hemijski parametri $-\text{CF}_3$ grupe (Tabela 3) može se reći da većoj potentnosti najverovatnije doprinose sterna efekti $-\text{CF}_3$ grupe kojima ona utiče na geometriju molekula.

Kako vazorelaksantno dejstvo nije endotel-zavisno to ukazuje da endotel zavisni relaksirajući faktor (NO) nije uključen u mehanizam vazorelaksantnog dejstva ispitivanih jedinjenja.

Učešće jonskih kanala u vazorelaksantnom mehanizmu dejstva derivata propafenona ispitano je u prisustvu sledećih antagonista jonskih kanala: lidokaina, antagoniste Na^+ kanala (3 mmol/l), nifedipina, selektivnog antagoniste L- Ca^{2+} kanala (1

$\mu\text{mol/l}$) i 4-aminopiridina (4-AP), neselektivnog anagoniste K^+ kanala (3 mmol/l). Utvrđeno je da je 4-APa u koncentraciji od 3 mmol/l selektivan prema Kv kanalima.

Rezultati dobijeni u *in vitro* ispitivanjima (Tabele 8, 9 i 10) ukazuju da su jonski kanali uključeni u mehanizam vazorelaksantnog dejstva i da su strukturne modifikacije doprinele selektivnom delovanju sintetisanih derivata na odgovarajuće tipove jonskih kanala. Uticaj uvedenih grupa na fizičko-hemijske osobine derivata i njihov različit afinitet i efikasnost može se opisati preko; četiri fizičko-hemijska parametra koja karakterišu date supstituente: parametar hidrofobnosti (π), induktivna sigma konstanta (σ_I), *van der Waalsov* radijus (V_r) kao i *van der Waalsov* volumen (V_v) (Tabela 3).

U ispitivanju uloge K^+ kanala u vazorelaksantnom dejstvu sintetisanih derivata i propafenona uočava se da 4-AP antagonizuje efekat derivata kod kojih je terminalni benzenov prsten *para* supstituisan (5PCH₃ i 5PF). Na osnovu dobijenih EC_{50} vrednosti u prisustvu i odsustvu antagoniste 4-AP (Tabela 8), formiran je rastući niz potentnosti derivata: 5OF < Propafenon < 5OCH₃ = 5OCl < 5CF < 5PF < 5PCH₃ na osnovu koga se jasno uočava da Kv kanali učestvuju u vazorelaksantnom efektu *para* supstituisanih derivata 5PF i 5PCH₃ (Sl. 37) i da su ova jedinjenja potentnija od *orto* supstituisanih. Značajno pomeranje kumulativne krive udesno, ukazuje da je 5PCH₃ derivat selektivniji za K^+ kanale u odnosu na druge derivate i propafenon (Sl. 37). Srednja efektivna koncentracija za derivat 5PCH₃ (pEC_{50} 4,41) je u prisustvu antagoniste, 4-AP tri puta veća od koncentracije propafenona (pEC_{50} 4,97) i dva puta veća od koncentracije sledećeg u nizu po kompeticiji 5PF (Tabela 8).

Supstitucija vodonikovog atom *para* položaja terminalnog benzenovog prstena – CH₃ grupom menja voluminoznost, lipofilnost i elektronsku gustinu (+R efekat) u terminalnom benzilnom ostatku molekula propafenona. (Tabela 3). Uvođenjem u *para* položaj supstituenta manje voluminoznog od metil grupe koji smanjuje elektronsku gustinu u terminalnom benzenovom prstenu dovodi do smanjenja afiniteta derivata prema K^+ kanalima. Sledeći u nizu po kompeticiji je derivat sa –F u *para* položaju. Efekti *orto* supstituisanih derivata nisu antagonizovani 4-AP-om. Potvrđeno je da vazorelaksantni efekat indukovani 5OCl derivatom u koncentracijama manjim od 10 $\mu\text{mol/l}$, 4-AP u potpunosti antagonizuje (Tabela 8, Sl.37). Vrednost pEC_{25} za kontrolnu grupu iznosi $5,34 \pm 0,11$, dok je pEC_{25} vrednost u prisustvu 4-AP $5,07 \pm 0,14$ tj potrebna je dvostruko veća koncentracija 5OCl derivata ako je prisutan 4-AP. Ovi

rezultati idu u prilog činjenici da su K^+ kanali uključeni u vazorelaksantne efekte indukovane koncentracijama 5OCl derivata manjim od 10 $\mu\text{mol/l}$.

Nifedipin kao selektivni blokator $L\text{-Ca}^{2+}$ kanala antagonizuje dejstvo *orto* trifluorometil supstituisanog derivata (5OCF3). Statistički značajno pomeranje kumulativne krive udesno, ukazuje na veću selektivnost ovog derivata (pEC_{50} 4,55) prema $L\text{-Ca}^{2+}$ kanalima u odnosu na propafenon ($pEC_{50}=4,90$), ali i ostale derivate (pEC_{50} 4,70 - 4,97). Supstitucija tri vodonikova atoma metil grupe koja se nalazi u *orto* položaju terminalnog benzenovog prstena atomima fluora, doprinosi selektivnosti propafenona prema $L\text{-Ca}^{2+}$ kanalima. Svojom voluminoznošću $-\text{CF}_3$ izlazi iz ravni benzenovog prstena i dodatno utiče na geometriju molekula. Navedena grupa pokazuje negativan induktivni efekat kojim utiče na elektronsku gustinu u terminalnom benzenovom prstenu gradeći na taj način elektronima deficitaran fragment u strukturi derivata propafenona koji kao takav može bolje da ostvaruje interakcije sa naelektrisanim (*Arg*, *Glu*, *His*) kao i hidrofobnim (*Tyr*) aminokiselinskim ostacima u α_1 subjedinici $L\text{-Ca}^{2+}$ kanala.

Sledeći u nizu po kompeticiji je 5OCl derivat, koji je istovremeno i drugi u nizu po lipofilnosti sintetisanih derivata (Tabela 3). Koncentracija koja je potrebna da dovede do vazodilatatornog efekta u prisustvu nifedipina jedan i po put je veća u odnosu na propafenon, ali duplo manja u odnosu na 5CF3 derivat. Ako se analizira kumulativna kriva dobijena za 5OCl derivat u prisustvu nifedipina (Sl.37) može se uočiti da je antagonistički efekat nifedipina izraženiji kada su u pitanju niže koncentracije 5OCl derivata. U koncentracijama manjim od 10 $\mu\text{mol/l}$ efekat 5OCl derivata daleko efikasnije je antagonizovan nifedipinom. Skoro tri puta veća koncentracija 5OCl derivata (pEC_{25} $4,93 \pm 0,18$) je potrebna da dovede do dilatacije glatke muskulature aorte u poređenju sa istim efektom postignutim bez prisustva nifedipina (pEC_{25} $5,34 \pm 0,11$). Kao i u slučaju efekata na K^+ kanalima može se pretpostaviti da u nižim koncentracijama 5OCl deluje sinergistički sa nifedipinom i da je efekat sinergističkog delovanja dozno zavisian. Tome u prilog bi išla i hipoteza da su vezivna mesta u kanalu veoma bliska i alosterički povezana. Slična pojava zabeležena je i kod propafenona čije efekte dilatacije pri nižim koncentracijama nifedipin antagonizuje, ali je efekat manje izražen nego kod 5OCl derivata (pEC_{25} $5,15 \pm 0,19$ u prisustvu nifedipina, pEC_{25} $5,44 \pm 0,10$ u kontrolnoj grupi).

Da bi se ispitala uloga Na_v kanala u vazorelaksantnom dejstvu propafenona i sintetisanih derivata korišćen je lidokain kao referentni standard. Kao antiaritmik Ib grupe lidokain selektivno blokira Na_v kanale koji se nalaze u otvorenom ili inaktivnom stanju. Koncentracija lidokaina od 3 mmol/l koja je korišćena u *in vitro* eksperimentima je dovoljna da dovede do blokade Na_v kanala u glatkim mišićima aorte¹⁵⁸. Dobijeni rezultati ukazuju da Na_v kanali osetljivi na lidokain ne posreduju u vazorelaksantnom dejstvu propafenona i njegovih derivata. Ova konstatacija ide u prilog rezultatima dosadašnjih studija da Na_v kanali nisu uključeni u vazorelaksantnom dejstvu propafenona²¹⁹⁻²²¹. Dobijeni rezultati antagonizovanja efekata 5PF derivata su na granici statističke značajnosti. Srednja efektivna koncentracija 5PF derivata (pEC₅₀= 4,69) je jedan i po puta veća u odnosu na propafenon (pEC₅₀= 4,89) i druge derivate (pEC₅₀ 4,86-5,19) što ukazuje na njegovu nešto veću selektivnost prema Na⁺ kanalima.

Ako se analiziraju efekti postignuti sa koncentracijama nižim od 10 µmol/l za 5OCl derivat može se konstatovati da lidokain antagonizuje njegov efekat i da je dobijene EC₂₅ koncentracije daleko veće u poređenju sa koncentracijom kojom se isti efekat postiže bez prisustva lidokaina. Vrednost pEC₂₅ za 5OCl derivat u prisustvu lidokaina iznosi 4,99 ± 0,18 što je skoro dva i po puta veća koncentracija nego koncentracija koja dovodi do istog efekta, ali bez prisustva lidokaina (pEC₂₅ kontrola 5,34 ± 0,11). Vrednost pEC₂₅ 5OCl derivat u prisustvu lidokaina ukazuje na moguće učešće i Na_v kanala u njegovom vazorelaksantnom efektu do koga ovo jedinjenje dovode u koncentracijama nižim od 10 µmol/l.

Primenom *in silico* metode molekuskog uklapanja (molekulski *docking*) u izvesnoj meri su razjašnjeni efekti dobijeni tokom *in vitro* ispitivanja. Dosadašnji literaturni podaci koji povezuju metodu molekuskog uklapanja, jonske kanale, propafenon i do sada sintetisane derivate su malobrojni i bazirani na interakcijama propafenona sa hERG i K⁺ kanalima u srcu^{235, 271}. Literaturni podaci koji opisuju metode molekuskog uklapanja propafenona u Na⁺ ili L-Ca²⁺ kanale nisu do sada poznati. Iako je dostupna kristalografska struktura bakterijskog jednostavna i u dovoljnoj meri homologa sa K⁺ kanalima kod sisara, molekulsko uklapanje propafenona u poznatu strukturu KcsA kanala nije u literaturi opisano.

U *docking* studiji koja je sprovedena uz pomoć kristalografskih struktura bakterijskog KcsA kanala (PDB 1J95) i peptidnog kompleksa koji povezuje β i α_1 subjedinice L-Ca²⁺ kanala (PDB 1T0J) izvedeni su *docking* eksperimenti primenom programa *AutoDock 4.0.1* za optimizovane strukture ispitivanih jedinjenja i korišćenih antagonista (Sl. 38).

Docking eksperimenti su izvedeni pod pretpostavkom da se ispitivana jedinjenja vezuju za istu aminokiselinsku sekvencu u KcsA kanalu kao i 4-AP koji je kao blokator K⁺ kanala korišćen u *in vitro* eksperimentima. Definisano vezivno mesto nalazi se izvan pore u citoplazmatskom delu kanala i ograničeno je dvema aminokiselinskim sekvencama (Sl. 39). Prva zona koju čine četiri *Thr* aminokiselinska ostatka nalazi se na ulasku u centralnu šupljinu kanala, dok se druga zona nalazi pri ulasku u poru kanala sa citoplazmatske strane i čine je četiri *Ala* aminokiselinska ostatka. Između ove dve granične *aminokiselinske zone* nalaze se još tri aminokiselinska ostatka koji zajedno formiraju vezivno mesto za 4-AP u K⁺ kanalu (*Thr 107, Ala 108, Ala109, Leu 110 i Ala 111*). Za interakciju 4-AP sa kanalom ključne su tri amino kiseline: *Thr 107, Ala 108 i Ala 111*. Kao mali molekul 4-AP se u vezivnom mestu uvek postavlja pod uglom od 90° u odnosu na osu pore kanala i time blokira prolazak K⁺ jona u ekstracelularni prostor (Sl. 39). Kristalografskom analizom je potvrđeno da prvu *aminokiselinsku zonu* praktično čine četiri karbnilne grupe *Thr107* koje formiraju negativno naelektrisani *prsten* dimenzija 6,48 x 6,48 Å² sa kojim protonovani azotovi atomi –NH₂ grupe ili piridinskog prstena, kao proton-donori mogu da ostvare vodonične veze. Drugu *aminokiselinsku zonu* čine karbnilne grupe četiri *Ala111* ostataka koji takođe formiraju *prsten* dimenzija 6,78 x 6,78 Å² sa kojim pozitivno naelektrisani azotovi atomi mogu da ostvare vodonične veze²⁵⁸. Na taj način je 4-AP praktično *zaključan* u svom vezivnom mestu. Dodatna interakcija bitna za stabilizaciju molekula u vezivnom mestu je interakcija sa *Ala 108* koju ostvaruju ugljenikovi atomi piridinskog prstena²⁵⁸. Dosadašnja istraživanja koja su vezana za selektivnost i provodljivost K⁺ kanala na molekulskom nivou pokazala su da minimalne promene u rastojanju unutar TM 2 heliksa sve četiri α subjedinice u neposrednoj blizini *Thr 107 i Ala 108* utiču na provodljivost u kanalu. Ove dve aminokiseline se smatraju centrima rotacije (*pivot point*) oko kojih se okreću α heliksi menajući na taj način konformaciju kanala²⁶⁸.

Nakon simulacije vezivanja 4-AP-a za definisanu aminokiselinsku sekvencu pod istim uslovima izvedeni su i *docking* eksperimenti za sintetisane derivate, propafenon i antiaritmik III grupe amjodaron za koji je poznato da je blokator K⁺ kanala. Izračunate su vrednosti vezivnih energija, definisane orijentacije jedinjenja unutar pore kanala i njihove interakcije sa selektovanim aminokiselinama u vezivnom mestu (Sl.39, Tabela 11). Interakcije su procenjivane na osnovu razdaljine odgovarajućih delova molekula i navedenih aminokiselin. Ako se analiziraju vrednosti vezivnih energija dobijenih u eksperimentima izvedenim sa sintetisanim derivatima i propafenonom može se konstatovati da 5OF derivat ima daleko veći afinitet prema vezivnom mestu u kanalu ($E_{5OF} = -2,91$ kcal/mol) u odnosu na druge derivate i propafenon ($E_{propafenon} = -1,53$ kcal/mol, $E_{5PF} = -1,14$ kcal/mol, $E_{5PCH_3} = -0,73$ kcal/mol, $E_{5OCF_3} = +7,90$ kcal/mol, $E_{5OCl} = +4,10$ kcal/mol i $E_{5OCH_3} = +1,25$ kcal/mol).

Prisustvo elektronegativnog -F u *orto* položaju u manjoj meri modifikuje lipofilnost molekula propafenona ($\log P_{propafenon} = 3,46$, $\log P_{5OF} = 3,58$) u poređenju sa drugim supstituentima ($\log P_{5PF} = 3,62$, $\log P_{5OCH_3} = 3,68$, $\log P_{5PCH_3} = 3,91$, $\log P_{5OCl} = 4,09$, $\log P_{5OCF_3} = 4,31$). Veći radijus atoma fluora u poređenju sa vodonikovim atomom ($V_r = 1,47$ Å za -F i $V_r = 1,20$ Å za -H) utiče na dužinu C-F veze (C-F = 1,41 Å, C-H = 1,09 Å), a ujedno i na hidrofobne interakcije terminalnog benzenovog prstena 5OF derivata sa *Ala 111* u izdvojenoj aminokiselinskoj sekvenci (Sl. 39, Tabela 11). Pored terminalnog benzenovog prstena u interakcije sa *Ala 111* uključen je i atom fluora. Njegovo rastojanje od hidrofobnog bočnog niza *Ala 111* iznosi 3,61 Å što ukazuje da je se radi o hidrofobnoj interakciji. Ako se analiziraju rastojanja terminalnog benzenovog prstena i piridinskog prstena 4-AP od *Ala 111* može se konstatovati da je terminalni benzenov prsten daleko bliži *Ala 111* nego piridinski prsten što znači da promena elektronske gustine u aromatičnom prstenu potencira intenzitet interakcije sa *Ala 111*. Terminalni benzenov prsten je pozicioniran između TM2 i TM4 heliksa normalno na ravan u kojoj leži 4-AP i poklapa se sa osom pore kanala (Sl. 39). Ova pozicija je stabilizovana hidrofobnim interakcijama sa *Ala 108* u oba TM2 i TM4 heliksa (Tabela 11). Orijehtacija terminalnog benzenovog prstena 5OF slična je orijentaciji benzenovog prstena kod amjodarona (Sl.39), za koji su takođe izvedeni *docking* eksperimenti sa izdvojenom aminokiselinskom sekvencom. Svojom voluminoznošću atomi joda bolje uklapaju molekul u definisano vezivno mesto i stabilizuju ga halogenim interakcijama

sa *Ala 108* u tri od četiri TM heliksa. Ovakva pozicija amjodarona doprinosi njegovom većem afinitetu za kanal u poređenju sa 4-AP (Tabela 11).

4-AP gradi dve vodonične veze sa kiseonikovim atomima $-C=O$ grupa *Thr 107* iz TM2 i TM 4 heliksa. Vodonična veza sa $-C=O$ grupom *Thr 107* iz TM4 heliksa zabeležena je kod 5OF derivata, dok kod ostalih derivata i propafenona ova interakcija nije ostvarena (Tabela 11). *Docking* studija je pokazala da je prisustvo $-F$ u *orto* položaju utiče na orijentaciju terminalnog benzenovog prstena u kanalu. Prsten je orijentisan tako da svojom pozicijom u kanalu verovatno utiče na orijentaciju α -heliksa potencirajući na taj način konformaciju zatvorenog stanja kanala, slično 4-AP. Veća voluminoznost ostalih supstituenata bez obzira na njihove elektronske efekte sterno ometaju interakcije molekula u vezivnom mestu i samim tim smanjuju afinitet vezivanja derivata prema kanalu (Sl.39, Tabela 11). Može se konstatovati da se vezivna mesta za 4-AP i 5OF u KcsA kanalu poklapaju. Zbog veće stabilnosti kompleksa *4-AP-protein* u odnosu na stabilnost kompleksa *5OF-protein*, 4-AP nije mogao antagonizovati efekte 5OF derivata.

Para supstituisani derivati kod kojih je zabeležen efekat dilatacije u prisustvu 4-AP pokazuju mnogo manji afinitet prema KcsA kanalu u poređenju sa 5OF derivatom i propafenonom (Tabela 11). Supstitucija *para* položaja terminalnog benzenovog prstena takođe utiče na njegovu orijentaciju u vezivnom mestu. Prsten je vertikalno orijentisan i postavljen paralelno sa osom pore kanala tako da se ne ostvaruju interakcije sa *Ala 108*, što utiče na orijentaciju TM2-heliksa, a time dovodi i do promene konformacije kanala. Orijehtacija O-aminoalkoksi ostatka molekula 5PF derivata je takva da etarski kiseoniki i $-OH$ grupa *Thr 107* grade vodoničnu vezu koja stabilizuje vezivanje 5PF derivata i čini da njegov afinitet za dato vezivno mesto bude veći od afiniteta 5PCH3 derivata kod koga αC -atom propionil grupe sa $-OH$ grupom *Thr 107* ostvaruje nešto slabiju dipol-dipol interakciju (Tabela 11). Očigledno da izostanak interakcije sa *Ala 108* utiče na rastojanje *Thr- Ala*. Pozicija centra rotacije α -heliksa se time menja, kao i njegov položaj što utiče na konformaciono stanje kanala. Nastala konformacija odgovara otvorenom stanju kanala u kome postoji slobodan put za efluks K^+ jona iz ćelije. Membrana se usled toga hiperpolarizuje, što ima za posledicu zatvaranje Ca^{2+} kanala i relaksaciju prekontrahovanog krvnog suda.

Ako se sumiraju rezultati *docking* studije može se konstatovati da *para*-supstitucija doprinosi opisanoj orijentaciji derivata u kanalu sa tendencijom da se kanal otvori i omogući efluks K^+ jona u ekstracelularni prostor. Ako 4-AP pokazuje veći afinitet prema kanalu i ako razlika u vezivnim energijama je izvan granica greške korišćenog softverskog programa (Auto Dock v. 4.0.1, dozvoljena greška programa je 2,177 kcal/mol), za 5PCH3 derivat može se konstatovati da najverovatnije u višim koncentracijama interaguje sa K^+ kanalima za koje 4-AP nije selektivan (npr. K_{Ca}) i da preko njih ostvaruje vazodilatatorni efekat.

Na osnovu definisane aminokiselinske sekvence (*Tyr 239-Glu 240-Ile 353-Lys 354-Arg 356-His 363-Leu 364-Gln 367*) za koju su Davood i saradnici u svojim *docking* studijama pokazali⁷⁶ da interaguje sa delovima strukture nifedipina i analoga izvedeni su *docking* eksperimenti sa propafenonom i sintetisanim derivatima. Na osnovu dobijenih rezultata (Tabela 12) može se uspostaviti korelacija sa efektima dobijenim u *in vitro* ispitivanjima i vezivnim energijama derivata za definisano mesto u kanalu.

Anatagonisti Ca^{2+} kanala su lipofilni molekuli koji zaobilaznim putem (posle prolaska kroz ćelijsku membranu) dolaze do vezivnog mesta na α_1 -subjedinici. Eksperimentalni rezultati dobijeni metodom fotoafinitetnog obeležavanja kao i studije mapiranja proteina kanala potvrdile su da se blokatori Ca^{2+} kanala vezuju za IV domen α_1 -subjedinice, a da se dodatna mesta vezivanja 1,4-DHP derivata nalaze na I i III domenu. Navedena mesta su verovatno alosterički povezana. Ovoj tvrdnji ide u prilog činjenica da vezivanje diltiazema povećava mogućnost vezivanja nifedipina, dok je efekat vezivanja verapamila suprotan. U neposrednoj blizini vezivnog mesta nifedipina nalazi se mesto za vezivanje Ca^{2+} jona. Uklanjanje Ca^{2+} jona sa vezivnog mesta smanjuje afinitet vezivanja nifedipina (Sl.15).

Rezultati dobijeni u *in vitro* studijama na izolovanoj aorti pacova u prisustvu nifedipina kao antagoniste Ca^{2+} kanala ukazuju da su Ca^{2+} kanali najverovatnije uključeni u vazorelaksantni efekat 5CF3 derivata. Nakon izvedenih *docking* studija sa kristalografskom strukturom peptidnog kompleksa koji u kanalu povezuje β i α_1 subjedinice izdvojena je aminokiselinska sekvenca koja je odgovorna za vezivanje nifedipina. Najpovoljnija konformacija nifedipina koja se najjače vezuje za definisano mesto ima 1,4-DHP prsten, orjentisan tako da kiseonikovi atomi karbonilne grupe estra u položaju C3 ostvaruju vodoničnu vezu sa polarnim bočnim nizom *Gln 367*. Fenil

grupa na položaju C4, 1,4-DHP leži u hidrofobnom džepu koji formiraju *Ile 353*, *Lys 354* i *Leu 364* aminokiselinski ostaci. Nitro grupa je orjentisana tako da sa *His 363* gradi vodoničnu vezu bitnu za vezivanje jedinjenja u vezivnom mestu. Orijentacija NO₂ grupe odgovara orijentaciji estarske grupe u položaju C3 nifedipina što se takođe smatra jednim od bitnih uslova za interakcije 1,4-DHP u vezivnom mestu (Sl. 40). Metil grupe u položajima C2 i C6 1,4-DHP-a svojim hidrofobnim interakcijama sa bočnim nizom *Tyr 239* i *Glu 240* stabilizuju nagrađeni kompleks *nifedipin-protein*. Ove interakcije se takođe smatraju bitnim za vezivanje molekula. Ako se analiziraju vrednosti vezivnih energija dobijenih u *docking* studijama može se reći da pored nifedipina ($E = -6,32$ kcal/mol) derivati veće lipofilnosti koji su *orto* supstituisani voluminoznim elektronegativnim atomima ili grupama (-Cl ili -CF₃) takođe pokazuju veći afinitet i veću vezivnu energiju ($E_{5CF_3} = -5,26$ kcal/mol, $E_{5OCl} = -5,08$ kcal/mol) u odnosu na druge derivate, ali veoma sličnu propafenonu ($E = -5,21$ kcal/mol).

Orijentacija molekula propafenona u vezivnom mestu je takva da kiseonikov atom karbonilne grupe ostvaruje vodoničnu vezu sa *His 363* kao i kiseonikovi atomi NO₂ grupe nifedipina. Ova interakcija je bitna za vezivanje propafenona za kanal. Terminalni benzenov prsten orijentisan je tako da sa hidrofobnim delom bočnih nizova *Glu 240*, *Ile 353* i *Arg 356* ostvaruje hidrofobne interakcije. Centralni benzenov prsten samo delimično leži u hidrofobnom džepu formiranom od aminokiselinskih ostataka: *Ile 353*, *Lys 354* i *Leu 364*. U poređenju sa nifedipinom interakcije su slabije (Tabela 12).

Uvođenjem trifluorometil grupe u *orto* položaj terminalnog benzenovog prstena orijentiše ovaj deo molekula tako da je ravan u kojoj leži benzenov prsten paralelna i gotovo se poklapa sa ravni u kojoj se nalaze metil grupe nifedipina. Rastojanje metil grupa u položajima C2 i C6 1,4-DHP od aminokiselinskih ostataka *Tyr 239* i *Glu 240* identično je rastojanju terminalnog benzenov prsten 5CF₃ derivata (Tabela 12). Predpostavlja se da su ove aminokiseline značajne za vezivanje 1,4-DHP. Centralni benzenov prsten, slično fenil grupi 1,4-DHP, uklapa se u hidrofobnom džepu: *Ile 353*, *Lys 354* i *Leu 364*. Protonovana sekundarna -NH- grupa kao proton donor gradi vodoničnu vezu sa *Lys 354*. Orijentacija 5CF₃ derivata u definisanom vezivnom mestu uslovljena prisustvom -CF₃ grupe čini kompleks *5CF₃-protein* stabilnijim u poređenju sa kompleksom *propafenon-protein*. Ukoliko se u *orto* položaj terminalnog benzenovog prstena uvede supstituent sličnih elektronskih i lipofilnih osobina, ali manje

voluminoznosti od $-\text{CF}_3$ (kao što je $-\text{Cl}$) orijentacija i interakcije derivata propafenona u vezivnom mestu L-Ca^{2+} kanala se menjaju u odnosu na propafenon u manjoj meri. Orijentacija karbonilne grupe 5OCl derivata i propafenona je slična NO_2 grupi nifedipina, gradi vodoničnu vezu sa *His 363*, a rastojanje karbonilnog kiseonika gotovo je inentično rastojanju kiseonika NO_2 grupe (Tabela 12). Centralni benzenov prsten je kao i kod propafenona samo delimično orjentisan prema hidrofobnom džepu koji u najvećoj meri okupira bočni propilaminoalkoksi niz. Smanjenje elektronske gustine u terminalnom benzenovom prstenu uticalo je na ostvarivanje dodatnih interakcija 5OCl derivata sa *Gln 367* i *Leu 364* koje kod propafenona nisu zabeležene. Orijentacija *orto* fluoriranog derivata slična je orijentaciji 5OCl derivata, ali je vezivna energija manja za 10 kcal/mol, što ide u prilog činjenici da su sterna efekti udruženi sa elektronskim efektima ključni za poziciju molekula i njegove interakcije u vezivnom mestu. Uvođenjem elektropozitivne $-\text{CH}_3$ grupe u *orto* položaj dovodi do smanjenja afiniteta vezivanja za oko 15 kcal/mol, dok *para* supstitucija dovodi do izostanka sternog efekta čine se afinitet vezivanja dodatno smanjuje. Energija vezivanja oba *para* supstituisana derivata je gotovo identična i iznosi -4,62 kcal/mol za 5PF tj. -4,64 kcal/mol za 5PCH3 derivat (Tabela 12).

Sumiranjem rezultata se može konstatovati da supstitucija terminalnog benzenovog prstena utiče na afinitet vezivanja derivata prema kanalu. Treba uzeti u obzir i činjenicu da je *docking* studija sprovedena samo na *jednom od mogućih* vezivnih mesta 1,4-DHP u kanalu, za koje veći afinitet vezivanja pokazuju nifedipinski analozi. Dosadašnje studije koje su sprovedene sa analozima 1,4-DHP na Ca^{2+} kanalima pokazuju da analozi 1,4-DHP sa $-\text{CF}_3$ i $-\text{Cl}$ supstituentima u molekulu mogu imati u zavisnosti od stereohemije agonisti ili antagonisti⁷⁶.

Sledeća faza u ispitivanju efekata sintetisanih derivata na KVS odnosi se na ispitivnje antiaritmijskog efekta. Izbor animalnog modela* za ispitivanje antiaritmika zavisi od grupe antiaritmika koja se ispituje odnosno od mehanizma dejstva, koji je pretpostavljen ili potvrđen u prethodno izvedenim *in vitro* ili *in silico* eksperimentima. Poremećaji srčanog ritma se uglavnom ispituju na glodarima (zamorci, pacovi ili miševi), a ređe na psima i svinjama Akonitinski test na pacovu soja Wistar izabran je kao eksperimentalni model za *in vivo* ispitivanje antiaritmijskog potencijala odabranih halogenovanih derivata i propafenona kao referentnog standarda. Za ispitivanje je odabran protokol (uz manje modifikacije) koji su opisali Bartosova i saradnici²⁷⁴.

U eksperimentalnim modelima aritmije, aritmija se može indukovati hemijskim sredstvima, električnim nadražajima ili mehanički (ishemija ili reperfuzija). Za hemijsku indukciju aritmije uglavnom se koriste simpatomimetici (adrenalin), kardiotonični glikozidi (ouabain, digoksin), alkaloidi (akonitin, veratridin). Efekat i doza koja dovodi do željenog efekta u hemijskoj indukciji aritmije prvenstveno zavisi od vrste i soja životinje koja se koristi u izabranom modelu. Elektrostimulacija se primenjuje kada je potrebno indukovati poremećaje ritma koji simuliraju klinički značajne aritmije (flater ili fibrilacija komora). Aritmija može biti provocirana i ishemijom ili reperfuzijom kada se simuliraju stanja slična infarktu miokarda.

Vodeći se 3R pravilom** koje se odnosi na dobrobit eksperimentalnih životinja, kao i dosadašnjim iskustvima kliničke prakse da mnogi lekovi čije primarno dejstvo nije vezano za KVS pokazuju proaritmogeni potencijal, *in vivo* eksperimentima prethodili su *docking* eksperimenti. Kako kristalografska struktura hERG kanala nije dostupna u PDB bazi, *docking* studija izvedena je sa homologim modelom hERG kanala. Na osnovu kristalografske strukture bakterijskog KcsA kanala (pdb 1BL8) uz pomoć programa *Modelar* napravljen je homologi model hERG kanala na kome su izvedeni *docking* eksperimenti sa svih šest sintetisanih derivata. Efekat blokade *I_{Kr}* struje koja protiče kroz hERG kanal odražava se na srčanu funkciju jer se na taj način produžava faza repolarizacije i QT interval. Ovakav poremećaj srčanog ritma može dovesti do naprasne smrti kod ljudi koji nisu imali KVS poremećaje^{16, 271}.

* Animalni model se definiše kao živi organizam koji poseduje urođenu sklonost za razvoj određenog patološkog procesa ili je u njemu moguće indukovati isti patološki proces pod kontrolisanim eksperimentalnim uslovima, a koji se slično razvija i kod čoveka. ; ** 3 R pravilo koje ističe principe etičkog planiranja i izvođenja oglada. Naziv 3R potiče od engleskih reči replacment (zamena), reduction (smanjenje) i refinement (usavršavanje).

Zato se u novije vreme, kao jedno od obaveznih pretkliničkih ispitivanja, sprovodi ispitivanje interakcije potencijalnih biološki aktivnih molekula sa hERG kanalom.

U definisanom vezivnom mestu lekova u pori hERG kanala, izdvojena su dva aminokiselinska ostatka koji se smatraju odgovornim za neželjena dejstva lekova: *Phe 656* i *Tyr 652*²⁷¹. Nakon izvedenih *docking* eksperimenata najveća pažnja bila je usmerena ka interakcijama sintetisanih derivata sa ovim aminokiselinskim ostacima. Farmakoforni model koji definiše osobine molekula, ključne za interakcije potencijalnog blokatora hERG kanala podrazumeva prisustvo azotovog atoma koji će pri fiziološkom pH biti protonovan ($pK_a > 9$) i tri hidrofobna centra mase (centrioida) koja su prostorno raspoređena oko protonovanog azota.

Kod potentnijih hERG blokatora ove centriode predstavljaju aromatični prstenovi. Konformacija propafenona je relativno fleksibilna i ne sadrži optimalan broj centrioida što ga čini manje potentnim od drugih hERG blokatora. Strukturnim modifikacijama na terminalnom benzenovom prstenu propafenona može se uticati na intenzitet interakcija sa hERG kanalom. Dosadašnja ispitivanja interakcije propafenona sa hERG kanalom su pokazala da je za blokadu odgovorna interakcija propafenona sa *Phe 656* i da njen intenzitet zavisi od konformacionog stanja kanala. Interakcija sa *Phe 656* odgovorna je i za orijentaciju propafenona u vezivnom mestu kanala, dok se dodatna $\pi - \pi$ interakcija aromatičnog ostatka *Tyr 652* sa aromatičnim prstenovima propafenona smatra značajnom za stabilizaciju kompleksa *propafenon-protein*²⁷¹.

Dobijene vrednosti vezivnih energija (Tabela 13) za najpovoljnije konformacije sintetisanih derivata ($E = -5,87$ do $-8,07$ kcal/mol) ukazuju da veća hidrofobnost kao i voluminoznost pore hERG omogućava povoljnije pozicioniranje molekula u kanalu u poređenju sa KcsA kanalom (Tabela 12). Derivati kod kojih su za terminalni benzenov prsten vezane voluminozne $-CH_3$ i $-CF_3$ grupe ostvaruju interakcije sa *Phe 656* ali i *Tyr 652*. Kod derivata sa manje voluminoznim grupama ($-F$ i $-Cl$) samo propil grupa na protonovanom sekundarnom aminu ostvaruje interakcije sa hidrofobnim bočnim nizom *Tyr 652*, dok je ključna interakcija sa *Phe 656* izostala (Tabela 13). U izdvojenoj grupi halogenovanih derivata izuzetak predstavlja 5OF derivat. Rezultati *docking* studije izvedene na homologom modelu hERG kanala sa 5OF derivatom su saglasni sa rezultatima *docking* studije na KcsA kanalu. Sintetisani 5OF derivat ima povoljniju orijentaciju u hERG kanalu od ostalih sintetisanih derivata. Svojim prisustvom u

vezivnom mestu kanala smeštenom u transmembranskom delu, ka citoplazmatskoj strani blokira njegovu aktivnost. Derivat 5OF ostvaruje interakcije sa obe aminokiseline (*Tyr 652*, *Phe 656*). Velika elektronegativnost –F grupe i promena elektronske gustine u terminalnom benzenovom prstenu bez obzira na malu voluminoznost idu u prilog povoljnom pozicioniranju 5OF derivata u visoko hidrofobnom džepu (*Tyr 652*, *Ala 653*, *Phe 656*, *Ser 649*) u kome deo terminalne benzil grupe učestvuje u hidrofobnim interakcijama sa *Phe 656* (3,25 Å). Propil grupa na protonovanom sekundarnom aminu ostvaruje hidrofobne interakcije sa *Tyr 652*, *Thr 623* i *Ser 624*. Vodonikov atom sekundarne alkoholne grupe 5OF sa kiseonikom karbonilne grupe *Ser 649* gradi vodoničnu vezu (rastojanje 2,01 Å).

Ukoliko se položaj –F grupe u prstenu promeni i –F grupa uvede u *para* položaj terminalnog benzenovog prstena (5PF), orijentacija derivata u kanalu se menja i 5PF derivat se postavlja ka centralnom delu pore tako da ključna hidrofobna interakcija sa *Phe 656* izostaje (rastojanje >5 Å). Propil grupa na protonovanom sekundarnom aminu je slično orjentisana kao propil grupe kod 5OF derivata i nalazi se na istoj udaljenosti od hidrofobnog bočnog niza *Tyr 652* (3,45 Å) (Tabela 13). Položaj protonovane amino grupe je takva da sa bočnim nizom *Ser 649* ostvaruje π -katjon interakciju. Iako vezivna energija 5OCl derivata ukazuje na njegov najveći afinitet prema kanalu (Tabela 13), interakcije sa ključnim aminokiselinskim ostacima u vezivnom mestu su malobrojne. Interakcije ostvaruje samo centralni benzenov prsten postavljen u hidrofobnom džepu (*Ser649*, *Tyr 652*) u koji delimično uranja propilni *spacer* koji spaja etarski kiseonik sa protonovanim sekundarnim aminom (Sl. 46).

Nakon izvedenih docking eksperimenata izvedena su ispitivanja antiaritmijskog potencijala koja su obuhvatala ispitivanje preventivnog delovanja derivata na pojavu poremećaja srčanog ritma, kao i njihovog potencijala da zaustave akonitinom indukovani poremećaji srčanog ritma kod pacova. Kako primarni antiaritmijski efekat propafenon ostvaruje blokirajući $\text{Na}_v1.5$ kanale u srcu opravdana je primena akonitinskog testa u ispitivanju antiaritmijskog potencijala sintetisanih derivata.

U ispitivanjima antiaritmijskog potencijala sintetisanih derivata, aritmija je indukovana dozom akonitina od 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, za koju je eksperimentalno (u kontrolnoj grupi životinja) potvrđeno da dovodi do vidnog poremećaja srčanog ritma u kratkom vremenskom periodu. Nastale tahiaritmije vremenom prati otežano disanje i pojačana

salivacija. Traheotomijom koja je izvedena u fazi pripreme eksperimentalne životinje za ispitivanje ovi efekti su u zavisnosti od doze koja se ispituje ublaženi ili otklonjeni.

Eksperimenti su izvedeni na mužjacima pacova *Wistar* soja u dobokoj anesteziji koja je postignuta intraperitonealnom aplikacijom 20 % rastvora uretana u dozi od 1g/kg. Ova doza obezbeđuje stabilnu, dugotrajnu anesteziju sa minimalnim depresornim efektima na KVS i respiratorni sistem. Efekat hipotermije je prevaziđen u periodu adaptacije životinje u kome se ona nalazila na podlozi sa kontrolisanom temperaturom od 37 ± 1 °C.

Novosintetisani derivati testirani su u dozama od 2, 4, 6 mg/kg kako bi se ispitala dozna zavisnost antiaritmijskog efekta. Na osnovu literaturnih podataka kao početna doza za ispitivanje uzeta je terapijska doza za *iv* aplikaciju propafenona, 2 mg/kg²⁰¹.

Životinje su podeljene u tri eksperimentalne grupe. Prva (kontrolna) grupa je *i.v.* primala akonitinom u dozi od 60 µg/kg. Prvi poremećaj srčanog ritma koji je zabeležen na EKG zapisu bila je ventrikularna ekstrasistola (VES) koja će se u ispitivanoj grupi (druga eksperimentalna grupa) koristiti kao parametar za registrovanje poremećaja srčanog ritma.

Kako se u kliničkoj praksi propafenon primenjuje u prevenciji i lečenju VT uključujući PVT, SVT i WPW sindrom druga eksperimentalna grupa životinja je poslužila upravo za ispitivanje preventivnog delovanja derivata na pojavu poremećaja srčanog ritma kod pacova. Poznato je da propafenon zbog svog neselektivnog delovanja ispoljava negativno inotropno i hronotropno dejstvo. Elektrofiziološka ispitivanja su potvrdila negativan inotropni efekat dok je za hronotropni efekat pokazana dozna zavisnost²⁰¹. Navedeni efekti se definišu kao neželjeni efekti u terapiji aritmije. Na ispitivanom eksperimentalnom modelu, posle *i.v.* primene halogenovanih derivata i propafenona (2, 4 i 6 mg/kg) na EKG zapisu je zabeležen negativan hronotropni efekat koji nije pokazao doznu zavisnost (Sl.47a). Dobijeni rezultati ukazuju da uvedene strukturne promene umanjuju, ali ne eliminišu simpatolitički efekat propafenona. Jedan od razloga može biti i taj što strukturna modifikacija sintetisanih derivata ne utiče na ariloksipropanolski niz koji je kao farmakofora prisutan u molekulima β-blokatora (Sl. 25).

Proaritmogeni profil sintetisanih derivata razlikuje se od propafenona. Dva (5PF i 5OCl) od tri halogenovana derivata nisu pokazala takom ispitivanja proaritmogeni efekat, dok je kod 5OF derivata nakon aplikacije doze od 6 mg/kg registrovan poremećaj srčanog ritma koji se manifestuje kao prolazne SVES i VES u trajanju od 30-60 sek. Isti efekat u trajanju od 60-180 sek zabeležen je sa istom dozom propafenona. Prema docking studiji na hERG kanalu proaritmogeni efekat derivata 5OF je očekivan. Očigledno je da se uvođenjem -F grupe u *orto* položaj terminalnog benzena aritmogeni potencijal propafenona vidno smanjuje.

Tokom pripreme životinje za ispitivanja preparisana je karotidna arterija (*poglavlje 5.1.8.2*) i tokom eksperimenata neprekidno praćen arterijski krvni pritisak. Zabeležen je blaži pad krvnog pritiska nakon aplikacije derivata ili propafenona (Sl.47b). S obzirom da je efekat kratkotrajan i ne pokazuje doznu zavisnost moguće je da je indukovano samim načinom aplikacije (*i.v.* bolus injekcija).

Nakon aplikacije akonitina praćena je pojava prve VES kao parametra poremećaja srčanog ritma i dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima za propafenon za istu koncentraciju. Efekti ispitivanih derivata pokazuju doznu zavisnost (Tabela 14). Statistički značajna rezlika u efektima u okviru iste doze zabeležena je među derivatima, ali u poređenju sa propafenonom samo doza od 6 mg/kg 5OF derivata pokazuje statistički značajnu razliku (Tabela 15). Doza od 6 mg/kg 5OF derivata odložila je u potpunosti pojavu aritmije u 83,3 % ispitivanih životinja sa 100 % preživljavanja, što nije bio slučaj sa grupama koje su primale istu dozu 5PF i 5OCl derivata kao ni sa propafenonskom grupom (Tabela 16). Karakteristično je da statistički značajna razlika u efektima derivata sa fluorom u terminalnom benzenovom prstenu postoji u sve tri doze (Tabela 15). To može ukazati da je različita selektivnost ovih derivata prema jonskim kanalima uslovljena pozajem supstituenta u molekulu, a koja je uočena i u *in vitro* i *docking* studijama.

Potencijal derivata da zaustavi akonitinom indukovano aritmiju ispitan je na trećoj eksperimentalnoj grupi životinja. Dozom akonitina od 60 µg/kg aplikovanom *i.v.* bolus injekcijom indukovane su ventrikularne aritmije. Nakon 10 sek od pojave prve VES na EKG zapisu aplikovana je ispitivana doza od 4 ili 6 mg/kg oba fluorirana derivata i propafenona. Propafenon kao i 5OF derivat nisu uspeli da zaustave indukovano aritmiju, bez obzira na primenjenu dozu (preživljavanja 0%), dok su nakon

aplikacije 5PF derivata u dozi od 6 mg/kg sve životinje koje su primale navedenu dozu preživele, uz povremeno vraćanje sinusnog ritma (Tabela 17). Pretpostavlja se da doza od 4 mg/kg nedovoljna da zaustavi aritmiju indukovanu akonitinom ili doza akonitina od 60 µg/kg dovodi do takvih konformacionih promena u kanalu da je vezivanje derivata za kanal onemogućeno. Doza od 6 mg/kg propafenona i 5OF derivata indukuje aritmiju tako da se njihov proaritmogeni efekat praktično adiran sa efektima akonitina. 5PF derivat je ublažio efekte akonitina, jer u poređenju sa propafenonom pokazuje veći afinitet za Na_v kanale u srcu. 5PF derivat je i jedini derivat čije je efekte lidokain u *in vitro* ispitivanjima antagonizovao (granica statističke značajnosti) (Tabela 9).

Drugi segment bioloških ispitivanja sintetisanih propafenonskih derivata obuhvatala je ispitivanje njihovog potencijalnog antitumorskog dejstva.

I pored velikog broja propafenonskih analoga koji su do sada sintetisani u dostupnoj literaturi nisu zabeleženi podaci koji ukazuju na antitumorsku aktivnost pomenutih analoga bez prisustva drugih antitumorskih agenasa. Sprovedene *docking* studije kao i *in vitro* i *in vivo* ispitivanja pokazali su da do sada sintetisani analozi propafenona poseduju modulatornu aktivnost prema različitim tipovima jonskih kanala, ali da isto tako reaguju i sa drugim proteinskim strukturama u organizmu kakvi su npr. Transportni proteini. Pošto se u novije vreme sve veća pažnja posvećuje ulozi modulatora jonskih kanala u proliferaciji maligno transformisanih ćelija, ispitivanje potencijalne antitumorske aktivnosti sintetisanih derivata takođe je opisano u ovoj doktorskoj disertaciji.

U studiji ispitivanja potencijalne antitumorske aktivnosti uključeni su i halkoni, intermedijeri u sintetskom putu dobijanja propafenonskih derivata. U širokom spektru bioloških aktivnosti halkoni pokazuju i citotoksično i antikancerogeno dejstvo¹. Ketovinilna grupa u molekulu halkona je odgovorna za njihove reakcije sa -SH grupama biološki aktivnih proteina (Sl. 1A), koje inhibiraju aktivnost i funkciju ćelije. U novije vreme je dokazano da biološku aktivnost halkoni ispoljavaju i vezivanjem za nukleinske kiseline slično alkilirajućim agensima¹.

Antiproliferativna aktivnosti sintetisanih derivata i njihovih intermedijera, ispitana je prema šest humanih malignih ćelijskih linija: ćelije humanog fatalnog adenokarcinoma grlića materice (HeLa), ćelije humanog melanoma (Fem-X), ćelije

adenokarcinoma debelog creva (LS174), ćelije humane eritroleukemije (K562), ćelije humanog karcinoma prostate (PC3) i ćelije humanog estrogen zavisnog karcinoma dojke (MCF-7). Ispitana je i antiproliferativna aktivnost sintetisanih jedinjenja i prema zdravoj humanoj ćelijskoj liniji, mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC), da bi se utvrdilo da li sintetisana jedinjenja pokazuju selektivnu citotoksičnost. Antineoplastik iz grupe alkilirajućih agenasa, cisplatin, korišćen je kao referentni standard. Prema opšte prihvaćenim kriterijumima, zadovoljavajuću citotoksičnu aktivnost pokazuju oni molekuli čija je IC_{50} vrednost niža od 20 $\mu\text{mol/l}$. Ako je IC_{50} u intervalu 20–100 $\mu\text{mol/l}$ supstanca pokazuje umerenu ili slabu citotoksičnost, dok se jedinjenja čija vrednost IC_{50} veća od 100 $\mu\text{mol/l}$ smatraju neaktivnim. Analizom dobijenih rezultata, u skladu sa navedenim kriterijumima, može se konstatovati da su jedinjenja iz grupe halkona kao i sintetisani derivati propafenona pokazali antiproliferativnu aktivnost prema svih šest malignih ćelijskih linija ($IC_{50} < 100 \mu\text{mol/l}$) (Tabela 18).

Antiproliferativni potencijal sintetisanih jedinjenja je određen kolorimetrijskim MTT testom (*Microculture Tetrazolium Assays* (MTAs)) koji se koristi za *in vitro* ispitivanje hemosenzitivnosti ćelija.

Radi jednostavnijeg upoređivanja antiproliferativne aktivnosti ispitivana jedinjenja su podeljena u dve grupe: derivati propafenona i intermedijernii halkoni. Kao što se iz Tabele 18 može videti veću efikasnost u inhibiciji proliferacije malignih ćelija u kulturi pokazuju propafenonski derivati. Pokazano smanjenje preživljavanja ima dozno-zavistan karakter (SI_{50}). Osetljivosti ćelijskih linija na antiproliferativno dejstvo ispitivanih derivata je različita: HeLa ($3,0 \pm 1,5$ do $21,7 \pm 3,1$) > Fem X ($4,9 \pm 0$ do $38,2 \pm 3,0$) > K562 ($6,0 \pm 1,5$ do $37,6 \pm 2,9$) > MCF-7 ($9,7 \pm 1,6$ do $33,0 \pm 1,3$) > PC-3 ($12,6 \pm 2,4$ do $46,4 \pm 1,2$) > LS174 ($11,2 \pm 0,3$ do $72,2 \pm 0,2$). Osetljivost PBMC ćelija zdravih davalaca koje su stimulisane mitogenom, fitohemaglutininom, na proliferaciju i PBMC koje nisu stimulisane bila je podjednaka što ukazuje na pretpostavku da ciljna mesta dejstva propafenonskih derivata najverovatnije nisu molekuli uključeni u regulaciju ćelijske proliferacije. Veće vrednosti IC_{50} dobijene u eksperimentima na PBMC ukazuju na veću selektivnost derivata propafenona prema maligno transformisanim ćelijama. Najveću selektivnost među propafenonskim derivatima pokazao je 5OCl derivat (IS vrednosti iznose od 19,83 na HeLa do 2,95 na MCF-7 ćelijama). Kako je u *docking* studijama sprovedenim na homologom modelu hERG ovo

jedinjenje pokazuje najmanji broj interakcija sa izdvojenom aminokiselinskom sekvencom u pori kanala (Tabela 14) bez ključne propafenonske interakcije sa *Phe 656*, to ga čini interesantnim za dalja istraživanja u ovoj oblasti.

Ukoliko se uporede IC₅₀ vrednosti dobijene za propafenon kao odabrani *lead* molekul i vrednosti za sintetisane derivate može se konstatovati da je strukturna modifikacija terminalnog benzenovog prstena pozitivno utiče na antiproliferativno dejstvo. Sumiranjem rezultata iz Tabele 18 može se napraviti opadajući niz efikasnosti derivata prema navedenim ćelijskim linijama:

HeLa: 5OCl > 5OCF₃ > 5OCH₃ > 5OF = 5PF > 5PCH₃

Fem X: 5OCl > 5OCH₃ > 5PF > 5PCH₃ > 5CF₃ > 5OF

K562: 5OCl > 5OCH₃ ~ 5OCF₃ > 5PCH₃ > 5PF > 5OF

MCF-7: 5OCF₃ > 5OF ~ 5OCl > 5OCH₃ 5PF ~ 5PCH₃

PC-3: 5OCl > 5OCH₃ > 5OCF₃ > 5PCH₃ > 5PF > 5OF

LS174: 5OCl > 5OCF₃ ~ 5OCH₃ > 5PCH₃ > 5PF > 5OF

Uvođenje elektronegativne, lipofilne hlora grupe u *orto* položaj terminalnog benzenovog prstena doprinosi većoj efikasnosti ovog derivata u odnosu na ostale prema pet od šest maligno transformisanih ćelijskih linija (Tabela 18).

Najveću efikasnost 5OCl derivat pokazao je prema HeLa ćelijama (3 μmol/l). Za ove ćelije je poznato da poseduju Ca²⁺ propustljive kanale sa veoma malom katjonskom selektivnošću, zbog koje propuštaju K⁺ i druge jednovalentne jone. Kanali nisu voltažno zavistni i pokazuju osobine receptorskih kanala. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da 5OCl derivat svoje antiproliferativno dejstvo ostvaruje remeteći Ca²⁺ homeostazu u ćeliji za koju su odgovorni i K⁺ i Ca²⁺ kanali.

Karakteristično je da analog *orto* fluorirani derivat, 5OF za koga su *in vitro* i *in silico* ispitivanja u KVS pokazala potencijalnu blokatorsku aktivnost prema K⁺ kanalima pokazuje daleko slabije efekte (3-6 puta) u poređenju sa 5OCl derivatom. Gotovo je zanemarljiva razlika u efektima ovog derivata prema zdravim i maligno transformisanim ćelijama (Tabela 19). Građa jonskih kanala maligno transformisanih ne mora u potpunosti da odgovara građi kanala zdravih ćelija. Verovatno elektronegativnost -F u ovom slučaju nepovoljno utiče na interakcije terminalnog benzenovog prstena sa aminokiselinskim ostatcima kanala u malignoj ćeliji. Izuzetak predstavljaju MCF-7 ćelije, ćelije humanog karcinoma dojke. Efikasnost 5OCl derivata

je manja u poređenju sa 5CF3, ali gotovo identična sa 5OF derivatom. Za ove ćelije je poznato da u velikoj meri eksprimiraju Ca^{2+} kao i BK_{Ca} kanale. Derivat 5CF3 je u *in vitro* eksperimentima na aorti pacova pokazao veću selektivnost prema Ca^{2+} kanalima u poređenju sa ostalih pet derivata, te se može konstatovati da je njegova efikasnost prema MCF-7 očekivana.

Aktivnost kao i selektivnost ispitivanih halkona je daleko manja u poređenju sa derivatima propafenona, što se može pripisati njihovom nespecifičnom delovanju. Za antikancersku aktivnost halkona na ćelijskim linijama HeLa, PC-3, MCF-3 postoje literaturni podaci koji ukazuju da se aktivnost ovih jedinjenja kreće u nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama, što zavisi od strukture ispitivanih halkona¹. Rezultati ispitivanja antikancerske aktivnosti halkona u ovoj studiji pokazuju aktivnost koja je u opsegu koncentracija od 9 do 70 $\mu\text{mol/l}$, a u poređenju sa literaturnim podacima niža ili ekvivalentna. Ne postoje statistički značajne razlike u osetljivosti ćelijskih linija na ispitivane halkone što se može objasniti njihovim manje specifičan mehanizam delovanja u poređenju sa sintetisanim derivatima propafenona. Red aktivnosti uglavnom prati redosled elektronegativnosti supstituenata uvedenih u benzilni deo molekula (Slika 1A).

HeLA: 1OF > 1OCl > 1OCH₃ ~ 1CF₃ > 1PCH₃ > 1PF

Fem X: 1OF > 1OCl = 1OCF₃ > 1PF = 1PH₃ ~ 1OCH₃

K562: 1OF > 1OCF₃ > 1OCl > 1PF ~ 1PCH₃ ~ 1OCH₃

MCF-7: 1OF > 1CF₃ > 1PF > 1OCl > 1PCH₃ > 1OCH₃

PC-3: 1OCH₃ > 1OCl ~ 1OF > 1PCH₃ > 1PF > 1CF₃

LS174: 1OF > 1CF₃ > 1OCl > 1PF > 5PCH₃ > 1OCH₃

Iz halkonske grupe kao najaktivnija jedinjenja izdvajaju se 1OF ($4,8 \pm 0,6$ na K562 do $21,6 \pm 3,5$ na PC-3 ćelijskoj liniji) i 1OCl ($9,8 \pm 1,4$ na K562 do $32,2 \pm 1,2$ na LS174 ćelijskoj liniji). Indeks selektivnosti za 1OF derivat na MCF-7 je 3,67, dok je prema PC-3 svega 0,81. Nešto veću selektivnost pokazuje 1CF₃ derivat sa IS vrednostima 4,55 prema K562 i 1,04 prema PC-3 ćelijskoj liniji.

Da bi se uspostavila korelacija između strukturnih modifikacija na terminalnom benzenovom prstenu (benzil grupi) i antiproliferativne aktivnosti sintetisanih derivata propafenona i njihovih intermedijera halkona, izvedena je 2D i 3D QSAR studija u kojoj su formirani QSAR modeli. Očigledno je da je geometrija tj prostorni raspored

grupa u molekulima sintetisanih derivata od značaja kako za KVS efekte tako i za njihovo antiproliferativno dejstvo.

U sprovedenoj QSAR studiji bolju korelaciju pokazali su 3D QSAR modeli ($R^2 > 0,9$) koji su dobijeni pomoću programa *Pentacle*. Analizirajući dobijene korelacije za svih šest ćelijskih linije može se konstatovati da interakcije između sekundarne alkoholne ili amino grupe sa topološkim i hidrofobnim površinama terminalnog benzenovog prstena doprinose izraženijoj antikancerskoj aktivnosti, dok specifični odnosi između karbonilne i etarske grupe kao akceptora vodonične veze mogu biti odgovorni za smanjenu antikancersku aktivnost analiziranih propafenonskih derivata prema HeLa ćelijskoj liniji (Sl.51A i 51B) Razvijeni 3D farmakoforni HeLa model ukazuje da dalje strukturne modifikacije najaktivnijeg 5OCl propafenonskog derivata treba usmeriti ka uvođenju voluminoznih i hidrofobnih supstituenata u položaje C4 i C5 terminalnog benzenovog prstena 5OCl derivata (O-TIP: v565, v566, v568; O-DRY: v301; N1-DRY: v366)

Analizom rezultata uspostavljenog 3D QSAR (Fem-X) modela utvrđeno je da specifične interakcije između karbonilne grupe propafenonskih derivata sa topološkim i hidrofobnim površinama propil grupe na N-atomu sekundarnog amina doprinose izraženijoj antikancerskoj aktivnosti propafenonskih derivata, dok specifični odnos između N-atoma kao akceptora vodonične veze i atoma F u *para* položaju terminalnog benzenovog prstena može biti odgovoran za smanjenu antikancersku aktivnost analiziranih propafenonskih derivata prema Fem-X ćelijskoj liniji (Sl. 52A i 52B). Razvijeni 3D-farmakoforni Fem-X model ukazuje da dalje strukturne promene treba usmeriti ka uvođenju voluminoznih i hidrofobnih supstituenata u položaj C4 terminalnog benzenovog prstena kao i na modifikaciju propil grupe na N-atomu sekundarne amino, uvođenjem hidrofobnih i voluminoznih grupa (N1-TIP: v631, N1-DRY: v367, TIP-TIP: v252). Nasuprot tome supstitucija elektronegativnim grupama imala bi negativan uticaj na antitumorsku aktivnost i u slučaju Fem-X ćelijske linije trebalo bi je izbegavati (N1-N1: v164).

Na osnovu sprovedene 3D QSAR studije na K562 ćelijskoj liniji utvrđeno je da specifične interakcije između propil grupe na N-atomu sekundarnog amina i terminalnog benzenovog prstena kao i interakcije propil grupe sa sekundarnom alkoholnom grupom doprinose antikancerskoj aktivnosti propafenonskih derivata.

Analizom 3D QSAR modela (K562) može se zaključiti da specifične interakcije između fenolske grupe kao akceptor vodonične veze i fluoro grupe kao i interakcije između topoloških površina položaja C4 i C4' dva benzenova prstena smanjuju antikancersku aktivnost halkonskih derivata prema K562 ćelijskim linijama. Razvijeni 3D-farmakoforni K562 model ukazuje da dalju strukturnu promenu propafenonskih derivata treba usmeriti ka uvođenju voluminoznih grupa u položaj C2 terminalnog benzenovog prstena (N1-TIP: v633). U cilju postizanja bolje antikancerske aktivnosti halkonskih derivata prema K562 ćelijskoj liniji u sintezi novih derivata položaji C4 i C4' oba benzenova prstena trebali bi biti nesupstituisani (TIP-TIP: v239, DRY-TIP: v426) dok bi u položaje C2' ili C6' benzenovog prstena A trebalo uvoditi elektronegativne supstituente (O-TIP: v534). Nasuprot tome supstitucija u benzenovom prstenu B sa izrazito elektronegativnim grupama imala bi negativan uticaj na antikancersku aktivnost halkonskih derivata prema K562 ćelijskoj liniji (N1-N1: v164).

Na osnovu sprovedene 3D QSAR studije na MCF-7 ćelijskoj liniji (Sl. 54A) utvrđeno je da specifične interakcije između propil grupe na N atomu sekundarnog amina i topoloških i hidrofobnih površina centralnog benzenovog prstena (posebno položaja C4' i C5') izrazito doprinose antikancerskoj aktivnosti propafenonskih derivata. Razvijeni 3D-farmakoforni MCF-7 model ukazuje da dalje strukturnu promenu potentnih 5CF3/5OF propafenonskih derivata treba usmeriti ka uvođenju voluminoznih i hidrofobnih grupa u položaj 4' ili 5' centralnog benzenovog prstena (TIP-DRY: v439, DRY-DRY: v41, O-TIP: v534, v548). U cilju postizanja bolje antikancerske aktivnosti potentnih halkonskih derivata 1CF3 ili 1OF nove strukturne promene treba usmeriti ka uvođenju voluminoznih i hidrofobnih substituenata u položaj C4' benzenovog prstena A. (O-TIP: v534).

Na osnovu sprovedene 3D QSAR studije utvrđeno je da interakcije između propil grupe na N atomu sekundarnog amina sa topološkim i hidrofobnim površina centralnog benzenovog prstena (posebno položaja C4' i C5') izrazito doprinose antikancerskoj aktivnosti propafenonskih derivata prema PC-3 ćelijskoj liniji. Razvijeni 3D-farmakoforni PC-3 model ukazuje da dalje strukturne modifikacije najpotentnijih 5OCl/5OCH3 propafenonskih derivata treba usmeriti ka uvođenju voluminoznih i hidrofobnih grupa u položaj C4', C4 ili C5 benzenovih prstenova (TIP-TIP: v252, DRY-DRY: v36) istovremeno supstituišući propil grupu na N-atomu sekundarnog amina sa

hidrofobnim i elektronegativnim grupama (TIP-TIP: v252, DRY-DRY: v36, DRY-O: v294).

Na osnovu sprovedene 3D QSAR studije utvrđeno je da interakcije karbonilne ili sekundarne alkoholne grupe sa topološkim i hidrofobnim površina benzenovih prstenova (posebno položaja C4 terminalnog benzenovog prstena kao i položaja C5' centralnog benzenovog prstena) doprinose antikancerskoj aktivnosti propafenonskih derivata prema LS174 ćelijskoj liniji (Sl. 56A). Nasuprot tome interakcije između topoloških okruženja sekundarne alkoholne grupe i položaja C4'/ili C5' centralnog benzenovog prstena smanjuju antikancersku aktivnost propafenonskih derivata prema LS174 ćelijskoj liniji. Razvijeni 3D-farmakoforni LS174 model ukazuje da dalje strukturne modifikacije najpotentnijih 5OCl/5CF3 propafenonskih derivata treba usmeriti ka uvođenju voluminoznih i hidrofobnih grupa u položaj C4 terminalnog benzenovog prstena (N1-TIP: v602/630, DRY-N1: v366, TIP-TIP: v226), istovremeno supstituišući propil grupu na N-sekundarnog amina sa hidrofobnim i elektronegativnim grupama (TIP-TIP: v252, DRY-DRY: v36, DRY-O: v294).

Analizirajući rezultate ispitivanja jedinjenja može se konstatovati da bi dodatna supstitucija propil grupu na N-atomu sekundarnog amina sa hidrofobne i elektronegativnim grupama doprinela antitumorskoj aktivnosti novosintetisanih propafenonskih derivata (v252: TIP-TIP) prema svim ćelijskim linijama.

S druge strane negativan uticaj na citotoksičnu aktivnost pokazuju interakcije sekundarne alkoholne grupe propafenonskih derivata kao donora vodonične veze i hidrofobne površine terminalnog benzenovog prstena (prstena B) (v265: DRY-O) kada su u pitanju K562, Fem-X, PC-3 i LS174 ćelijske linije.

3D QSAR analiza je pokazala da supstitucija terminalnog benzenovog prstena u *orto* položaju predstavlja preduslov za antiproliferativnu aktivnost propafenonskih derivata i da se struktura i dalje može modifikovati promenama na baznom centru.

8. ZAKLJUČAK

- Na osnovu prethodno izvedene QSPR studije izvršena je sinteza šest intermedijernih halkona, trifluorometil flavanona i šest novih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona.
 - Sinteza novih aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona odvija se u pet faza koje obuhvataju reakciju aldolne kondenzacije, katalitičku hidrogenizaciju, nukleofilnu supstituciju sa epihlorhidrinom, aminolizu i prevođenje dobijenih amina u hidrohloridne soli.
 - U prvoj fazi sinteze dobijeni su intermedijerni halkoni. Halkon sa trifluorometil grupom u *orto*-položaju prstena B (1CF3) je prvi put sintetisan i poslužio je kao intermedijer u sintezi trifluorometil flavanona (FCF3).
 - Struktura i stepen čistoće novosintetisanih jedinjenja potvrđena je primenom hromatografskih (TLC, HPLC), spektroskopskih metoda (UV, FT-IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS-TOF i MS-MS) i određivanjem temperature topljenja. Struktura flavanona FCF3 potvrđena je i kristalografski.
- U *in vitro* studijama ispitana je vazorelaksantna aktivnost sintetisanih derivata propafenona.
 - Svih šest sintetisanih derivata, uključujući i propafenon, pokazuju dozno-zavisni vazorelaksantni efekat koji nije posredovan endotel-zavisnim relaksirajućim faktorom.
 - Učešće jonskih kanala u vazorelaksantnom mehanizmu dejstva derivata propafenona ispitana je u prisustvu antagonista jonskih kanala: lidokaina, nifedipina i 4-AP. Dobijeni rezultati ukazuju da su jonski kanali uključeni u mehanizam vazorelaksantnog dejstva.
 - Izvršene strukturne modifikacije u molekulu propafenona doprinose postizanju većeg stepena selektivnosti u odnosu na propafenon kao referentni standard.
 - Derivat 5PCH3 je selektivniji za K^+ kanale u odnosu na druge derivate. Srednja efektivna koncentracija za derivat 5PCH3 ($\text{pEC}_{50}=4,41$), u prisustvu antagoniste K^+ kanala, 4-AP je tri puta veća od koncentracije propafenona ($\text{pEC}_{50}=4,97$) i dva puta veća od koncentracije sledećeg u nizu po kompeticiji, *para*-fluoro supstituisanog derivata (5PF).

- U prisustvu nifedipina kao selektivnog blokatora L-Ca²⁺ kanala, najbolji antagonizam postignut je kod *orto*-trifluorometil supstituisanog derivata (5OCF3) koji ima veću selektivnost (pEC₅₀=4,55) u odnosu na propafenon (pEC₅₀=4,90), ali i ostale derivate (pEC₅₀ od 4,70 do 4,97).
 - Rezultati *docking* studije sprovedene na KcsA kanalu ukazuju da *para*-supstitucija elektropozitivnom, lipofilnom, manje voluminoznom alkil grupom doprinosi takvoj orijentaciji 5PCH3 derivata koja održava kanal u otvorenoj konformaciji i omogućava efluks K⁺ jona u ekstracelularni prostor. Hidrofobne interakcije terminalnog benzenovog prstena 5OF derivata sa odgovarajućom aminokiselinskom sekvencom u pori kanala održavaju kanal u zatvorenom stanju, blokirajući efluks jona K⁺ iz ćelije u spoljašnju sredinu.
 - *Docking* eksperimenti na izdvojenom peptidu L-Ca²⁺ kanala potvrđuju rezultate *in vitro* ispitivanja u kojima je nifedipin antagonizovao efekte 5OCF3 i 5OCl derivata. Vrednosti vezivnih energija (E = -5,26 kcal/mol i E = -5,21 kcal/mol) potvrđuju veći afinitet 5OCF3 i 5OCl derivata za L-Ca²⁺ kanal.
 - Uvođenje voluminoznih i lipofilnih supstituenata u *orto*-položaj terminalnog benzenovog prstena molekula propafenona povećava selektivnost prema L-Ca²⁺ kanalima.
- Primenom akonitinskog testa u *in vivo* eksperimentima ispitivan je antiaritmijski potencijal halogenovanih derivata propafenona.
- U *docking* eksperimentima na homologom modelu hERG kanala, derivati kod kojih su za terminalni benzenov prsten vezane -CH₃ i -CF₃ grupe ostvaruju interakcije sa *Phe 656* i *Tyr 652*, aminokiselinama odgovornim za neželjene efekte mnogih lekova. Kod halogenovanih derivata (5PF i 5OCl), samo propil grupa na protonovanom sekundarnom aminu ostvaruje interakcije sa hidrofobnim bočnim nizom *Tyr 652*, dok je ključna interakcija sa *Phe 656* izostala.
 - Uvođenje halogena u terminalni benzenov prsten ne utiče na negativno hronotropno dejstvo propafenona. Proaritmogeni efekat je potvrđen samo

kod 5OF derivata u dozi od 6 mg/kg, koja kod druga dva derivata ne dovodi do proaritmogenog efekta.

- Doza od 6 mg/kg 5OF derivata odlaže pojavu VES-a u potpunosti kod 83 % eksperimentalnih životinja, što se istom dozom 5PF, 5OCl derivata i propafenona ne postiže. Derivat 5PF pokazuje određeni potencijal sprečavanja poremećaja srčanog ritma indukovanih akonitinom.
- Antiproliferativna aktivnost derivata propafenona i njihovih intermedijera, halkona, ispitana je MTT testom na šest humanih malignih ćelijskih linija (HeLa, Fem-X, LS174, K562, PC3 i MCF-7).
 - Selektivnost testiranih jedinjenja ispitana je na mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih osoba. Ispitivana jedinjenja iz grupe halkona, kao i sintetisani derivati propafenona, pokazuju antiproliferativnu aktivnost prema svih šest malignih ćelijskih linija ($IC_{50} < 100 \mu\text{mol/l}$).
 - Veću efikasnost i selektivnost pokazuju sintetisani derivati propafenona. Najaktivnije i najselektivnije jedinjenje iz grupe propafenonskih derivata je 5OCl (IC_{50} od $3,0 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$ na HeLa do $20,2 \pm 4,3 \mu\text{mol/l}$ na MCF-7 ćelijskoj liniji, IS od $19,63 \mu\text{mol/l}$ na HeLa do $2,95 \mu\text{mol/l}$ na MCF-7 ćelijskoj liniji).
 - Kvantitativan odnos strukture i antiproliferativne aktivnosti sintetisanih jedinjenja ispitan je 2D i 3D QSAR studijama. Bolja korelacija postignuta je sa 3D QSAR modela ($R^2 > 0,9$) koji pokazuju da supstitucija terminalnog benzenovog prstena u *orto*-položaju predstavlja uslov za antiproliferativnu aktivnost propafenonskih derivata.

9. LITERATURA

1. Batovska DI, Todorova TI. Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. *Current Clinical Pharmacology*. 2010; 5:1-29.
2. Lowes DJ, Guiguemde WA, Connelly MC, et al. Optimization of propafenone analogues as antimalarial leads, *J Med Chem*. 2011;54(21):7477-85.
3. Jabeen I, Pleban K, Rinner U, Chiba P, Ecker GF. Structure-activity relationships, ligand efficiency, and lipophilic efficiency profiles of benzophenone-type inhibitors of the multidrug transporter P-glycoprotein. *J Med Chem*. 2012; 55(7):3261-73.
4. Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* 2007; 42:125-137.
5. Ansari FL, Nazir S, Noureen H, Mirza B. Combinatorial Synthesis and Antibacterial Evaluation of an Indexed Chalcone Library. *Chem. Biodivers*. 2005; 1656-1663.
6. Lahtchev KL, Batovska DI, Parushev StP, Ubiyvovk VM, Sibirny AA. Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. *Eur. J. Med. Chem.* 2008; 43:2220-2228.
7. Dimmock JR, Kandepu NM, Hetherington M, et al. Cytotoxic Activities of Mannich Bases of Chalcones and Related Compounds. *J. Med. Chem.* 1998; 41:1014-1026.
8. Sabzevari O, Galati G, Moridani MY, et al. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chem-Bio. Interac.* 2004;148:57-67.
9. Lin YM, Zhoua Y, Flavina MT, et al. Chalcones and Flavonoids as Anti-Tuberculosis Agents. *Bioorgan. Med. Chem* 2002; 10:2795-2802.
10. Dimmock JR, DW Elias, MA Beazely et al. Bioactivities of Chalcones, *Current Med. Chem.* 1999;6:1125-1149.
11. Chanet A, Milenkovic D, Manach C, et al. Citrus Flavanones: What Is Their Role in Cardiovascular Protection? *J Agric Food Chem*. 2012;60(36):8809-8822
12. Lu YH, Su MY, Huang HY, Lin-Li, Protective effects of the citrus flavanones to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide *Neurosci Lett*. 2010; 484(1):6-11.
13. Fischer M: Propafenone-a new generation anti-arrhythmia agent. *Med Klin* 1980;75:39-41.
14. Jawinska-Tamawska E, Orzechowska-Juzwenko K., Niewinski P et al., The influence of CYP2D6 polymorphism on the antiarrhythmic efficacy of propafenone in patients with paroxysmal atrial fibrillation during 3 months propafenone prophylactic treatment. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2001;36:288-292
15. Echt DS, Liebson PR, Mitchell B, et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide or placebo; the Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J. Med.* 1991;324:781-788.

16. Gojković- Bukarica Lj, Kažić T. Jonski kanali i kanalopatije.U: Klinička kardiovaskularna farmakologija.Urednik: Kažić T, Ostojić M., 4. izdanje, Integra, Beograd 2004;37-56.
17. Kažić T. Lekovi propiv aritmije U: Klinička Kardiovaskularna farmakologija, Urednik, Kažić T., Ostojić M., Integra , Beograd, 2004 407-448.
18. Chiba P, Burghofer S, Richter E, et al. Synthesis, Pharmacologic Activity and Structure-Activity-Relationships of a Series of Propafenone-Related Modulators of Multi-Drug-Resistance. *J. Med. Chem.* 1995;38:2789-2793.
19. Thai KM, Windisch A, Stork D, et al. The hERG potassium channel and drug trapping: insight from docking studies with propafenone derivatives. *ChemMedChem.* 2010;5(3):436-442.
20. Madeja M, Steffen W, Mesic I, et al. Overlapping binding sites of structurally different antiarrhythmics flecainide and propafenone in the subunit interface of potassium channel Kv2.1. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33898-33905.
21. Franke A, Müller J, Helmut L. et al. Aminopropanol derivatives of 2-hydroxy- β -phenylpropionophenones, pharmaceutical compositions and use, 1985 United States Patent 4,540,697.
22. Lotz B., Greier G., Aryloxalkylamine derivatives and uses thereof, 1994 United States Patent, 5,334,602.
23. Doyle, DA. Morais Cabral J, Pfuetzner RA et al. The structure of the potassium channel:molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*,1998;280:69–77.
24. Jiang, Y. Lee A, Chen J et al. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002;417: 515–522.
25. Jiang, Y. Lee A, Chen J, et al. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺channel. *Nature* 2003,423:33–41
26. Mackinnon R. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004;43:4265–4277.
27. Cohen CN, The Molecular Modeling Perspective in Drug Design, In: Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design, ed. Cohen CN, San Diego, California, Academic Press Inc., 1996:1-17.
28. Kinghorn DA, Drug Discovery from Natural Products, In: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry* 7th edition, Lemke TL, Williams DA., Baltimore eds. Lippincott Williams & Wilkins, 2007:13-29
29. Patrick GL. Drug discovery and drug development, In: An Introduction to Medicinal Chemistry, 2nd edition, New York: Oxford University Press, 2001:142-190
30. Macarron R, Banks MN, Bojanić D, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery* 2011;10:188-195.

31. Leacha R, Gillet VJ, Lewis RA, Taylor R., Three-Dimensional Pharmacophore Methods in Drug Discovery. *J.Med:Chem.* 2010; 53(2):539-558.
32. Todeschini R.; Consonni V.. Introduction, Molecular Descriptors for Chemoinformatics., Germany, WILEY-VCH,Verlag GmbH and Co KGaA 2009: XVI-XVII
33. Luque Ruiz I, , Gómez-Nieto MÁ, Computational Science and its Applications ICCSA 2008, Workshop on Molecular Simulations Structures and Processes (MOSSAP 2008) Lecture Notes in Computer Science, Perugia, Italy, June 30–July 3, 986
34. van de Waterbeemd H, Rose S. Quantitative Approaches to Structure Activity Relationships. In: The Practice of Medicinal Chemistry, Ed Wermuth C., 3th edition San Diego, California, Academic Press Inc, 2008: 481-490.
35. Scitor T, Medina-Franco JL, Do Q.-Tet al. How to recognize and workaroud pitfalls in QSAR studies: a critical review. *Curr. Med. Chem.* 2009;16: 4297-4313.
36. Tropsha A, Gramatica P, Gombar VJ. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. *QSAR & Comb. Sci.* 2003;22: 69–77.
37. Hansch C, Fujita T. p-sigma-pi Analysis. A Method for the correlation of Biological Activity and Chemical Structure *J.Am,Chem. Soc.* 1964;86(8):1616-1626.
38. Free SM, Wilson JW, A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *J.Med.Chem.* 1964; 7(4):395-399.
39. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking:Current status and future challenges. *Proteins.* 2006; 65(1):15-26.
40. Ott M. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA), CoMFA tutorial: <http://www.cmbi.kun.nl/edu/bioinf4/comfa-Prac/comfa.shtml>
41. Eliel EL, Allinger NL, Angyal S J et al. Conformational Analysis, New York, J.Wiley, 1965: 1.
42. Westheimer FH, Mayer JE, The Theory of the racemization of optically active derivatives of diphenyl. *J. Chem. Phys.* 1946;14:733-738
43. Hendrickson JB. Molecular geometry.I.Machine computation of the common rings. *J. Am. Chem. Soc.* 1961;83:4537-4547.
44. Allinger NL, Tribble MT, Miller MA, et al. Conformational analysis. LXIX. Improved force field for the calculation of the structures and energies of hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.* 1971; 93:1637-1648.
45. Blaney JM, Jorgensen EC, Connolly ML, Ferrin TE, Langridge R, Oatley SJ, Burridge JM, Blake CC Computer graphics in drug design: molecular modeling of thyroid hormone-prealbumin interactions. *J Med Chem.* 1982,25(7):785-90.
46. Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S. Overcoming the challengers of membrane protein crystallography.*Curr.OpinStruct.Biol.* 2008, 18(5):581-586.

47. Deane CM, Blundell TL, Protein Comparative Modelling and Drug Discovery. In: The Practice of Medicinal Chemistry, Ed. Wermuth CG., London, Academic Press, 2003, 445-458
48. Xiang Z. Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Curr Protein Pept Sci.* 2006;7(3):217-227.
49. Grant MA, Protein Structure Prediction in Structure –based Ligand Design and Virtual Screening. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2009;12(10):940-960.
50. Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW, A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2002;16:151-166.
51. Guvench O, MacKerell Jr AD. Computational evaluation of protein-small molecule binding. *Curr. Opin Struct Biol.* 2009;9(1):56-61.
52. Ouadid-Ahidouch H, Soriani O, Besson P, et al. Voltage-Gated Ion Channels, New Targets in Anti-Cancer Research , *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2007;2:189-202.
53. Arcangeli A., Becchetti A, New Trends in Cancer Therapy: Targeting Ion Channels and Transporters, *Pharmaceuticals* 2010,3:1202-1224.
54. Minghua L, Zhi-Gang X. Ion channels as targets for cancer therapy *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2011;3(2):156-166.
55. Kunzelmann K., Ion Channels and cancer, *J. Membrane Biol.* 2005,205:159-173.
56. Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets, *Drug Discov. Today* 2000, 5:506-520.
57. Triggle DJ, The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels, *Eur. J. Pharmacol.* 1999;375:311-325.
58. Becchetti A. Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer, *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301(2):C255-265.
59. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, et al. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy, *Curr Med Chem.* 2009;16(1):66-93.
60. Armstrong CM. Gating currents. *Scholarpedia*, 2008, 3(10):3482-3489
61. Hodgkin, AL, Huxley AF. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre *Nature* 1939,144:710-711.
62. Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981;391(2):85-100
63. Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA. Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel, *Cell.* 1987;50(3):405-413.

64. Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, et al. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science*. 1987;237(4816):770-775.
65. Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, et al. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*., *Nature*. 1988;331(6152):137-142.
66. Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, et al. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*, *EMBOJ*. 1995;14(21):5170-5178.
67. Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 2001;414:37 – 42.
68. Yamagishi T, Li RA, Hsu K, et al. Molecular architecture of the voltage-dependent Na channel: functional evidence for alpha helices in the pore. *J. Gen. Physiol.* 2001;118:171–182.
69. Anson L, Introduction Ion channels, *Insight Nature* 2006, 440(7083):439-489
70. Wulff H, Zohorov B. K Channel Modulators for the Treatment of Neurological Disorders and Autoimmune Diseases. *Chem. Rev.*2008, 108: 1744-1773.
71. Aidely DJ. The physiology of excitable cell. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
72. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP. et al. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol Rev.* 2000;52:557–593.
73. Madeja M, Steffen W, Mesic I, et al. Overlapping binding sites of structurally different antiarrhythmics flecainide and propafenone in the subunit interface of potassium channel Kv2.1. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33898-33905.
74. Caballero NA, Francisco J, Niño MA, et al. Molecular docking study of the binding of aminopyridines within the K⁺ channel. *J Mol Model* 2007;13:579–586.
75. Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, et al. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*,2004;429(6992):671-675.
76. Davood A, Nematollahi AR, Iman M, Shafiee A. Synthesis and docking studies of new 1,4-dihydropyridines containing 4-(5)-Chloro-2-ethyl-5-(4)-imidazolyl substituent as novel calcium channel agonist, *Arch. Pharm. Res.* 2009; 32(4):481-487.
77. Doupnik CA, Davidson N and Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol.*1995;5:268–277.
78. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, et al. Molecular diversity of K1 channels. *Ann NY Acad Sci.* 1999;868:233–285.
79. Cook N.S., Quast U. Potassium channels pharmacology. In: Potassium channels: Structure, classification, function and therapeutic potential: 1stedition, Cook NS ed., New York, John Wiley and Sons, 1990:181-258.

80. Rang, HP *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2003:60.
81. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):473–508.
82. www.tocris.com
83. Monsuez J. Cardiac potassium currents and channels--part I: basic science aspects. *J. Int J Cardiol*. 1997;61(3):209-219.
84. MacKinnon R. Using mutagenesis to study potassium channel mechanisms. *J Bioenerg Biomembr*. 1991;23(4):647-63.
85. Papazian DM, Shao XM, Seoh SA, et al. Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel. *Neuron*. 1995;14(6):1293-1301.
86. Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*. 1996;16(6):1159-1167.
87. Brown AM, Drewe JA, Hartmann HA, et al. The potassium pore and its regulation *Ann N Y Acad Sci*. 1993;707:74-80.
88. Yellen G, Sodickson D, Chen TY, Jurman ME An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J*. 1994;66(4):1068-1075.
89. Rennie KJ, Weng T, Correia MJ. Effects of KCNQ channel blockers on K⁺ currents in vestibular hair cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 2001;280:C473–C480.
90. Jentsch TJ. Neuronal potassium KCNQ channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 2000;1:21–30
91. Perry M, De Groot MJ, Helliwell R, et al. Structural determinants of HERG channel block by clofilium and ibutilide. *Mol Pharmacol* 2004;66:240–249.
92. Warmke JW, Ganetzky BA. Family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(8):3438-3442.
93. Ascroft FM. *Ion Channels and Disease*, San Diego, California, Academic Press 2000,
94. Tseng GN. I(Kr): the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:835–849.
95. Vandenberg JI, Walker BD, Campbell TJ. HERG K_t channels: friend and foe. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:240–246.
96. Stansfeld PJ, Gedeck P, Gosling M, et al. Drug Block of the hERG Potassium Channel: Insight From Modeling. *Proteins*. 2007;68:568–580.
97. Liu J, Zhang M, Jiang M, et al. Structural and functional role of the extracellular s5-p linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol*. 2002;120:723–737.

98. Torres AM, Bansal PS, Sunde M, et al. Structure of the HERG K_p channel S5P extracellular linker: role of an amphipathic α -helix in C-type inactivation. *J Biol Chem* 2003;278:42136–4214
99. Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, et al. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* 1998;95:649–655.
100. Kamiya K, Niwa R, Mitcheson JS, et al. Molecular determinants of HERG channel block. *Mol Pharmacol* 2006;69:1709–1716.
101. Perry M, Stansfeld PJ, Leaney J, et al. Drug binding interactions in the inner cavity of HERG channels: molecular insights from structure-activity relationships of clofilium and ibutilide analogs. *Mol Pharmacol*. 2006;69:509–519.
102. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC A structural basis for drug-induced long QT syndrome *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12329-33.
103. Mitcheson JS, Perry MD, Molecular determinants of high-affinity drug binding to HERG channels, *Curr.Opin. drug Discovery Dev*. 2003;6:667-674.
104. Ishii K, Kondo K, Takahashi M, et al. An amino acid residue whose change by mutation affects drug binding to the HERG channel, *FEBS Lett*. 2011;506:191-195.
105. Rajamana R., Tounge BA, Li J, et al. A two state homology model of the hERG K channel: application to ligand binding, *Bioorg.Med.Chem.Lett*. 2005;15:1737-1741.
106. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006;440(7083):463-469.
107. Castle NA, Strong PN. Identification of two toxins from scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) venom which block distinct classes of calcium-activated potassium channel. *FEBS Lett*. 1986;209(1):117-121.
108. Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science*. 1991;253(5019):551-555.
109. Wei A, Solaro C, Lingle C, et al. Calcium sensitivity of BK-type K_{Ca} channels determined by a separable domain. *Neuron*. 1994;13:671–681.
110. Pantazis A and Olcese R. Relative transmembrane segment rearrangements during BK channel activation resolved by structurally assigned fluorophore–quencher pairing. *J Gen Physiol* 2012;140:207-218.
111. Schreiber M and Salkoff L A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*. 1997;73:1355-1363.
112. Enyedi P, Czirják G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*. 2010;90(2):559-605.
113. Shyng SL and Nichols CG. Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J. Gen. Physiol*. 1997;110:655–664.

114. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993;362:31–38.
115. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, et al. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 2010;90(1):291-366.
116. Lu Z., MacKinnon R. Electrostatic tuning of Mg^{2+} affinity in an inward-rectifier K^+ channel. *Nature.* 1994;371:243–246.
117. Wible BA, Taglialatela M, Ficker E, et al. Gating of inwardly rectifying K_1 channels localized to a single negatively charged residue. *Nature.* 1994;371:246–249.
118. Birnbaumer L. Expansion of signal transduction by G proteins The second 15 years or so: From 3 to 16 α subunits plus $\beta\gamma$ dimers. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(4):772–793.
119. Corey S, Clapham DE. Identification of native atrial G-protein-regulated inwardly rectifying K^+ (GIRK4) channel homomultimers. *J Biol Chem.* 1998;273(42):27499-27504.
120. Shen WK, Kurachi Y. Mechanisms of adenosine-mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995;70: 274-291.
121. Noma A, ATP-regulated K channels in cardiac muscle, *Nature* 1983;305: 147-148.
122. Edwards G., Weston AH, Effects of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle. In Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. III, Eds Szekers V, PappJP, Heidelberg, Springer, 1994: 469-531
123. Jovanović A, Gojković Lj., Kazić T. Et al, Relaxation of human uterine artery in response to pinacidil: predominant role for ATP-dependent potassium channels. *Arch Int Pharmacodyn* 1994;327:344-354.
124. Gribble FM, Ashfield R, Ammälä C, et al. Properties of cloned ATP-sensitive K^+ currents expressed in *Xenopus* oocytes, *J Physiol.* 1997;498(Pt 1):87-98.
125. Kovacs RJ, Nelson MT. ATP-sensitive K^+ channels from aortic smooth muscle incorporated into planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 1991;26:H604–H609.
126. Jahangir A and Terzic A. K_{ATP} channel therapeutics at the bedside K_{ATP} channel therapeutics at the bedside. *J Mol Cell Cardiol.* 2005, 39(1): 99–112.
127. Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, et al. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 1995;376:690–695.
128. Volk KA, Matsuda JJ and Shibata EF. A voltage-dependent potassium current in rabbit coronary artery smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)* 1991;439: 751–768.
129. Muraki K, Imaizumi Y, Kojima T, et al. Effects of tetraethylammonium and 4-aminopyridine on outward currents and excitability in canine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1990;100(3):507-515.
130. Kazić T, Gojković-Bukarica Lj. Potassium channels and the development of new drugs. *Med Pregl.* 1998;51(11-12):481-488.

131. Beech DJ, Bolton TB. Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J Physiol.* 1989;418:293-309.
132. Okabe K, Terada K, Kitamura K, et al. Selective and long-lasting inhibitory actions of the dihydropyridine derivative, CV-4093, on calcium currents in smooth muscle cells of the rabbit pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;243(2):703-710.
133. Quast U, Cook NS. Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1989;10(11):431-435.
134. Hille B.. Ionic channels of excitable membranes. 3rd edition, Sunderland, MA, Sinauer Associates, 2001.
135. Heginbotham L, Lu Z, Abramson R, et al. Mutations in the K⁺ channel signature sequence *Biophys.J.* 1994;66:1061-1067.
136. Heginbotham L, MacKinnon R. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 1992; 8:483-491.
137. Lockhart DJ, Kim PS. Internal stark effect measurement of the electric field at the amino terminus of an alpha helix, *Science.* 1992;257(5072):947-951.
138. Aqvist J, Luzhkov V. Ion permeation mechanism of the potassium channel, *Nature.* 2000, 404:881–884.
139. Zhou Y, MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: Charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* 2003;333(5):965–975.
140. Hodgkin Al, Keynes RD. The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J Physiol.* 1955;128(1):61-88.
141. Tikhonov DB, Zhorov BS. Sodium channels: ionic model of slow inactivation and state-dependent drug binding. *Biophys J.* 2007;93(5):1557-1570.
142. Taylor CP, Meldrum BS. Na⁺ channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(9):309-316.
143. Bruhova I, Tikhonov DB and Zhorov BS. Access and Binding of Local Anesthetics in the Closed Sodium Channel. *Mol Pharmacol.* 2008;74(4):1033-1045.
144. Catterall WA: From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26:13-25.
145. Catterall WA, Scher T, West JW et al., Structure and modulation of voltage gated sodium Channels. In: Ion channels in the cardiovascular System,. Spooner PM, Brown AM, Catterall WA et al. eds, New York ,Future, Armonk, 1994:317-341.
146. Sato C, Matsumoto G. Sodium channel functioning based on an octagonal structure model. *J Membr Biol.* 1995;147(1):45-70.
147. Denac H, Mevissen M, Scholtysik G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362(6):453-479.

148. Rohl CA, Boeckman FA, Baker C, et al. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* 1999;38:855-861.
149. Kellenberger S., West JW, Scheurer T, et al. Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *J Gen Physiol.* 1997;109:589-605.
150. Sato C, Ueno Y, Asai K, et al. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* 2001;409:1047-1051.
151. Schlieff T, Schonherr R, Imoto K, et al: Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur Biophys J.* 1996;25:75-91.
152. Sun YM, Favre I, Schild L, et al. On the structural basis for size-selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel. Effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity, inhibition by Ca²⁺ and H⁺, and molecular sieving. *J Gen Physiol* 1997;110:693-715.
153. Favre I, Moczydlowski E, Schild L. On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel. *Biophys J.* 1996;71(6):3110-3125.
154. Zhorov BS, Tikhonov DB. Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: pore architecture and ligand action. *J Neurochem.* 2004;88(4):782-799.
155. Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, et al. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;356:441-443.
156. Catterall WA. Physiology. A one-domain voltage-gated sodium channel in bacteria. *Science.* 2001;294(5550):2306-2308.
157. Ren D, Navarro B, Xu H, et al. A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* 2001; 294:2372-2375.
158. Wood JN, Baker M. Voltage-gated sodium channels. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(1):17-21.
159. Tamkun MM, Knittle TJ, Deal KK et al., Molecular physiology of voltage-ated potassium and sodium channels, In: Ion channels in the cardiovascular System, Spooner PM, Brown AM, Catterall WA et al eds, New York, Future, Armonk, 1994:287-317
160. Sheets MF, Fozzard HA, Lipkind GM, et al. Sodium channel molecular conformations and antiarrhythmic drug affinity. *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20(1):16-21.
161. Sato H, Yamada C, Konno C, et al. Hikino H Pharmacological actions of aconitine alkaloids. *Tohoku J Exp Med.* 1979;128(2):175-187.
162. Varadi G, Strobeck M, Koch S, et al. Molecular elements of ion permeation and selectivity within calcium channels. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1999;34(3):181-214.
163. Catterall WA. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science.* 1988;242(4875):50-61.

164. Stokes DL, Wagenknecht T. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: structure and function of Ca²⁺-ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem.* 2000; 267(17):5274-5279.
165. Fatt P, Katz B. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 1953;120(1-2):171-204.
166. Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;139:33-87.
167. Lacinová L. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* 2005, Suppl 1:1-78.
168. Annette C. Dolphin A. Short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol.* 2006;147:S56-S62.
169. Lory P, Chemin J. Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11(5):717-722.
170. Roden DM. Antiarrhythmic drugs. In: Goodman and Gillman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11. edition, Eds Gillman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, Oxford, Pergamon Press 2002:933-969.
171. Llinás R, Yarom Y. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol.* 1981;315:549-67
172. Welling A, Kwan YW, Bosse E, et al. Subunit-Dependent Modulation of Recombinant L-Type Calcium Channels Molecular Basis for Dihydropyridine Tissue *Circ Res.* 1993;73:974-980
173. Llinás R, Yarom Y. Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones *in vitro.* *J Physiol.* 1981 ,315:569-584.
174. Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature.* 1999;402(6763):813-817.
175. Yang J, Ellinor PT, Sather WA, et al. Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature.* 1993;366:158-161.
176. Varadi G, Strobeck M, Koch S, et al. Molecular elements of ion permeation and selectivity within calcium channels *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1999;34:181-214.
177. Lipkind GM. and Fozzard HA. Modeling of the outer vestibule and selectivity filter of the L-type Ca²⁺ channel. *Biochemistr.* 2001;40:6786-6794.
178. Bosse E, Regulla S, Biel M, et al. The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1990;267(1):153-156.
179. Salomone S, Godfraind T. Radioligand and functional estimates of the interaction of the 1,4-dihydropyridines, isradipine and lacidipine, with calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1993;109(1):100-106

180. O'Rourke B., Back PH, Mejia-Alvarez R. et al Calcium channels as biosensors of cellular energy metabolism: effects on magnesium and Mg-ATP. channels. In: Ion channels in the cardiovascular System, Spooner PM, Brown AM, Caterall WA et al eds. New York Future, Armonk, 1994:441-463.
181. Bean BP. Beta-adrenergic modulation of cardiac calcium channels gating. channels. In: Ion channels in the cardiovascular System. Spooner PM, Brown AM, Caterall WA et al. eds, New York, Future, Armonk, 1994:237-253.
182. Kamm KE, Stull JT. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem.* 2001;276(7):4527-4530.
183. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation *Adv Physiol Educ.* 2003;27(4):201–206
184. The cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. Preliminary report: Effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. *N Engl. J. Med.* 1989;321:406-412.
185. Sheldon R, Connolly S, Krahn A et al. On behalf of the CIDS Investigation. Identification of patients most likely to benefit from implantable cardioverter/defibrillator. *Circulation* 2000;101:1660-1664.
186. Roubart M, Zipes DP. Genesis of cardiac arrhythmias: Electrophysiological consideration. In: Heart Disease, Braun-Wald E, Zipes DP, Libby P, Philadelphia, WB Saunders Co, 2001:659-699.
187. Grujić M. Srčane aritmije: elektrofiziologija, kliničke karakteristike, dijagnostika, lečenje, Eds Ostojić M, Dimković S, Đurić D., Beograd, Medicinski fakultet, 2010.
188. Harvey W. The Circulation of the Blood and Other Writings. London, Everyman: Orion Publishing Group, 1993.
189. Andrew G. Harvey's Heart, The Discovery of Blood Circulation. Cambridge, England: Icon Books, 2001.
190. Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, et al. Hurst's the heart. New York, NY: McGraw-Hill, 1999.
191. Fogoros RN. Mechanisms of cardiac tachyarrhythmias. In: Antiarrhythmic drugs: a practical guide 2nd edition, Malden, Blackwell Publishing, 2007:3-35.
192. Grant AO. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2009;(2):185-194.
193. Vos MA, Lerman BB. Automaticity and triggered activity. In: Foundations of Cardiac Arrhythmias, Spooner PM, Rosen MR eds, Marcel Dekker Inc 2001:424-448.
194. Cooper J. Electrocardiography 100 years ago. Origins, pioneers, and contributors. *N Engl J Med.* 1986;315(7):461–464.
195. Bharuch DB, Podrid PhJ: The Use of the Electrocardiogram in the Diagnosis of Arrhythmia. In: Cardiac Arrhythmia-Mechanisms, Diagnosis and Management 2nd edition, Podrid PJ, Kowey PR. eds, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001:127-164.

196. Kennedy HL, Podrid PHJ: Role of Holter monitoring and Exercise Testing for Arrhythmia Assessment and Management: In: Cardiac Arrhythmia-Mechanisms, Diagnosis and Management. 2nd edition, Podrid PJ, Kowey PR eds., Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001:165-194.
197. , Vaughan Williams EM, A classification of antiarrhythmias. Actions reassessed after a decade of new drugs. *J.Clin. Pharmacol.* 1984;24:129-147.
198. Miller JM, Zipes DP. Therapy for cardiac arrhythmias. In: Braunwald's Heart Diseases: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 7th edition, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, et al. eds, Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005:713-766.
199. Task Force of Working Group on Arrhythmias of the European Society of cardiology. The *Sicilian Gambit*. A new approach to the classification of antiarrhythmic drugs based on their actions on arrhythmogenic mechanisms. *Circulation* 1991;84:1831-1851.
200. No authors listed. Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. *N Engl. J. Med.* 1989;321(6):406-412.
201. Rythmol Propafenone Drug Information: Description, User Reviews www.rxlist.com/rythmol-drug.htm
202. Funck-Brentano C, Kroemer HK, Lee JT, et al. Propafenone. *N Engl J Med.* 1990;322(8):518-525.
203. Edrich T, Wang S-Y, Wang GK, State-dependent block of human cardiac hNav1.5 Sodium Channels by propafenone, *J. Membr. Biol.* 2006;207:35-43.
204. Alboni P, Botto GL, Baldi N, et al. Outpatient treatment of recent-onset atrial fibrillation with the "pill-in-the-pocket" approach. *N Engl J Med.* 2004;351(23):2384-2391.
205. Benz I, Kohlhardt M. Responsiveness of cardiac Na⁺ channels to antiarrhythmic drugs: the role of inactivation. *J Membr Biol.* 1991;122:267-278.
206. Tamargo J, Valanzuela C and Delpón E. New insights into the pharmacology of sodium channel blockers. *Eur heart J.* 1992;13:2-13
207. Glaaser IW, Clancy CE. Cardiac Na⁺ channels as therapeutic targets for antiarrhythmic agents. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;171:99-121.
208. Kuo CC, Bean BP. Na⁺ channels must deactivate to recover from inactivation *Neuron.* 1994;12(4):819-829.
209. Kohlhardt M and Seifert C. Tonic and phasic I_{Na} blockade by antiarrhythmics. Different properties of drug binding to fast sodium channels as judged from V max studies with propafenone and derivatives in mammalian ventricular myocardium, *Pflüegers Arch.*, 1983;396:199-209.
210. Slawsky MT, Castle NA. K⁺ channel blocking actions of flecainide compared with those of propafenone and quinidine in adult rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:66-74.

211. Duan D, Fermini B, Nattel S. Potassium channel blocking properties of propafenone in rabbit atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:1113–1123.
212. Mergenthaler J, Haverkamp W, Huttenhofer A, et al. Blocking effects of the antiarrhythmic drug propafenone on the HERG potassium channel. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363:472–480.
213. Cahill SA and Gross GJ. Propafenone and Its Metabolites preferentially Inhibit I_{Kr} in Rabbit ventricular myocytes. *JPET*. 2004;3008:59-65
214. Witchel HJ, Dempsey CE, Sessions RB, et al. The low-potency, voltage-dependent HERG blocker propafenone--molecular determinants and drug trapping. *Mol Pharmacol*. 2004; 66(5):1201-1212,
215. Bryson HM, Palmer KJ, Langtry HD, et al. Propafenone. A reappraisal of its pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic use in cardiac arrhythmias. *Drugs* 1993;45:85-130.
216. Choe H, Nah KH, Lee SN, et al. A novel hypothesis for the binding mode of HERG channels blockers, *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:72-78.
217. Windisch A, Timin EN, Schwarz T, et al. Trapping and dissociation of propafenone derivatives in HERG channels. *Br J Pharmacol*. 2011;162:1542-1552.
218. Fei L; Gill JS, McKenna WJ, et al. Effects of propafenone on calcium current in single ventricular myocytes of guinea pig. *Br J Pharmacol*. 1993;109:115-182.
219. Carrón R, Pérez-Vizcaino F, Delpón E, et al. Effects of propafenone on ⁴⁵Ca movements and contractile responses in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1991;103(2):1453-1457.
220. Pérez-Vizcaino F, Fernández del Pozo B, Zaragoza F et al. Voltage- and time-dependent inhibitory effects on rat aortic and porcine coronary artery contraction induced by propafenone and quinidine. *Br J Pharmacol* 1994;113(4):1281–1288.
221. Cogolludo AL, Perez-Vizcaino F, Tamargo J, Antagonism by class I antiarrhythmic drugs of levromakalim-induced relaxation in isolated rat aorta, *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287(1):81-6.
222. Ivković B, Vladimirov S, Novaković R, et al. The novel phenylpropiophenone derivatives induced relaxation of isolated rat aorta. *Arzneimittelforschung*. 2012;62(7):345-350.
223. Greenberg S, Cantor E, Paul J. Beta-adrenoceptor blocking activity of diprafenone in anesthetized dogs: comparison with propafenone and propranolol. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;14(3):444-453.
224. Stoschitzky K, Klein W, Stark G, et al. Different stereoselective effects of (R)- and (S)-propafenone: clinical pharmacologic, electrophysiologic, and radioligand binding studies. *Clin Pharmacol Ther*. 1990;47(6):740-746.
225. Connolly S, Lebsack C, Winkle RA, et al. Propafenone disposition kinetics in cardiac arrhythmia. *Clin Pharmacol Ther* 1984;36:163-168.

226. Xie S, Zeng S. Stereoselective glucuronidation of propafenone and its analogues by human recombinant UGT1A9. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010;58(6):879-883.
227. Tan W, Li Q, McKay G, et al. Identification and determination of phase I metabolites of propafenone in rat liver perfusate. *J Pharm Biomed Anal*. 1998;16(6):991-1003.
228. Reder-Hilz B, Ullrich M, Ringel M, et al. Metabolism of propafenone and verapamil by cryopreserved human, rat, mouse and dog hepatocytes: comparison with metabolism *in vivo*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(4):408-417.
229. Cai WM, Chen B, Cai MH, et al. Influence of CYP2D6 activity on the kinetics of propafenone enantiomers in Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47:553-556.
230. Mizutani T, Masuda M, Nakai E, et al. Genuine functions of P-glycoprotein(ABCB1). *Curr Drug Metab* 2008;9(2):167-174.
231. Baguley BC, Multidrug Resistance in cancer. In: Multidrug Resistance in cancer Zhou J, Totowa NJ eds, Humana Press, 2010:1-14.
232. Goldstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer*. 1996;32A(6):1039-1050.
233. van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(3):192-204.
234. Chiba P, Burghofer S, Richter E, et al. Synthesis, pharmacologic activity, and structure-activity relationships of a series of propafenone-related modulators of multidrug resistance. *J Med Chem*. 1995;38(14):2789-2793.
235. Thai KM, Windisch A, Stork D, et al. The hERG potassium channel and drug trapping: insight from docking studies with propafenone derivatives. *ChemMedChem*. 2010;5(3):436-442
236. Chiba P, Rebitzer S, Richter E, et al. Synthesis and pharmacological activity of the stereoisomers of GP-88, a propafenone-type modulator of multidrug resistance. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8(7):829-832.
237. D. Kaiser, M. Smiesko, S. Kopp, et al. Interaction field based and hologram based QSAR analysis of propafenone-type modulators of multidrug resistance. *Med. Chem*. 2005;1:431-444.
238. Schmid D, Staudacher DL, Loew HG et al. A subset of highly effective propafenone-type MDR-modulators lacks effects on cardiac action potential and mechanical twitch parameters of rat papillary muscles. *J Pharmacol. Exp. Ther*. 2003;307:589-596.
239. Tmej C, Chiba P, Huber M, et al. A combined Hansch/Free-Wilson approach as predictive tool in QSAR studies on propafenone-type modulators of multidrug resistance, *Arch Pharm (Weinheim)*. 1998;331(7-8):233-240.
240. Kupsáková I, Rybár A, Docolomanský P, et al. Reversal of P-glycoprotein mediated vincristine resistance of L1210/VCR cells by analogues of pentoxifylline. A QSAR study. *Eur J Pharm Sci*. 2004;21(2-3):283-293.

241. Weisman JL, Liou AP, Shelatt AA, et al. Searching for new antimalarial therapeutics amongst known drugs. *Chem. Biol. drug Des.* 2006;67:409-416.
242. Tasanor O, Ernst M, Thriemer K, et al. Characterization of a novel class of antimalarials and its applicability to plasmodial target identification *Wiener Klinische Wochenschrift* 2007;19(3):83-87
243. Lowes D, Pradhan A, Lalitha V. et al. Lead Optimization of Antimalarial Propafenone Analogues, *J. Med. Chem.* 2012;55 (13):6087–6093.
244. Sanguinetti and tristani-Firouzi 2006, Choe H, Nah KH, Lee SN, Lee HS, Lee Hui Sun, Jo SH, Leem CH and Jang YJ, A novel hypothesis for the binding mode of HERG channels blockers, *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:72-78.
245. Klepsch F, Chiba P, Ecker GF Exhaustive sampling of docking poses reveals binding hypotheses for propafenone type inhibitors of P-glycoprotein., *PLoS Comput Biol.* 2011;(5):e1002036.
246. Leroux F . Atropisomerism, biphenyls, and fluorine: A comparison of rotational barriers and twist angles . *Chembiochem.* 2004;5:644–649.
247. Smart B E . Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J Fluorine Chem.* 2001;109:3–11.
248. Claisen L, Claparède A. Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* 1881;14(1):2460–2468.
249. Schmidt, J. G. Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl in Gegenwart von Alkalilauge. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1881;14(1): 1459–1461.
250. Sheldrick GM. A short history of *SHELX Acta Cryst* 2008;A64:112–122
251. Farrugia LJ, *WinGX* suite for small-molecule single-crystal crystallography. *J. Appl. Cryst.* 1999;32:837-838.
252. Farrugia LJ J. *ORTEP-3* for Windows - a version of *ORTEP-III* with a Graphical User Interface (GUI). *Appl. Cryst.* 1997; 30:565.
253. Arunlakshana O , Shild H O . Some quantitative uses of drug antagonists .*Br J Pharmacol Chemother* 1959;14:48 – 58
254. Furchgott RF, The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from standpoint of receptor theory. In: Handbook of Experimental Pharmacology Blashko H. and Muschol E eds, New York, Springer-Verlage, 1972. Vol 33, 293-335.
255. De Mey JG and Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J. Physiol.* 1981;316:347-355.
256. De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res.* 1982;51(4):439-47.
257. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-376.

258. Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, et al. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*, 2001;411:657-661.
259. Goodford PJ. A computational procedure for determination energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J.Med.Chem.* 1985;28,849-857.
260. John S. Mitcheson, Jun Chen, Monica Lin, Chris Culberson, and Michael C. Sanguinetti, A structural basis for drug-induced long QT syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97 (22):12329–12333
261. Virginia Commonwealth University, The Chemical/Biological Safety Section (CBSS) of the Office of Environmental Health and Safety, Working with Urethane, 2006. Accessed May 13, 2006
262. Field KJ. and Lang CM. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. *Laboratory Animals* 1988;22:255-262.
263. www.atcc.org
264. Arlett CF. The use of dubious cell lines in research: is trust enough? *Lancet Oncol.* 2001;2: 467.
265. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983;65:55-63.
266. Ohno M.; Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Methods.* 1991;145:199-203.
267. Eriksson L.; Johansson E.; Kettaneh-Wold N.; et al. (eds.) Multi-and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I, 2nd edition., Umetrics Academy, Umeå, 2001:39.
268. Wold S; Johansson E; Cocchi M. 3D QSAR in drug design, theory, methods, and applications. H. Kubinyi ed., ESCOM Science Publishers: Leiden, 1993:523–550
269. Stähle, L.; Wold, S. Analysis of variance (ANOVA). *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 1989;6: 259-272
270. Shen Y., Kong Y., Ma J., Intrinsic flexibility and gating mechanism of the potassium channel KcsA. *PNAS*, 2002;99(4):1949–1953
271. Jamieson C, Moir EM, Rankovic Z, Wishart G, Medicinal chemistry of hERG optimizations: Highlights and hang-ups, *J Med Chem.* 2006;49(17):5029-5046.
272. <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>
273. Ravi Kumar R, Krishnaiah M, Jagadesh Kumar N, et al. 2-(2,6-Dimethoxy-phenyl)-5-hydroxy-7-methoxy-4H-1-benzopyran-4-one. *Acta Crystallogr Sect E.* 2009;65(Pt 9):o2262.

274. Bartosova L, Novak F, Bebarova M, Frydrych M, Brunclik V, Opatrilova R, Kolevska J, Mokry P, Kollar P, Strnadova V, Suchy P .Antiarrhythmic effect of newly synthesized compound 44Bu on model of aconitine-induced arrhythmia -- compared to lidocaine, *Eur J Pharmacol.* 2007;575(1-3):127-33.

10. PRILOZI

Prilog Tabela 1. Deskriptori koji su korišćeni za formiranje 2D QSAR modela u proceni antitumorske aktivnosti sintetisanih jedinjenja prema HeLa ćelijama

Compound name	HOMO [hartrees], B3LYP-6-31-d,p	BIC4	RDF145m	RDF145v	RDF145s	Observed pIC ₅₀ (HeLa)*	Predicted pIC ₅₀ (HeLa)
5PF	-0.22146	0.884	1.149	1.634	9.324	4.79317	4.86177
1CF3	-0.22762	0.894	0	0	0	4.74136	4.75584
1OCH3	-0.22241	0.894	0.005	0.049	0.703	4.83268	4.81764
1OCL	-0.22427	0.913	0	0	0	4.95078	4.91786
1OF	-0.22110	0.913	0	0	0	5.05061	4.95306
1PCH3	-0.22083	0.859	0	0	0	4.68613	4.60113
1PF	-0.22426	0.873	0	0	0	4.64589	4.65507
5CF3	-0.21250	0.896	1.603	2.208	21.999	5.16877	5.11447
5OCH3	-0.21735	0.896	0.199	0.466	3.625	5.05061	4.91297
5OCL	-0.21055	0.911	7.093	5.911	35.799	5.52288	5.51129
5OF	-0.22054	0.911	0.235	0.805	6.55	4.78463	4.99647
5PCH3	-0.21782	0.877	0.306	0.63	4.665	4.66354	4.79347
R ²	0.853	r ² (obs/pred)	0.924				
Q ² (Y)	0.790	F-ratio	5.152				
RMSEE	0.094	P-value	0.0296				

Prilog Tabela 2. Deskriptori koji su korišćeni za formiranje 2D QSAR modela u proceni antitumorske aktivnosti sintetisanih jedinjenja prema Fem-X ćelijama

jedinjenja												Observed	Predicted
	RDF040s	Mor08u	Mor08e	Mor08i	Mor26i	Mor27i	E3s	T(O..Cl)	F09[C-Cl]	G(O..Cl)	CMC-50	pIC ₅₀ (Fem-X)*	pIC ₅₀ (Fem-X)
5PF	57.200	-0.960	-0.715	-1.542	0.020	-0.118	0.466	0	0	0	1	5.01773	4.91056
1CF3	60.760	-0.998	-1.314	-1.094	0.030	0.088	0.663	0	0	0	0	4.99140	5.03655
1OCH3	11.290	-0.829	-0.541	-0.851	0.020	-0.035	0.228	0	0	0	1	4.84975	4.88737
1OCL	38.493	-0.594	-0.581	-0.346	0.206	0.004	0.334	14	1	13.029	0	4.98297	4.92945
1OF	43.439	-0.921	-0.973	-0.800	-0.670	-0.061	0.657	0	0	0	0	5.06048	4.89992
1PCH3	47.000	-0.197	-0.295	0.121	-0.593	-0.188	0.019	0	0	0	1	4.67366	4.52889
1PF	42.436	-0.845	-0.918	-0.692	-0.619	-0.120	0.149	0	0	0	0	4.66154	4.79979
5CF3	69.892	-0.757	-0.690	-1.124	-0.844	0.146	0.450	0	0	0	0	4.79317	4.84162
5OCH3	54.728	-1.246	-0.991	-1.837	-0.232	-0.349	0.507	0	0	0	0	5.16749	5.07083
5OCL	63.658	-1.054	-0.871	-1.607	0.202	-0.574	0.503	25	2	29.334	0	5.30980	5.38723
5OF	33.770	-0.520	-0.402	-0.972	-0.699	0.135	0.409	0	0	0	1	4.41794	4.64049
5PCH3	53.117	-0.674	-0.458	-1.067	-0.157	-0.583	0.446	0	0	0	0	4.89620	4.90944
R ²	0.788	r ² (obs/pred)	0.887										
Q ² (Y)	0.706	F-ratio	10.8218										
RMSEE	0.112	P-value	0.004										

Prilog Tabela 3. Deskriptori koji su korišćeni za formiranje 2D QSAR modela u proceni antitumorske aktivnosti sintetisanih jedinjenja prema K562 ćelijama

jedinjenje				Observed	Predicted
	Mor06e	Mor08e	CMC-50	pIC ₅₀ (K562)	pIC ₅₀ (K562)
5PF	1.396	-0.715	1	4.55752	4.65802
1CF3	3.001	-1.314	0	5.03621	5.16055
1OCH3	2.321	-0.541	1	4.73283	4.68634
1OCL	3.235	-0.581	0	5.00877	4.98387
1OF	2.162	-0.973	0	5.31876	5.00177
1PCH3	1.927	-0.295	1	4.72354	4.58886
1PF	2.263	-0.918	0	4.74715	4.99525
5CF3	4.830	-0.690	0	5.05552	5.14184
5OCH3	3.374	-0.991	0	5.09152	5.10451
5OCL	3.020	-0.871	0	5.22185	5.04388
5OF	1.448	-0.402	1	4.42481	4.57871
5PCH3	1.459	-0.458	0	4.83268	4.80754
R ²	0.660	r ² (obs/pred)	0.812		
Q ² (Y)	0.602	F-ratio	6.802		
RMSEE	0.151	P-value	0.016		

Prilog Tabela 4. Deskriptori koji su korišćeni za formiranje 2D QSAR modela u proceni antitumorske aktivnosti sintetisanih jedinjenja prema MCF-7 ćelijama

jedinjenje				Observed	Predicted
	ATSC6e	Eig02_AEA(dm)	H5s	pIC ₅₀ (MCF-7)*	pIC ₅₀ (MCF-7)
5PF	0.402	2.954	2.504	4.48149	4.60355
1CF3	0.598	3.528	2.817	4.77211	4.78607
1OCH3	0.104	2.884	0.723	4.42366	4.44071
1OCL	0.204	3.108	1.813	4.52578	4.55842
1OF	0.290	3.091	3.180	4.84164	4.63344
1PCH3	0.100	2.697	2.273	4.4698	4.46543
1PF	0.204	2.915	2.097	4.58503	4.52960
5CF3	0.892	3.641	6.289	5.01323	5.02815
5OCH3	0.334	3.005	3.193	4.63078	4.62662
5OCL	0.402	3.183	3.252	4.69465	4.68339
5OF	0.483	3.169	3.340	4.73283	4.70401
5PCH3	0.322	2.938	3.217	4.49894	4.61053
R ²	0.779	r ² (obs/pred)	0.882		
Q ² (Y)	0.772	F-ratio	15.236		
RMSEE	0.080	P-value	0.0013		

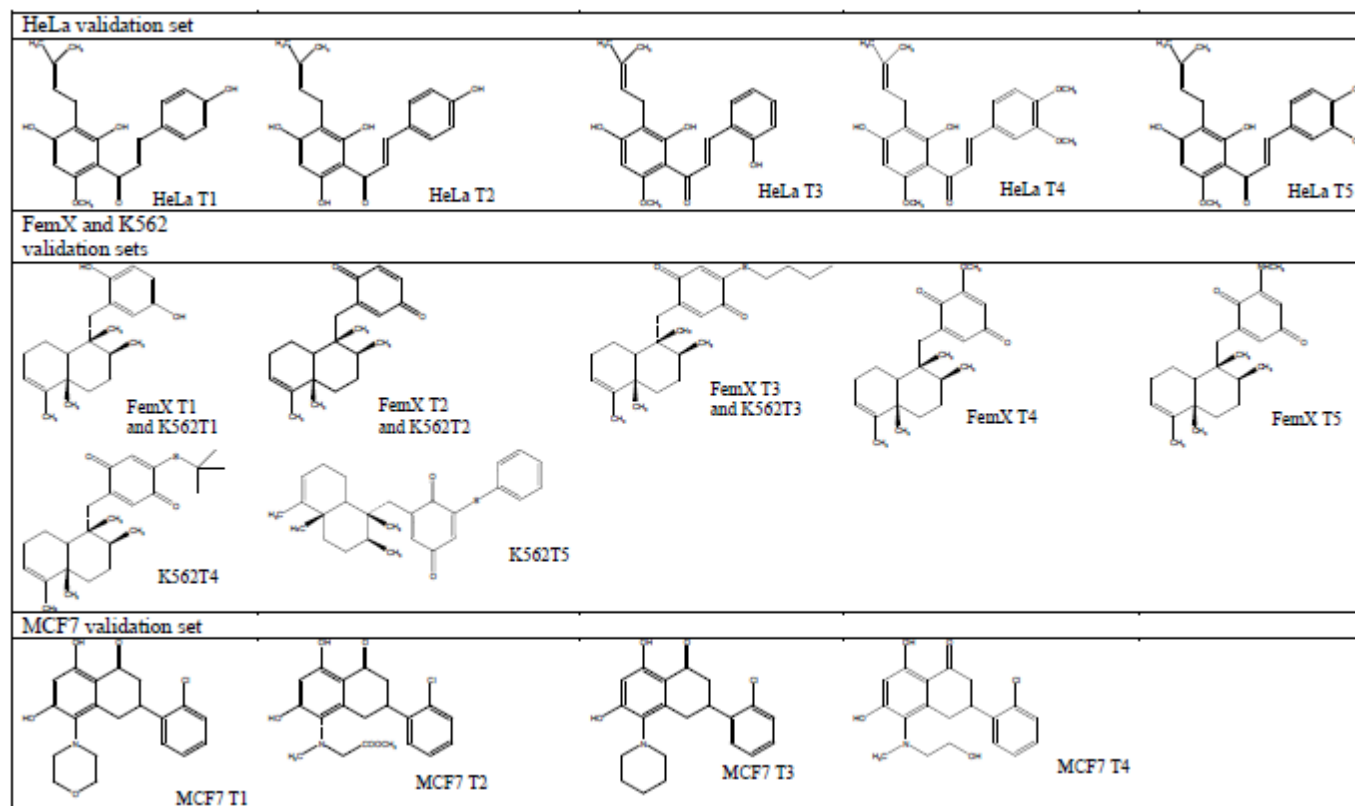
Prilog Tabela 5. Deskriptori koji su korišćeni za formiranje 2D QSAR modela u proceni antitumorske aktivnosti sintetisanih jedinjenja prema PC-3 ćelijama

jedinjenje	Mor32s	E2s	G(O..C)	Observed pIC ₅₀ (PC-3)	Predicted pIC ₅₀ (PC-3)
5PF	1.36	0.535	0	4.49621	4.48429
1CF3	1.925	0.368	0	4.47496	4.53727
1OCH3	-1.215	0.394	0	4.71670	4.72495
1OCL	0.224	0.482	13.029	4.6968	4.69649
1OF	0.79	0.454	0	4.66555	4.56417
1PCH3	1.222	0.455	0	4.55909	4.53590
1PF	1.932	0.369	0	4.51713	4.53629
5CF3	0.764	0.215	0	4.63264	4.69357
5OCH3	-1.475	0.440	0	4.74473	4.71706
5OCL	0.741	0.324	29.334	4.89963	4.88660
5OF	2.344	0.687	0	4.33348	4.33988
5PCH3	-0.525	0.493	0	4.60730	4.62775
R ²	0.916	r ² (obs/pred)	0.957		
Q ² (Y)	0.717	F-ratio	11.396		
RMSEE	0.041	P-value	0.0034		

Prilog Tabela 6. Deskriptori koji su korišćeni za formiranje 2D QSAR modela u proceni antitumorske aktivnosti sintetisanih jedinjenja prema LS174

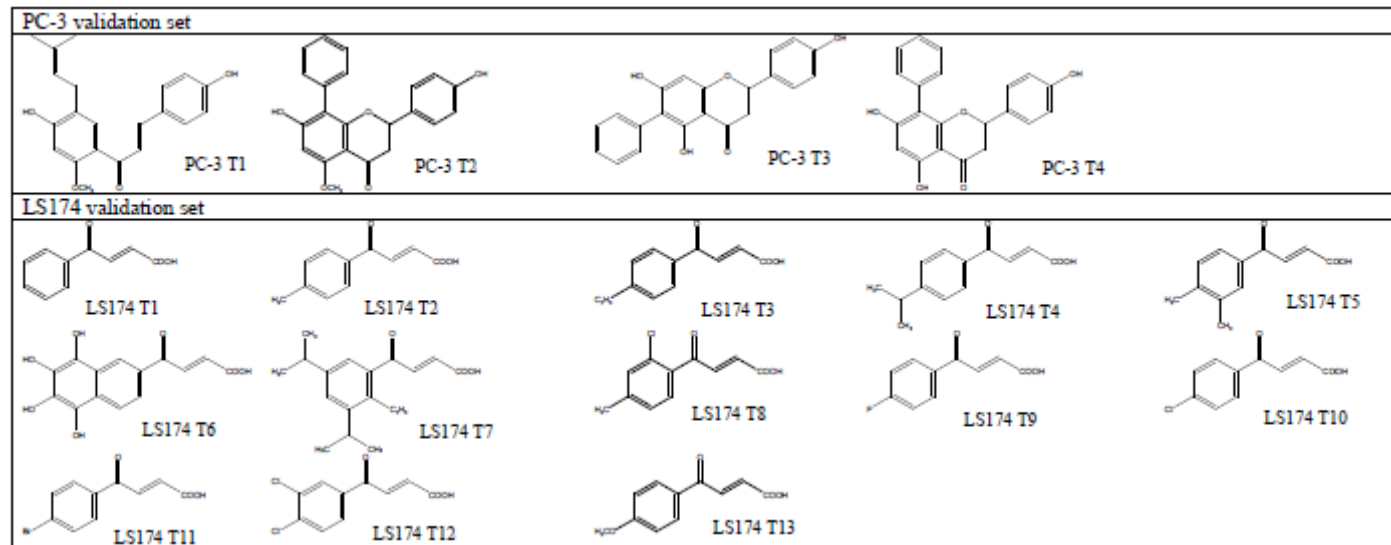
jedinjenje	RDF040s	Mar08u	G2u	G1v	CMC-50	Observed pIC ₅₀ (LS174)	Predicted pIC ₅₀ (LS174)
5PF	57.200	-0.96	0.167	0.149	1	4.63451	4.63523
1CF3	60.760	-0.998	0.184	0.167	0	4.57840	4.65101
1OCH3	11.290	-0.629	0.184	0.200	1	4.31158	4.23192
1OCL	38.493	-0.594	0.209	0.171	0	4.49214	4.42806
1OF	43.439	-0.921	0.171	0.171	0	4.75945	4.60527
1PCH3	47.000	-0.197	0.184	0.184	1	4.38510	4.32409
1PF	42.436	-0.845	0.19	0.171	0	4.45223	4.53625
5CF3	69.892	-0.757	0.156	0.147	0	4.73049	4.77686
5OCH3	54.728	-1.246	0.156	0.152	0	4.69250	4.79431
5OCL	63.658	-1.054	0.149	0.149	0	4.95078	4.81983
5OF	33.770	-0.52	0.185	0.167	1	4.14146	4.38119
5PCH3	53.117	-0.674	0.185	0.147	0	4.68194	4.62656
R ²	0.741	r ² (obs/pred)	0.861				
Q ² (Y)	0.684	F-ratio	9.754				
RMSEE	0.108	P-value	0.0056				

ćelijama

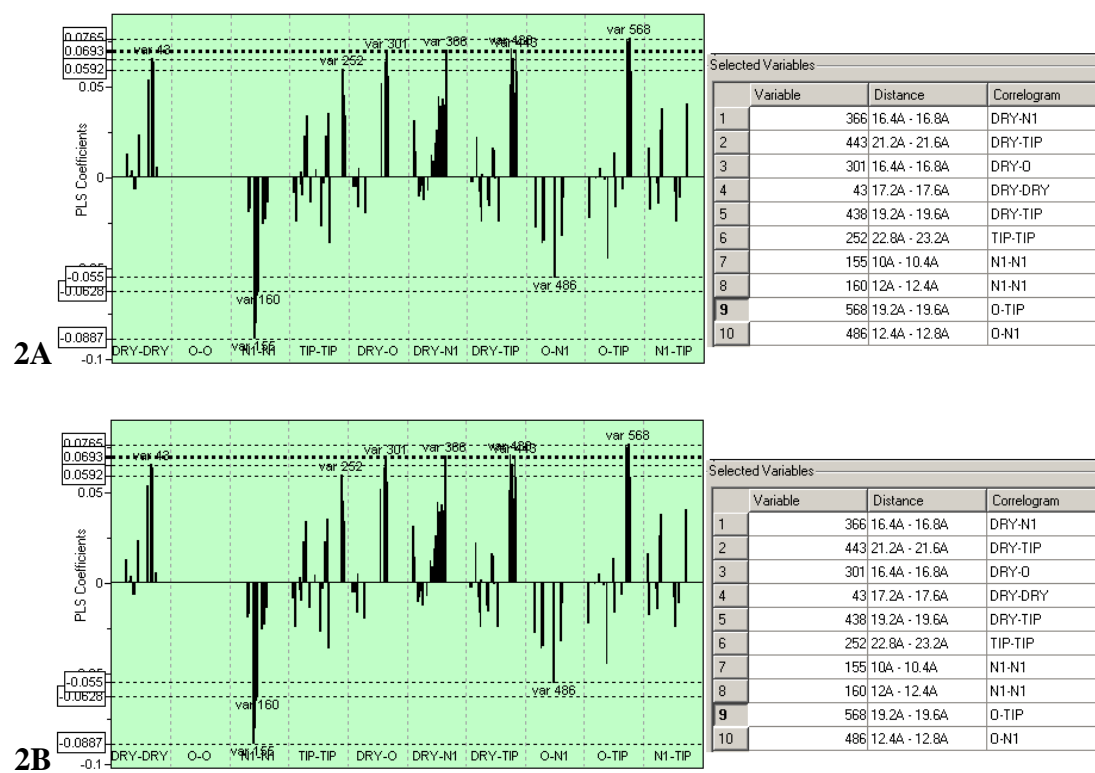


Prilog Slika 1. Strukture jedinjenja koja su korišćena za eksterne validacione setove

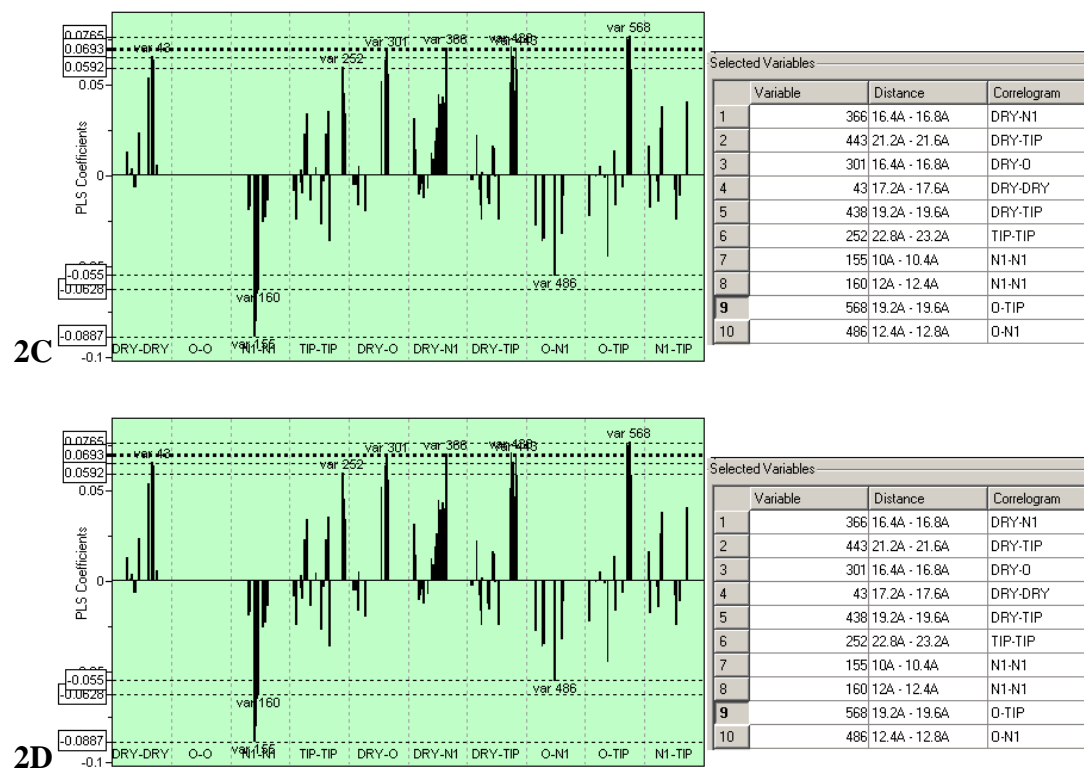
Nastavak- Prilog Slika 1



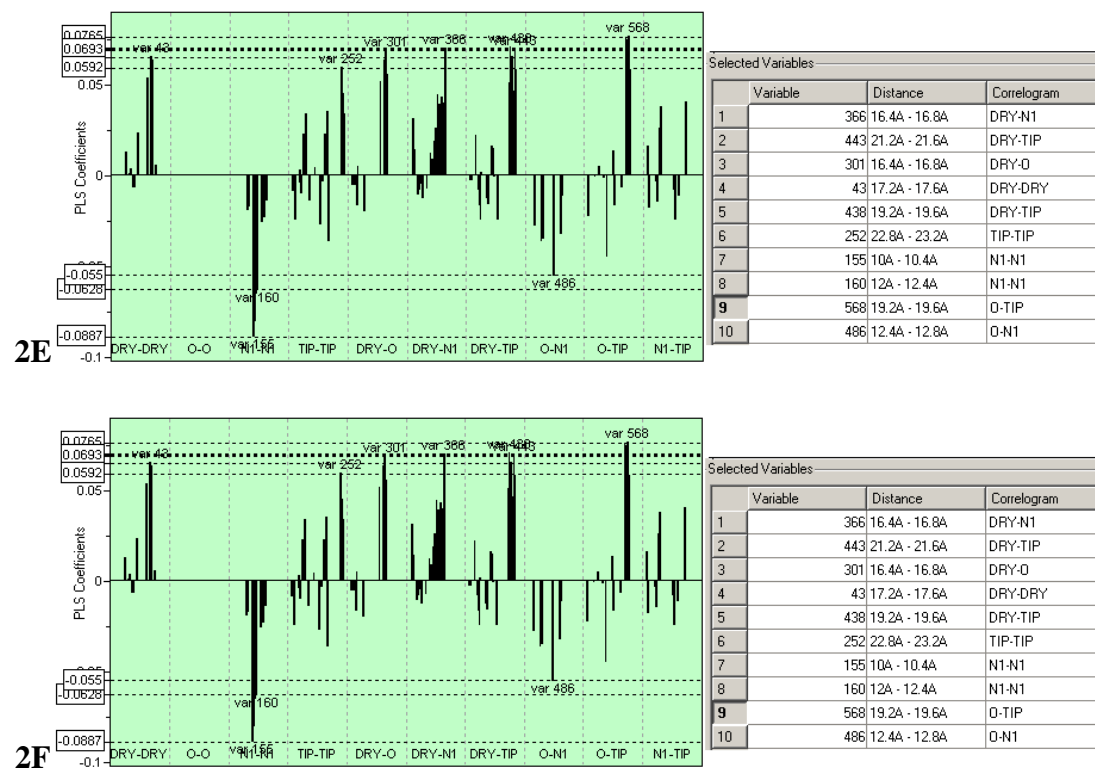
Prilog Slika 1. Strukture jedinjenja koja su korišćena za eksterne validacione setove



Prilog Slika 2. Grafikoni PLS koeficijenta važnih za tumačenje :
A. 3D QSAR (HeLa) modela **B.** 3D QSAR (Fem-X) modela



Prilog Slika 2. Grafikoni PLS koeficijenta važnih za tumačenje :
C. 3D QSAR (K562) modela, **D.** 3D QSAR (MCF-7) modela.



Prilog Slika 2. Grafikoni PLS koeficijenta važnih za tumačenje :
E. 3D QSAR (PC-3) modela, **F.** 3D QSAR (LS174) modela

BIOGRAFIJA

Branka Ivković je rođena 18. januara 1972. godine u Kuli. Osnovnu školu završila je u Sivcu, a srednju farmaceutsku školu u Somboru. Na Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala se školske 1990/91. godine i na istom diplomirala 1995. godine. Od oktobra 1996. godine zaposlena je na Katedri za Farmaceutsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Magistarsku tezu pod nazivom: *“Primena različitih hiralnih selktora u razdvajanju enantiomera metoprolol tartarata planarnom hromatografijom i visokoefikasnom tečnom hromatografijom”* čiji je mentor bila prof. dr Dušanka Radulović, odbranila je 2002. godine. Autor je ili koautor trinaest naučnih radova u međunarodnim časopisima, deset radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja štampanih u celini i dvadeset pet radovi saopštenih na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu.

Pod mentorstvom prof. Dr Sote Vladimirova 2012. godine je završila izradu doktorske disertacije pod nazivom : *“Dizajniranje, sinteza i biološka aktivnost aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona”* iz koje je do sada objavila dva rada u međunarodnim časopisima, jedan rad u tematskom zborniku međunarodnog značaja i jedanaest saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu.

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima

1. **Ivković B**, Vladimirov S, Novaković R, Cupić V, Heinle H, Gojković-Bukarica L The novel phenylpropiophenone derivates induced relaxation of isolated rat aorta, *Arzneimittelforschung*. **2012** Jul;62 62(7):345-50 **M23**
2. Francuski BM, **Ivković B**, Stojanović I, Vladimirov S, Francuski D. 2-[2-(Trifluoro-meth-yl)phen-yl]-2H-1-benzopyran-4(3H)-one. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*. **2012** May 1;68(Pt 5):o1522. doi: 10.1107/S160053681201687X. Epub **2012** Apr 25. **M23**

Spisak radova publikovanih u tematskim zbornicima međunarodnog značaja

1. **Ivković Branka**, Soković Marina Marković Bojan, Sote Vladimirov, Synthesis and evaluation of novel propafenone analogs as potential antimicrobial and antifungal agents Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Budapest, Hungary, June 24-27, 2009. Medimond International Proceedings, Bologna, Italy, pp 61-64. **M14**

Spisak saopštenja na međunarodnim simpozijumima publikovanih u izvodu (M34)

1. **Branka Ivković**, Sote Vladimirov, Vladimir Savić, Synthesis and evolution of novel propafenone analogs as potential antiarrhythmic agent, The 5th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Portoroz, Slovenia, jun 17-21, 2007-PO056
2. **Branka Ivković**, Zorica Juranić, Bojana Ilić, Bojan Marković, Sote Vladimirov, Synthesis and evaluation of derivatives of phenylpropiophenone as antiproliferative agents, *Drugs of the future*, 33 (suppl. A): XXth International Symposium on Medicinal Chemistry, Vienna, Austria, August 31 – September 4, 2008. P466
3. **Ivković Branka**, Soković Marina Marković Bojan, Sote Vladimirov, Synthesis and evaluation of novel propafenone analogs as potential antimicrobial and antifungal agents Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Budapest, Hungary, June 24-27, 2009. P-10
4. **Branka Ivković**, Marija Mladić, Marina Milenković, Sote Vladimirov, Synthesis, lipophilicity determination and QSAR study of phenolic chalcones with antibacterial and antifungal activity, 14th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, Thessaloniki, Greece, april 23-25, 2010.P-53

5. **Branka Ivković**, Ljiljana Gojković Bukarica Bojan Marković, Sote Vladimirov, The vasodilatation effects of novel propafenone analogues, *V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem*, 13-17 Oktobar, 2010, Beograd, Srbija, *Arhiv za farmaciju* 60(5), **2010**, 944-945.

6. **Ivkovic Branka**, Vladimirov Sote, Bojan Marković, Radmila Novaković, Dragana Protić, Ljiljana Gojković Bukarica, *Vasodilatation and cytotoxic effect of novel propafenone analogs*, *Drugi Kongres Farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem*, banja Luka, novembar 17-20, **2011**, 108-109.

7. **Ivkovic Branka**, Vladimirov Sote, Bojan Marković, Radmila Novaković, Dragana Protić, Ljiljana Gojković Bukarica, *Cytotoxic and Vasodilatation effect of novel propafenone analogs*, *Prvi Kongres Farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem*, **2012**, 51-52

8. I.Stojanović, M. Milenković, **B. Ivković** In vitro study of antimicrobial activity of newly synthesized flavanone, FEMS 2011-Congress Abstracts

9. Filipić B., **Ivković B.**, Ćirković I., Antić-Stanković J., Milenković M., Antibacterial activity of newly synthesized chalcones 6thCongres of Medical Mycrobiology, MIKROMED 2008, Beograd 11-14 jun, 2008.

10. **Ivkovic Branka M** Vladimirov Sote M Opacic D Protic Dragana D Novakovic Radmila B Cvejic Jelena M Kanjuh Vladimir I Gojkovic-Bukarica Ljiljana Novel Propafenone Analogs Have Antiarrhythmic Effect, Abstracs der wissenschaftlichen Beiträge zur 23. jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Artrioskleroseforschung e v vom 12-14 Marz 2009 im Heinrich-Fabri-institut in Blaubeuren, februar 2009.

11. **Ivkovic Branka M** Vladimirov Sote M Opacic D Protic Dragana D Novakovic Radmila B Cvejic Jelena M Kanjuh Vladimir I Gojkovic-Bukarica Ljiljana, cardiovascular effects of novel propafenone analogs Abstracs der wissenschaftlichen Beiträge zur 23. jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Artrioskleroseforschung e v vom 24-16 Marz 2011 im Heinrich-Fabri-institut in Blaubeuren

Изјава о ауторству

Потписана Бранка Ивковић

број индекса

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Дизајнирање, синтеза и биолошка активност аминокиселинских деривата
фенилпропиофенона**

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

Потпис докторанда

У Београду, 24. 12. 2012.

Бранка Ивковић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранка Ивковић

Број индекса

Студијски програм: фармацеутска хемија

Наслов рада: Дизајнирање, синтеза и биолошка активност аминокиселина
деривата фенилпропиофенона

Ментор: Проф. др Соте Владимир

Потписана Бранка Ивковић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.12.2012.

Бранка Ивковић

Изјава о коришћењу

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

„Дизајнира, синтеза и биолошка активност аминокиселинских деривата фенилпропиофенона“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 24.12.2012.

