



UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Biljana K. Tubić

**DERIVATI ETILENDIAMIN-*N,N'*-DI-2-(3-
CIKLOHEKSIL)PROPANSKE KISELINE
SA POTENCIJALNIM CITOTOKSIČNIM
DEJSTVOM – *IN SILICO/IN VITRO*
FIZIČKO - HEMIJSKA I *ADME*
KARAKTERIZACIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Biljana K. Tubić

**DERIVATIVES OF ETHYLENDIAMINE-
N,N'-DI-2-(3-CYCLOHEXYL)PROPANOIC
ACID WITH POTENTIAL CYTOTOXIC
ACTIVITY - *IN SILICO/IN VITRO*
PHYSICOCHEMICAL AND
ADME CHARACTERIZATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskom fakultetu kao sastavni deo istraživanja na projektu OI172041 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

MENTOR:

Vanredni profesor Bojan Marković

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Sote Vladimirov

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Tibor Sabo

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Svjetlana Stojisavljević Šatara

Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Doc. dr Vladimir Dobričić

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvaljujem mentorima **prof. dr Soteu Vladimirovu i vanrednom profesoru Bojanu Markoviću** na pomoći, strpljenju, saradnji, razumevanju i velikoj podršci svih ovih godina naše saradnje i mog školovanja i razvoja. Ujedno, zahvaljujem im na velikoj pomoći tokom izrade doktorske disertacije, savetima i svesrdnoj podršci da istrajem na putu.

Zahvaljujem prof. dr Tiboru Sabo na ukazanom poverenju i pruženoj pomoći.

Zahvaljujem prof. dr Sojetlani Stojisavljević-Štari na saradnji i podršci u radu svih prethodnih godina.

Zahvaljujem doc. dr Vladimiru Dobričiću na korisnim sugestijama i pomoći prilikom pisanja doktorske disertacije i na savetima koje mi je davao tokom eksperimentalnog rada.

Hvala svim zaposlenim na Institutu za farmaceutsku hemiju i analitiku lekova, na pomoći i na osećanju pripadnosti, posebno prof. dr Danici Agbabi koja mi je uvek sa malo reči pružala veliku pomoć i podršku, vanrednom profesoru Katarini Nikolić na pomoći prilikom interpretacije in silico rezultata i doc. dr Branki Ivković na prijateljstvu, prisustvu i pruženom znanju.

Hvala na podršci prof. dr Jasminki Nikolić, doc. dr Vandi Marković-Peković i prof. dr Ranku Škrbiću.

Hvala dragim kolegama Agencije za lijekove i medicinska sredstva BiH, direktorima Nataši Grubiši, Petru Rokoviću i Aleksandru Zolaku.

Hvala Udruženju onkologa Republike Srpske na pomoći i podršci - dr Gordani Kecman i dr Saši Jungiću.

Hvala prof. dr Jeleni Joksimović na pomoći, podršci i divnim i toplim rečima.

Hvala kolegama i prijateljima Sandri Vladimirov, Ivanu Kovačeviću i Žarku Gagiću.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Borutu Štrukelju, kumi Veki i porodici, sestri Mariji i mojim roditeljima Krsti i Veroslavi Ratković.

Hvala mom sinu Relji što me je strpljivo čekao, na poljubcima i ljubavi.



DERIVATI ETILENDIAMIN-*N,N'*-DI-2-(3-CIKLOHEKSIL)PROPANSKE KISELINE SA POTENCIJALNIM CITOTOKSIČNIM DEJSTVOM - *IN SILICO/IN VITRO* FIZIČKO-HEMIJSKA I ADME KARAKTERIZACIJA

REZIME

Estri (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (EDCP) sa metanolom (DM-EDCP), etanolom (DE-EDCP), propanolom (DP-EDCP), butanolom (DB-EDCP) i izobutanolom (DIB-EDCP) i estri (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (PDCP) sa metanolom (DM-PDCP), etanolom (DE-PDCP), propanolom (DP-PDCP), butanolom (DB-PDCP), izobutanolom (DIB-PDCP), pentanolom (DPE-PDCP) i izopentanolom (DIPE-PDCP) dizajnirani su kao ligandi za Pt(IV) komplekse. U *in vitro* ispitivanjima utvrđena je značajna citotoksična aktivnost za navedene komplekse, ali i za ligande u nevezanom obliku. Ispitivana supstanca DE-EDCP pokazala je najveću citotoksičnu aktivnost.

U ovoj doktorskoj disertaciji opisan je razvoj i validacija savremene bioanalitičke metode - ultra visoko efikasne tečne hromatografije u sprezi sa masenom detekcijom (UHPLC-MS/MS). Metoda je razvijena i validirana za potrebe pretkliničkih ispitivanja, odnosno za određivanje ispitivane supstance DE-EDCP u biološkom materijalu, kao i njenog potencijalnog metabolita EDCP. Kao interni standard primenjen je strukturni analog DB-PDCP.

Tokom *in vitro* fizičko-hemijske biofarmaceutske karakterizacije ispitivanih supstanci određena je i ocenjena njihova rastvorljivost u vodenom rastvoru, lipofilnost i permeabilnost na veštačkim membranama. Profili rastvorljivosti kiselina i njihovih estara se značajno razlikuju, dok su profili rastvorljivosti obe kiseline (EDCP i PDCP) slični, kao i profili rastvorljivosti svih estara. Kiseline se dobro rastvaraju u izrazito kiseloj sredini i u izrazito baznoj sredini, dok je rastvorljivost estara najveća u izrazito kiseloj sredini.

Lipofilnost je ispitana primenom *shake-flask* metode i primenom UHPLC-MS/MS metode. Dobijene vrednosti particionog koeficijenta *n*-oktanol-voda ($\text{Log}D_{7,4}$) pokazuju da lipofilnost supstanci raste sa produžetkom alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama. Određene su vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti: retencioni faktor k ($\log k$), retenciono vreme (t_R) i indeks hidrofobnosti (CHI i φ_0). Razvijen je matematički model kojim se pomoću hromatografskih parametara lipofilnosti mogu predvideti vrednosti $\text{Log}D_{7,4}$ za potencijalne metabolite ispitivanih supstanci ili za novosintetisane derivate (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline.

Primenom *leave-one-out* validacione metode ocenjena je i pokazana dobra prediktivna moć predloženog matematičkog modela ($Q^2 = 0,89$).

Primenjen je paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama (PAMPA test) kojim je ispitana gastrointestinalna permeabilnost na veštačkoj membrani čiji je sastav 1% lecitin u dedekanu, kao i permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru na veštačkoj membrani izrađenoj od polarnih lipida svinjskog mozga. Na oba modela estri su pokazali značajno zadržavanje u membrani (30,09 – 99,89 %), a u niskom procentu su prolazili kroz membranu (0,07 – 22,00 %). Za dietil estre obe kiseline (DE-EDCP i DE-PDCP) određeno je da se u najvećem procentu zadržavaju u membrani.

In silico biofarmaceutska karakterizacija ispitivanih supstanci izvršena je primenom više računarskih programa. Za predviđanje dominantnih metaboličkih reakcija i metabolita primenjen je računarski program *Metabolizer* i utvrđeno je da su glavne metaboličke reakcije hidroliza estra i naknadno intramolekulska ciklizacija (građenje laktama). Predviđanje apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije i toksičnosti za sve ispitivane supstance, potencijalne metabolite i odabrane oficinalne lekove izvršeno je primenom programa *ADME(T) predictor*. Za predviđanje mehanizma dejstva ispitivanih supstanci i njihove interakcije sa ciljnim mestima primenjen je molekularni *docking*. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da ispitivane

supstance antiproliferativno dejstvo ostvaruju putem više mehanizama i da su aktivne kiseline i potencijalni metaboliti: laktam-karboksilat i laktam-alikestar, dok su estri verovatno *pro drug* supstance sa povoljnim osobinama da osiguraju dovoljnu bioraspoloživost na ciljnim mestima delovanja.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da u daljim istraživanjima treba ispitati postojanje metabolita laktam-karboksilata i laktam-alkilestra u biološkom materijalu. Takođe, rezultati opravdavaju inicijativu da se izvrše pretklinička ispitivanja sa dietilestarskim derivatima 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina. Za derivate 1,3-propandiamina, posebno za DIPE-PDCP, utvrđen je tokom *in vitro* ispitivanja zadovoljavajući stepen prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, što ukazuje da treba detaljno ispitati njihovu citotoksičnu aktivnost na glioma ćelijama.

Ključne reči: derivati 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline, derivati 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline, bioanalitička metoda, tačna hromatografija pod ultra visokim pritiskom u sprezi sa masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS), rastvorljivost, lipofilnost, membranska permeabilnost, docking, *ADME(T)* predviđanje, predviđanje metaboličkih reakcija i metabolita - *Metabolizer*

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 547.415.1:[543.544.5:004.94(043.3)]

DERIVATIVES OF ETHYLENDIAMINE-*N,N'*-DI-2-(3-CYCLOHEXYL)PROPANOIC ACID WITH POTENTIAL CYTOTOXIC ACTIVITY - *IN SILICO/IN VITRO* PHYSICOCHEMICAL AND ADME CHARACTERIZATION

ABSTRACT

Esters of (*S,S*)-1,2-ethanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid (EDCP) with methyl alcohol (DM-EDCP), ethyl alcohol (DE-EDCP), *n*-propyl alcohol (DP-EDCP), *n*-butyl-alcohol (DB-EDCP) and isobutyl-alcohol (DIB-EDCP), and esters of (*S,S*)-1,3-propanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid (PDCP) with methyl alcohol (DM-PDCP), ethyl alcohol (DE-PDCP), *n*-propyl alcohol (DP-PDCP), *n*-butyl alcohol (DB-PDCP), and isobutyl alcohol (DIB-PDCP), *n*-pentyl alcohol (DPE-PDCP) and isopentyl alcohol (DIPE-PDCP) were designed as ligand of Pt(IV) complexes. During the *in vitro* investigation it was found significantly cytotoxic activity of these complexes, and also it was found cytotoxic activity of ligand without complexes. Investigated substance DE-EDCP was exerted the strongest cytotoxic activity.

In this doctoral dissertation, there is presented a development and validation of a new ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry bioanalytical method (UHPLC-MS/MS). The developed method is supposed for determination of DE-EDCP and its potential metabolit EDCP in biological materials during non-clinical and clinical studies. The structural analogue DB-PDCP was used as an internal standard.

During the *in vitro* biopharmaceutical characterization of the investigated substances, there was performed a determination of solubility, lipophilicity and membrane permeability. Profiles of solubility of the observed acids and their corresponding esters are significantly different, while the profiles of solubility for two acids (EDCP and PDCP) are similar as well as the profiles of solubility for all the esters. Acids have good solubility in water with low pH value, as well as in

water with high pH value, while esters have very good solubility in water with low pH value.

Lipophilicity of the investigated compound was determined by a *shake-flask* method, and also by the UHPLC-MS/MS method. Observed values of partition coefficient of *n*-octanol-water ($\text{Log}D_{7,4}$) have shown that the lipophilicity of the investigated compounds was growing up with the extension of alkyl chain on ester functional groups. Chromatographic data of the investigated compounds were obtained by the UHPLC-MS: lipophilicity index ($\log k_w$), retention time (t_R) and chromatographic hydrophobicity index (CHI, φ_0). Based on the lipophilicity data obtained by the shake flask method and UHPLC-MS/MS method, there was development a mathematical model for prediction of partition coefficient for potential metabolite of the investigated substances and for novel derivatives of (*S,S*)-1,2-ethanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid and (*S,S*)-1,3-propanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid based on chromatographic data obtained by the UHPLC-MS/MS method. Observed mathematical model was validated by the leave-one-out method and it showed good predictable power ($Q^2 = 0.89$).

By the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA), there was investigated the *in vitro* permeability on artificial membrane of gastrointestinal tract (1 % lecithin in dodecane) and permeability on blood brain barrier with an artificial membrane which consisted of polar pork lipids. Both models presented that the investigated substances have had a good membrane retention (30.09-99.89%) and low percent of membrane permeability (0.07-22.00%). For diethyl esters of (*S,S*)-1,2-ethanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and (*S,S*)-1,3-propanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid, it was determined the highest percent of membrane retention.

In silico biopharmaceutical characterization of investigated substances was performed by several softwares. Prediction of main metabolic reactions and metabolites was performed by the Metabolizer software and it was obtained that the major metabolic reactions were the hydrolyses of ester and subsequently

intramolecular cyclization (lactate formation). *In silico* prediction of absorption, distribution, metabolism, elimination and toxicity for all the investigated substances, potential metabolites, and official drugs was performed by using the software *ADME(T)* predictor. Based on the results obtained by the Molecular docking, it can be assumed that the anti-proliferative effects of the investigated substances were realized through the multiple mechanisms. Although it can be assumed that the cytotoxic activity was realized by the acids and potential metabolites of 1,2-ethanediamine derivatives: lactam carboxylate and lactam alkyl esters, while the esters are probably a pro-drug substance with favourable properties to provide sufficient bioavailability at the target of action.

Based on the results of this doctoral dissertation, it can be proposed there to be investigated the existence of the metabolites: lactam carboxylate and lactam alkyl esters in biological materials. There should also be investigated and carried out preclinical studies with diethyl aryl derivatives of 1,2-ethanediamine and 1,3-propandiamine. In *in vitro* assays it was found that 1,3-propandiamine derivatives (especially DIPE-PDCP) have satisfying degree of membrane permeability through the blood-brain barrier, which indicating that cytotoxic activity of these substances on glioma cells should be investigated in detail.

Key words: derivatives of (*S,S*)-1,2-ethanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and (*S,S*)-1,3-propanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid, bioanalytical method, ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry-UHPLC-MS/MS), solubility, lipophilicity, membrane permeability, docking study, *ADME(T)* prediction, prediction of metabolic reactions and metabolites - *Metabolizer*

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDC number: 547.415.1:[543.544.5:004.94(043.3)

SADRŽAJ

1	UVOD	2
1.1	MALIGNA OBOLJENJA - PODELA I KARAKTERISTIKE	3
1.1.1	Karcinogeneza i ciljna mesta.....	3
1.1.1.1	Apoptoza.....	4
1.1.1.2	Protein kinaze.....	7
1.1.1.3	Matriks metaloproteaze.....	10
1.1.2	Lečenje malignih oboljenja.....	11
1.2	DERIVATI 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA SA POTENCIJALNIM CITOTOKSIČNIM DEJSTVOM	15
1.2.1	Derivati 1,2-etandiamina.....	16
1.2.2	Derivati 1,3-propandiamina.....	20
1.3	RAZVOJ I VALIDACIJA BIOANALITIČKE METODE	23
1.3.1	Ekstrakcija analita iz biološkog matriksa.....	23
1.3.2	Tečna hromatografija sa masenom detekcijom.....	25
1.3.3	Validacija bioanalitičke metode.....	29
1.4	IN VITRO METODE ZA BIOFARMACEUTSKU KARAKTERIZACIJU JEDINJENJA	38
1.4.1	Rastvorljivost.....	38
1.4.2	Lipofilnost.....	40
1.4.3	Membranska permeabilnost.....	43
1.5	IN SILICO METODE ZA BIOFARMACEUTSKU KARAKTERIZACIJU JEDINJENJA	47
2	CILJ RADA	50
3	EKSPERIMENTALNI DEO	52
3.1	OPŠTI PODACI	53
3.1.1	Ispitivane supstance.....	53
3.1.2	Hemikalije i reagensi.....	54
3.1.3	Oprema, instrumenti i laboratorijski materijal.....	55
3.1.4	Računarski programi.....	56

3.2 RAZVOJ I VALIDACIJA BIOANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE DIETIL ESTRA 1,2-ETANDIAMIN-<i>N,N'</i>-DI-2-(3-CIKLOHEKSIL)PROPANSKE KISELINE I ODGOVARAJUĆE KISELINE KAO POTENCIJALNOG METABOLITA	58
3.2.1 Priprema rastvora.....	58
3.2.2 Ekstrakcija analita iz biološkog materijala.....	58
3.2.2.1 Čvrsto-tečna ekstrakcija	59
3.2.2.2 Tečno-tečna ekstrakcija	60
3.2.2.3 Ekstrakcija precipitacijom proteina.....	60
3.2.3 Validacija UHPLC-MS/MS metode	61
3.2.3.1 Priprema radnih rastvora ispitivanih jedinjenja.....	61
3.2.3.2 Priprema kalibracionih rastvora (CS)	61
3.2.3.3 Priprema rastvora kontrolnih uzoraka (QC)	63
3.2.3.4 Priprema mobilne faze	63
3.2.3.5 Hromatografski uslovi	64
3.2.3.6 Maseno-spektrometrijski uslovi.....	64
3.2.3.7 Selektivnost.....	65
3.2.3.8 Linearnost i kalibraciona zavisnost.....	66
3.2.3.9 Tačnost i preciznost	66
3.2.3.10 Limit kvantifikacije	66
3.2.3.11 <i>Recovery</i> (%).....	67
3.2.3.12 Uticaj matriksa	67
3.2.3.13 Stabilnost	67
3.2.4 Međulaboratorijski transfer UHPLC-MS/MS metode	68
3.2.4.1 Validacija bioanalitičke metode u prijemnoj laboratoriji	70
3.2.4.2 <i>Cross-validacija - Passing and Bablok</i> regresiona analiza	70
3.3 RASTVORLJIVOST I LIPOFILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA	71
3.3.1 Ispitivanje rastvorljivosti.....	71
3.3.1.1 Priprema rastvora	71
3.3.2 Ispitivanje lipofilnosti	73

3.3.2.1	Određivanje partitionog koeficijenta ($\log D_{7,4}$) primenom <i>shake-flask</i> metode.....	73
3.3.2.1.1	Priprema rastvora	73
3.3.2.2	Određivanje hromatografskih parametara lipofilnosti primenom UHPLC/MS metode	75
3.3.2.2.1	Priprema rastvora.....	75
3.3.2.2.2	Određivanje hromatografskog parametra $\log k$ metodom izokratskog eluiranja	76
3.3.2.2.3	Određivanje hromatografskog parametra CHI metodom gradijentnog eluiranja	76
3.3.3	Razvoj i validacija matematičkog modela	76
3.4	PERMEABILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA	78
3.4.1	Priprema rastvora.....	78
3.4.2	Izvođenje PAMPA testa.....	78
3.5	IN SILICO BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA	80
3.5.1	Predviđanje primenom <i>Metabolizer</i> -a	80
3.5.2	Predviđanje primenom <i>ADME(T) predictor</i> -a.....	80
3.5.3	Predviđanje primenom molekuskog <i>docking</i> -a	80
4	REZULTATI I DISKUSIJA	84
4.1	RAZVOJ I VALIDACIJA BIOANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE DIETIL ESTRA 1,2-ETANDIAMIN-<i>N,N'</i>-DI-2-(3-CIKLOHEKSIL)PROPANSKE KISELINE I ODGOVARAJUĆE KISELINE KAO POTENCIJALNOG METABOLITA	85
4.1.1	Procena validacionih parametara UHPLC-ESI-MS/MS metode u odsustvu biološkog matriksa.....	90
4.1.2	Ekstrakcija analita iz biološkog materijala.....	93
4.1.3	Validacija UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitičke metode.....	94
4.1.4	Međulaboratorijski transfer UHPLC-MS/MS metode	99

4.2 RASTVORLJIVOST I LIPOFILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA	107
4.2.1 Rezultati ispitivanja rastvorljivosti	107
4.2.2 Rezultati ispitivanja lipofilnosti	113
4.2.2.1 Vrednosti particionog koeficijenta ($\log D_{7,4}$) dobijene primenom <i>shake-flask</i> metode.....	113
4.2.2.2 Vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti dobijene primenom UHPLC-MS metode	115
4.2.2.2.1 Vrednosti hromatografskog parametra $\log k$ dobijene metodom izokratskog eluiranja	115
4.2.2.2.2 Vrednosti hromatografskog parametra CHI dobijene metodom gradijentnog eluiranja	118
4.2.3 Razvoj i validacija matematičkog modela	126
4.3 PERMEABILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA.....	133
4.3.1 Rezultati ispitivanja permeabilnosti na veštačkoj membrani GIT-a	133
4.3.2 Rezultati ispitivanja permeabilnosti na veštačkoj membrani BBB-a.....	136
4.4 IN SILICO BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA	140
4.4.1 Rezultati predviđanja primenom <i>Metabolizer</i> -a	140
4.4.2 Rezultati predviđanja primenom <i>ADME(T) predictor</i> -a.....	144
4.4.3 Rezultati molekularskih <i>docking</i> studija.....	156
4.4.3.1 Signalni put.....	161
4.4.3.2 Matriks-metaloproteaze	166
4.4.3.3 Mitohondrijalni put	171
4.4.4 Predviđanje biorasploživosti i molekularnog mehanizma citotoksičnog dejstva ispitivanih suspcstanci na osnovu rezultata <i>in vitro/in silico</i> biofarmaceutske karakterizacije	175
5 ZAKLJUČAK.....	178
6 LITERATURA	183
7 PRILOZI.....	202

SKRAĆENICE KORIŠĆENE U TEKSTU:

ADME(T)	eng. <i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity</i> (Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam, Eliminacija, Toksičnost)
AIF	eng. <i>Apoptosis-inducing factor</i> (faktor indukcije apoptoze)
Akt	eng. <i>v-Murine Thymoma Viral Oncogene</i> (dodatni naziv za protein kinazu B)
APAF-1	eng. <i>Apoptosis protease activating factor-1</i> (genski fragment kojim je kodirana citoplazmatska proteaza, koja učestvuje u procesu apoptoze)
ASC	eng. <i>American Society Commettee on Analytical Reagents</i> (Američka Komisija za reagense koji se koriste u analitici, stepen čistoće ASC odgovara p.a. stepenu čistoće)
BBB	eng. <i>Blood brain barrier</i> (krvno-moždana barijera)
CHI	eng. <i>Chromatographic hydrophobicity index</i> (hromatografski indeks hidrofobnosti)
CI	eng. <i>Confidential interval</i> (interval poverljivosti)
CS	eng. <i>Calibration solution</i> (kalibracioni rastvor)
Cyto C	eng. <i>Cytochrome c</i> (citohromski kompleks - mali hemoprotein, koji je labavo povezan sa unutrašnjom membranom mitohondrija)
ECM	eng. <i>Extracellular matrix</i> (ekstracelularni matriks)
EGFR	eng. <i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor epidermalnog faktora rasta)
ELISA	eng. <i>Enzyme-linked immunoadsorbent assay</i> (imunoenzimski test)
EMA	eng. <i>European Medicines Agency</i> (Evropska agencija za lekove)
FDA	eng. <i>Food and Drug Administration</i> (Američka Agencija za hranu i lekove)
GLP	eng. <i>Good Laboratory Practice</i> (dobra laboratorijska praksa)
GSH	eng. <i>Glutathione</i> (glutation)
GMP	eng. <i>Good Manufacturing Practice</i> (dobra proizvođačka praksa)

HER2	eng. <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> (receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2)
HESI	eng. <i>Heated Electrospray Ionization Source</i> (izvor jona nastao u spreju rastvora mobilne faze pod uticajem jakog električnog polja i uz zagrevanje)
HPLC	eng. <i>High-performance liquid chromatography</i> (tečna hromatografija pod visokim pritiskom)
HO-1	eng. <i>Heme oxygenase-1</i> (hem oksigenaza – antioksidativni protein)
LLE	eng. <i>liquid-liquid extraction</i> (tečno-tečna ekstrakcija)
IC₅₀	polovina maksimalne inhibitorne koncentracije ili koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do smanjenja broja živih ćelija za 50 % u odnosu na kontrolne ćelije)
ICH	eng. <i>International Council for Harmonisation</i> (Međunarodno veće za harmonizaciju)
IGF	eng. <i>Insulin-like growth factors</i> (faktor rasta sličan insulinu)
IGFR	eng. <i>Insulin-like growth factor – receptor</i> (receptor za faktor rasta sličan insulinu)
IS	eng. <i>Internal standard</i> (interni standard)
KV	Koeficijent varijacije
LOO	eng. <i>Leave-one-out</i> (validaciona metoda “izbaci jedan rezultat”)
LLOQ	eng. <i>Lower limit of quantification</i> (donja granica kvantifikacije)
mAbs	eng. <i>Monoclonal antibodies</i> (monoklonska antitela)
MF	eng. Matrix effect (uticaj matriksa)
MMP	eng. <i>Mitochondrial membrane permeabilization</i> (propustljivost mitohondrijalne membrane)
MMPs	eng. <i>Matrix metalloproteinases</i> (matriks metaloproteaze)
MRM	eng. <i>Multiple reaction monitoring</i> (metoda praćenja više jonskih tranzicija)

MPTP	eng. <i>Mitochondrial permeability transition pore</i> (mitohondrijalne propusne pore)
mTOR	eng. <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
OECD	eng. <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> (organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj)
PAMPA	eng. <i>Parallel artificial membrane permeability assay</i> (paralelno ispitivanje permeabilnosti na veštačkim membranama)
PARP	eng. <i>Poly ADP-ribose polymerase - Nuclear protein with a wide range of physiological as well as pathological functions</i> (jedarni protein sa širokom ulogom u fiziološkim i patofiziološkim uslovima)
PDB	eng. <i>Protein Data Bank</i> (elektronska baza podataka trodimenzionalnih struktura velikih bioloških molekula - proteina i nukleinskih kiselina)
PDGFR	eng. <i>Platelet-derived growth factor receptor</i> (receptor trombocitnog faktora rasta)
PI3K	eng. <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (fosfatidilinozitol 3-kinaza)
PK	eng. <i>Protein kinase</i> (protein kinaze)
PPB	eng. <i>Plasma protein binding</i> (vezivanje za proteine plazme)
PRESS	eng. <i>Parameters predictive error sum of squares</i> (statistički parametar koji se koristi u validaciji matematičkog modela)
PKA	Protein kinaza A
PKB	Protein kinaza B
PKC	Protein kinaza C
QC	eng. <i>Quality control sample</i> (kontrolni uzorak)
QSAR	eng. <i>Quantitative structure-activity relationships</i> (kvantitativni odnos strukture i dejstva)
RIA	eng. <i>Radioimmunoassay</i> (radio imunološko ispitivanje)

RMSD	eng. <i>Root mean square deviation</i> (statistički parametar za ocenu validnosti izvedene <i>docking</i> studije – kvadratni koren odstupanja položaja atoma liganda iz kristalografske i izračunate strukture)
RNS	eng. <i>Reactive nitrogen species</i> (reaktivna azotova jedinjenja)
ROS	eng. <i>Reactive oxygen species</i> (reaktivna kiseonikova jedinjenja)
RSD	Relativna standardna devijacija
RTK	Receptor-zavisne tirozin kinaze
SD	Standardna devijacija
SIM	eng. <i>Single ion monitoring</i> (metoda praćenja pojedinačnog jona)
SPE	eng. <i>Solid-phase extraction</i> (čvrsto-tečna ekstrakcija)
SRM	eng. <i>Selected Reaction Monitoring</i> (metoda praćenja odabrane jonske tranzicije)
TLC	eng. <i>Thin layer chromatography</i> (hromatografija na tankom sloju)
TNF	eng. <i>Tumor necrosis factor</i>
TRAIL	eng. <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> (TNF zavistan ligand za indukciju apoptoze)
UHPLC	eng. <i>Ultra High-performance liquid chromatography</i> (tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom)
ULOQ	eng. <i>Upper limit of quantification</i> (gornja granica kvantifikacije)
VGFR	eng. <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> (receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta)

1 UVOD

1 UVOD

Još je davne 1231. godine *Frederick II of Hohenstaufen* (vladar Nemačke i kralj Sicilije) doneo edikt u Palermu o razdvajanju farmacije i medicine. Farmacija je postala nauka koja se bavi razvojem i izradom lekovitih supstanci i lekova, njihovom pravilnom i racionalnom upotrebom. Nešto kasnije, 1498. godine donesena je prva farmakopeja *Nuovo Receptario, Firenca*, produkt apotekarske gilde (udruženja) i medicinskog društva.

Tehnološki razvoj, koji je započeo početkom prošlog veka, doprineo je efikasnijem otkrivanju i praćenju patoloških stanja kod ljudi. Istovremeno sa istraživanjem bolesti i uzroka bolesti rasla je i potreba za razvojem novih lekova. Od velike talidomidske krize, odnosno od 1965. godine, bezbednost lekova je zauzela centralno mesto u procesu odobravanja lekova za terapijsku primenu na ljudima - *risk based approach*. Uspostavljeni su farmaceutski regulatorni zahtevi kojima se definišu kriterijumi za ocenu kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti lekova, kao i za ocenu odnosa korist/rizik. Navedene ocene predstavljaju osnov i uporište u procesu odobravanja dolaska leka na tržište.

Nakon ere malih hemijskih molekula, koje zbog male strukture i relativno lakog prolaska kroz ćelijske membrane mogu delovati toksično oštećujući DNK lance malignih, ali i zdravih ćelija (zbog niskog stepena selektivnosti), od '90-tih godina prošlog veka započela je era biotehnoških lekova. Za razliku od malih hemijskih molekula koje nastaju u procesu sinteze u laboratorijskim uslovima, biotehnoške lekove proizvode živi organizmi. Karakteriše ih veliki volumen zbog čega ne ulaze u ćelije i toksičnost im je manja. Međutim, zbog toga što su biološki i biotehnoški lekovi u najvećem procentu proteini, čovekov organizam ih može prepoznati kao antigene i razviti antitela na njih (imunogenost).

U ovoj doktorskoj disertaciji predmet proučavanja su male sintetske molekule. Ove novosintetisane supstance su derivati 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina. U dosadašnjim istraživanjima pokazana je njihova citotoksična aktivnost na odabranim ćelijskim linijama u *in vitro* uslovima.^{1,2}

1.1 MALIGNNA OBOLJENJA – PODELA I KARAKTERISTIKE

Maligna oboljenja su značajan uzrok mortaliteta, a lečenje obolelih predstavlja veliki izazov u medicini. Okarakterisana su postojanjem malignog tkiva i malignih ćelija, čije su karakteristike sledeće:

- ⇒ **klonalno poreklo** (potiču od matične maligno izmenjene ćelije, koja proliferacijom daje klon malignih ćelija),
- ⇒ **autonomnost** (imaju nekontrolisani rast i proliferaciju jer razvijaju sopstvene signalne puteve i ignorišu postojeće inhibitore rasta i deobe; gube kontaktnu inhibiciju; izbegavaju ćelijsku smrt - apoptozu),
- ⇒ **anaplazija** (podležu nepotpunoj i nekoordinisanoj ćelijskoj diferencijaciji, što uzrokuje gubitak specifične ćelijske funkcije),
- ⇒ **metastaziranje i invazivnost** (imaju sposobnost neprekidnog rasta i razmnožavanja, karakteriše ih gubitak kohezivnosti i adhezivnosti što dovodi do odvajanja malignih ćelija sa površine malignih tumora i njihov prelazak u cirkulaciju),
- ⇒ **angiogeneza** (razvoj guste mreže krvnih sudova kojima se dopremaju hranljive materije za rast i razvoj malignog tkiva).³

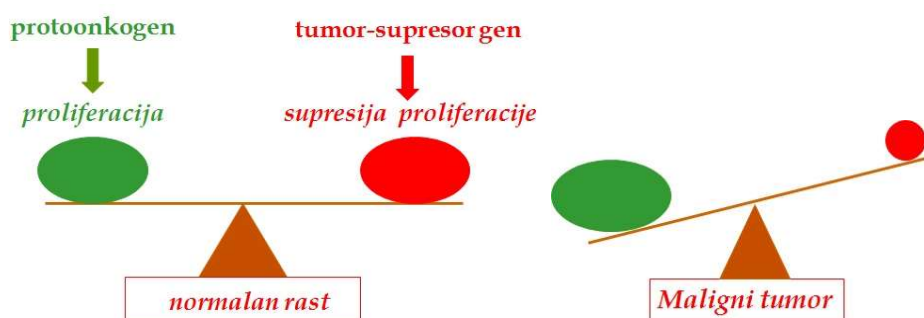
Maligni tumori se dele na solidne tumore i hematološke tumore.

1.1.1 Karcinogeneza i ciljna mesta

Karcinogeneza je proces nastanka i proliferacije malignih ćelija, formiranja i progresije malignog tumora. Izazivači karcinogeneze nazivaju se karcinogeni i dele se na genotoksične i negenotoksične. Genotoksični su ksenobiotici ili metaboliti koji reaguju sa DNK izazivajući mutaciju. Negenotoksični su mutageni koji stimulišu proliferaciju ćelija u mirovanju i citotoksini koji izazivaju regenerativnu ili reparativnu proliferaciju ćelija.^{4,5}

Maligne ćelije se svakodnevno formiraju, ali ih organizam odstranjuje kao nefunkcionalne. Gubitkom ove sposobnosti, kao i sposobnosti reparacije genetskih oštećenja dolazi do akumulacije mutacija i započinje karcinogeneza.^{6,7}

Genetska oštećenja izazivaju aktivaciju proto-onkogena u onkogene i inaktivaciju tumor-supresor gena (slika 1.1).



Slika 1.1: (Ne)ravnoteža protoonkogena i tumor-supresor gena

Onkogeni su geni koje karakteriše sposobnost stimulisanja ćelijskog rasta u odsustvu mitogenih signala i drugih signala ćelijskog ciklusa. Postoji razlika među onkogenima. Onkogeni čiji su onkoproteini smešteni u jedru imaju ulogu u regulisanju transkripcije i u ekspresiji gena. Oni uslovljavaju odsustvo apoptoze (besmrtnost ćelije). Onkogeni čiji su onkoproteini smešteni u citoplazmi izazivaju morfološke promene u ćeliji.⁸

1.1.1.1 Apoptoza

Apoptoza (grč. *a-po-toe-sis* – otpadati) je prirodni mehanizam uklanjanja svih oštećenih ćelija u koje spadaju i maligne ćelije.^{9,10} Pored apoptoze, kao programirane ćelijske smrti, ćelija može umreti i usled mehaničkog oštećenja ili trovanja ćelije autofagijom¹¹⁻¹⁴ ili drugim oblicima ne-apoptopske smrti uzrokovanim gubitkom matriksa.^{11,15-21}

Izostanak apoptoze malignih ćelija i njihova proliferacija integralni su deo karcinogeneze.

Apoptoza ili smrt ćelije prvi put je opisana 1972. godine.^{22,23} Apoptozu pokreću razna vrsta oštećenja na ćeliji, oštećenja na DNK lancu, a može nastati i usled nedostatka međućelijskih signala.^{9,24} Predstavlja dobro organizovan, energetski zavisian proces.

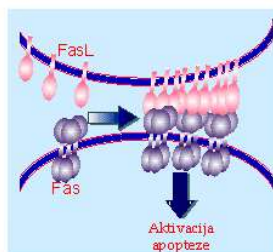
Tokom apoptoze dolazi do fragmentacije jedra i DNK, razgradnje jedarnih i citoskeletnih proteina i na kraju do formiranja apoptotskih tela i ekspesije markera na ćelijskoj membrani koji omogućavaju fagocitozu ovih fragmenata ćelije.²⁵

Apoptoza može biti pokrenuta spoljašnjim ili unutrašnjim putem, a tok apoptoze može biti kaspazno-zavisna ili kaspazo-nezavisna.

Spoljašnji put apoptoze započinje aktivacijom receptora smrti. Ovako pokrenut put apoptoze je uvek kaspazno-zavisna. Receptore smrti aktiviraju pokretači smrti ili apoptotični liganadi.^{26,27} U receptore smrti se ubrajaju:

- ⇒ Fas-receptor (FasR) poznat i kao APO-1 ili CD95 receptor,
- ⇒ tumor nekroza faktor (TNF),
- ⇒ limfotoksin (TNF β),
- ⇒ TRAIL (eng. *TNF-related apoptosis inducing ligand*).^{9,28}

Vezivanjem pokretača smrti za receptor smrti započinje autoproteolitički proces i aktivacija kaspaza.^{26,27} Kaspaze koordinišu kompleksnu kaskadu događaja u ćeliji, što rezultuje njenom smrću - kaspaza-zavisna apoptoza.



Slika 1.2: Receptor smrti i ligand smrti²⁹

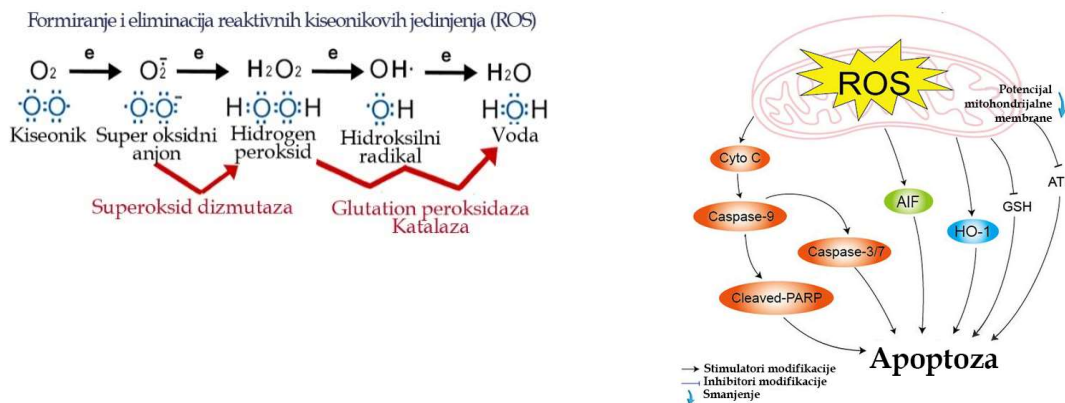
Fas-ligand (poznat i kao CD95 ligand) je pokretač smrti i predstavlja tip II transmembranskog proteina. Vezivanjem Fas-liganda za FasR indukuje se apoptoza (slika 1.2). Citoplazmatski delovi aktiviranog receptora smrti privlače različite proteine stvarajući supramolekularnu platformu, koja kontroliše aktivaciju kaspaze-8 ili 10. Nakon aktivacije ovih kaspaza započinje kaskadna aktivacija efektornih kaspaza -3, -6 i -7 što dovodi do apoptoze.³⁰

Interakcija Fas-ligand – Fas receptor igra važnu ulogu u regulaciji imunskog sistema i u karcinogenezi.^{31,32}

Unutrašnji put apoptoze (mitohondrijalni put): mitohondrije kod kojih dolazi do tranzitorne promene potencijala membrane imaju centralno mesto u unutrašnjem putu apoptoze. Unutrašnji put apoptoze pokreću različita stresna stanja: oštećenje na DNK, oksidativni stres, nedostatak faktora rasta, povećanje koncentracije jona Ca^{2+} u citozolu i dr., koja dovode do promene propustljivosti mitohondrijalne membrane (MMP). Promena u MMP-u izaziva oslobađanje proapoptogenih faktora iz mitohondrija: citohroma *c* i/ili faktora indukcije apoptoze (AIF).

Citohrom *c* aktivira kaspaza-zavisan put apoptoze, dok AIF pokreće kaspaza-nezavisan put apoptoze.

Citohrom *c* prelazi u citoplazmu i vezuje se za citoplazmatski protein označen kao APAF-1 pri čemu dolazi do njegove konformacione promene, koja uzrokuje aktivaciju kaspaze-9, a nakon toga i aktivaciju efektorne kaspaze-3. Nasuprot navedenom, AIF prelazi u jedro i nezavisno od kaspaza cepa DNK na fragmente i izaziva kaspaza-nezavisnu apoptozu³⁰ (slika 1.3).



Slika 1.3: Uloga ROS u apoptozi³³

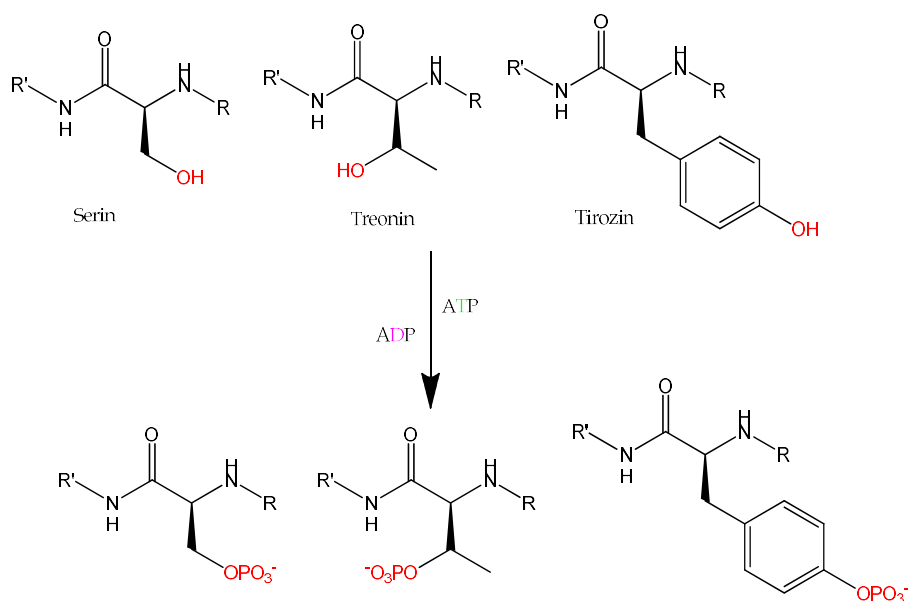
Kaspaza-zavisan put apoptoze ne isključuje kaspaza-nezavisan put i nekada ova dva puta mogu biti udružena.^{9,34}

Apoptozu mogu izazvati i slobodni radikali menjajući MMP. Slobodni radikali su reaktivna kiseonikova jedinjenja (ROS) i reaktivna azotova jedinjenja (RNS). ROS nastaju tokom aerobnog metabolizma ili pod dejstvom UV i X zračenja, a odstranjuju se u antioksidativnom procesu (ćelijski redoks proces) (slika 1.3). Kada se ovaj proces naruši, raste koncentracije ROS i javlja se ćelijski stres. Povećana koncentracija ROS-a uslovljava promenu u MMP i oslobađanje pro-apoptogenih faktora (citohrom *c* i AIF).^{23,35,36}

1.1.1.2 Protein kinaze

Protein kinaza (PK) su enzimi iz grupe fosfotransferaza. Protein kinaze vrše prenos fosfatne grupe sa visoko energetskog adenzin-trifosfata (ATP) na određene supstrate, čime ih fosforilišu i aktiviraju. PK imaju ulogu u regulisanju brojnih funkcija u ćeliji: permeabilnost, kontrakcija, migracija, hipertrofija, proliferacija, apoptoza, sekrecija, ćelijsko preživljavanje.²³ Enzimi iz grupe protein kinaza dele se na:

- ⇒ **tirozin kinaze** (fosfatna grupa se vezuje za tirozinske aminokiselinske ostatke u primarnoj strukturi PK – slika 1.4),
- ⇒ **serin/treonin kinaze** (fosfatna grupa se vezuje za serinske ili treoninske aminokiselinske ostatke u primarnoj strukturi PK – slika 1.4).



Slika 1.4: Fosforilacija aminokiselinskih ostataka

Tirozin kinaze mogu biti receptor-zavisne tirozin kinaze (RTK) ili receptor-nezavisne tirozin kinaze.

Receptor-zavisne tirozin kinaze (**RTK**) ili membranske tirozin kinaze imaju ključnu ulogu u prenosu informacija iz ekstraćelijskog prostora u citoplazmu. To su glikoproteini, receptori faktora rasta:

- a) receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR),
- b) receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta (VGFR),
- c) receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER2),
- d) receptor trombocitnog faktora rasta (PDGFR),
- e) receptor za faktor rasta sličan insulinu (IGFR).

Receptor-nezavisne tirozin kinaze ili citoplazmatske/jedarne tirozin kinaze učestvuju u sprovođenju signala kroz citoplazmu do jedra i u jedro. U ovu grupu spadaju Bcr-Abl tirozin kinaze. Bcr-Abl tirozin kinaze su grupa enzima koja obuhvata pro- i anti-apoptotske proteine. Imaju ulogu u regulisanju oslobađanja pro-apoptogenih faktora (citohrom *c* i AIF) iz mitohondrija ili međumembranskog prostora mitohondrija. U receptor-nezavisne tirozin kinaze spada i *Src* kinaza. *Src* kinaza je grupa nespecifičnih tirozin kinaza.

Vezivanjem odgovarajućeg faktora rasta za ekstracelularni domen RTK dešava se dimerizacija i/ili autofosforilacija i nastaje aktivna RTK. Citoplazmatski domen aktivirane RTK poseduje tirozin-kinaznu aktivnost i fosforilacijom receptor-nezavisnih tirozin kinaza vrši njihovu aktivaciju, čime se signal prenosi dalje kroz citoplazmu do jedra. Prenos signala odvija se:

- ⇒ putem cAMP ili
- ⇒ putem fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K).

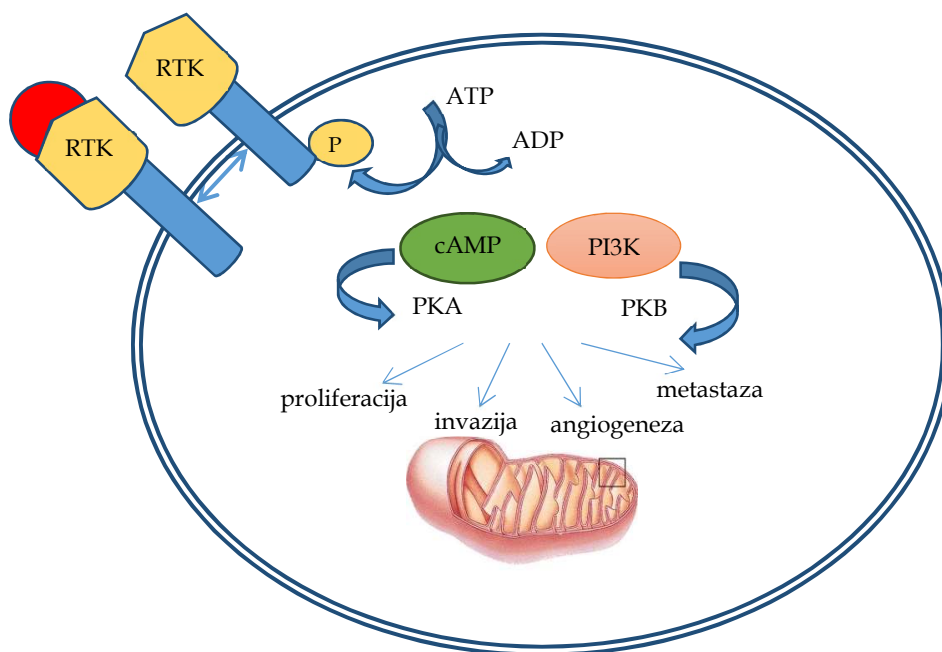
U prenosu signala putem cAMP učestvuje **protein kinaza A (PKA)**. Kada se cAMP veže za regulatorne subjedinice PKA menja se konformacija enzima, dolazi do disocijacije regulatornih subjedinica i aktivacije PKA. Aktivirana PKA daje biološke efekte: vrši fosforilaciju specifičnih enzima u odgovarajućem metaboličkom putu, a može regulisati i ekspresiju gena, ćelijsko lučenje i membransku permeabilnost.

U prenosu signala putem PI3K (PI3K/ Akt) učestvuje **protein kinaza B (PKB)**. PKB je označena i kao Akt (eng. *v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene*) ili **serin/treonin kinaza**. Aktivna PKB aktivira mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) što za posledicu ima aktivaciju signala koji promovišu proliferaciju ćelije i redukciju apoptoze.^{37,38}

Protein kinaza C (PKC) je najznačajniji predstavnik velike familije protein kinaza. PKC kontroliše dejstvo drugih proteina putem fosforilacije njihovih hidrosolubilnih grupa serinskih i treoninskih aminokiselinskih ostataka.

PKC grupa sadrži 10 izoenzima,²³ a aktiviraju se usled povećanja koncentracije diacilglicerola ili Ca^{2+} .

Povećan nivo aktiviranih protein kinaza uzrokuje ushodnu regulaciju signalnih puteva unutar ćelije, čime ćeliju vodi u nekontrolisanu proliferaciju (slika 1.5).



Slika 1.5: Uloga protein kinaza u regulaciji ćelijskog ciklusa i prenosu signala

1.1.1.3 Matriks metaloproteaze

Matriks metaloproteinaze (MMPs) su Ca^{2+} i Zn^{2+} zavisne endopeptidaze. Karakteriše ih sposobnost hidrolitičke razgradnje ekstracelularnih proteina i proteoglikanskih komponenti, kao i uticaj na funkcionisanje brojnih bioaktivnih molekula. Enzim iz grupe MMPs izlučuje se u latentnom (inaktivnom) obliku, a aktivacija se dešava posredstvom nekog drugog MMPs ili serin proteaze.³⁹ Grubo se dele na kolagenaze, želatinaze, stromelizine, membranske metaloproteinaze i druge.⁴⁰⁻⁴³ Primarnu strukturu matriks metaloproteinaza čine katalitički domen, aminoterminalni domen i karboksiterminalni domen.

Katalitički domen je odgovoran za hidrolizu supstrata.^{40,44-46} MMPs su uključeni u katalitičku degradaciju receptora na površini ćelija i inaktivaciju hemokina/citokina. Utiču na oslobađanje apoptotičnih liganada kao što je Fas-Ligand.^{31,32} Smatra se da MMPs igraju važnu ulogu u odvijanju brojnih ćelijskih funkcija: ćelijska proliferacija, migracija (adhezija/disperzija), diferencijacija, angiogeneza, apoptoza i imunološki procesi. MMPs imaju istovremeno i apoptopsku i anti-apoptopsku aktivnost.⁴⁷

Uloga MMPs u karcinogenezi objašnjava se i njihovim značajnim uticajem na sastav ekstracelularnog matriksa (ECM). MMPs izazivaju cepanje laminina, koji utiče na integrin signalni put.^{47,48} Ključni mehanizam u ekspanziji i invaziji malignog tkiva jeste degradacija ECM od strane membranski vezanih ili sekretornih proteaza, kao što su matriks metaloproteinaze, posebno MMP-2 i MMP-9.⁴⁹⁻⁵¹ Razgradnjom ECM, matriks metaloproteinaze indirektno olakšavaju vaskularizaciju, odnosno formiranje krvnih sudova kojima se malignim ćelijama dopremaju hranljivi sastojci, čime podspešuju angiogenezu.⁴⁰ Do sada je otkrivena uloga MMP-2, MMP-9 i MMP-14 u tumorskoj angiogenezi.^{40,47,52-55} Takođe, ustanovljeno je da EGFR signalni putevi promovišu MMP-9 aktivaciju u ćelijama humanih karcinoma.⁵⁶

1.1.2 Lečenje malignih oboljenja

Lečenje obolelih sa malignim tumorima sprovodi se prema standardnim kliničkim protokolima, koji obuhvataju hirurško lečenje (ukoliko je maligni tumor operabilan), potom radio-, hemio-, ciljanu-, i/ili biološku terapiju. Odabir terapijskog modaliteta vrši se na osnovu lokaliteta malignog tumora, stadijuma razvijenosti, stepena diferencijacije malignih ćelija, dostupnosti nabrojanih terapijskih opcija i karakteristika samog pacijenta.

Hemioterapija obuhvata primenu antiproliferativnih lekova. Antiproliferativne lekove karakteriše citotoksičnost i mala selektivnost zbog čega izazivaju značajna neželjena dejstva.

Ciljana terapija obuhvata primenu malih sintetskih molekula, koje interferiraju sa ćelijskim signalnim putevima uključenim u određeni tip malignog oboljenja. Lekovi iz ove grupe uneli su revoluciju u terapiji hematoloških malignih oboljenja, a predstavnik im je imatinib - inhibitor protein kinaze C. Ova kategorija lekova označena je kao „nibovi“. Treba naglasiti da su ciljna mesta njihovog delovanja protein kinazni receptori koji učestvuju u ćelijskim signalnim putevima od kojih zavisi ćelijski rast i proliferacija ili ćelijska smrt, odnosno apoptoza. Radi se o malim molekulama koje svoj efekat ostvaruju unutar ćelije. Za razliku od „nibova“ postoje „mabovi“ o kojima će kasnije biti više reči. Ovde samo treba naglasiti da i „nibovi“ i „mabovi“ imaju ista ciljna mesta delovanja, samo što „nibovi“ deluju intracelularno, a „mabovi“ ekstracelularno.

Pored signalnih puteva, ciljno mesto delovanja novih terapeutika su i matriks metaloproteinaze (MMPs). Dosadašnja iskustva (batimastat, marimastat, prinomastat) ukazuju na nisku selektivnosti ovih lekova, za koju se pretpostavlja da je izazvana visokim afinitetom vezivanja za jone Zn^{2+} .⁵⁷ Neselektivnost je razlog neuspešne kliničke primene ovih lekova.

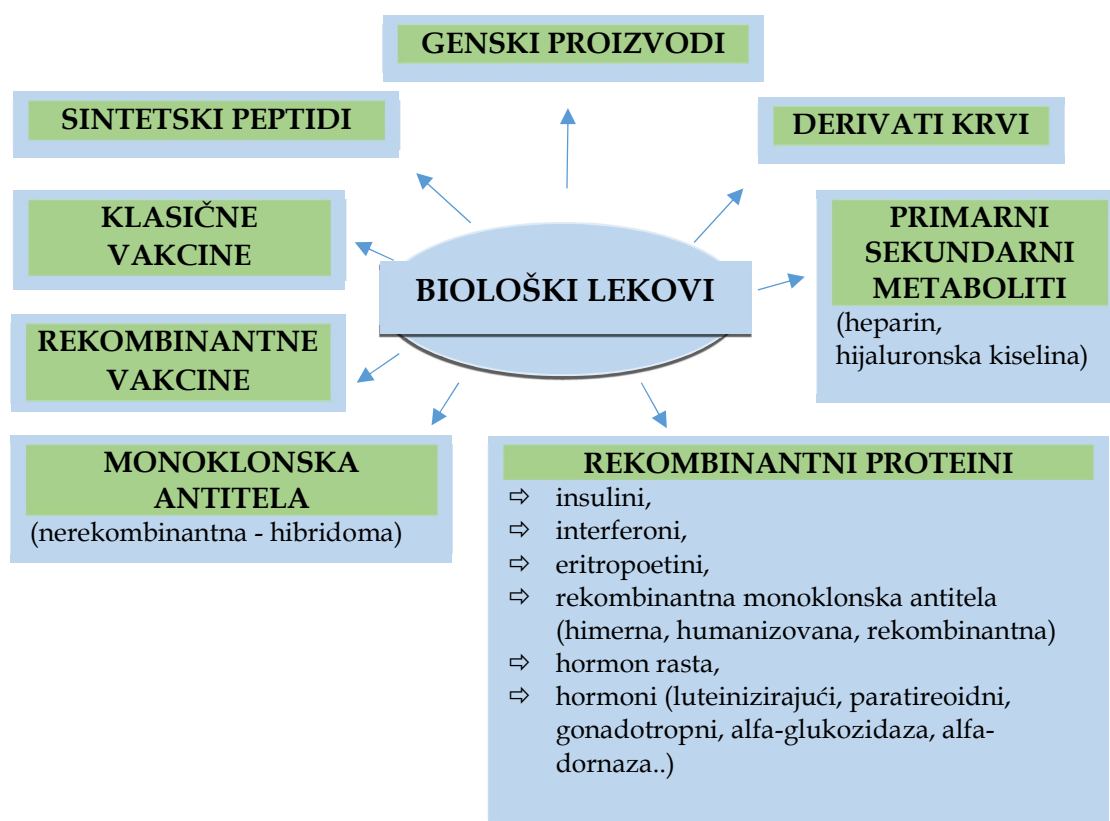
Biološka terapija obuhvata primenu bioloških lekova.

Biološki lek sadrži biološki aktivnu supstancu koju proizvodi živi organizam.

Biološki aktivne supstance mogu biti ugljeni hidrati, proteini, nukleinske kiseline, kompleksne kombinacije navedenih supstanci ili živi entiteti (ćelije ili tkiva), a mogu se dobiti:

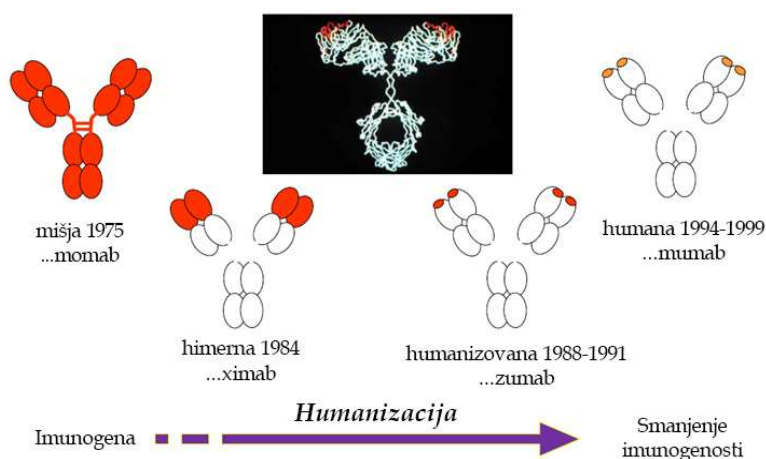
- ⇒ ekstrakcijom iz biološkog izvora,
- ⇒ primenom rekombinantne tehnologije, ili
- ⇒ sintetskim putem.

Za biološke lekove je potrebno uraditi karakterizaciju, izvršiti kontrolu proizvodnog procesa i odrediti kvalitet primenom fizičko-hemijskih i bioloških testova. Za ovu grupu lekova nije karakteristična toksičnost, jer zbog veličine molekule ne ulaze u ćelije, ali ih karakteriše imunogenost. Imunogenost se manifestuje pojavom alergijskih reakcija ili izostankom dejstva zbog pojave *anti-drug* antitela.⁵⁸ Na slici 1.6 prikazana je podela bioloških lekova.



Slika 1.6: Podela bioloških lekova⁵⁸

Monoklonska antitela (mAbs) ili „mabovi“ značajna su u lečenju malignih oboljenja. Razvoj mAbs išao je u pravcu njihove humanizacije i smanjivanja molekulske mase sa ciljem smanjenja rizika od imunogenosti (slika 1.7). Dele se na nerekombinantna mAbs dobijena hibridoma tehnologijom i rekombinantna mAbs u koja spadaju himerna, humanizovana i rekombinantna. Nerekombinantna mAbs se koriste u dijagnostičke svrhe, osim imunosupresiva muromonaba-CD3 (ortoklon OKT3).⁵⁸ Rekombinantna mAbs se koriste u terapijske svrhe. Ulaze u sastav brojnih kliničkih protokola za tretman malignih oboljenja različitih lokaliteta. Poznati predstavnici ove grupe lekova su bevacizumab i rituksimab.



Slika 1.7: Razvoj monoklonskih antitela⁵⁸

Genski lekovi su najnoviji vid terapije malignih oboljenja. Nastaju transfekcijom antionkogenata (“suicid gen terapija”).

Nedostaci u farmakoterapiji malignih tumora su:

- 1) **nedovoljna selektivnost** - posledično visoka toksičnost i manja bezbednost;
- 2) **razvoj rezistencije na terapiju** - razvija se vremenom i umanjuje efekte lečenja. Predstavlja odsustvo željene apoptoze malignih ćelija. Delimično se može prevazići povećanjem doze leka, ali povećanjem doze izraženiji su toksični efekti. Poremećaj u signalnom putu PIK3/Akt je vodeći uzročnik rezistencije.⁵⁹ Prisutna je i kod bioloških lekova kod kojih nastaje stvaranjem ranije pomenutih *anti-drug* antitela;

3) **otežano dopremanje leka kroz krvno-moždanu barijeru.**⁶⁰ Krvno-moždanu barijeru (BBB) čine fizička barijera koja je rezultat čvrstih veza između endotelnih ćelija⁶¹⁻⁶³ i biohemijska (metabolička) barijera, koja se aktivira u toku procesa prolaska ksenobiotika kroz BBB. Metaboličku barijeru predstavljaju metaboličke funkcije čiji su nosioci enzimi, koji prevode lipofilne supstance u hidrofilne i na taj način im onemogućavaju prolaz ka mozgu.^{60,61,64}

Proces penetracije lekovite supstance kroz BBB odvija se u najvećoj meri aktivnim transportom. U navedeni proces uključena su dva mehanizma: mehanizam ulaska pomognut transportnim proteinima i mehanizam izlaska („ispumpavanja“) koji je pomognut P-glikoproteinom (Pgp) i proteinima odgovornim za rezistenciju, a koji sprečavaju prolazak veće količine raznih vrsta lekova kroz BBB.⁶⁵⁻⁶⁷ Pgp je membranski protein BBB.^{68,69} Uloga mu je da eliminiše supstance potencijalno štetne za mozak.

Preuzimanje leka iz sistemske cirkulacije u mozak koreliše sa brojnim fizičko-hemijskim karakteristikama leka: lipofilnost, površina molekule, naelektrisanje, veličina molekule, molekularna fleksibilnost, broj veza koje se mogu rotirati i broj potencijalnih vodoničnih veza.^{61,70-73} Drugi faktori od značaja za prolazak leka kroz BBB obuhvataju vezivanje leka za proteine plazme (PPB), aktivni transport u CNS istiskivanje leka.^{61,68,74-77} Opisan je jednostavan set od 2 pravila, na osnovu kojih se može predvideti CNS aktivnost lekovite supstance:

- ⇒ $N + O$ (broj azotovih i kiseonikovih atoma u molekuli) ≤ 5 ukazuje na veliku verovatnoću za prolazak BBB;
- ⇒ Drugo pravilo je: $\log P - (N + O) =$ pozitivna vrednost pokazuje da je lekovita supstanca CNS aktivna.^{71,78}

Intenzivno se radi na otkrivanju novih terapijskih opcija, koje bi umanjile izostanak rezistencije, veću selektivnost, zaustavljanje rasta ćelije u G0/G fazi, čime bi lečenje malignih tumora - jake proliferacije i invazije malignih ćelija, posebno onih koje imaju nizak stepen diferencijacije, bilo uspešnije.

1.2 DERIVATI 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA SA POTENCIJALNIM CITOTOKSIČNIM DEJSTVOM

Tim istraživača sa Hemijskog fakulteta i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu radi na razvoju Pt(IV) kompleksa, čiju organsku osnovu čine:

⇒ (S,S)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina i njeni estri sa metanolom, etanolom, propanolom, butanolom i izobutanolom,^{1,38,79} i

⇒ (S,S)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina i njeni estri sa metanolom, etanolom, propanolom, butanolom, izobutanolom, pentanolom i izopentanolom.^{2,79,80}

Kao *lead molecule* koristi se cisplatin (diammin-dihlorido-platina(II)). Cisplatin je sintetisan 1845. godine, struktura mu je prvi put opisana u literaturi 1893. godine. U terapiji se od 1911. godine koristio kao antibiotik, a 1965. godine otkrivena je njegova citotoksična aktivnost i od tada se koristi kao hemioterapeutik.

U dosadašnjim ispitivanjima, navedeni kompleksi pokazali su dobru antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama humanog glioma (U251) i glioma pacova (C6), mišjeg fibrosarkoma (L929) i melanoma (B16) i humanim leukemijskim ćelijama (HL-60). Na analiziranim ćelijskim linijama cisplatin je pokretao apoptozu zavisnu od kaspaza, a novi Pt(IV) kompleksi indukovali su oksidativni stres praćen vakuolizacijom citoplazme, narušavanjem integriteta ćelijske membrane i izostajanjem kaspazne aktivacije i protektivne autofagije.^{38,81} Međutim, posebnu pažnju privukao je ispoljeni citotoksični efekat liganada navedenih kompleksa.

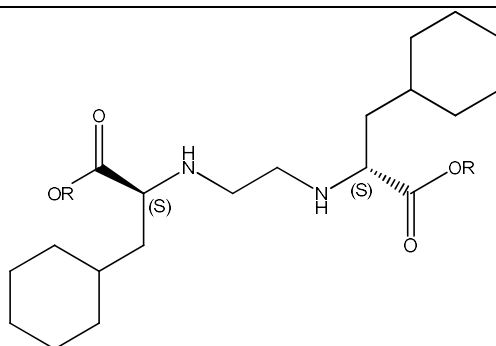
1.2.1 Derivati 1,2-etandiamina

Prema teorijskim ispitivanjima i proračunima etandiaminski fragment u organskom molekulu može uslovljavati značajnu antitumorsku aktivnost.^{82,83}

Istraživačka grupa pod rukovodstvom Tibora J. Sabo sintetisala je (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propansku kiselinu i odgovarajuće metil, etil, propil, butil i izobutil estre (tabela 1.1) na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Hemijska struktura novosintetisanih jedinjenja okarakterisana je i publikovana.^{38,81} Stereoselektivna sinteza realizovana je upotrebom *S*-aminokiseline.⁸³⁻⁸⁵ Pored etandiaminske grupe, važan strukturni fragment čine dve cikloheksil grupe, koje povećavaju lipofilnost i time olakšavaju prolazak kroz ćelijske membrane.⁸¹

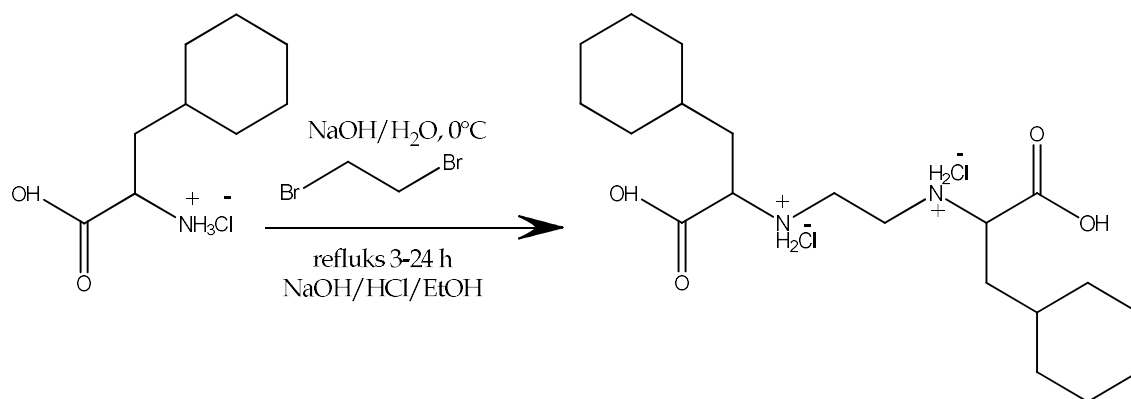
Ispitivanjem rastvorljivosti sintetisanih liganada u dimetil sulfoksidu (DMSO) utvrđeno je da etil ester ima najveću rastvorljivost ~ 10 mg/ml na 25 °C u poređenju sa ostalim estrima, čija je rastvorljivost iznosila ~ 5-6 mg/ml na 35-45 °C.³⁸

U tabeli 1.1 dat je prikaz derivata 1,2-etandiamina.

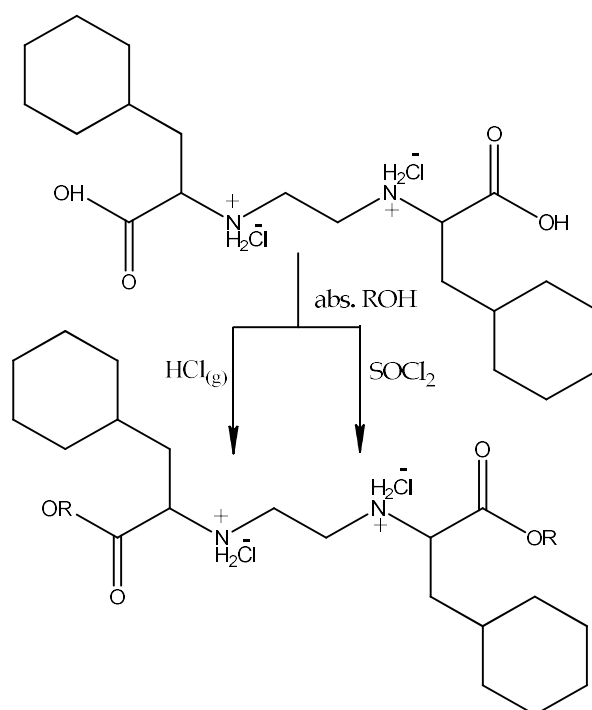
Tabla 1.1: Derivati 1,2-etandiamina

	Skraćeni naziv	R
<i>(S,S)</i> -etandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina	EDCP	H
<i>(S,S)</i> - <i>O,O</i> -dimetil-1,2-etandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DM-EDCP	CH ₃
<i>(S,S)</i> - <i>O,O</i> -dietil-1,2-etandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DE-EDCP	C ₂ H ₅
<i>(S,S)</i> - <i>O,O</i> -dipropil-1,2-etandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DP-EDCP	C ₃ H ₇
<i>(S,S)</i> - <i>O,O</i> -dibutil-1,2-etandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DB-EDCP	C ₄ H ₉
<i>(S,S)</i> - <i>O,O</i> -diizobutil-1,2-etandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DIB-EDCP	C ₄ H ₉

Sinteza derivata 1,2-etandiamina prikazana je na shemama 1.1 i 1.2.



Shema 1.1: Sinteza kiseline⁸⁶



Shema 1.2: Sinteza estara⁸⁷

In vitro citotoksična aktivnost derivata 1,2-etandiamina ispitana je na humanim leukemijskim ćelijama i mononuklearnim ćelijama izolovanim iz uzorka periferne krvi zdravih dobrovoljaca i obolelih od leukemije: humana promijelocitna leukemija (HL-60), limfocitna (REH), mijelogena eritroleukemija (K562), akutna mijelogena (KG-1), akutna limfoblastna (MOLT-4) i B-promijelocitna leukemija (JVM-2).

Citotoksičnost je određivana kolorimetrijskim metodama zasnovanim na merenju aktivnosti kisele fosfataze i laktat dehidrogenaze nakon 24 h tretmana leukemijskih ćelija dvostruko opadajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja (100-1,56 μM). Za svako ispitivano jedinjenje i na svakoj od korišćenih ćelijskih linija aktivnost je izražena kao koncentracija koja je dovela do smanjenja broja živih ćelija za 50 % u odnosu na kontrolne ćelije (IC_{50} vrednost).³⁸

U sprovedenim ispitivanjima najveću aktivnost je pokazao dietilestar (DE-EDCP), a sa povećavanjem alkil niza uočeno je smanjenje aktivnosti: etil-estar>metil-estar>propil-estar>butil-estar=kiselina.¹ HL-60 ćelijska linija pokazala se kao najosetljivija na citotoksično dejstvo ispitivanih jedinjenja. Citotoksičnost etil-estra ispitana na HL-60 ćelijskoj liniji iznosi $\text{IC}_{50}=10,7-45,4 \mu\text{M}^1$ što je bilo statistički značajno ($p<0,05$) i istog je reda veličine kao i citotoksičnost cisplatine iako DE-EDCP ne sadrži platinu. U subtoksičnim dozama DE-EDCP dovodi do diferencijacije HL-60 ćelija, a poznato je da viši stepen diferencijacije maligne ćelije znači i manji stepen njene agresivnosti. Objavljeni rezultati dosadašnjih ispitivanja ukazuju i na selektivno delovanje DE-EDCP jedinjenja, jer su na citotoksično dejstvo osetljivije maligne ćelije u odnosu na zdrave.^{1,38,79}

Rezultati ispitivanja ukazuju na apoptozu leukemijskih ćelija nezavisnu od kaspaza, kao osnovni mehanizam citotoksičnog dejstva. Apoptoza je posledica indukovanog oksidativnog stresa uzrokovanog hiperprodukcijom ROS-a, odnosno superoksidnih anjona (O_2^{\bullet}). Povećana koncentracija ROS-a dovodi do pojačane depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, otvaranja mitohondrijalnih propusnih pora (MPTP) i izlaska malih molekula proapoptogenih faktora, citohrom *c* i AIF iz mitohondrija.

Zbog najveće potentnosti za dalja ispitivanja izabran je DE-EDCP i ćelijska linija HL-60.³⁸

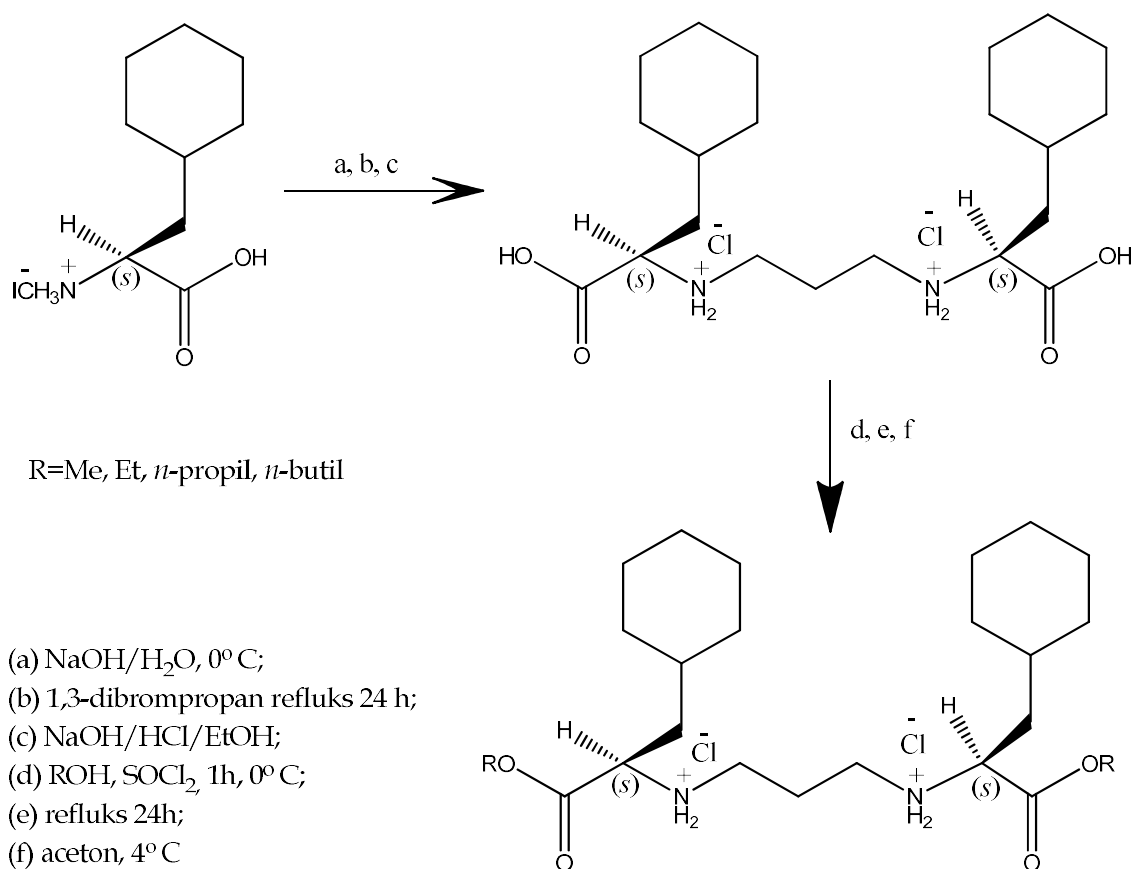
1.2.2 Derivati 1,3-propandiamina

Viši homolozi derivata 1,2-etandiamina predstavljeni su kao (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina i njeni metil-, etil-, *n*-propil-, *n*-butil- i-butil-, *n*-pentil- i-pentil- estri. Imaju jedan ugljenikov atom više u mostu između dve amino grupe (tabela 1.2), a sintetisala ih je istraživačka grupa Tibora J. Sabo na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.^{2,79,80}

Tabla 1.2: Derivati 1,3-propandiamina

		Skraćeni naziv	R
(<i>S,S</i>)-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina	PDCP	H	
(<i>S,S</i>)- <i>O,O</i> -dimetil-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DM-PDCP	CH ₃	
(<i>S,S</i>)- <i>O,O</i> -dietil-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DE-PDCP	C ₂ H ₅	
(<i>S,S</i>)- <i>O,O</i> -dipropil-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DP-PDCP	C ₃ H ₇	
(<i>S,S</i>)- <i>O,O</i> -dibutil-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DB-PDCP	C ₄ H ₉	
(<i>S,S</i>)- <i>O,O</i> -diizobutil-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DIB-PDCP	C ₄ H ₉	
(<i>S,S</i>)- <i>O,O</i> -dipentil-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DPE-PDCP	C ₅ H ₁₀	
(<i>S,S</i>)- <i>O,O</i> -diizopentil-1,3-propandiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat	DIPE-PDCP	C ₅ H ₁₀	

Sinteza derivata 1,3-propandiamina prikazana je na shemi 1.3.



Shema 1.3: Sinteza (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i njenih estara²

In vitro citotoksična aktivnost jedinjenja PDPCP, DM-PDPCP, DE-PDPCP, DP-PDPCP, DB-PDPCP i DIB-PDPCP ispitana je na pet tumorskih ćelijskih linija: gliom pacova (C6) i humani gliom (U251), mišji fibrosarkom (L929), humani neuroblastom (SHSY-5Y) i humana promijelocitna leukemija (HL-60).⁸⁰ *In vitro* citotoksična aktivnost jedinjenja DIB-PDPCP, DPE-PDPCP, DIPE-PDPCP ispitana je na šest tumorskih ćelijskih linija: karcinom grlića materice (HeLa), alveolarni bazalni adenokarcinom (A549), karcinom dojke (MDA-MB-231), kolorektalni adenokarcinom (LS-174), humana ćelijska linija fibroblasta iz pluća (MRC-5) i humana ćelijska linija endotela (EA.hy 926).⁸⁰

Rezultati pokazuju da su IC_{50} vrednosti za ligande DM-PDCP, DE-PDCP, DP-PDCP, DB-PDCP niže u poređenju sa kiselinom (PDCP) na svim ćelijskim linijama, osim na ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma (SH-SY5Y).⁸⁰ Pored navedenog, dobijeni rezultati pokazuju da DB-PDCP ima snažnije citotoksično dejstvo u odnosu na cisplatinu na obe najosetljivije ćelijske linije glioma ($IC_{50}=3,55-4,01$), što je bilo statistički značajno ($p<0,05$).^{2,79,80}

Ispitivanje mehanizma citotoksičnog delovanja, odnosno utvrđivanje tipa ćelijske smrti, vršeno je na najosetljivijoj ćelijskoj liniji - ćelijama humanog glioma (U251) i sa najefikasnijim ligandom DB-PDCP. Zapažena je akumulacija U251 ćelija u G_0/G_1 fazi ćelijskog ciklusa, praćena povećanjem broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem, odnosno fragmentisanom DNK.² DB-PDCP indukuje proizvodnju ROS u ćelijama glioma, nakon čega sledi aktivacija kaspaza i fragmentacija DNK.⁸⁰

1.3 RAZVOJ I VALIDACIJA BIOANALITIČKE METODE

Bioanalitička metoda predstavlja analitičku metodu, koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu lekova i njihovih metabolita iz biološkog materijala (serum, plazma, krv, urin, saliva, homogenat jetre, mozga, bubrega). Bioanalitička metoda se koristi za praćenje leka i njegovih metabolita kod životinja tokom pretkliničkih ispitivanja, odnosno, u humanom biološkom materijalu tokom kliničkih ispitivanja. Pretklinička i klinička ispitivanja sprovode se sa ciljem ispitivanja toksikoloških karakteristika leka i njegovih metabolita i ispitivanja farmakokinetičkog profila (farmakokinetičkih i farmakodinamskih karakteristika leka).

Bioanalitičke metode imaju primenu i prilikom ispitivanja biološke raspoloživosti lekova, biološke ekvivalentnosti lekova (studije bioekvivalencije). Studije bioekvivalencije se koriste za potvrđivanje suštinske sličnosti generičkih lekova sa odgovarajućim referentnim (inovativnim lekovima).

Bioanalitičke metode, koje se najčešće primenjuju, su:

- ⇒ klasične hromatografske tehnike udružene sa masenom spektrometrijom:
 - ✓ gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (GC-MS),
 - ✓ tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) ili pod ultra visokim pritiskom (UHPLC) spregnuta sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS),
- ⇒ tehnike vezivanja liganada (RIA, ELISA).

1.3.1 Ekstrakcija analita iz biološkog matriksa

Ono što bioanalitičku metodu razlikuje od klasične analitičke metode jeste priprema uzorka. Uzorak za bioanalitičku metodu se dobija ekstrakcijom iz biološkog matriksa. Metode ekstrakcije mogu biti:

- a) **Čvrsto-tečna ekstrakcija** (SPE) koja se zasniva na selektivnoj raspodeli analiziranih supstanci između čvrste i tečne faze. Čvrsta faza je adsorbens. Tečna faza može biti i emulzija, gas ili superkritični fluid.

- b) **Tečno-tečna ekstrakcija** (LLE) zasniva se na selektivnoj raspodeli analiziranih supstanci između dve tečne faze.
- c) **Precipitacija proteina** je metoda ekstrakcije kojom se vrši odvajanja proteina iz biološkog materijala dodatkom perhlorne kiseline, trihlorsirćetne kiseline ili pet zapremina acetonitrila ili metanola.⁸⁸

Čvrsto tečna ekstrakcija danas ima najširu primenu, a za sprovođenje ovog tipa ekstrakcije koriste se različite vrste adsorbensa:

- ⇒ Normalno fazna SPE upotrebljava se kada je analizirana supstanca polarna. Adsorbens je polaran. Analizirana supstanca sa adsorbensom ostvaruje vodonične veze, dipol-dipol interakcije ili π - π interakcije.
- ⇒ Reverzno fazna SPE upotrebljava se kada je analizirana supstanca nepolarna ili slabo polarna. Adsorbens je nepolaran, a između analizirane supstance i adsorbensa ostvaruju se *Van der Waals*-ove (particione, hidrofobne) interakcije.
- ⇒ Jonoizmenjivačka SPE može biti anjonska i katjonska. Zadržavanje analizirane supstance na adsorbensu ostvaruje se na osnovu elektrostatičkog privlačenja njihovih funkcionalnih grupa. Da bi do elektrostatičkog privlačenja došlo, funkcionalne grupe moraju biti u jonizovanom obliku što se postiže odabirom i podešavanjem pH vrednosti rastvora uzorka u odnosu na pKa vrednosti analiziranih supstanci i adsorbensa.⁸⁹

Postupak SPE čine sledeći koraci:

- 1) Kondicioniranje (aktiviranje kolone) izvodi se propuštanjem rastvarača ili smeše rastvarača kroz kolonu/kertridž.
- 2) Nanošenje uzorka, pri čemu dolazi do ostvarivanja interakcija između adsorbensa i analizirane supstance.
- 3) Ispiranje komponenti iz biološkog matriksa sa adsorbensa, pri čemu analiziranu supstancu treba zadržati na adsorbensu.
- 4) Eluiranje – spovodi se primenom rastvarača koji imaju jaku elucionu moć. Rastvarač treba da raskine uspostavljene veze između analizirane supstance i adsorbensa. Brzina eluiranja može uticati na reproduktivnost.^{89,90}

1.3.2 Tečna hromatografija sa masenom detekcijom

Hromatografija je fizičko-hemijska metoda koja omogućava razdvajanje izolovanje identifikaciju i određivanje sastava smeše, na osnovu procesa koji se dešavaju na granici dve faze koje se ne mešaju. Jedna faza je stacionarna i može biti čvrsta ili tečna, a druga je mobilna, tečna ili gasovita i ona prelazi preko stacionarne faze.⁹¹

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) je vrsta tečne hromatografije koja se odvija na koloni. Mobilna faza prolazi kroz kolonu pod visokim pritiskom, što znatno ubrzava njen protok. U zavisnosti od polarnosti faza razlikuju se dva hromatografska sistema: sistem reverznih faza i sistem normalnih faza.⁹¹ Delovi HPLC sistema su: rezervoar mobilnih faza, mešač mobilnih faza, degazer, pumpa, injektor, pretkolona, kolona, detektor, kolektor, računar.

Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom (UHPLC) je metoda koja ima mnogo veću efikasnost od klasične HPLC. U UHPLC koriste se stacionarne faze čiji je dijametar čestica manji od 2 μm . Klasični HPLC sistemi koriste kolone sa veličinom čestica 3,5-10 μm (obično 3,5 ili 5 μm). Smanjenje veličine čestica kod UHPLC sistema značajno poboljšava rezoluciju, skraćuje trajanje analize i povećava osetljivost detekcije. Pokazano je da je kod UHPLC sistema čak 3 puta bolja rezolucija u poređenju sa klasičnom HPLC. Jedini problem je što se smanjenjem veličine čestica povećava otpor protoku mobilne faze kroz kolonu. Zbog toga je potrebno primeniti mnogo viši pritisak (višestruko viši pritisak u odnosu na kolonu sa česticama veličine 5 μm) da bi se obezbedio protok mobilne faze. Injektor, predkolone, kolone, detektor i ostali delovi UHPLC sistema moraju biti prilagođeni da podnesu visoke pritiske.⁹²

Masena spektrometrija (MS) se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu, kao i za strukturnu karakterizaciju supstanci. Rezultati dobijeni masenom spektrometrijom mogu biti prikazani na više načina u zavisnosti šta je cilj analize.⁹³

Maseni spektrometar je aparat koji stvara snop jona čija se raspodela vrši prema njihovom odnosu masa i naelektrisanja (m/z odnos). Na kraju se obezbeđuje izlazni signal koji je mera relativne količine svakog od prisutnih jona. Primena masene spektrometrije podrazumeva da se molekuli moraju adekvatnim postupkom prevesti u jone i to u gasovitom stanju, jer samo joni mogu biti detektovani, dok se čestice koje nemaju naelektrisanje uklanjaju iz sistema uz pomoć vakuum pumpe.

Joni se detektuju na osnovu m/z odnosa. Navedeni m/z odnos je neimenovan broj i predstavlja odnos mase molekula koji se ispituje i njegovog naelektrisanja. Poznavanje vrednosti m/z za određeni molekul koristi se za kvalitativnu analizu, a broj jona odnosno jačina signala, za kvantitativnu analizu. U zavisnosti od hemijskih osobina analizirane supstance, u masenom analizatoru mogu nastati pozitivni ili negativni joni. Prinos pozitivnih i negativnih jona može biti različit u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova. Tokom analize se prate ili pozitivni ili negativni joni, odnosno, analiza se sprovodi u pozitivnom ili u negativnom modu. Odabir moda vrši se pre početka analize, na osnovu podatka koji joni (pozitivni ili negativni) daju veću osetljivost detektora.

MS je veoma osetljiva tehnika jer može detektovati analit u veoma malim količinama, reda veličine 10^{-12} g i u veoma kompleksnim smešama.⁹²

Postoji veliki broj masenih spektrometara. Razlikuju se po vrsti osnovnih komponenata koje sadrže. Odabir komponenata zavisi od cilja analize koja se sprovodi. Osnovne komponente svih MS-instrumenata su:

- 1) sistem za uvođenje uzorka,
 - 2) izvor jonizacije,
 - 3) maseni analizator,
 - 4) detektor,
 - 5) računar.
- 1) Jedan od **sistema za uvođenje uzorka** je sistem direktnog ulivanja pomoću kapilarne kolone. Ovakav način uvođenja uzorka je pogodan zato što uzorak direktno iz tečnog hromatografa ulazi u maseni detektor.

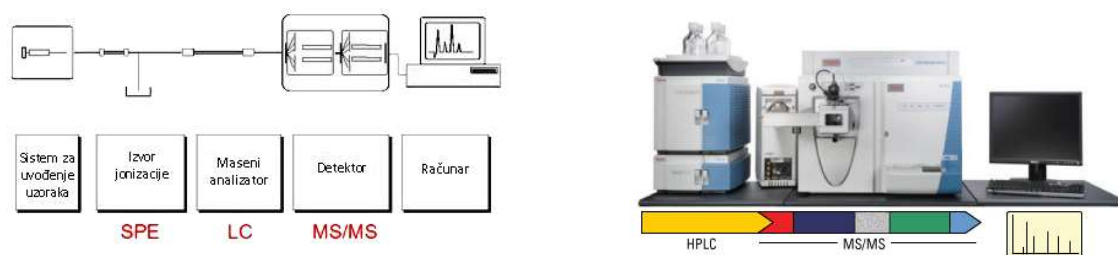
- 2) **Izvor jonizacije** je deo uređaja koji jonizuje neutralne molekule analita i na taj način omogućava dalju analizu. Najčešće tehnike jonizacije su: jonizacija udarom elektrona (EI), hemijska jonizacija (CI), elektro-sprej jonizacija (ESI), hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI), fotojonizacija pod atmosferskim pritiskom (APPI), laserska desorpcija i jonizacija potpomognuta matriksom (MALDI), bombardovanje brzim atomima (FAB).⁹³ ESI je zajedno sa MALDI metoda izbora za analizu biomolekula i ksenobiotika u današnje vreme.⁹² Pored toga, metoda ESI je posebno pogodna za kombinovanje sa LC, jer molekularni joni nastaju u spreju rastvora mobilne faze pod uticajem jakog električnog polja. Postoji modifikacija navedene metode koja se označava kao HESI i pri kojoj se, za razliku od ESI, jonizacija odvija na povišenoj temperaturi.
- 3) **Maseni analizator (m/z analizator)** je strukturno najbitniji deo MS uređaja. U njemu se vrši razdvajanje jona prema njihovom "ponašanju" u električnom i/ili magnetnom polju, a koje je zavisno od njihovog m/z odnosa. Na osnovu različitog ponašanja u prostoru ili vremenu, vrši se razdvajanje jona kako bi se izmerila njihova količina. Pri tumačenju rezultata m/z odnos se uzima kao neimenovana veličina. Vrednost m/z odnosa zavisi najviše od masenog broja jedinjenja (m), pa je samim tim i razdvajanje zasnovano na molekularnoj masi. Kvadrupol je maseni analizator koji ima prednost u kvantitativnoj LC-MS analizi zbog visoke osetljivosti, ali ima slabiju primenu u kvalitativnoj analizi. Redno povezani maseni analizatori čine tandem MS/MS i predstavljaju metodu koja pored toga što detektuje zadatu supstancu preko njenog m/z odnosa ima mogućnost da uz pomoć kolizionog gasa (najčešće argon ili helijum) vrši fragmentaciju supstance. Ovi novonastali fragmenti mogu da se naknadno detektuju preko njihovih m/z odnosa.
- Jedan od najčešće korišćenih masenih analizatora u bioanalitičkim metodama je trostruki kvadrupol. Trostruki kvadrupol se sastoji od tri kvadrupola.

U pojedinačnom kvadrupolu se uz pomoć oscilatornih električnih polja selektivno stabilizuju ili destabilizuju putanje jona koji prolaze kroz radiofrekventno polje. U trostrukom kvadrupolu, tri pojedinačna kvadrupola su redno povezana i svaki od njih ima različitu funkciju: prvi (Q1) detektuje i selektuje željeni jon; drugi (Q2), koji se naziva još i kolizijska ćelija koristi kolizijski gas (argon ili helijum) da cepa selektovane jone na fragmente; treći kvadrupol (Q3) analizira fragmentisane jone.⁹² Ovako se specifičnije određuju joni.

- 4) **Detektor** je poslednji element u masenom spektrometru. Ovaj deo uređaja registruje jon selektovan u masenom analizatoru, koji pada na njegovu površinu ili prođe pored njega, i pretvara ga u izlazni električni signal koji se dalje obrađuje u računaru.
- 5) **Računar** od izlaznih signala stvara maseni spektar i omogućava njegovu vizuelizaciju.

Pored ovih osnovnih delova, MS instrument sadrži i turbomolekularnu vakuum pumpu, koja obezbeđuje neophodni visoki vakuum u sistemu.

Svi delovi LC-MS/MS uređaja povezani su sa računarem, preko koga se uz pomoću odgovarajućeg programa (*software*) kontroliše rad čitavog sistema i svih parametara (slika 1.8).



Slika 1.8: Šema LC-MS/MS uređaja^{94,95}

1.3.3 Validacija bioanalitičke metode

Validacija metode je važan deo Dobre proizvođačke prakse (GMP) i Dobre laboratorijske prakse (GLP) i prvi je nivo u procesu obezbeđivanja kvaliteta.

Validacija analitičkih metoda sprovodi se na osnovu smernica koje su na snazi i koje su objavljene od strane vodećih regulatornih tela za oblast lekova:

- ⇒ Međunarodno veće za harmonizaciju (ICH) - smernica za validaciju analitičkih procedura: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*;
- ⇒ Američka Agencija za hranu i lekove (FDA) - vodič za validaciju bioanalitičkih metoda: *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, 2001;⁹⁶
- ⇒ Evropska Agencija za lekove (EMA) - vodič za validaciju bioanalitičkih metoda EMA: *Guideline on bioanalytical method validation*, 2011.⁹⁷

Validacija bioanalitičke metode obuhvata ispitivanja kojima se pokazuje da li razvijena metoda daje pouzdane i reproduktivne rezultate.

Validacija bioanalitičke metode može biti:

- a) Potpuna validacija (eng. *Full validation*),
- b) Delimična validacija (eng. *Partial validation*),
- c) Ukrštena validacija (eng. *Cross validation*).

Potpuna validacija izvodi se u sledećim slučajevima:

- ⇒ razvoj nove bioanalitičke metode,
- ⇒ ispitivanje novog leka sa ranije razvijenom metodom ili
- ⇒ uvođenje praćenja novog metabolita.

Delimična validacija izvodi se ukoliko se javle određene promene u ranije validiranoj bioanalitičkoj metodi. Promene mogu biti:

- ⇒ transfer bioanalitičke metode (inter-laboratorijski ili intra-laboratorijski),
- ⇒ promene u analitičkoj proceduri (npr. izmena sistema za detekciju signala),
- ⇒ promena antikoagulansa koji se koristi za obradu biološkog materijala,
- ⇒ promena vrste biološkog matriksa u okviru iste biološke vrste,
- ⇒ promena u postupku ekstrakcije,
- ⇒ promena koncentracionog opsega za kvantitativnu analizu analita,

- ⇒ promena uslova čuvanja uzoraka,
- ⇒ promene u opremi i
- ⇒ izmene u softveru.

Delimična validacija može podrazumevati ispitivanje samo jednog parametra validacije, npr. tačnost ili preciznost, integritet pri razblaženju ili ispitivanje gotovo svih parametara validacije.

Ukrštena validacija predstavlja poređenje vrednosti validacionih parametara dobijenih primenom različitih bioanalitičkih metoda u sklopu jedne laboratorije ili primenom iste bioanalitičke metode u različitim laboratorijama. Ukrštena validacija se sprovodi na način da se isti set rastvora kontrolnih uzoraka (QC) i ispitivanih uzoraka analizira primenom obe metode. Razlike u rezultatima kvantitativne analize, dobijenim primenom posmatranih metoda ne smeju biti veće od 15 % za QC, odnosno, veće od 20 % za ispitivane uzorke.

QC uzorci za validaciju metode pripremaju se na način da se prazan biološki materijal (eng. *blank sample*) optereti ili spajkuje (eng. *spike sample*) referentnim standardom. Referentni standardi moraju biti sertifikovani, komercijalni ili supstance sintetisane u hemijskoj laboratoriji odgovarajućeg stepena čistoće (dobijena struktura treba da bude potvrđena najmanje elementalnom analizom). Vrsta biološkog matriksa koja se koristi za validaciju metode treba biti identična onoj u kojoj će se nalaziti ispitivano jedinjenje tokom pretkliničkih i kliničkih ispitivanja.

Validacioni parametri koji se određuju u postupku validacije bioanalitičke metode su:

- a) linearnost – kalibraciona kriva (eng. *Calibration curve or Calibration range*),
- b) tačnost (eng. *Accuracy*),
- c) limiti kvantifikacije: donji limit kvantifikacije (eng. *Lower limit of quantification* – LLOQ) i gornji limit kvantifikacije (eng. *Upper limit of quantification* - ULOQ),
- d) preciznost (eng. *Precision*),
- e) selektivnost (eng. *Selectivity*),
- f) stabilnost (eng. *Stability*),

- g) *Recovery* (eng. *Recovery* ili *Extraction efficiency*) (prema FDA smernicama),
- h) zaostajanje analita (eng. *Carry-over*) (prema EMA smernicama),
- i) uticaj matriksa (eng. *Matrix effect*),
- j) integritet pri razblaženju (eng. *Dilution integrity*) i
- k) robustnost metode (eng. *Ruggedness*) (prema EMA smernicama).

a) Linearnost: Linearnost metode ili kalibraciona kriva, predstavlja opseg koncentracija za koje je moguće dobiti proporcionalni odnos između površine pika i deklarisanе koncentracije analita. Kalibraciona kriva se konstruiše metodom najmanjih kvadrata i data je jednačinom $y=ax+b$, gde „y“ označava površinu ispod pika za datu koncentraciju „x“; „a“ označava nagib prave, dok je odsečak na ordinati označen sa „b“. Nagib prave definiše osetljivost metode. Za procenu linearnosti važno je znati vrednost odsečka na ordinati i vrednosti koeficijenta korelacije r , koji predstavlja stepen rasipanja tačaka oko idealne prave. Za analitičku metodu, r treba da ima vrednost $\geq 0,99$, dok važeće smernice za validaciju bioanalitičke metode ne definišu vrednost za r .

Za formiranje kalibracione krive koriste se kalibracioni rastvori. Kalibracioni rastvori u validaciji bioanalitičke metode pripremaju se tako što se prazan biološki matriks optereti (spajkuje) rastvorom referentnog standarda poznate koncentracije.

Kalibraciona kriva treba da sadrži sledeće tačke:

- ⇒ prazan uzorak (biološki matriks koji je prošao postupak ekstrakcije),
- ⇒ nulti uzorak (biološki matriks spajkovan radnim rastvorom internog standarda (IS)),
- ⇒ 6-8 (prema FDA) odnosno najmanje 6 (prema EMA) različitih kalibracionih rastvora (biološki matriks spajkovan rastvorima referentnog standarda poznate rastuće koncentracije).

Najniža tačka na kalibracionoj krivi je donji limit kvantifikacije (LLOQ), a najviša tačka je gornji limit kvantifikacije (ULOQ).

Očekivana koncentracija ispitivane supstance u biološkom uzorku mora biti unutar koncentracionog opsega kalibracione krive.

b) Tačnost metode: tačnost metode predstavlja meru usaglašenosti kvantitativnih rezultata dobijenih primenom predložene bioanalitičke metode, u odnosu na deklarisanu koncentraciju. Tačnost metode ukazuje na ispravnost merenja. Određuje se za 4 odabrane koncentracije. Uzorci koji se koriste za određivanje tačnosti pripremaju se na način da se prazan biološki matriks optereti (spajkuje) odabranim rastvorom referentnog standarda sledećih koncentracija:

- ⇒ koncentracija koja odgovara LLOQ vrednosti;
- ⇒ koncentracija 3xLLOQ vrednost;
- ⇒ koncentracija koja odgovara središnjoj tački na kalibracionoj krivoj;
- ⇒ koncentracija 75 % od ULOQ.

Prema EMA smernici, tačnost se određuje na dva nivoa:

- ⇒ tačnost u okviru jednog *run*-a – analizira se najmanje 5 uzoraka za svaku od 4 koncentracije; srednja vrednost dobijenih rezultata, za svaku koncentraciju, sme da odstupa najviše ± 15 % od deklarisanu koncentraciju QC uzorka, odnosno ± 20 % za uzorak čija je koncentracija na nivou LLOQ.
- ⇒ tačnost između *run*-ova određuje se za najmanje 3 *run*-a pokrenuta tokom najmanje dva različita dana. Srednja vrednost dobijenih rezultata za određenu koncentraciju sme da odstupa najviše ± 15 % od deklarisanu koncentraciju QC uzorka, odnosno ± 20 % za kontrolni uzorak čija je koncentracija na nivou LLOQ.

Tačnost metode izražava se kao procenat (%) odstupanja srednje vrednosti izmerenih koncentracija od deklarisanu koncentracije.

c) Donji limit kvantifikacije (LLOQ) je najmanja koncentracija analita u uzorku, koju je moguće odrediti sa tačnošću od ± 20 % i sa preciznošću od 20 % u odnosu na deklarisanu koncentraciju.

d) Preciznost metode predstavlja stepen rasipanja pojedinačnih rezultata dobijenih iz više puta ponovljene kvantitativne analize istog uzorka i pod istim uslovima. Izražava se jednim od statističkih parametara: standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD), koeficijent varijacije (KV).

Preciznost se, kao i tačnost, određuje za 4 odabrane koncentracije. Preciznost se određuje na dva nivoa:

- ⇒ preciznost u okviru jednog *run*-a – analizira se najmanje 5 uzoraka za svaku od 4 koncentracije; predstavlja ponovljeno analiziranje uzoraka u jednoj laboratoriji, od strane istog analitičara, na istoj aparaturi i sa istim setom reagenasa. Srednja vrednost dobijenih rezultata kvantitativne analize za svaku od koncentracija sme da odstupa najviše 15 % od deklarisanе koncentracije QC uzorka, odnosno 20 % za kontrolni uzorak čija je koncentracija na nivou LLOQ.
- ⇒ preciznost između *run*-ova (*between run precision*) – njome se određuje preciznost kroz vreme i uključuje više analitičara instrumenata, reagenasa i laboratorija. Procena preciznosti provodi se na najmanje 3 *run*-a pokrenuta tokom najmanje dva različita dana. Srednja vrednost dobijenih rezultata kvantitativne analize za svaku od koncentracija sme da odstupa najviše 15 % od deklarisanе koncentracije QC uzorka, odnosno 20 % za kontrolni uzorak čija je koncentracija na nivou LLOQ.

d) Selektivnost: selektivnost je mogućnost tačnog merenja analizirane supstance u prisustvu svih drugih supstanci koje se mogu naći u analiziranom uzorku (komponente matriksa, metaboliti, degradacioni proizvodi, drugi lekovi kod politerapije). Selektivnost se ispituje sa najmanje 6 neopterećenih bioloških uzoraka (*blank sample*), koji su dobijeni iz 6 različitih izvora (npr. plazma od 6 različitih pacova). Selektivnost se procenjuje u odnosu na donji limit kvantifikacije. Ukoliko je odgovor (intezitet signala) na retencionom vremenu analita manji od 20 % LLOQ i ukoliko je odgovor (intezitet signala) na retencionom vremenu IS manji od 5 % LLOQ, može se konstatovati odsustvo interferirajućih supstanci.

f) Stabilnost: stabilnost se ispituje kako bi se pokazalo i potvrdilo da prilikom pripreme uzoraka i čuvanja istih pod propisanim uslovima ne dolazi do promene koncentracije analita u uzorku. Stabilnost leka u biološkom materijalu zavisi od hemijskih osobina leka, uslova čuvanja, prirode i sastava biološkog materijala u kome se lek nalazi i određuje, kao i kontejnera/pakovnog materijala u kome se biološki materijal sa lekom čuva. Podaci o stabilnosti analita određeni za konkretan biološki materijal i pakovni materijal ne mogu se ekstrapolirati na drugi biološki matriks i pakovni materijal. Uslovi u kojima se ispituje stabilnost biraju se u skladu sa onima koji se očekuju pri rukovanju i analizi tokom pretkliničkih i kliničkih ispitivanja ili tokom rutinskog rada sa pacijentima u praksi. Za procenu stabilnosti analita u biološkom matriksu, koristi se niska i visoka koncentracija QC uzorka, koji se analiziraju odmah nakon pripreme i nakon skladištenja, odnosno tretiranja pod unapred utvrđenim i određenim uslovima.

FDA smernice preporučuju ispitivanje sledećih nivoa stabilnosti:

- ⇒ stabilnost pri ponovljenom zamrzavanju i topljenju,
- ⇒ kratkotrajna temperaturna stabilnost,
- ⇒ dugotrajna temperaturna stabilnost,
- ⇒ stabilnost osnovnih rastvora,
- ⇒ stabilnost uzorka.

EMA smernice preporučuju ispitivanje sledećih nivoa stabilnosti:

- ⇒ stabilnost osnovnih rastvora, radnih rastvora analita i radnog rastvora internog standarda,
- ⇒ stabilnost analita u rastvorima pri ponovljenom zamrzavanju i topljenju,
- ⇒ kratkotrajna temperaturna stabilnost,
- ⇒ dugotrajna temperaturna stabilnost,
- ⇒ stabilnost uzorka na sobnoj temperaturi ili na temperaturi na kojoj se čuva tokom studije,
- ⇒ stabilnost uzorka na temperaturi u injektoru i u *autosampler*-u.

g) Recovery: predstavlja sadržaj analita, koja se prilikom pripreme uzorka ekstrahuje iz biološkog matriksa. Izražava se u procentima (%) u odnosu na deklarirani sadržaj. Vrednost za *Recovery* se izvodi poređenjem rezultata dobijenih kvantitativnom analizom bioloških uzoraka koji su spajkovani rastvorima analita u 3 koncentracije (niska, srednja, visoka) sa rezultatima dobijenim kvantitativnom analizom rastvora koji se koriste za spajkovanje i koji predstavljaju 100 % *Recovery*. Kada je analit u biološkom matriksu teško je postići vrednost *Recovery*-a od 100 %. Cilj je postići da *Recovery* vrednosti i analita i internog standarda budu stalne, precizne i reproducibilne.⁹⁸ Granice prihvatljivosti za vrednost *Recovery*-a zavise od koncentracije ispitivane supstance.⁹⁹

h) Zaostajanje analita (*carry-over*) je uticaj koji mogu da ostvare eventualno prisutne supstance u ispitivanom uzorku (npr. reagensi koji su korišćeni za pripremu uzorka, rastvarači, rastvori za pranje uzoraka) na rezultate kvantitativne analize. *Carry-over* treba da se ispita i minimizira tokom razvoja metode. Tokom validacije, *carry-over* se ispituje injektovanjem praznih uzoraka nakon uzorka visoke koncentracije ili kalibracionog standarda čija koncentracija je jednaka ULOQ. *Carry-over* u praznim uzorcima ne bi trebalo da bude veći od 20 % ULOQ za analit i 5 % ULOQ za interni standard. Ako se *carry-over* ne može izbeći, onda se problem prevazilazi na način da se pre analize narednog uzorka injektuje prazan biološki uzorak, posebno nakon uzorka visoke koncentracije analita.

i) Uticaj matriksa je efekat biološkog matriksa na rezultate ispitivanja. FDA smernice samo napominju da je kod LC-MS i LC-MS/MS metode potrebno preduzeti određene korake kojima se obezbeđuje odsustvo uticaja matriksa na vrednosti validacionih parametara (tačnost, preciznost, selektivnost) i rezultate kvantitativne analize primenom iste, naročito ukoliko se menja matriks nakon validacije. FDA smernice ne definišu način na koji se uticaj matriksa ispituje. Smernice EMA definišu postupak ispitivanja uticaja matriksa: skuplja se matriks od 6 različitih izvora.

Za svaki analit i interni standard računa se faktor matriksa (MF) koji predstavlja odnos površine pikova dobijenih analizom matriksa koji je podrvgnut postupku ekstrakcije pa tek onda opterećen analitom u niskoj i visokoj koncentraciji i matriksa koji je bez prethodne obrade opterećen istim koncentracijama. MF normalizovan internim standardom se računa kao odnos MF analita i MF internog standarda. Koeficijent varijacije faktora matriksa normalizovanog internim standardom ne sme biti veći od 15 % od deklarisanе koncentracije. Ukoliko je predviđeno da se pretklinička i klinička ispitivanja sprovode sa uzoracima dobijenim od specifičnih populacija (pacijenti sa oštećenim funkcijama jetre, bubrega ..) potrebno je sakupiti biološki materijal samo od takvih pacijenata i ispitati MF. Dozvoljeno je korišćenje manje od 6 uzoraka samo u slučaju kada je teško dobiti biološki matriks. Neki ekscipijensi u formulaciji mogu dovesti do efekta matriksa (polisorbata, polietilen glikol) i tada se uporedo ispituje uticaj samog matriksa i matriksa koji sadrži jedan ili više ovih ekscipijenasa.

j) Integritet pri razblaženju: razblaživanje uzoraka ne sme da utiče na tačnost i preciznost. Integritet pri razblaženju ispituje se opterećivanjem biološkog matriksa analitom u koncentraciji koja je iznad ULOQ i dodavanjem matriksa (razblaživanje matriksom) do određenog dilucionog faktora. Razblaživanje se vrši u skladu sa razblaživanjem koje se primenjuje u radu sa uzorcima dobijenim od pacijenata. Analizira se po 5 uzoraka za svaki dilucioni faktor. Dozvoljeno odstupanje je do 15 % od deklarisanе koncentracije.

k) Robusnost metode: Robusnost metode je mera sposobnosti metode da se odupre malim i namernim promenama u definisanim optimalnim uslovima (npr. promene pH, sastava mobilne faze, temperature kolone i sl.), a ujedno je i mera pouzdanosti metode tokom rutinske primene. Robusnost nije obavezan parametar. Ispitivanje robusnosti je značajno u fazi razvoja metode ili predvalidacionoj fazi, kako bi se unapred predvideli potencijalni problemi tokom validacije metode. Često se robusnost metode ispituje primenom eksperimentalnog dizajna (Ph.Eur.9).

Ispitivanje robusnosti metode ima značaja ukoliko se očekuje ili planira transfer metode nakon validacije, odnosno primena metode u drugoj ili u drugim laboratorijama.¹⁰⁰⁻¹⁰²

1) Ponovljivost metode pokazuje stalnost rezultata kvantitativne analize dobijenih primenom iste metode u dve laboratorije (kolaborativne studije se najčešće primenjuje za standardizaciju metode).^{100,102} I FDA i EMA iskazuju potrebu da se ispita ponovljivost metode izvođenjem inter-laboratorijskog transfera, ali ni jedna od navedenih smernica ne propisuje način sprovođenja i ispitivanja ovog parametra. Ponovljivost metode se ispituje kada se bioanalitička metoda prenosi iz laboratorije u kojoj je razvijena i validirana (inicijalna ili originalna laboratorija, eng. *sender laboratory*) u laboratoriju u kojoj će se ponoviti, odnosno, reprodukovati - prijemna laboratorija (eng. *receiver laboratory or recipient*).¹⁰³ Postoji nekoliko pristupa kojima se opisuje ocena ponovljivosti metode.¹⁰⁴⁻¹¹³ U literaturi nije usaglašeno da li je potrebno uraditi potpunu validaciju metode u *receiving* laboratoriji ili je moguće ponovljivost pokazati i ispitivanjem manjeg broja parametara.¹¹⁴ Uspešan transfer ne zavisi samo od naučnih sposobnosti i kapaciteta obe laboratorije već i od komunikacijskih veština među istima.¹¹⁵

Passing and Bablok regresiona analiza je statistička procedura, koja omogućava kvalitetnu procenu odnosa rezultata dobijenih primenom iste analitičke metode u 2 različite laboratorije. Rezultati analize predstavljaju se kroz dijagram, regresionu krivu i regresionu jednačinu u kojoj odsečak pokazuje konstantnu, a nagib proporcionalnu grešku u merenju. Interval poverljivosti (CI) od 95% za odsečak i za nagib objašnjavaju da li se njihove vrednosti razlikuju od 0 (za odsečak) i od 1 (za nagib) slučajno, dozvoljavajući zaključak o ponovljivosti (transferabilnosti) metode.¹¹⁶ Ponovljivost i transferabilnost metode, ocenjuje se na osnovu vrednosti navedenih statističkih parametara (nagib i odsečak sa intervalom poverljivosti) i na osnovu dobijenih vrednosti ispitanih validacionih parametara (selektivnost, linearnost, limit kvantifikacije, *recovery*, tačnost, preciznost i uticaj matriksa).

1.4 IN VITRO METODE ZA BIOFARMACEUTSKU KARAKTERIZACIJU JEDINJENJA

Ono što prethodi planiranim prekliničkim i kliničkim ispitivanjima farmaceutskih supstanci je njihova *in vitro* biofarmaceutska karakterizacija. Procesi difuzije kroz biološke membrane determinisani su fizičko-hemijskim osobinama farmaceutskih supstanci: rastvorljivost, molekulska masa, particioni i difuzioni koeficijenti.¹¹⁷ Na osnovu rezultata biofarmaceutske karakterizacije moguće je predvideti biološku raspoloživost ispitivanih jedinjenja:

$$\text{Biološka aktivnost} = f(\text{Fizičko-hemijske osobine}).$$

1.4.1 Rastvorljivost

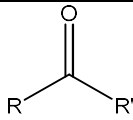
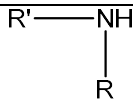
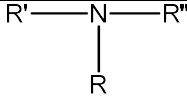
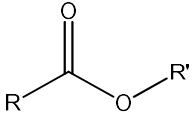
Rastvorljivost farmaceutske supstance u vodi jedna je od ključnih fizičko-hemijskih karakteristika koja se ispituje u ranoj fazi razvoja leka. Od rastvorljivosti zavisi i budući put primene leka, kao i farmakokinetički parametri leka (apsorpcija, distribucija i eliminacija).¹¹⁸

Broj potencijalnih vodoničnih veza i broj funkcionalnih grupa koje mogu jonizovati u velikoj meri određuju koliki će stepen rastvorljivosti u vodi pokazati određena supstanca.¹¹⁸

Broj potencijalnih vodoničnih veza - Funkcionalne grupe koje imaju mogućnost ostvarivanja vodoničnih veza povećavaju hidrofilitnost molekule. U tabeli 1.3. date su najčešće funkcionalne grupe u organskim molekulama i njihov potencijal za građenje vodoničnih veza¹¹⁸. Vodonične veze su značajne i u reakciji leka i receptora.

Pored vodoničnih veza, za rastvorljivost supstance u vodi od značaja je prisustvo polarnih funkcionalnih grupa, koje mogu da jonizuju pri različitim pH vrednostima. Prisustvo polarnih funkcionalnih grupa u jednoj molekuli upućuje na bolju rastvorljivost u vodi. Međutim, ukoliko polarne grupe jonizuju pri istom pH i ostvaruju intramolekulsku interakciju tada ne povećavaju, već smanjuju rastvorljivost supstance u vodi. Primer za ovu pojavu su aminokiseline i njihova cviter-jonska struktura pri pH 7,4.¹¹⁸

Tabela 1.3: Najčešće funkcionalne grupe u organskim molekulama i njihov potencijal za građenje vodoničnih veza¹¹⁸

Funkcionalna grupa	Broj potencijalnih vodoničnih veza
R-OH	3
	2
R-NH ₂	3
	2
	1
	2

Lemke je razvio empirijski pristup za predviđanje rastvorljivosti supstance u vodi zasnovan na potencijalnoj rastvorljivosti nekoliko ugljenikovih funkcionalnih grupa. Prema ovoj teoriji, ukoliko je broj potencijalnih vodoničnih veza u jednoj veći od broja ugljenikovih atoma u njoj može se zaključiti da je supstanca rastvorljiva u vodi.^{118,119}

Rastvorljivost se izražava kao $\text{Log}S$, gde S označava koncentraciju ispitivane supstance u njenom zasićenom rastvoru pri definisanim uslovima izraženu u jedinicama mol/l.

Rastvorljivost supstance u vodi određuje se pri različitim vrednostima pH, pri različitim temperaturama (najčešće se ispituje rastvorljivost na sobnoj temperaturi) i u različitim vremenskim tačkama (period rastvaranja najčešće traje 24-48 sati).¹²⁰ Prema podacima iz poglavlja „General Notice“ važeće 9. Evropske Farmakopeje (Ph.Eur) i poglavlja „Opšti podaci“ V Jugoslovenske Farmakopeje (Ph.Jug), rastvorljivost supstanci se na temperaturi 15-25 °C klasifikuje na način dat u tabeli 1.4.

Tabela 1.4: Klasifikacija stepena rastvorljivosti prema Ph.Jug.V.

Opisni termin	Približna zapremina rastvarača izražena u ml po 1 g rastvorene supstance		
Vrlo lako rastvoran	Manje od	1	
Lako rastvoran		1	- 10
Rastvoran		10	- 30
Umereno rastvorljiv		30	- 100
Teško rastvorljiv		100	- 1000
Vrlo teško rastvorljiv		1000	- 10000
Gotovo nerastvorljiv	Više od	10000	

Prema podacima *World Drug Index*-a, 62,5 % lekova koji su u primeni su jonizovane supstance i njihova rastvorljivost zavisi od pH vrednosti rastvarača.¹²¹

1.4.2 Lipofilnost

Za supstance koje su kandidati za novi lek, vrlo je važno tokom rane faze razvoja odrediti vrednosti parametara lipofilnosti. Na osnovu istih moguće je predvideti bioraspoloživost ispitivane supstance (apsorpciju, distribuciju, metabolizam, eliminaciju i toksičnost - ADMET). Transport supstanci kroz ćelijske membrane odvija se pasivnom difuzijom ili aktivnim transportom.

Lipofilnost supstance izražava se kao *n*-oktanol/voda particioni koeficijent (LogP) ukoliko su u pitanju nenaelektrisane (neutralne) molekule, odnosno, kao distribucionni koeficijent (LogD) ukoliko su u pitanju naelektrisane (jonizovane) molekule.¹²² LogP predstavlja najšire korišćen deskriptor hidrofobnosti, lipofilnosti i odnosa strukture i dejstva (QSAR) farmakološki aktivnih supstanci.¹²³⁻¹²⁷

Shake-flask metoda predstavlja klasičnu proceduru za direktno određivanje LogP i LogD. Tokom izvođenja metode, nakon uspostavljenе ravnoteže, određuje se koncentracija ispitivane supstance u organskoj fazi (*n*-oktanol) i u vodenoj fazi (pufer ili voda). Na osnovu izmerenih koncentracija izračunava se LogD prema jednačini (1)¹²⁸:

$$\log D = \log (C_{\text{oktanol}}/C_{\text{voda}}) \quad (1)$$

C_{oktanol} je koncentracija ispitivane supstance u *n*-oktanolu; C_{voda} je koncentracija ispitivane supstance u vodenoj fazi.

Za određivanje lipofilnosti farmaceutskih supstanci razvijene su nove *in vitro* metode:¹²⁹⁻¹³¹ imobilisane hromatografske tehnike,^{129,132,133} veštačke membrane,^{129,134} ili raspodela lipozom-voda.^{129,135}

Brojne hromatografske tehnike, kao što su hromatografija na tankom sloju (TLC), HPLC ili UHPLC prepoznate su kao pouzdane metode za određivanje lipofilnosti neutralnih, kiselih, baznih i amfoternih farmaceutskih supstanci.

Primenom reverzno-fazne HPLC ili UHPLC metode izračunavaju se hromatografski parametri, koji predstavljaju meru lipofilnosti ispitivanog jedinjenja: retencioni faktor k ($\log k$), hromatografski indeks hidrofobnosti (CHI) i indeks φ_0 . Navedeni parametri određuju se primenom odabrane hromatografske tehnike pri izokratskom ili gradijentnom eluiranju ispitivanih supstanci.

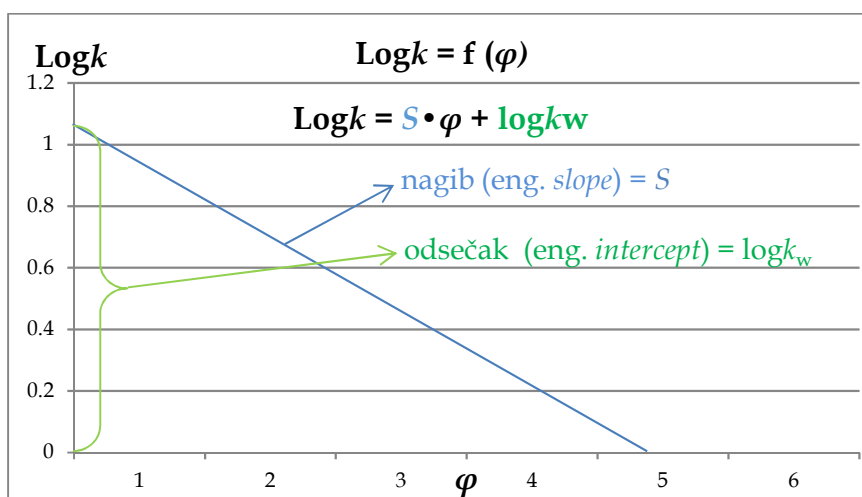
Log k se izračunava iz retencionog vremena ispitivane supstance (t_R) i retencionog vremena mobilne faze (*dead time* - t_0) prema jednačini (2):

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2)$$

Da bi se dobila vrednost $\log k$ potrebno je primeniti izokratsko eluiranje. Koriste se mobilne faze sa različitim sadržajem organskog rastvarača. Procentualni sadržaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi označava se sa φ . Ekstrapolacijom linearne krive, koja predstavlja zavisnost $\text{Log}k = f(\varphi)$ dobija se vrednost za $\log k_w$, odnosno vrednost retencionog faktora kada je sadržaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi jednako 0 (slika 1.9).

Indeks φ_0 je zapreminski udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi (iskazan u %) kojim se postiže retenciono vreme ispitivanog jedinjenja dvostruko veće od retencionog vremena mobilne faze (*dead time* - t_0), pri čemu je $\log k = 0$. Jedinjenja sa izraženijim hidrofobnim (lipofilnim) karakteristikama zahtevaju viši procenat organskog rastvarača u sastavu mobilne faze, kako bi se postigao $\log k = 0$ u relativno kratkom vremenu. Može se uspostaviti linearna zavisnost između indeksa φ_0 i lipofilnosti ispitivanog jedinjenja: veća lipofilnost - viša vrednost za φ_0 . Vrednost φ_0 izračunava se od odsečka ($\log k_w$) i nagiba (S) linearne krive, koja predstavlja zavisnost $\log k$ i φ primenom jednačine (3)¹³⁶:

$$\varphi_0 = -\log k_w / S \quad (3)$$



Slika 1.9: Zavisnost Logk i φ

Za razliku od φ_0 čija se vrednost dobija iz serije merenja u izokratskim uslovima, vrednost parametra CHI izračunava se iz retencionog vremena u gradijentnim uslovima prema jednačini (4)¹³⁶:

$$CHI = A \cdot t_R + B \quad (4)$$

Primena hromatografskih parametara, a posebno $\log k_w$, za određivanje lipofilnosti farmaceutskih supstanci postala je česta. Za veliki broj jedinjenja koja nisu strukturno povezana uspostavljena je značajna korelacija između indeksa φ_0 i LogP dobijenog tradicionalnom *shake-flask* metodom, što je prikazano jednačinom (5)¹³⁷:

$$\varphi_0 (\text{metanol}) = 13 \cdot \log P + 42 \quad (5)$$

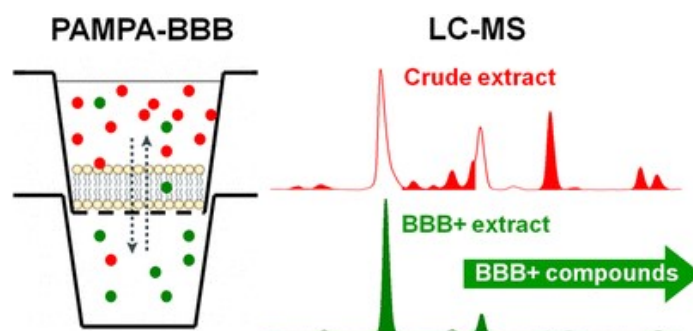
Za proveru vrednosti parametara lipofilnosti dobijenih primenom novih *in vitro* metoda koristi se *shake-flask* metoda zbog jasnog odnosa particionog fenomena koji pruža.

Matematički modeli, koji predstavljaju korelaciju parametara lipofilnosti dobijenih primenom *shake-flask* metode i primenom hromatografskih parametara se validiraju. Ukoliko trening set supstanci nije veliki, najčešće primenjivana validaciona tehnika je *leave-one-out* (LOO). Ova validaciona tehnika se koristi za ocenu robustnosti razvijenog matematičkog modela (stabilnost parametara modela) i njegove prediktivne moći. *Leave-one-out* metoda ili metoda ukrštene validacije je metoda u kojoj se svako jedinjenje trening seta eliminiše po jednom, a od preostalih jedinjenja se formira model. Vrednost zavisne varijable eliminisanog jedinjenja predviđa se razvijenim matematičkim modelom, koji je predmet validacije. Procedura se ponavlja dok sva jedinjenja iz trening seta ne budu eliminisana po jednom i vrednosti njihovih zavisnih varijabli predviđene predmetnim modelom.^{138,139} Validacioni parametri koji se izračunavaju i na osnovu kojih se izvodi ocena robustnosti i kapaciteta prediktivnosti su: PRESS (*Parameters predictive error sum of squares*) i *cross-validated* Q^2 . Na osnovu vrednosti parametra Q^2 ocenjuje se kolika je moć predviđanja razvijenog matematičkog modela za posmatranu grupu jedinjenja: $Q^2 \leq 1$.¹⁴⁰

1.4.3 Membranska permeabilnost

Permeabilnost farmaceutske supstance kroz biološke membrane važna je osobina na osnovu koje se predviđa njena bioraspoloživost. Za predviđanje permeabilnosti koristi se metoda označena kao paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama (PAMPA). PAMPA-tehniku su prvi put uveli Kansy i saradnici, a koristi se za brzu procenu permeacije lekova, koja se uglavnom odvija pasivnom difuzijom i transcelularnim transportom.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Metoda ima veliku primenu u postupku ocene kandidata za budući lek. Rezultati dobijeni njenom primenom pouzdano se koriste za predviđanje *in vivo* transmembranske, energetski nezavisne, pasivne difuzije ispitivanog jedinjenja.

PAMPA test se izvodi na mikrofilterskoj ploči, koja se sastoji od 96 odeljaka i sadrži dva prostora (donorski i akceptorski) koji su razdvojeni veštačkom membranom. U donorski odeljak se stavlja rastvor ispitivane supstance u puferu (donorski rastvor) koji može, a i ne mora, da uključi mešanje. Akceptorski odeljak sadrži samo rastvarač (akceptorski rastvor). Spajanjem donorskog i akceptorskog odeljka formira se “sendvič” u kome se tokom perioda inkubacije odvija difuzija ispitivane supstance kroz veštačku membranu iz donorskog u akceptorski odeljak, odnosno, u pravcu gradijenta koncentracije (slika 1.10). Gradijent koncentracije može biti u pravcu gravitacione sile, ali i ne mora. Nakon perioda inkubacije, donorski i akceptorski odeljci se razdvajaju i određuje se koncentracija ispitivanog jedinjenja u svakom od njih, kao i koncentracija ispitivanog jedinjenja u polaznom rastvoru.



Slika 1.10: PAMPA metoda¹⁴⁵

Membranska permeabilnost kroz veštačku membranu može se izraziti kroz procenat transportovanog jedinjenja sa jedne strane membrane na drugu %*T* što je dato jednačinom (6)¹⁴¹ ili kao koeficijent permeabilnosti P_{app} što je dato jednačinom (7)¹⁴¹:

$$\%T = 100 \cdot (A_R \cdot V_R) / (A_{D(0)} \cdot V_D) \quad (6)$$

$A_{D(0)}$ i A_R su površine pikova ispitivanog jedinjenja dobijene analizom iz početnog rastvora i akceptorskog rastvora nakon perioda inkubacije; analiza se vrši primenom HPLC/UV-VIS ili UHPLC-MS/MS metode; V_D i V_R su zapremine donorskog i akceptorskog rastvora.

Vrednosti P_{app} izračunava se iz jednačine (7):

$$P_{app} = (V_D \cdot V_R) / ((V_D + V_R) \cdot s \cdot t) \cdot \ln [(100 \cdot V_D) / (100 \cdot V_D - \%T \cdot (V_D + V_R))] \quad (7)$$

s je površina veštačke membrane; t je vreme inkubacije.

Generalno, farmaceutске supstance koje imaju $P_{app} < 10 \cdot 10^{-6}$ cm/s klasifikovane su kao jedinjenja koja imaju nisku permeabilnost, dok su farmaceutске supstance koje imaju $P_{app} > 20 \cdot 10^{-6}$ cm/s svrstane u one koje imaju visoku permeabilnost.¹⁴⁶ Permeabilnost u rasponu $3-20 \cdot 10^{-6}$ cm/s^{77,147,148} ukazuje da supstanca može biti kandidat za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru.

Brzina prolaska supstance kroz veštačku membranu izražava se kroz parametar J -flux i izračunava se iz jednačine (8)¹⁴¹:

$$J = P_{app} \cdot s \cdot (C_D - C_R) \quad (8)$$

gde je C_D koncentracija ispitivane supstance u donorskom rastvoru, a C_R koncentracija u akceptorskom rastvoru.

Pored nabrojanih parametara membranske permeabilnosti, primenom PAMPA metode može se odrediti i zadržavanje ispitivanog jedinjenja u membrani (R)^{117,149} kao i koeficijent efektivne permeabilnosti Pe na osnovu jednačina (9) i (10):¹⁵⁰

$$R = 1 - C_{D(t)} / C_{D(0)} - V_A / V_D \cdot C_{A(t)} / C_{D(0)} \quad (9)$$

$$Pe = - \frac{2,303 \cdot V_D}{A \cdot (t - t_{LAG})} \left[\frac{V_A}{V_A + V_D} \right] \log \left[1 - \left[\frac{V_A + V_D}{V_D \cdot (1-R)} \right] \frac{C_{A(t)}}{C_{D(0)}} \right] \quad (10)$$

V_A - zapremina akceptorskog rastvora (ml)

V_D - zapremina donorskog rastvora (ml)

A - filtraciona površina (cm²)

t - vreme inkubacije (s)

t_{LAG} - vreme uspostavljanja ravnotežnog stanja (20 minuta) (s)¹⁵¹

$C_{D(t)}$ - koncentracija ispitivanog jedinjenja u donorskom rastvoru nakon vremena t (μM)

$C_{A(t)}$ - koncentracija ispitivanog jedinjenja u akceptorskom rastvoru nakon vremena t (μM)

$C_{D(0)}$ - inicijalna koncentracija ispitivanog jedinjenja u donorskom rastvoru pre početka inkubacije (μM)

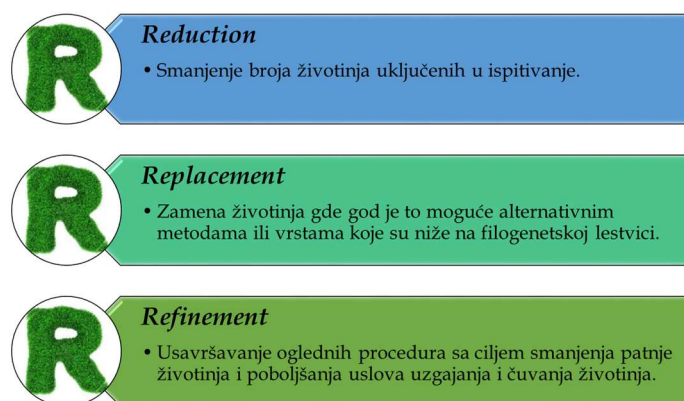
Veštačka membrana simulira biološku membranu (kožu, krvno-moždanu barijeru ili membranu gastrointestinalnog trakta). Veštačke membrane za predviđanje prolaska leka kroz krvno-moždanu barijeru sadrže lipidni ekstrakt celih mozgova svinja (polarne moždane lipide).^{60,65} Veštačke membrane impregnirane rastvorom fosfolipida ili heksadekana omogućavaju da se provođenjem PAMPA testa dobiju podaci, kojima se uspostavlja značajna korelacija sa gastrointestinalnom apsorpcijom jedinjenja u humanom organizmu.^{117,152}

U cilju povećanja korelacije *in vitro* i *in vivo* rezultata rade se modifikacije u lipidnom sastavu veštačkih membrana, kao i modifikacije pH vrednosti.

Podaci dobijeni u dosadašnjim ispitivanjima primenom PAMPA metode ukazuju na dobru korelaciju sa *in vivo* dobijenim podacima za gastrointestinalnu resorpciju^{117,152} i penetraciju kroz krvno-moždanu barijeru.¹⁵³

1.5 IN SILICO METODE ZA BIOFARMACEUTSKU KARAKTERIZACIJU JEDINJENJA

U novije vreme, razvojem kompjuterske hemije, sve više su u istraživanjima farmaceutskih supstanci zastupljene *in silico* tehnike. Termin *in silico* obuhvata primenu odgovarajućeg računarskog programa kojim se simulira određeni biohemijski proces, čije bi izvođenje u laboratoriji bilo dugotrajnije i kompleksnije. *In silico* tehnike se koriste za predviđanje biofarmaceutskih karakteristika molekula: lipofilnost, permeabilnost, apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost, način vezivanja za ciljna mesta, kao i za određivanje odnosa strukture i dejstva. U pojedinim situacijama mogu biti adekvatna zamena za životinjske eksperimentalne modele. Njihovom primenom moguće je predvideti ponašanje analiziranih supstanci u *in vivo* uslovima. Imaju prednost u pretkliničkim ispitivanjima, jer se njihovom primenom izbegava nekritično i prekomereno korišćenje životinjskih eksperimentalnih modela. Russell je sa saradnicima prvi put uveo 3R princip (slika 1.11) 1959. godine.¹⁵⁴ 3R princip daje dobru osnovu i podršku razvoju i primeni *in silico* tehnika.



Slika 1.11: 3R princip¹⁵⁵

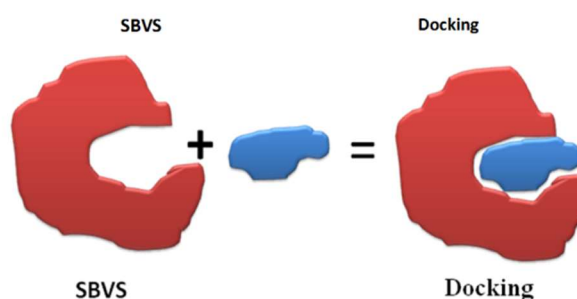
Za *in silico* biofarmaceutsku karakterizaciju supstanci koriste se različiti računarski programi: *ADME(T) predictor*, *Metabolizer*, *AutoDock Vina* i dr.

Metabolizer-om se predviđaju metaboliti prve faze metabolizma i procenat u kom oni nastaju i akumuliraju se u organizmu. Baza podataka na osnovu koje se navedeno predviđanje zasniva sadrži 159 reakcija prve faze metabolizma.¹³⁹

AutoDock Vina je računarski program u kojem se izvodi molekularni *docking* i *virtual screening*.

Molekularni *docking* ili metoda uklapanja je široko korišćena metoda kojom se objašnjavaju molekularni mehanizmi dejstva lekova, a koristi se i za racionalizaciju odnosa strukture i dejstva.¹⁵⁶ Predstavlja kompjutersku simulaciju interakcije između ciljnog mesta čija je kristalografska struktura poznata i ispitivanog jedinjenja. *Docking* studijama se pronalazi energetski najoptimalnija konformacija i orijentacija liganda na određenom ciljnom mestu.

Ranije se smatralo da se ligand i ciljno mesto ponašaju kao ključ i brava. Ligand je mali molekul i smatrano je da se čvrsto vezuje za svoj ciljni protein s kojim formira kompleks (slika 1.12).



Slika 1.12: Shematski prikaz *docking-a*¹⁵⁷

Danas je slika „ključ-brava“ dopunjena novim saznanjima - smatra se da je energija i zauzimanje položaja sa minimumom energije ono što se dešava u interakciji liganda i ciljnog mesta i da odnos ligand-ciljno mesto nije rigidan, već konformaciono i energetsko promenljiv. Kao što i elektroni imaju svoje kretanje u atomu i atomi u molekulu, tako i ligand u interakciji sa receptorom ne miruje.

Kod *docking* studije vrši se predviđanje najverovatnije pozicije i konformacije liganda u ciljnom mestu putem translokacija i rotacija kao i internim promenama strukture liganda, kao što je na primer promena ugla torzije. Odabir parova ciljno mesto-ligand vrši se na osnovu statističkih podataka o utrošku energije.

Visoki afinitet liganda za ciljno mesto dovodi do oslobađanja energije, što uzrokuje promene u konformaciji ciljnog mesta.

Rezultat ovih promena može biti pojačana aktivnost na ovom ciljnom mestu (agonistička aktivnost liganda) ili smanjena aktivnost na ciljnom mestu (antagonistička aktivnost liganda).

Računarski alati za *docking* studije zasnovani su na simulaciji procesa molekuskog prepoznavanja:

- ⇒ optimizacijom konformacije ciljnog mesta i liganda u komplementarne strukture,
- ⇒ minimizacijom ukupne energije u interakciji ciljno mesto-ligand.

U *docking* studiji se koristi trodimenzionalna struktura ciljnog mesta, koja se dobija iz proteinske banke podataka. Proteinska banka podataka (PDB) je kolekcija trodimenzionalnih struktura velikih bioloških molekula (proteina i nukleinskih kiselina). PDB je formirao Walter Hamilton 1971. godine u Brookhaven nacionalnoj laboratoriji u Teksasu, a 2003. godine je transformisana u internacionalnu organizaciju wwPDB.^{158,159} Član wwPDB je *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank - RCSB PDB*. Cilj wwPDB je održavanje jedinstvene, slobodno dostupne PDB arhive podataka o strukturi makromolekula. PDB format je tekstualna datoteka koja sadrži podatke o molekuli kao što su: koordinate atoma, sekvence aminokiselina, podatke o istraživačima koji su definisali strukturu.

Virtual screenings je računarska tehnika koja se primenjuje za odabir malih molekula, koji bi mogli zauzeti najpovoljniji položaj na ciljnom mestu. Takođe, nakon izvršene *docking* studije, primenjuje se za vizuelizaciju interakcije između liganda i ciljnog mesta, koja uključuje: određivanje vrsta interakcija, otkrivanje amiokiselinskih ostataka koji učestvuju u interakcijama sa ligandom, otkrivanje rastojanja između aktivnih mesta i farmakofora...¹⁵⁶

Ako znamo gde i kako se vezuje ligand, možemo da utvrdimo delove liganda i biomolekula (ciljnog mesta) koji su od značaja za dejstvo, predložimo promene strukture koje će povećati afinitet vezivanja i izbegnemo promene koje bi onemogućile vezivanje („fitovanje“) sa proteinom.

2 CILJ RADA

Cilj ove doktorske može se formulirati na sledeći način:

- ↻ **Razvoj i validacija bioanalitičke metode za fazu pretkliničkih ispitivanja dietil estra 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i odgovarajuće kiseline kao potencijalnog metabolita uz primenu internog standarda dibutil estra 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline:**
 - a) ekstrakcija ispitivanih supstanci iz biološkog materijala;
 - b) razvoj i validacija bioanalitičke metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivanih supstanci;
 - c) transfer bioanalitičke metode - ispitivanje mogućnosti primene razvijene i validirane metode u drugoj laboratoriji;
- ↻ **Određivanje parametara rastvorljivosti i lipofilnosti za derivate 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline:**
 - a) ispitivanje rastvorljivosti u vodenim rastvorima različitih pH vrednosti;
 - b) određivanje particionog koeficijenta *shake-flask* metodom;
 - c) određivanje hromatografskih parametara lipofilnosti primenom UHPLC-MS/MS hromatografije;
 - d) razvijanje matematičkog modela za predviđanje particionog koeficijenta nosintetisanih derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina i potencijalnih metabolita ispitivanih supstanci.
- ↻ **Određivanje parametara membranske permeabilnosti ispitivanih supstanci primenom PAMPA metode.**
- ↻ ***In silico* biofarmaceutska karakterizacija ispitivanih supstanci i potencijalnih metabolita:**
 - a) predviđanje metabolita primenom računarskog programa *Metabolizer*;
 - b) predviđanje farmakokinetičkog i toksikološkog profila primenom računarskog programa *ADME(T) predictor*;
 - c) *Docking* studija na ciljnim mestima za ostvarivanje citotoksičnog dejstva;
 - d) Predviđanje bioraspoloživosti i molekularnog mehanizma citotoksičnog dejstva ispitivanih supstanci i potencijalnih metabolita na osnovu rezultata *in vitro/in silico* biofarmaceutske karakterizacije.

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 OPŠTI PODACI

3.1.1 Ispitivane supstance

Derivati 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline:

(*S,S*)-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid (EDCP•2HCl), C₂₀H₃₈O₄N₂Cl₂, Mr=441,43 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dimetil-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DM-EDCP•2HCl), C₂₂H₄₂O₄N₂Cl₂, Mr=469,48 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dietil-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DE-EDCP•2HCl), C₂₄H₄₆O₄N₂Cl₂, Mr=497,54 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dipropil-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DP-EDCP•2HCl), C₂₆H₅₀O₄N₂Cl₂, Mr=525,59 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dibutil-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DB-EDCP•2HCl), C₂₈H₅₄O₄N₂Cl₂, Mr=553,64 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-diizobutil-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DIB-EDCP•2HCl), C₂₈H₅₄O₄N₂Cl₂, Mr=553,64 g/mol;

Derivati 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline:

(*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid (PDCP•2HCl), C₂₁H₄₀O₄N₂Cl₂, Mr=455,46 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dimetil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DM-PDCP•2HCl), C₂₃H₄₄O₄N₂Cl₂, Mr=483,51 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dietil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DE-PDCP•2HCl), C₂₅H₄₈O₄N₂Cl₂, Mr=511,56 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dipropil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DP-PDCP•2HCl), C₂₇H₅₂O₄N₂Cl₂, Mr=539,62 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dibutil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DB-PDCP•2HCl), C₂₉H₅₆O₄N₂Cl₂, Mr=567,67 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-diizobutil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DIB-PDCP•2HCl), C₂₉H₅₆O₄N₂Cl₂, Mr=567,67 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-dipentil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DPE-PDCP•2HCl), C₃₁H₆₀O₄N₂Cl₂, Mr=595,72 g/mol;

(*S,S*)-*O,O*-diizopentil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DIPE-PDCP•2HCl), C₃₁H₆₀O₄N₂Cl₂, Mr=595,72 g/mol.

3.1.2 Hemikalije i reagensi

- a) Acetonitril – ACN, HPLC čistoće (J.T.Baker, SAD),
- b) Metanol – MeOH, HPLC čistoće (J.T.Baker, SAD),
- c) Etil acetat, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- d) Dietil etar, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- e) Trietanolamin – TEA, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- f) Hloroform, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- g) Trifluorosirćetna kiselina (CF₃COOCH₃) 98 % (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- h) Amonijum acetat (CH₃COONH₄) p.a. (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- i) Natrijum-fluorid, ACS čistoće (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- j) Dejonizovana voda (TKA Gen Pure, Nemačka),
- k) Komercijalni serum miša (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD),
- l) Fosforna kiselina (H₃PO₄) p.a. (Merck - Darmstadt, Nemačka),
- m) NaOH, p.a. (Merck - Darmstadt, Nemačka),
- n) Natrijum-dihidrogenfosfat, dihidrat (NaH₂PO₄•2H₂O) p.a. (Merck - Darmstadt, Nemačka),
- o) Dinatrijum-fosfat, dihidrat (Na₂HPO₄•2H₂O) p.a. (Merck - Darmstadt, Nemačka),
- p) Dimetil sulfoksid (DMSO) ≥ 99,9% (Sigma-Aldrich Co, SAD),
- q) Uracil p.a. (Merck - Darmstadt, Nemačka),
- r) *n*-Oktanol p.a. (Merck - Darmstadt, Nemačka),
- s) Lecitin 99 % (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD),
- t) Dodekan 99 % (Acros Organics, Belgija),
- u) Lipidi mozga (Avanti Polar Lipids, Nemačka).

3.1.3 Oprema, instrumenti i laboratorijski materijal

- a) Tečni hromatograf Thermo ACCELA (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) UHPLC Accela, Thermo Scientific sistem opremljen autosamplerom, TSQ QUANTUM Access Max masenim analizatorom i degazerom, sa elektrosprej jonizacijom (HESI),
- b) Hromatografska kolona (Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ, 100 x 2,1 mm 1,9 µm Thermo Scientific, SAD),
- c) Zaštitna pretkolona 10 mm L x 2,1 mm ID, SecurityGuard™ ULTRA cartridges for C18 UHPLC, Phenomenex (Værløse, Danska),
- d) Agilent 1290 UHPLC sistem opremljen masenim spektrometrom Agilent 6420 sa trostrukim kvadrupolskim masenim analizatorom (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) sa elektrosprej jonizacijom (ESI);
- e) Analitička vaga (5-digit Mettler analytical balance, Mettler-Toledo International Inc, SAD),
- f) Analitička vaga (Adventurer Pro analytical, OHAUS, SAD),
- g) Automatska pipeta (Acura® manual 825 adjust Tabela volume micropipettes Swiss made, Švajcarska),
- h) Ultrazvučno kupatilo (Sonic Ultrasonic cleaner, Sortex, Koreja)
- i) Eppendorf 5417R microcentrifuge (Eppendorf, Nemačka),
- j) Kolona (kertridž) za čvrsto-tečnu ekstrakciju (eng. *Solid-phase extraction* - SPE):
 - Strata X-C (Phenomenex, SAD),
 - OASIS HLB (Waters, SAD),
- k) Vortex - TIP new zx (VELP Scientifica Italija),
- l) Spektrofotometar (Thermo Scientific, Evolution 300, SAD),
- m) Mehanička mešalica („šejker“) (KINETOR-M, Elektromedicina-Ljubljana, Slovenija),
- n) pH-Metar (pH/Ion meter MeterLab PHM240, Radiometer analytical, Francuska),
- o) Vakutajner sa NaF (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, SAD),
- p) Filter papir LLG-nylon membranes filter 0,45 µm Ø47 mm (Kefo, Francuska),

- q) hidrofobne polivinilidenfluoridne mikrofiltracione ploče sa 96 odeljaka Multi Screen™ HTS (Millipore, Francuska),
- r) Hidrofobne polivinilidenfluoridne mikrofiltracione ploče sa 96 odeljaka MultiScreen™ HTS (Millipore, Francuska).

3.1.4 Računarski programi

- a) MarvinSketch 4.1.13 (ChemAxon, Budapest, Mađarska) korišćen je za računanje $\log D_{7.4}$ vrednosti ispitivanih supstanci;
- b) TSQ Tune Software (Thermo Electron Corporation, Hemel Hempstead, Velika Britanija);
- c) Xcalibur 1.3 software (Thermo Electron Corporation, Hemel Hempstead, Velika Britanija);
- d) LC Quan™ software (Version 2.5.6, Thermo Electron Corporation, Hemel Hempstead, Velika Britanija);
- e) Mass Hunter Optimizer software version 6.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD);
- f) Mass Hunter Data Acquisition software version 6.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD);
- g) Mass Hunter Qualitative software version 6.00 i Mass Hunter Quantitative software version 6.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD),
- h) ChemBioDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft Corporation);
- i) ChemBio3D Ultra 12.0 (CambridgeSoft Corporation);
- j) MarvinSketch 6.2.1 (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>);
- k) UCSF Chimera v1 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, 2006, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>);
- l) Metabolizer (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>);
- m) AutoDock Vina za Windows <http://vina.scripps.edu/download.html>;
- n) MGLTools (AutoDock Tools-ADT) za Windows <http://mgltools.scripps.edu/downloads>

- o) Discovery Studio Visualizer 4.1.0.14169. Accelrys Inc., San Diego, SAD, 2014; software available at <http://accelrys.com>;
- p) Python 3.4.3 <https://www.python.org/downloads/>;
- q) Open Babel <http://sourceforge.net/projects/openbabel/>;
- r) Swiss-PDBViewer v4.1 (Swiss Institute of Bioinformatics, 2012, <http://spdbv.vitalit.ch/>),
- s) *ADME(T)* Predictor v. 6.5, Simulations Plus inc. 42505 10th Street West, Lancaster, California 93534-7059 SAD, 2013, <http://www.simulations-plus.com/>

3.2 RAZVOJ I VALIDACIJA BIOANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE DIETIL ESTRA 1,2-ETANDIAMIN-*N,N'*-DI-2-(3-CIKLOHEKSIL)PROPANSKE KISELINE I ODGOVARAJUĆE KISELINE KAO POTENCIJALNOG METABOLITA

3.2.1 Priprema rastvora

a) Priprema osnovnih rastvora

Osnovni rastvor (*stock* rastvor) ispitivane supstance DE-EDCP priprema se rastvaranjem 5 mg čvrste supstance u metanolu, u odmernom sudu od 50 ml. Dobijen osnovni rastvor je koncentracije 0,1 mg/ml.

Osnovni rastvor ispitivanih supstanci DE-EDCP i EDCP priprema se rastvaranjem 200 µl *stock* rastvora DE-EDCP i 5 mg čvrste supstance EDCP u metanolu, u odmernom sudu od 100 ml. Dobijen osnovni rastvor ispitivanih supstanci je koncentracije 0,2 µg/ml za DE-EDCP i 0,05 mg/ml za EDCP.

Osnovni rastvor internog standarda (IS) priprema se rastvaranjem 5 mg čvrste supstance DB-PDCP u metanolu, u odmernom sudu od 50 ml. Dobijen osnovni rastvor IS je koncentracije 0,1 mg/ml.

b) Priprema radnih rastvora

Radni rastvor IS priprema se razblaživanjem 100 µl osnovnog rastvora IS metanolom, u odmernom sudu od 100 ml. Dobijen radni rastvor IS je koncentracije 100 ng/ml.

3.2.2 Ekstrakcija analita iz biološkog materijala

Kao biološki materijal tokom isptivanja korišćen je serum miša (serum). Ispitana je mogućnost ekstrakcije ispitivanih jedinjenja iz seruma primenom čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE), tečno-tečne ekstrakcije (LLE) i precipitacijom proteina.

Za ekstrakciju se koristi sveže odmrznut serum, u koga se nakon odmrzavanja dodaje 40 mM NaF.¹⁶⁰

Priprema rastvora za ekstrakciju

Odmeri se 5 ml trietanolamina i prenese se u odmerni sud od 100 ml. Dopuni se metanolom do crte. Dobija se 5% rastvor trietanolamina (TEA) u metanolu (MeOH) (v/v).

Odmeri se 5 ml trietanolamina i prenese se u odmerni sud od 100 ml. Dopuni se vodom do crte. Dobija se 5% rastvor trietanolamina (TEA) u vodi (H₂O) (v/v).

Odmeri se 1 ml trifluorosirćetne kiseline (CF₃COOH) i prenese se u odmerni sud od 100 ml. Dopuni se vodom do crte. Dobija se 1% rastvor trifluorosirćetne kiseline (CF₃COOH) u vodi (v/v).

3.2.2.1 Čvrsto-tečna ekstrakcija

Čvrsto-tečna ekstrakcija izvedena je na tri načina uz korišćenje dve SPE kolone: Strata X-C (Phenomenex, SAD) i OASIS HLB (Waters, SAD).

a) Prvi postupak

- ⇒ Kondicioniranje: nanese se 1 ml 5% rastvora TEA/MeOH, zatim 1 ml 5% rastvora TEA/H₂O;
- ⇒ Nanošenje uzorka: nanese se 50 µl seruma, 50 µl MeOH i 50 µl radnog rastvora IS i 50 µl osnovnog rastvora DE-EDCP;
- ⇒ Ispiranje: 500 µl 5% rastvora TEA/H₂O;
- ⇒ Eluiranje: 500 µl 5% rastvora TEA/MeOH; sakupljeni eluat se analizira primenom UHPLC-MS/MS.

b) Drugi postupak

- ⇒ Kondicioniranje: nanese se 1 ml 5% rastvora TEA/MeOH, zatim 1 ml 1% rastvora CF₃COOH/H₂O;
- ⇒ Nanošenje uzorka: nanese se 50 µl seruma, 50 µl metanola, 50 µl radnog rastvora IS i 50 µl osnovnog rastvora DE-EDCP;
- ⇒ Ispiranje: nanese se 500 µl 1% rastvora CF₃COOH/H₂O;
- ⇒ Eluiranje: nanese se 500 µl 5% rastvora TEA/MeOH; sakupljeni eluat se analizira primenom UHPLC-MS/MS.

c) Treći postupak

Serum se pre nanošenja na SPE kolonu tretira prema sledećoj proceduri: Izmeša se 50 μ l seruma, 250 μ l vode, 250 μ l 0,1 M ZnSO₄, 50 μ l radnog rastvora IS, 50 μ l osnovnog rastvora DE-EDCP i 450 μ l metanola u ependorfu i stavi na vorteks mešalicu u trajanju od 30 sekundi, a potom se centrifugira na 16 000 rcf u trajanju od 5 minuta. Supernatant se koristi za čvrsto-tečnu ekstrakciju na SPE koloni prema proceduri opisanoj kao Prvi postupak - tačka 3.2.2.1.

3.2.2.2 *Tečno-tečna ekstrakcija*

U epruvetu se automatskom pipetom prenese 150 μ l seruma, 250 μ l vode, 100 μ l MeOH, 100 μ l radnog rastvora IS i 100 μ l osnovnog rastvora DE-EDCP i EDCP, 100 μ l rastvora MeOH i vode u odnosu (60:40 v/v) i 3 ml etil-acetata. Dobijeni sadržaj u epruveti se izmeša na vorteks mešalici (nekoliko sekundi), a onda se centrifugira pri 2500 rcf u trajanju od 15 minuta. Nakon centrifugiranja se odvoji gornji sloj u čistu epruvetu za uparavanje. Uparavanje se izvodi u struji azota na 40 °C. Suvi ostatak se rastvori sa 500 μ l MeOH i izmeša na vorteks mešalici u trajanju od 30 sekundi, a potom analizira primenom UHPLC-MS/MS. Tečno-tečna ekstrakcija je po opisanoj proceduri ispitana sa rastvaračima za ekstrakciju: etil acetat, dietil etar, hloroform i acetonitril.

3.2.2.3 *Ekstrakcija precipitacijom proteina*

U ependorf od 2 ml automatskom pipetom prenese se 150 μ l seruma, 100 μ l radnog rastvora IS, 100 μ l osnovnog rastvora DE-EDCP i EDCP, 100 μ l metanola i 750 μ l ACN.⁸⁸ Sadržaj u ependorfu se izmeša na vorteks mešalici u trajanju od 1 minuta. Potom se centrifugira u trajanju od 10 minuta, pri temperaturi od 4°C i broju obrtaja 25000 rcf. Nakon centrifugiranja, dobijeni supernatant se analizira primenom UHPLC-MS/MS metode.

3.2.3 Validacija UHPLC-MS/MS metode

3.2.3.1 Priprema radnih rastvora ispitivanih jedinjenja

U sedam odmernih sudova od 10 ml automatskom pipetom se prenesu odgovarajuće zapremine osnovnog rastvora DE-EDCP i EDCP (100 μ l, 250 μ l, 500 μ l, 750 μ l, 1000 μ l, 1500 μ l, 2000 μ l). U svaki odmerni sud se dodaje po 3-5 ml metanola. Sadržaj se izmeša na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, sadržaj u odmernom sudu se dopuni metanolom do crte. Na opisan način se dobija 7 kalibracionih rastvora rastućih koncentracija u koncentracionom opsegu: 2 - 40 ng/ml za DE-EDCP, odnosno, 0,5 - 10 μ g/ml za EDCP (tabela 3.1)

3.2.3.2 Priprema kalibracionih rastvora (CS)

Od radnih rastvora ispitivanih supstanci pripremljenih po postupku opisanom u tački 3.2.3.1. pripremaju se kalibracioni rastvori. Svaki pojedinačni kalibracioni rastvor priprema se na sledeći način: u ependorf od 2 ml automatskom pipetom prenese se 150 μ l seruma, 100 μ l radnog rastvora ispitivanih jedinjenja određene koncentracije, 100 μ l radnog rastvora IS i 750 ml acetonitrila (ACN). Sadržaj u ependorfu se potom izmeša na vortex mešalici u trajanju od 1 minuta, a onda se centrifugira u ultra-centrifugi 10 min pri broju obrtaja 25000 rcf i temperaturi od 4°C. Dobijeni supernatant predstavlja kalibracioni rastvor. Na opisan način dobijaju se serija kalibracionih rastvora (CS) sledećih koncentracija: 0,18; 0,45; 0,91; 1,36; 1,82; 2,73; 3,64 ng/ml za DE-EDCP, odnosno, 0,045; 0,11; 0,23; 0,34; 0,45; 0,68; 0,91 μ g/ml za EDCP.

Umesto 150 μ l seruma, za validaciju i primenu metode bez prisutnog biološkog matrikasa treba upotrebiti 150 μ l vode, HPLC čistoće.

Tabela 3.1: Koncentracije radnih rastvora i kalibracionih rastvora ispitivanih jedinjenja

Rastvor	Zapremine osnovnih rastvora DE-EDCP i EDCP	Koncentracije radnih rastvora DE-EDCP i EDCP		Koncentracije kalibracionih rastvora DE-EDCP i EDCP	
		DE-EDCP	EDCP	DE-EDCP	EDCP
		Prvi (I)	100 µl u 10 ml	2,00 ng/ml	0,50 µg/ml
Drugi (II)	250 µl u 10 ml	5,00 ng/ml	1,25 µg/ml	0,45 ng/ml* (niska)	0,11 µg/ml* (niska)
Treći (III)	500 µl u 10 ml	10,00 ng/ml	2,50 µg/ml	0,91 ng/ml	0,23 µg/ml
Četvrti (IV)	750 µl u 10 ml	15,00 ng/ml	3,75 µg/ml	1,36 ng/ml* (srednja)	0,34 µg/ml* (srednja)
Peti (V)	1000 µl u 10 ml	20,00 ng/ml	5,00 µg/ml	1,82 ng/ml	0,45 µg/ml
Šesti (VI)	1500 µl u 10 ml	30,00 ng/ml	7,50 µg/ml	2,73 ng/ml* (visoka)	0,68 µg/ml* (visoka)
Sedmi (VII)	2000 µl u 10 ml	40,00 ng/ml	10,00 µg/ml	3,64 ng/ml	0,91 µg/ml

*koncentracije rastvora kontrolnih uzoraka

3.2.3.3 Priprema rastvora kontrolnih uzoraka (QC)

Rastvori kontrolnih uzoraka pripremaju se na način opisan pod tačkom 3.2.3.2. i to od odgovarajućih radnih rastvora ispitivanih jedinjenja (I, II, IV i VI). Rastvori kontrolnih uzoraka (QC) su odabrani kalibracioni rastvori sledećih koncentracija: 0,18; 0,45; 1,36; 2,73 ng/ml za DE-EDCP i 0,045; 0,11; 0,34; 0,68 µg/ml za EDCP.

Svi radni rastvori i osnovni rastvori čuvaju se na tamnom mestu i na temperaturi od 5 °C.

CS i QC rastvori se sveže pripremaju za svaku seriju ispitivanja.

3.2.3.4 Priprema mobilne faze

Koristi se mobilna faza koju čine Pufer A i Pufer B:

⇒ Pufer A: amonijum-acetat (5 mM) – trifluorosirćetna kiselina (99,9:0,1 v/v).

Način pripreme pufera A: odmeri se 0,3854 g amonijum acetata ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) i prenese u staklenu čašu od 1000 ml. Rastvori se dodatkom 300 ml 0,1 % rastvora CF_3COOH u H_2O (v/v) mešanjem na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta, na sobnoj temperaturi. Potom se rastvor istim rastvaračem dopuni do crte.

⇒ Pufer B: metanol – trifluorosirćetna kiselina (99,9:0,1 v/v)

Način pripreme pufera B: automatskom pipetom se odmeri 1 ml 98 % rastvora CF_3COOH i prenese u čašu od 1000 ml. Dopuni se metanolom do crte.

Oba pripremljena pufera profiltriraju se na Bihnerovom levku uz vakuum pumpu i kroz filter papir.

3.2.3.5 Hromatografski uslovi

Kvalitativna i kvantitativna analiza ispitivanih jedinjenja izvodi se primenom tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom UHPLC u sprezi sa masenim spektrometrom (UHPLC-MS/MS).

Mobilnu fazu čini smeša pufera A i pufera B. Potrebno je primeniti sledeći gradijent: 50% pufera A i 50% pufera B u periodu 0 - 0,3 min. U periodu 0,3 - 1,5 min udeo pufera A linearno se smanjuje do 10 %. Uspostavljeni odnos (pufer A 10 % i pufer B 90 %) ostaje konstantan u naredna 3,5 minuta (1,5 - 5,0 min) kada se i eluiraju ispitivanja jedinjenja. Nakon toga se u periodu 5,0 - 5,2 min povećava udeo pufera A do uspostavljanja početnog odnosa pufera A i pufera B (50%:50%) kojim se ekvilibriše kolona u periodu 5,2 - 6,0 min.

- ⇒ Brzina protoka mobilne faze: 300 μ l/s
- ⇒ Temperatura autosemplera: 10,0 °C
- ⇒ Temperatura kolone: 25,0 °C
- ⇒ Injektovana zapremina: 10 μ l
- ⇒ Detekcija masenim spektrometrom (MS/MS)

3.2.3.6 Maseno-spektrometrijski uslovi

Detekcija ispitivanih jedinjenja vrši se primenom masene spektrometrije (MS) u pozitivnom modu. MS operativni uslovi optimizovani su na način prikazan u tabeli 3.2. U MS eksperimentima detekcija jona izvodi se primenom metode praćenja odabrane reakcije (SRM) koristeći tranzicije date u tabeli 3.3 i vreme skeniranja od 0,1 sekunde po tranziciji.

TSQ Tune Software koristi se za automatsku optimizaciju parametara. Podaci se prikupljaju i obrađuju primenom Xcalibur 1.3 *software*-a. Integracija pika (eng. *peak integration*) i kalibracija (eng. *calibrations*) izvode se primenom LC QuanTM *software*-a.

Tabela 3.2: Maseno-spektrometrijski uslovi

Maseno-spektrometrijski uslovi	
Napon spreja (eng. <i>spray voltage</i>)	4500 V
Potencijal jonske optike (eng. <i>tube lens offset</i>)	107 V
Napon na skimeru (eng. <i>skimmer offset</i>)	0 V
Temperatura kapilare (eng. <i>capillary temperature</i>)	300 °C
Temperatura isparivača (eng. <i>vaporizer temperature</i>)	300°C
Linearni pritisak gasa nosača (azot) (eng. <i>sheath gas</i>)	50 jedinica
Kružni pritisak pomoćnog gasa (azot) (eng. <i>auxiliary gas</i>)	10 jedinica
Pritisak kolizionog gasa (argon)	1,5 mTorr

Tabela 3.3: MS/MS uslovi detekcije sa m/z odnosima i kolizionim energijama

Supstanca	m/z odnos molekulskog jona	m/z odnos fragmentnog jona	Koliziona energija (eV)
EDCP	369,26	152,130	19
		198,100	9
DE-EDCP	425,22	197,800	23
		226,070	22
DB-PDCP	495,34	166,034	40
		268,062	28

3.2.3.7 Selektivnost

Selektivnost metode ocenjuje se analizom 6 neopterećenih mišjih seruma.

Serum se obradi prema postupku koji je opisan pod tačkom 3.2.3.2, samo što se umesto 100 µl metanola i 100 µl radnog rastvora određene koncentracije, dodaje 200 µl metanola.

Hromatogram dobijen primenom opisane UHPLC-MS/MS metode upoređuje se sa hromatogramom, koji je dobijen za kalibracioni rastvor najniže koncentracije (uporedni hromatogram).

Na hromatogramu praznog mišjeg seruma, na retencionom vremenu ispitivanih jedinjenja, površina pika ne sme biti veća od 20% površine pika DE-EDCP, odnosno EDCP na uporednom hromatogramu. Na retencionom vremenu IS površina pika na hromatogramu praznog mišjeg seruma ne sme biti veća od 5 % površine pika IS na uporednom hromatogramu.

3.2.3.8 *Linearnost i kalibraciona zavisnost*

Za ispitivanje kalibracione zavisnosti koriste se sveže pripremljeni kalibracioni rastvori. Postupak se izvodi u duplikatu i ponavlja se tokom tri uzastopna dana. Kalibraciona kriva predstavlja odnos površina pikova dobijenih za DE-EDCP, odnosno EDCP i IS (DE-EDCP/IS i EDCP/IS) i deklarisanе koncentracije u odgovarajućem CS. Koeficijent korelacije treba biti iznad 0,99.

3.2.3.9 *Tačnost i preciznost*

Tačnost i preciznost se ispituju primenom rastvora kontrolnih uzoraka (QC) čije su koncentracije zvezdicom naznačene u tabeli 3.1. Rastvori se pripremaju u 6 replikata i postupak se ponavlja tokom tri dana. Tačnost se računa i izražava kao relativna greška (eng. *relative error*) u odnosu na nominalnu koncentraciju (%RE). Preciznost se računa i izražava kao koeficijent varijacije (eng. *coefficient of variation*) (%CV). Granice prihvatljivosti za %RE su: ± 15 , osim za rastvor najniže koncentracije gde su $\pm 20\%$. Granice prihvatljivosti za %CV su $< 15\%$ osim za rastvor najniže koncentracije gde su $< 20\%$.

3.2.3.10 *Limit kvantifikacije*

Limit kvantifikacije je najniža tačka na kalibracionoj krivoj, odnosno, najniža koncentracija iz serije koncentracija kalibracionih rastvora. Ocenjuje se analiziranjem 6 kalibracionih rastvora sa najnižim koncentracijama ispitivanih jedinjenja, a postupak se ponavlja tokom 3 dana.

Odnos signal-šum (*signal-to-noise ratio* - S/N) treba da bude veći od 10.

3.2.3.11 Recovery (%)

Recovery pokazuje efikasnost ekstrakcije. Vrednost za *recovery* treba biti konzistentna, precizna i ponovljiva za ispitivana jedinjenja i IS. Izražava se kao procenat % izmerene količine analita u odnosu na nominalnu vrednost.

QC bez biološkog matriksa pripremi se na način opisan pod tačkom 3.2.3.2. s tim što se umesto 150 µl seruma i 100 ml metanola tokom pripreme upotrebi 250 µl metanola.

Da bi se ocenio *Recovery* upoređuje se koncentracija ispitivanog jedinjenja dobijena analizom QC sa koncentracijom ispitivanog jedinjenja koja je dobijena analizom rastvora QC bez biološkog matriksa.

3.2.3.12 Uticaj matriksa

Sveže odmrznut serum se podvrgne postupku ekstrakcije opisanom pod tačkom 3.2.2.3., s tim što se umesto po 100 µl rastvora ispitivanih jedinjenja dodaje 200 µl metanola. Od tako dobijenog seruma pripremi se QC i analizira primenom UHPLC-MS/MS metode. Iz dobijenog hromatograma odredi se odnos površine pika za DE-EDCP i IS (A), kao i odnos površine pika za EDCP i IS (A).

Potom se uradi analiza QC pripremljenog na način opisan pod tačkom 3.2.3.2. Iz dobijenog hromatograma odredi se odnos površine pika za DE-EDCP i IS (B), kao i odnos površine pika za EDCP i IS (B).

Odnos $(A/B) \cdot 100$ % se definiše kao uticaj matriksa.

3.2.3.13 Stabilnost

Ispitana je *in vitro* stabilnost osnovnih rastvora i radnih rastvora.

Stabilnost osnovnih (*stock*) rastvora DE-EDCP, osnovnog rastvora DE-EDCP i EDCP i osnovnog rastvora IS u metanolu ispituje se na sledećim temperaturama: sobna, 5°C i -20°C. Svaki od ispitivanih osnovnih rastvora pripremi se u tri serije. Jedna serija se čuva na sobnoj temperaturi, druga na -5°C i treća na -20°C tokom 7 dana.

Nakon toga, rastvori se analiziraju i dobijeni rezultati se porede sa rezultatima analize sveže pripremljenih rastvora. Rezultat stabilnosti je prihvatljiv ukoliko odstupanje između poređenih rezultata nije veće od 15 %.

Stabilnost radnih rastvora DE-EDCP, EDCP i IS ispituje se na sledećim temperaturama: sobna, 5°C i -20°C. Svaki od ispitivanih radnih rastvora pripremi se u tri serije. Jedna serija se čuva na sobnoj temperaturi, druga na -5°C i treća na -20°C tokom 3 dana. Nakon toga se rastvori analiziraju i dobijeni rezultati se porede sa rezultatima analize sveže pripremljenih rastvora. Rezultat stabilnosti je prihvatljiv ukoliko odstupanje između poređenih rezultata nije veće od 15 %.

Stabilnost DE-EDCP, EDCP i IS u *autosampler*-u ispitana je sa QC u sve 4 koncentracije. Poređeni su rezultati dobijeni od sveže pripremljenih QC sa rezultatima dobijenim od QC, koji su u autosampleru stajali 24 h na 4°C.

Rezultat stabilnosti je prihvatljiv ukoliko odstupanje između poređenih rezultata nije veće od 15 %.

3.2.4 Međulaboratorijski transfer UHPLC-MS/MS metode

Transfer metode je urađen iz laboratorije u kojoj je metoda razvijena i validirana (*sending laboratory*) u laboratoriju u kojoj je metoda primenjena (*receiving laboratory* ili prijemna laboratorija).

Za transfer metode se u prijemnoj laboratoriji, pored hemikalija, opreme, aparata i računarskih programa navedenih pod tačkama 3.1.2, 3.1.3. i 3.1.4, koristi dodatno sledeća oprema i računarski programi:

- ⇒ Agilent 1290 UHPLC sistem opremljen masenim spektrometrom Agilent 6420 sa trostrukim kvadrupolskim masenim analizatorom (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) sa elektrosprej jonizacijom (ESI);
- ⇒ Mass Hunter Optimizer software version 6.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) je primenjen za automatsku optimizaciju akvizicionih parametara;
- ⇒ Mass Hunter Data Acquisition software version 6.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) koristi se za izvođenje podataka o akviziciji;

⇒ Mass Hunter Qualitative *software version* 6.00 i Mass Hunter Quantitative *software version* 6.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) koriste se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu.

Hromatografski uslovi korišćeni u prijemnoj laboratoriji identični su opisanim pod tačkama 3.2.3.5.

Kvantifikacija DE-EDCP, EDCP i IS vršena je uz primenu masene detekcije u pozitivnom modu. Maseno-spektrometrijski uslovi dati su u tabeli 3.4 i tabeli 3.5.

Primenjena je SRM metoda praćenja odabrane reakcije i vremenom skeniranja od 0,1 sekunde po tranziciji.

Tabela 3.4: Maseno-spektrometrijski uslovi - uporedni prikaz za obe laboratorije između kojih se vrši transfer

Maseno-spektrometrijski uslovi	<i>Sending Laboratory</i>	<i>Receiving laboratory</i>
Napon spreja (eng. <i>capillary spray voltage</i>)	4500 V	4500 V
Potencijal jonske optike (eng. <i>tube lens offset</i>)	107 V	n/a*
Napon na skimeru (eng. <i>skimmer offset</i>)	0 V	n/a*
Temperatura kapilare (eng. <i>capillary temperature</i>)	300°C	340°C
Linearni pritisak gasa nosača (azot) (eng. <i>sheath gas</i>)	50 jedinica	n/a*
Kružni pritisak pomoćnog gasa (azot) (eng. <i>auxiliary gas</i>)	10 jedinica	n/a*
Protok gasa	n/a	10 L/min
Pritisak na nebulizatoru (eng. <i>nebulizer pressure</i>)	n/a	35 psi
Napon fragmentatora (eng. <i>Fragmentor voltage</i>)	n/a	135 V
Pritisak kolizionog gasa (argon)	1,5 mTorr	n/a*

* n/a (nije primenjivo)

Tabela 3.5: MS/MS uslovi detekcije sa m/z odnosima i kolizionim energijama - uporedni prikaz za obe laboratorije između kojih se vrši transfer

Supstanca	m/z odnos molekulskog jona	m/z odnos fragmentnog jona	m/z odnos molekulskog jona	m/z odnos fragmentnog jona
	<i>Sending laboratory</i>		<i>Receiving laboratory</i>	
EDCP	369,256	152,130	369,3	152,1
		198,100		198,1
DE-EDCP	425,220	197,800	425,2	197,8
		226,070		226,1
DB-PDCP	495,339	166,034	495,3	166,0
		268,062		268,1

3.2.4.1 Validacija bioanalitičke metode u prijemnoj laboratoriji

U prijemnoj laboratoriji radi se potpuna validacija. Radni rastvori, kalibracioni rastvori (CS) i rastvori kontrolnih uzoraka (QC) pripreme se na prethodno opisan način. Tokom validacije metode, u prijemnoj laboratoriji ispituju se sledeći validacioni parametri: selektivnost, linearnost, limit kvantifikacije, *recovery*, tačnost, preciznost i uticaj matriksa.

3.2.4.2 Cross-validacija - Passing and Bablok regresiona analiza

Rastvori za validaciju metode i rezultati dobjeni tokom validacije analiziraju se dodatno primenom *Passing and Bablok* regresione analize.

3.3 RASTVORLJIVOST I LIPOFILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA

3.3.1 Ispitivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost supstance DE-EDCP i EDCP ispitana je u vodenim rastvorima različitih pH vrednosti (pH=1, pH=5, pH=9 i pH=12).

3.3.1.1 Priprema rastvora

Priprema fosfatnog pufera pH=1

Odmeri se 0,098 g H_3PO_4 i 0,8939 g NaCl i prenese se u staklenu čašu, pa se potom rastvori sa 90 ml vode. Izmeri se pH vrednost dobijenog rastvora i podesi na pH = 1 dodavanjem potrebne zapremine 0,1 M rastvora NaOH. Vrednost na pH-metru se očitava sa tačnošću od $\pm 0,002$. Sadržaj se prenese u odmerni sud od 100 ml dopuni se vodom do crte.

Priprema fosfatnog pufera pH=5

Odmeri se 0,156 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 0,8202 g NaCl i prenese se u staklenu čašu, pa se potom rastvori sa 90 ml vode. Izmeri se pH vrednost dobijenog rastvora i podesi na pH=5 dodavanjem potrebne zapremine 0,1 M rastvora NaOH. Vrednost na pH-metru se očitava sa tačnošću od $\pm 0,002$. Sadržaj se prenese u odmerni sud od 100 ml dopuni se vodom do crte.

Priprema fosfatnog pufera pH=9

Odmeri se 0,156 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 0,7306 g NaCl i prenese se u staklenu čašu, pa se potom rastvori sa 90 ml vode. Izmeri se pH vrednost dobijenog rastvora i podesi na pH=9 dodavanjem potrebne zapremine 0,1 M rastvora NaOH. Vrednost na pH-metru se očitava sa tačnošću od $\pm 0,002$. Sadržaj se prenese u odmerni sud od 100 ml dopuni se vodom do crte.

Priprema fosfatnog pufera pH=12

Odmeri se 0,268 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 0,6077 g NaCl i prenese se u staklenu čašu, pa se potom rastvori sa 90 ml vode. Izmeri se pH vrednost dobijenog rastvora i podesi na pH=12 dodavanjem potrebne zapremine 0,1 M rastvora NaOH. Vrednost na pH-metru se očitava sa tačnošću od $\pm 0,002$. Sadržaj se prenese u odmerni sud od 100 ml dopuni se vodom do crte.

Priprema rastvora ispitivane supstance

5 mg ispitivane supstance se odmeri i rastvori u epruveti sa 5 ml odgovarajućeg pufera. Rastvor se izmeša na vortex-u 1 minut i na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Nakon toga, rastvor se centrifugira u trajanju od 5 minuta na 3000 obrtaja/minut, a potom profiltrira kroz membranski filter.

Standardni rastvor DE-EDCP za upoređivanje: rastvori se 7,4 mg supstance DE-EDCP u 100 ml metanola.

Standardni rastvor EDCP za upoređivanje: rastvori se 8,1 mg supstance EDCP u 100 ml metanola.

3.3.2 Ispitivanje lipofilnosti

Lipofilnost ispitivanih supstanci određena je primenom metode mućkanja (*shake-flask* metoda) i primenom hromatografske UHPLC-MS metode.

3.3.2.1 Određivanje particionog koeficijenta ($\log D_{7,4}$) primenom *shake-flask* metode

3.3.2.1.1 Priprema rastvora

a) Priprema fosfatnog pufera pH=7,4

Odmeri se 13,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 4,0 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Prenesu se u čašu od 1000 ml i rastvore u 900 ml destilovane vode. Izmeri se pH vrednost dobijenog rastvora i podesi na pH=7,4 dodavanjem 0,1 M rastvora NaOH. Vrednost na pH-metru se očitava sa tačnošću od $\pm 0,002$. Nakon toga se sadržaj u čaši dopuni destilovanom vodom do crte.

b) Priprema rastvora ispitivane supstance

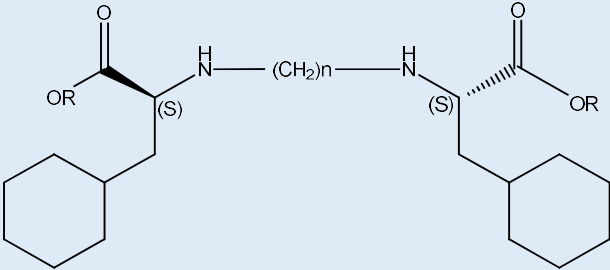
Odmeri se oko 1 mg ispitivanog jedinjenja, prenese se u epruvetu i rastvori u 5 ml fosfatnog pufera pH=7,4 na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijena suspenzija se centrifugira tokom 15 min na 3000 obrtaja/min i supernatant se uzima za dalje ispitivanje.

1 ml supernatanta (zasićen rastvor ispitivanog jedinjenja) prenese se u staklenu vialu i u rastvor se doda ista zapremina (1 ml) nepolarne faze *n*-oktanola. Viale se dobro zatvore. Postave se na mehanički šejker i to u horizontalnom položaju. Sadržaj u vialama se meša na šejkeru tokom 2 sata. Nakon toga se viala usprave i ostave tako tokom 24 sata kako bi došlo do potpunog odvajanja polarne i nepolarne faze.

Particioni koeficijent se izračunava na osnovu jednačine (1) iz poglavlja 1.4.1. Koncentracija ispitivanih jedinjenja određuje se primenom UHPLC-MS metode. Maseno-spektrometrijska analiza (MS analiza) rađena je u pozitivnom modu primenom metode praćenja odabrane jonske tranzicije selektovanog jona (SRM) za derivate 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i

primenom metode praćenja pojedinačnog jona (SIM) za derivate 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (tabela 3.6). Rezolucija masenog analizatora podešena je na 0,7 Da.

Tabela 3.6: MS uslovi detekcije sa m/z odnosima



Ispitivano jedinjenje	R	n	m/z
EDCP	H	2	369→152* 369→198*
DM-EDCP	CH ₃	2	397→212*
DE-EDCP	C ₂ H ₅	2	425→198* 425→226*
DP-EDCP	C ₃ H ₇	2	453→240*
DB-EDCP	C ₄ H ₉	2	481→254*
DIB-EDCP	C ₄ H ₉	2	481→254*
PDCP	H	3	383**
DM-PDCP	CH ₃	3	411**
DE-PDCP	C ₂ H ₅	3	438**
DP-PDCP	C ₃ H ₇	3	467**
DB-PDCP	C ₄ H ₉	3	495**
DIB-PDCP	C ₄ H ₉	3	495**
DPE-PDCP	C ₅ H ₁₁	3	523**
DIPE-PDCP	C ₅ H ₁₁	3	523**

*Selected reaction monitoring (SRM); **Single ion monitoring (SIM)

3.3.2.2 *Određivanje hromatografskih parametara lipofilnosti primenom UHPLC/MS metode*

3.3.2.2.1 **Priprema rastvora**

a) Rastvor derivata 1,2-etandiamina

Za svako od ispitivanih jedinjenja odmeri se oko 1 mg supstance, prenese u staklenu kivetu i rastvori sa 1 ml DMSO na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Od pripremljenog rastvora odmeri se 50 μ l i prenese u odmerni sud od 5 ml. Doda se 2,5 ml pufera pH=7,4 izmeša sadržaj na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi i dopuni puferom pH=7,4 do crte. Od dobijenog rastvora ispitivane supstance odmeri se 100 μ l i prenese u staklenu vialu u koju se doda još 900 μ l DMSO. Na isti način se postupi sa svim ispitivanim supstancama. U istoj viali se sakupe rastvori svih ispitanih jedinjenja iz grupe derivata 1,2-etandiamina.

b) Rastvor derivata 1,3-propandiamina

Za svako od ispitivanih jedinjenja odmeri se oko 1 mg supstance, prenese u staklenu kivetu i rastvori sa 1 ml DMSO na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Od pripremljenog rastvora odmeri se 50 μ l i prenese u odmerni sud od 5 ml. Doda se 2,5 ml pufera pH=7,4 izmeša sadržaj na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi i dopuni puferom pH=7,4 do crte. Od dobijenog rastvora ispitivane supstance odmeri se 100 μ l i prenese u staklenu vialu u koju se doda još 900 μ l DMSO. Na isti način se postupi sa svim ispitivanim supstancama. U istoj viali se sakupe rastvori svih ispitanih jedinjenja iz grupe derivata 1,3-propandiamina.

3.3.2.2 Određivanje hromatografskog parametra $\log k$ metodom izokraskog eluiranja

Rastvori derivata 1,2-etandiamina koji su u prvoj viali i rastvori derivata 1,3-ropandiamina koji su u drugoj viali analiziraju se primenom UHPLC-MS metode uz 6 različitih sastava mobilne faze:

⇒ pufer A:pufer B = 10:90; 20:80; 30:70; 35:65; 40:60 i 50:50 (v/v).

Za svaki od navedenih sastava mobilne faze rastvori iz obe viala injektuju se po tri puta.

Za svako od ispitivanih jedinjenja evidentira se retenciono vreme.

Vrednost hromatografskog parametra $\log k$ izračunava se na osnovu jednačine (2) iz poglavlja 1.4.1, odnosno na osnovu vrednosti retencionih vremena t_R dobijenih eluiranjem ispitivanih jedinjenja.

3.3.2.3 Određivanje hromatografskog parametra CHI metodom gradijentnog eluiranja

Eluiranje ispitivanih jedinjenja dobija se menjanjem udela pufera A i pufera B u sastavu mobilne faze na sledeći nači: tokom prvih 15 minuta linearno raste udeo organske faze (pufer B) od 5 % do 95 %, a potom u periodu 17,20 - 20 minuta linearno opada udeo pufera B u sastavu mobilne faze do 40 %.

Vrednosti hromatografskih parametara CHI i φ_0 izračunavaju se na osnovu jednačina (3) i (4) iz poglavlja 1.4.1. primenom UHPLC/MS metode i maseno-spektrometrijskih uslova datih u tabeli 3.6.

3.3.3 Razvoj i validacija matematičkog modela

Na osnovu rezultata dobijenih primenom obe metode, odnosno na osnovu vrednosti particionog koeficijenta ispitivanih jedinjenja dobijenog metodom mućkanja i izračunatih vrednosti hromatografskih parametara, razvija se matematički model za predviđanje vrednosti particionog koeficijenta ($\log P$) za nove derivate i potencijalne metabolite ispitivanih jedinjenja na osnovu hromatografskih parametara.

Validacija matematičkog modela vrši se primenom *leave-one-out* tehnike. Prediktivna moć razvijenog modela ocenjuje se na osnovu vrednosti validacionog parametra Q^2 - unakrsni validacioni koeficijent ($Q^2 \leq 1$) i parametra PRESS (prediktivna rezidualna suma kvadrata).

Validacioni parametri PRESS i Q^2 izračunavaju se na osnovu jednačina:

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (v_i - \hat{y}_{i/i})^2 \quad (11)$$

y_i – eksperimentalni odgovor;

$\hat{y}_{i/i}$ – predikcija odgovora na osnovu modela definisanog kada se i -ti uzorak izbaciti iz trening seta

$$\text{TSS} = \sum_{i=1}^n (v_i - \bar{y})^2 \quad (12)$$

\bar{y} – srednja vrednost eksperimentalnih vrednosti.

$$Q^2 = 1 - \text{PRESS}/\text{TSS}; \quad (13)$$

3.4 PERMEABILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA

Permeabilnost ispitivanih supstanci procenjena je primenom PAMPA metode na veštačkim membranama koje simuliraju gastrointestinalni trakt (GIT) i krvno-moždanu barijeru (BBB).

3.4.1 Priprema rastvora

Rastvor pufera pH=7,4 pripremi se na način opisan pod tačkom 3.3.1.1.a)

Donorski rastvor

Odmeri se oko 1 mg ispitivane supstance i prenese u staklenu vialu. Doda se 1 ml dimetilsulfoksida (DMSO) i rastvori na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Od pripremljenog rastvora odmeri se 50 μ l i prenese u odmerni sud od 5 ml. Doda se 2,5 ml pufera pH=7,4. Sadržaj se izmeša na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi i dopuni puferom pH=7,4 do crte.

Akceptorski rastvor

Pripremi se 1% rastvor DMSO u fosfatnom puferu pH 7,4 (v/v).

3.4.2 Izvođenje PAMPA testa

Za izvođenje PAMPA testa koriste se hidrofobne polivinilidenfluoridne mikrofiltracione ploče sa 96 odeljaka MultiScreen™ HTS (Millipore, Francuska).

Veštačka membrana koja imitira membranu GIT-a predstavlja 1% rastvor lecitina u dodekanu (w/v).

Veštačka membrana koja imitira krvno-moždanu barijeru predstavlja 1% rastvor svinjskih polarnih lipida mozga u dodekanu (w/v).

Veštačka membrana se formira nanošenjem po 5 μ l odgovarajućeg rastvora (za GIT ili za BBB) na dno svakog odeljka donorske ploče. Ploče pripremljene na opisani način ostave se 60 min na sobnoj temperaturi do potpunog uparavanja nanetog rastvora.

U akceptorske odeljke nanese se automatskom pipetom po 400 μ l akceptorskog rastvora. Potom se u donorske odeljke nanese automatskom pipetom po 300 μ l donorskog rastvora ispitivane supstance. Filtraciona površina je 0,28 cm².

Pripremljene ploče sa nanetim akceptorskim i donorskim rastvorima ostave se da stoje na sobnoj temperaturi narednih 16 sati.

Nakon završetka inkubacije, koncentracije ispitivanih supstanci u donorskim i akceptorskim odeljcima određuju se primenom UHPLC/MS metode. Svaka supstanca analizirana je u triplikatu.

3.5 IN SILICO BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA

In silico karakterizacija ispitivanih supstanci izvodi se uz pomoć računarskih programa.

Strukture svih ispitivanih jedinjenja nacrtane su u računarskom programu ChemBioDraw Ultra 12.0, optimizovane u računarskom programu ChemBio3D Ultra 12.0 primenom MMP2 minimizacije energije i sačuvane u *mol*-formatu.

3.5.1 Predviđanje primenom *Metabolizer-a*

Primenom računarskog programa *Metabolizer* dobijene su strukture najverovatnijih metabolita i dominantni metabolički putevi. Program predviđa proizvode prve faze metabolizma ispitivanog jedinjenja.

3.5.2 Predviđanje primenom *ADME(T) predictor-a*

ADMET osobine (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost) određene su primenom *ADME(T) Predictor v. 6.5 software*.

3.5.3 Predviđanje primenom molekuskog *docking-a*

Za predviđanje molekuskog mehanizma dejstva i interakcije ispitivanih supstanci sa ciljnim mestima koristi se *AutoDock Vina* za Windows, MGLTools (*AutoDock Tools-ADT*), *Discovery Studio Visualizer (DS)*, *Python 3.4.3* i *Open Babel*.

AutoDock Vina kombinuje saznanja potencijalnih i empirijski dobijenih rezultata, čime se obezbeđuje tačnost i pouzdanost dobijenih rezultata.

Strukture ciljnih mesta (receptori, enzimi i druge proteinske strukture) i liganada za *docking* proračune pripremaju se primenom *AutoDockTools 1.5.6 (ADT)*.¹⁶¹

Struktura ciljnog mesta u kompleksu sa ligandom preuzima se kao *PDB* fajl sa *Protein Data Bank* stranice i priprema se u računarskom programu *AutoDock Vina* koristeći *AutoDock Vina docking* protokol.¹⁶² Ciljno mesto se sačuva u *PDBQT* formatu.

Ciljna mesta za izvođenje *docking*-studije biraju se na osnovu podataka iz literature, koji govore o ostvarivanju citotoksičnog i antiproliferativnog dejstva dostupnih terapeutika, kao i na osnovu rezultata prethodno izvedenih *in vitro* studija na ćelijskim linijama (ćelijska linija akutne promijelocitne leukemije HL-60 i ćelijska linija humanog glioma U251 su se pokazale kao najosetljivije na citotoksično delovanje nosintetisanih supstanci).

Ciljno mesto može biti receptor, enzim ili neka druga proteinska makromolekula. Receptori mogu biti vezani za membranu ili mogu biti u citoplazmi.

Ispitivana jedinjenja pripremaju se u *AutoDock Vina* računarskom programu, nakon čega se sačuvaju u *PDBQT* formatu. I metaboliti predviđeni primenom programa *Metabolizer* takođe se koriste kao ispitivana jedinjenja. Supstanca, koja je kokristalisala sa ciljnim mestom preuzetim kao *PDB* fajl sa *Protein Data Bank* stranice, označava se kao ligand.

Pozicioniranje liganda i ciljnog mesta: mreža u kojoj će se vršiti *docking* izračunavanje za ispitivane supstance (*grid box*), centrirana se na ligand koji je kokristalisao sa ciljnim mestom, a razmak između linija u mreži je 1 Å (*Spacing angstroms*). Koordinate koje se generišu se sačuvaju i koriste za *docking* izračunavanje (*docking* studiju) ispitivanih supstanci. Broj tačaka na x, y i z osi podesi se na način da ne prelazi 20. Nakon obrade u *AutoDock-u*, za svako ispitivano jedinjenje kreira se log fajl sa energijama i *out.pdbqt* fajl sa konformacijama. Za svako ispitivano jedinjenje generiše se 9 konformacionih položaja i najbolja konformacija se određuje na osnovu najvišeg afiniteta vezivanja (*binding affinity*).

Validacija *docking* studije

Validacija izvedene *docking* studije vrši se poređenjem konformacije liganda iz kokristala sa ciljnim mestom (koja je određena primenom *X-ray* difrakcije) sa konformacijom iz *docking* proračuna (dokovana poza). Prilikom poređenja izračunava se prosečna udaljenost između ove dve konformacije, odnosno RMSD vrednost (eng. *Root mean square deviation*).

Udaljenost se određuje na osnovu koordinata alfa-C atoma, koje su karakteristika tercijarne strukture proteina. Vrednost RMSD izražava se putem merne jedinice Ångströma (Å) i iznosi 10^{-10} m. RMSD vrednost treba da bude manja od 2 Å. Računanje RMSD vrednosti vrši se primenom *Discovery Studio Visualizer v4.1*.

Ciljna mesta u interakciji sa kojima ispitivane supstance pokazuju najveći afinitet vezivanja (*binding affinity* < - 8 kcal/mol) uz zadovoljavajuću vrednost validacionog parametra (RMSD < 2 Å) prikazana su u tabeli 3.8.

Interakcije ispitivanih supstanci i predviđenih metabolita sa ciljnim mestima, koje su pokazale najviši afinitet vezivanja, vizuelizovane su primenom računarskog programa *Discovery Studio Visualizer v4.1*. Istovremeno, sa ciljem poređenja broja i vrste interakcija, urađena je vizuelizacija i interakcije liganda i ciljnog mesta iz kokristalografske strukture.

Tabela 3.8: Ciljna mesta za koja su ispitivane supstance pokazale najveći afinitet vezivanja

PDB kod	Receptor
Signalni put	
3IK3	
2HYY	
1OPK	Proto-onkogen tirozin kinaze
3CS9	
3MS9	
4R5Y	Serin/treonin protein kinaza B-raf
3O96	AKT1 (protein kinaza kod glioma)
3HEC	Mitogen-aktivirana protein kinaza 14 (P38)
3BV2	
2QYQ	Humani raf kinaza inhibitorski protein (rkip)
3OG7	B-Raf Kinaza V600E
4XEO	Alanin-tRNA ligaza
Matriks-metaloproteaze	
2JIH	ADAMTS-1
1RMZ	Makrofagne metaloelastaze
1GKD	
1GKC	Matriks-metaloproteaza MMP 9
5CUH	
Mitohondrijalni put apoptoze	
1M6I	
4BV6	AIF

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 RAZVOJ I VALIDACIJA BIOANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE DIETIL ESTRA 1,2-ETANDIAMIN-*N,N'*-DI-2-(3-CIKLOHEKSIL)PROPANSKE KISELINE I ODGOVARAJUĆE KISELINE KAO POTENCIJALNOG METABOLITA

Razvijena i validirana bioanalitička metoda prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji je nova metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivanih supstanci u biološkom materijalu: tečna hromatografija pod ultra-visokim pritiskom u sprezi sa masenom spektrometrijom (UHPLC-ESI-MS/MS). Pored razvoja i validacije nove UHPLC-ESI-MS/MS metode, u ovom poglavlju će biti predstavljena i odabrana metoda ekstrakcije ispitivanih supstanci iz biološkog materijala, kao i transfer metode, kojim je pokazana primena u drugoj laboratoriji.

Za svih 14 ispitivanih supstanci je nakon sinteze NMR-analizom i mikroanalizom (elementalni sastav) utvrđeno da u potpunosti odgovaraju pretpostavljenom sastavu.

Ispitivane supstance su novosintetisane i u literaturi je pronađen samo jedan podatak o njihovim fizičko-hemijskim karakteristikama – u ranijim istraživanjima određena je njihova rastvorljivost u dimetilsulfoksidu (DMSO). Etil-estar (DE-EDCP) imao je najveću rastvorljivost ~10 mg/ml na 25 °C u poređenju sa ostalim estrima, čija je rastvorljivost iznosila ~ 5-6 mg/ml na 35-45 °C.³⁸ Takođe, u literaturi se može naći da je za novosintetisane supstance derivate 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline pokazana citotoksična aktivnost u *in vitro* ispitivanjima na ćelijskim linijama.^{1,2} Kao najpotentnija među ispitivanim supstancama pokazala se (*S,S*)-*O,O*-dietil-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DE-EDCP).¹

Kako bi se sa *in vitro* ispitivanja na ćelijskim linijama prešlo na *in vivo* ispitivanja, odnosno, na pretklinička ispitivanja na odabranim animalnim modelima sa ciljem određivanja farmakokinetičkog profila i toksičnosti jedinjenja, bilo je potrebno razviti bioanalitičku metodu za praćenje DE-EDCP i (S,S)-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (EDCP) kao njenog potencijalnog metabolita.

Ispitivane supstance ne poseduju hromofore i imaju nizak molarni apsorpcioni koeficijent. Određen je maksimum apsorpcije (λ) i molarna apsorptivnost (a) za ispitivanu supstancu DE-EDCP i odabrani interni standard (S,S)-*O,O*-dibutil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DB-PDCP):

⇒ DE-EDCP: $\lambda = 209 \text{ nm}$; $a = 0.127 \text{ dm}^3\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$

⇒ DB-PDCP: $\lambda = 215 \text{ nm}$; $a = 0.085 \text{ dm}^3\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

Ispitivane supstance ne mogu biti detektovane UV/VIS spektrofotometrom te je zbog navedenog upotrebljena masena spektrometrija. Drugi razlog korišćenja masene spektrometrije je izuzetno velika osetljivost masenog detektora, tj. mogućnost kvantifikacije niskih koncentracija, što je značajno imajući u vidu da su lekovite supstance u biološkim materijalima prisutne u niskim koncentracijama.

Interni standard (DB-PDCP) izabran je na osnovu sličnosti u strukturi sa ispitivanim jedinjenjima. Vrlo mali broj lekovitih supstanci ima u svojoj strukturi etandiaminsku strukturu. Pretraživanjem literature i baza podataka nađeno je da etambutol poseduje etandiaminsku strukturu. Tako je i sastav mobilne faze izabran na osnovu dostupnih podataka za kvantitativnu analizu etambutola.¹⁶³

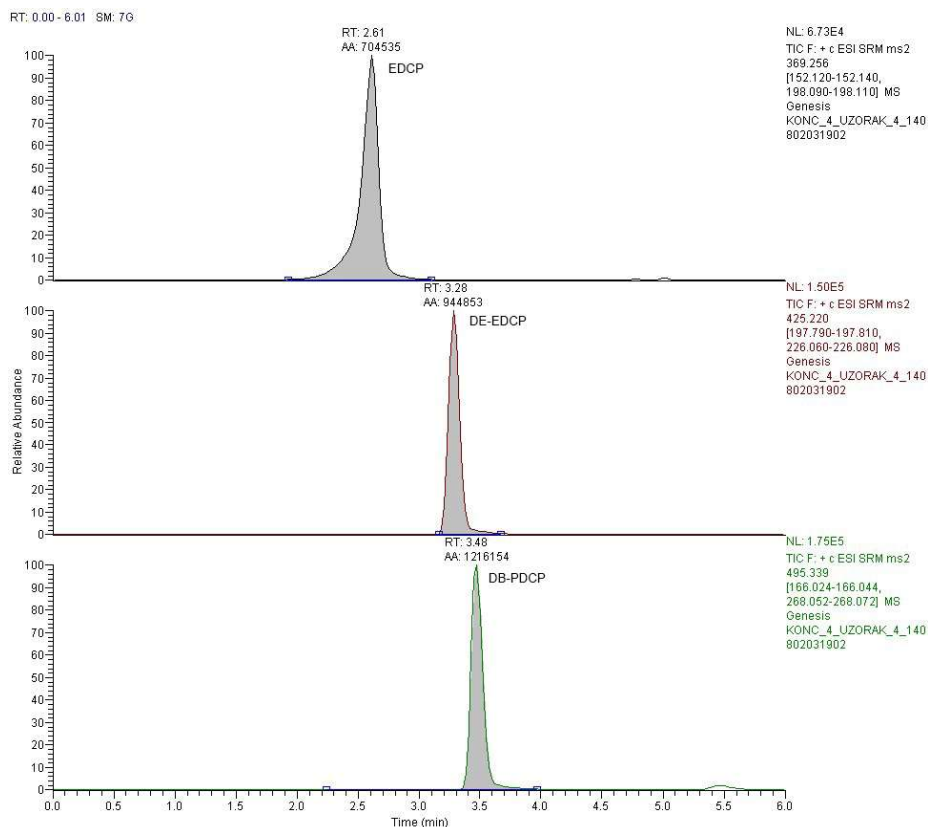
Mobilnu fazu čine dva pufera:

⇒ Pufer A: amonijum-acetat (5 mM) – trifluorosirćetna kiselina (99,9:0,1 v/v) i

⇒ Pufer B: metanol – trifluorosirćetna kiselina (99,9:0,1 v/v)

Primenom gradijenta postignuto je zadovoljavajuće razdvajanje aktivnih supstanci unutar 6 minuta trajanja *run-a*.

Retenciona vremena ispitivanih supstanci su: $t_{EDCP} = 2,65$ min, $t_{DE-EDCP} = 3,30$ min i $t_{S} = 3,53$ min. Dobijeni hromatogram prikazan je na slici 4.1.



Slika 4.1: Hromatogram ispitivanih supstanci

Detekcija i kvantifikacija ispitivanih supstanci urađena je na osnovu sledećih masenih tranzicija:

⇒ DE-EDCP (m/z 425,2 → 197,8; 226,1), EDCP (m/z 369,2 → 152,1, 198,1) i

⇒ DB-PDCP (m/z 495,3 → 166,1; 268,1).

Fragmentacija dobijena predloženom metodom praćenja odabrane reakcije (SRM) i dobijene strukture jonskih fragmenata date su na slikama 4.2-4.4.

U MS-MS spektru vidi se dominacija sledećih jonskih fragmenata:

⇒ $m/z=226$ za DE-EDCP i

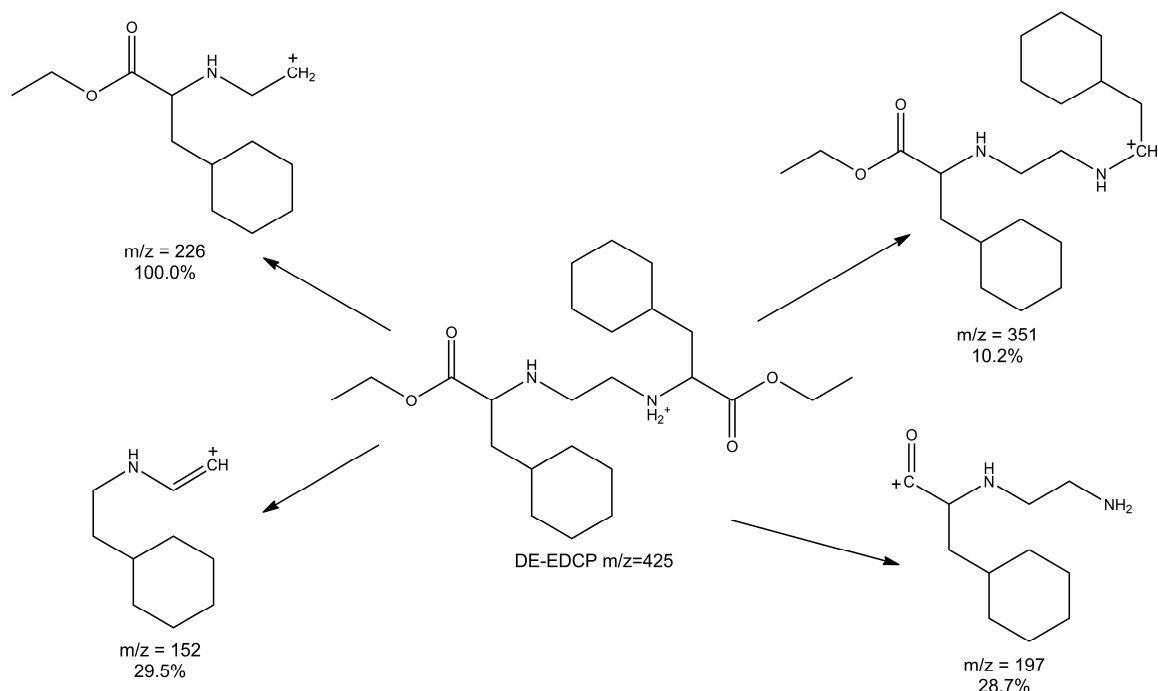
⇒ $m/z=268$ za DB-PDCP

koji su rezultat gubitka estra 2-amino-3-cikloheksil propanske kiseline na jednoj strani molekula (slike 4.2-4.4).

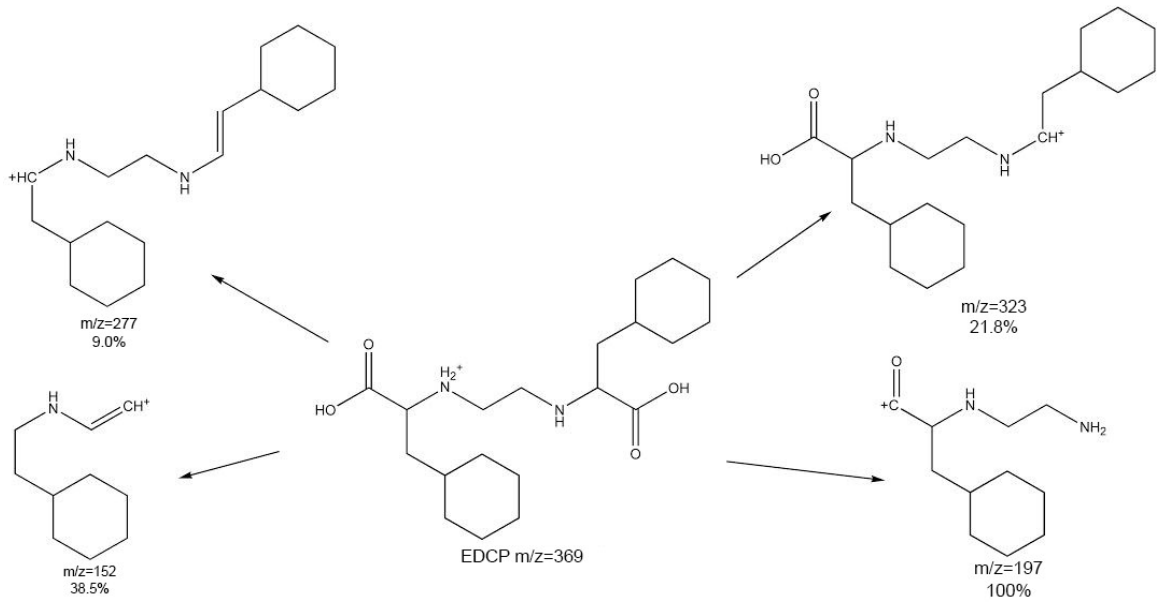
Jonski fragmenti $m/z=197$ za DE-EDCP i $m/z=211$ za DB-PDCP nastaju istovremenim gubitkom alkoksi grupe sa jedne strane i gubitkom estra 3-cikloheksil propanske kiseline sa druge strane obe molekule.

Cepanje C-C veze unutar 1,3-propandiaminskog mosta je specifična reakcija za DB-PDCP (slika 4.4) kojom nastaju dva jonska fragmenta: $m/z=254$ i $m/z=168$. Slična fragmentacija javlja se i kod jedinjenja DE-EDCP i EDCP, ali uz dodatno cepanje etoksikarbonil-, odnosno, karboksilne grupe do jonskog fragmenta $m/z=152$ (slika 4.2 i 4.3).

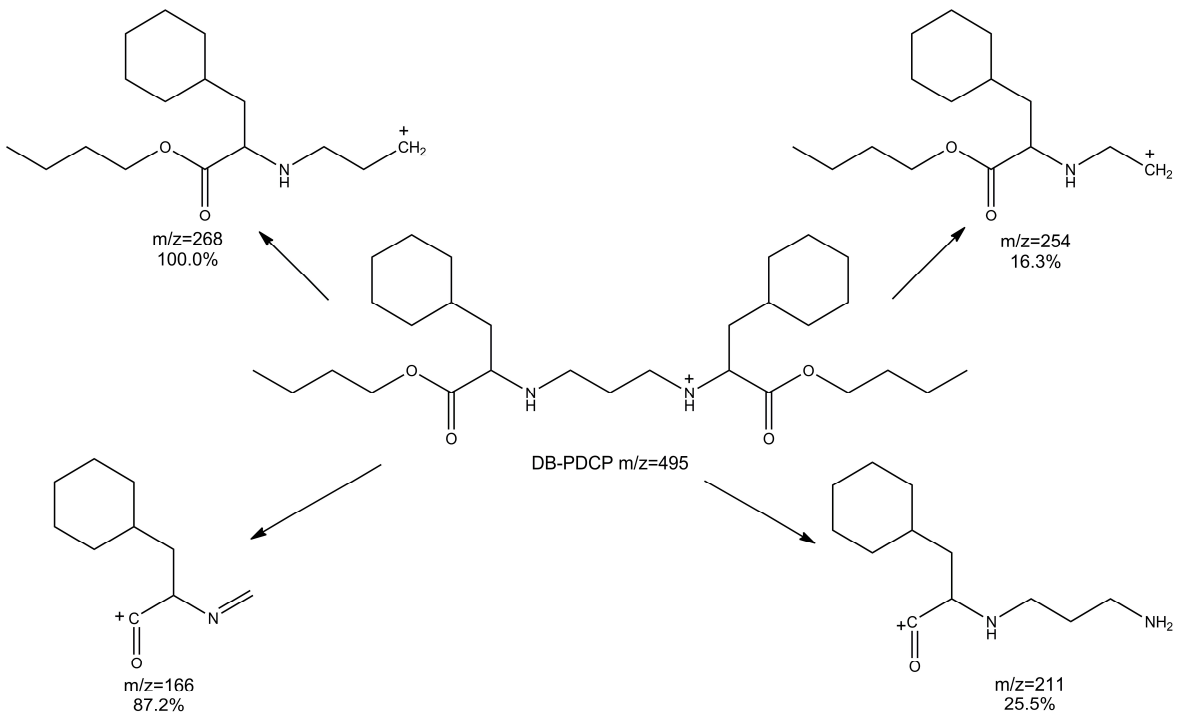
Jonski fragmenti (ćerke joni) $m/z=351$ i $m/z=323$ formiraju se cepanjem etoksikarbonil-, odnosno, karboksilne grupe samo na jednoj strani jedinjenja DE-EDCP, odnosno EDCP (slika 4.2 i 4.3).



Slika 4.2: Fragmentacija ispitivane supstance DE-EDCP



Slika 4.3: Fragmentacija ispitivane supstance EDCP



Slika 4.4: Fragmentacija internog standarda DB-PDCP

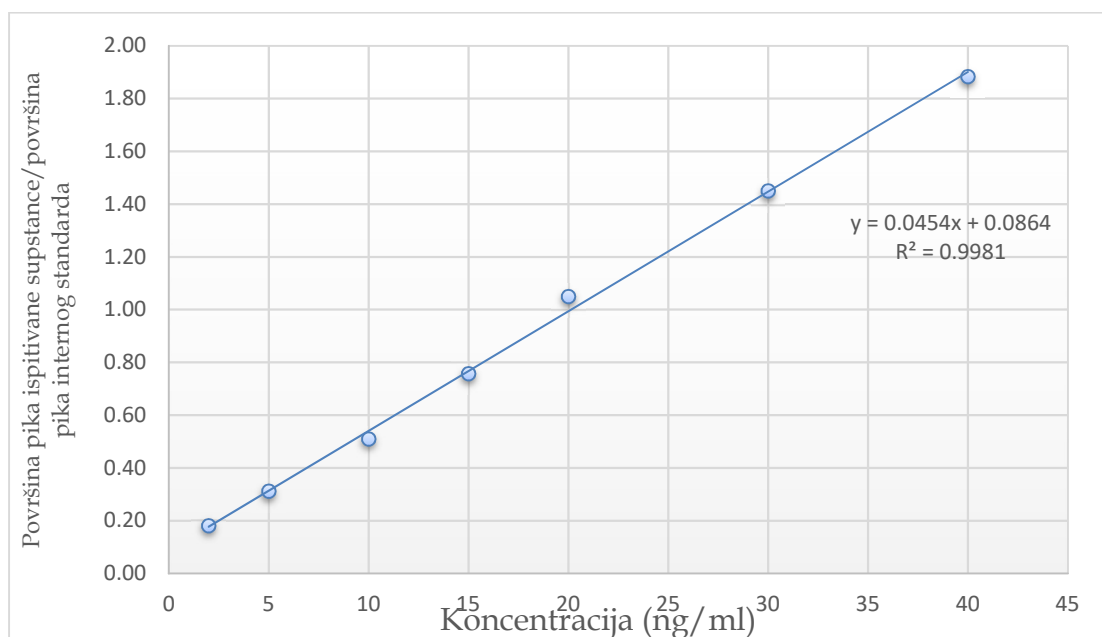
4.1.1 Procena validacionih parametara UHPLC-ESI-MS/MS metode u odsustvu biološkog matriksa

Pre početka validacije predložene bioanalitičke metode, urađena je validacija predložene metode u odsustvu biološkog matriksa i sa rastvorom ispitivanih supstanci u metanolu. U nastavku su prikazane dobijene vrednosti validacionih parametara.

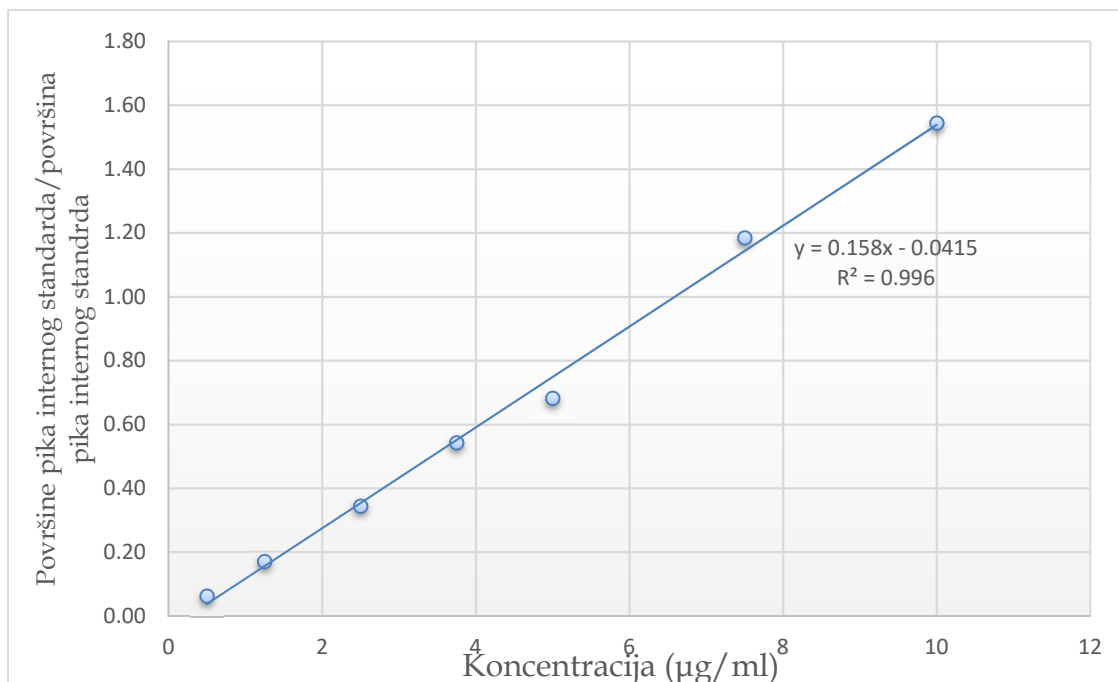
Tabela 4.1: Parametri linearnosti metode

Parametri linearnosti	DE-EDCP	EDCP
Koncentracioni opseg	2,0 - 40,0 ng/ml	0,5 - 10,0 µg/ml
Jednačina linearne krive	$y=0,0454 \cdot x + 0,0864$	$y=0,158 \cdot x - 0,0415$
Koeficijent korelacije	$r^2=0,9981$; $r=0,999$	$r^2=0,996$; $r=0,998$

gde y predstavlja odnos površine pika ispitivane supstance i internog standarda, a x predstavlja deklarisanu koncentraciju ispitivane supstance u rastvoru. Prikazan koeficijent korelacije (r) viši je od 0,99 na osnovu čega je pokazano da je predložena metoda linearna u posmatranom koncentracionom opsegu. Kalibracione krive za ispitivane supstance DE-EDCP i EDCP date su na slikama 4.5 i 4.6.



Slika 4.5: Kalibraciona kriva supstance DE-EDCP



Slika 4.6: Kalibraciona kriva supstance EDCP

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limiti detekcije i limiti kvantifikacije za supstance EDCP i DE-EDCP određivani su analizom odnosa signal/šum. Dobijene vrijednosti ovih limita prikazane su u Tabeli 4.2.

Tabela 4.2: Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) ispitivanih supstanci

Supstanca	LOD	LOQ
EDCP	0,16 µg/ml	0,50 µg/ml
DE-EDCP	0,66 ng/ml	2,00 ng/ml

Tačnost i preciznost

Za ispitivanje tačnosti i preciznosti upotrebljeni su rastvori kontrolnih uzoraka (QC) prikazani u tabeli 4.3. Za svaki koncentracioni nivo napravljeno je nezavisno po 4 rastvora. Uzorci su ispitivani u tri dana.

Tabela 4.3. Rezultati za tačnost i preciznost za ispitivane supstance

Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	Tačnost		Preciznost	
	<i>Within-run</i>	<i>Between-run</i>	<i>Within-run</i>	<i>Between-run</i>
	RE (%)	RE (%)	CV (%)	CV (%)
EDCP				
0,50	+2,94	+12,67	13,36	15,50
1,25	+8,37	+7,73	9,10	7,02
3,75	+13,50	+2,40	6,09	10,40
7,50	+1,48	+9,98	13,39	13,83
DE-EDCP				
2	+10,50	-16,00	13,36	18,07
5	-5,21	+4,40	6,17	8,51
15	+0,01	+0,62	3,31	3,29
30	-2,95	-3,46	9,18	10,03

Sva odstupanja od deklariranih koncentracija manja su od $\pm 15\%$ za QC uzorke, odnosno od $\pm 20\%$ za LOQ uzorak. Koeficijent varijacije (CV) za sve QC uzorke manji je od 15% , odnosno, za LOQ uzorke manji je od 20% . Može se zaključiti da predložena metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivanih supstanci DE-EDCP i EDCP ima zadovoljavajuću tačnost i preciznost.

Nakon što je pokazano da su primenom predložene UHPLC-ESI-MS/MS metode dobijene vrednosti validacionih parametara prihvatljive u odnosu na definisane granice važećim smernicama, prešlo se na razvoj ekstrakcije ispitivanih supstanci iz biološkog materijala.

4.1.2 Ekstrakcija analita iz biološkog materijala

Odabir načina ekstrakcije ispitivanih supstanci zavisi od više faktora, a pre svega od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika. U procesu razvoja optimalnih eksperimentalnih uslova za ekstrakciju DE-EDCP i EDCP iz biološkog materijala trebalo je uzeti u razmatranje sledeće:

- ⇒ Analizirana supstanca DE-EDCP je dietil estar, dok je EDCP dikarboksilna kiselina nastala hidrolizom estarskih funkcionalnih grupa. Ispitivane supstance su **različite polarnosti**.
- ⇒ Pored različite polarnosti, prisutna je **nestabilnost estara**, odnosno mogućnost hidrolize estarskih funkcionalnih grupa i u kiseloj i u baznoj sredini. Takođe, u biosredini pod dejstvom specifičnih i nespecifičnih esteraza dolazi do hidrolize estarskih funkcionalnih grupa u relativno kratkom vremenu.
- ⇒ Bilo je potrebno prevazići i efekat vezivanja ispitivanih supstanci **za proteine plazme**.

Tokom razvoja ekstrakcije ustanovljen je korak dodavanja 5 mM NaF¹⁶⁰. Natrijum-fluorid blokira specifične i nespecifične esteraze, čime se sprečava hidroliza estarskih funkcionalnih grupa ispitivane supstance tokom obrade biološkog materijala. NaF se dodaje komercijalnom serumu pre spajkovanja.

Tokom razvoja ekstrakcije ispitana je i mogućnost primene čvrsto-tečne ekstrakcije uz SPE kolonu. Metoda je testirana primenom baznih i kiselih rastvora za ispiranje i eluiranje, kao i primenom različitih vrsta SPE kolona (Strata X-C, Phoenomenex i OASIS HLB, Waters), ali je dobijena vrednost za *recovery* bila ispod 50 %. Tokom testiranja SPE ekstrakcije, vezivanje ispitivane supstance za proteine plazme isključeno je dodavanjem 0,1 M rastvora ZnSO₄ sa ciljem povećanja prinosa, odnosno vrednosti za *recovery*, ali ni ovaj korak nije doveo do boljeg stepena ekstrakcije ispitivanih supstanci iz biološkog materijala.

Ispitana je i mogućnost primene metode tečno-tečne ekstrakcije (LLE). Upotrebljeni su različiti organski rastvarači: dietil etar, hloroform, acetonitril.

Nivo ekstrahovanih ispitivanih supstanci DE-EDCP i EDCP nije bio zadovoljavajući. Različita polarnost ispitivanih supstanci jedan je od razloga za navedeno. Pored toga LLE iziskuje i više vremena za izvođenje.

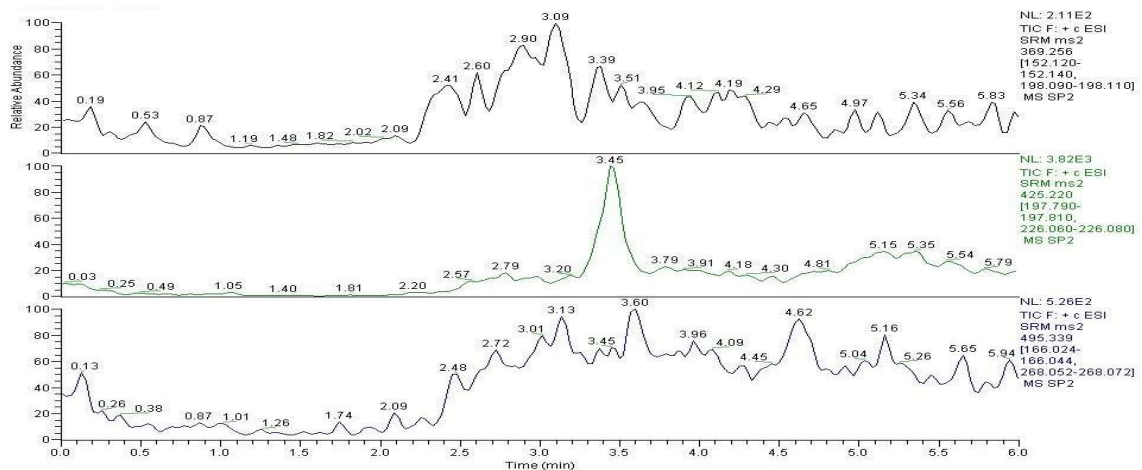
Odabrana metoda za ekstrakciju ispitivanih supstanci iz biološkog materijala je ekstrakcija precipitacijom proteina i to primenom pet zapremina acetonitrila (ACN) i ultracentrifugiranjem na niskoj temperaturi.⁸⁸ Vezivanje za proteine plazme eliminisano je optimizacijom dužine mešanja uzorka na *vortex*-mešalici. Određena je dužina mešanja u trajanju od 1 minuta. Produžetak ovog perioda rezultuje gubitkom linearnosti. Ispitana je mogućnost primene metanola umesto ACN zbog ekonomskih razloga, ali primenom ACN dobija se bolja vrednost za *recovery* i dobijeni supernatant je čistiji.

4.1.3 Validacija UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitičke metode

Razvijena bioanalitička metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivane supstance DE-EDCP i njenog metabolita EDCP iz seruma miša validirana je ispitivanjem sledećih validacionih parametara: selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost, limit kvantifikacije, *recovery*, efekat matriksa i stabilnost rastvora ispitivanih supstanci.

Selektivnost

Pokazana je visoka selektivnost metode. Na hromatogramima slepe probe dobijenim od 6 različitih praznih bioloških matriksa nisu pokazani pikovi endogenih supstanci na retencionim vremenima ispitivanih supstanci i internog standarda. Rastvor slepe probe sadržavao je sve komponente kao ispitivani rastvor osim analiziranih supstanci EDCP, DE-EDCP i DB-PDCP (IS). Hromatogram slepe probe prikazan je na slici 4.7.



Slika 4.7. Hromatogram slepe probe

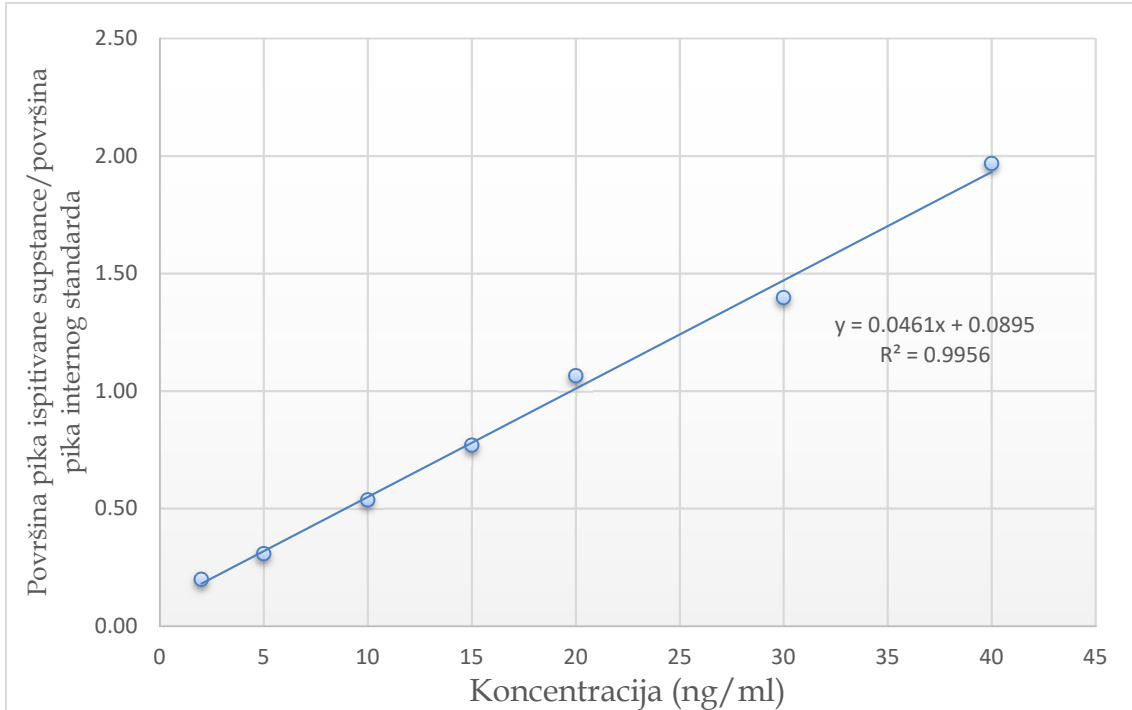
Linearnost kalibracione krive

Linearna zavisnost površine pika i deklarisanе koncentracije analita ispitana je u koncentracionom opsegu prikazanom u tabeli 4.4.

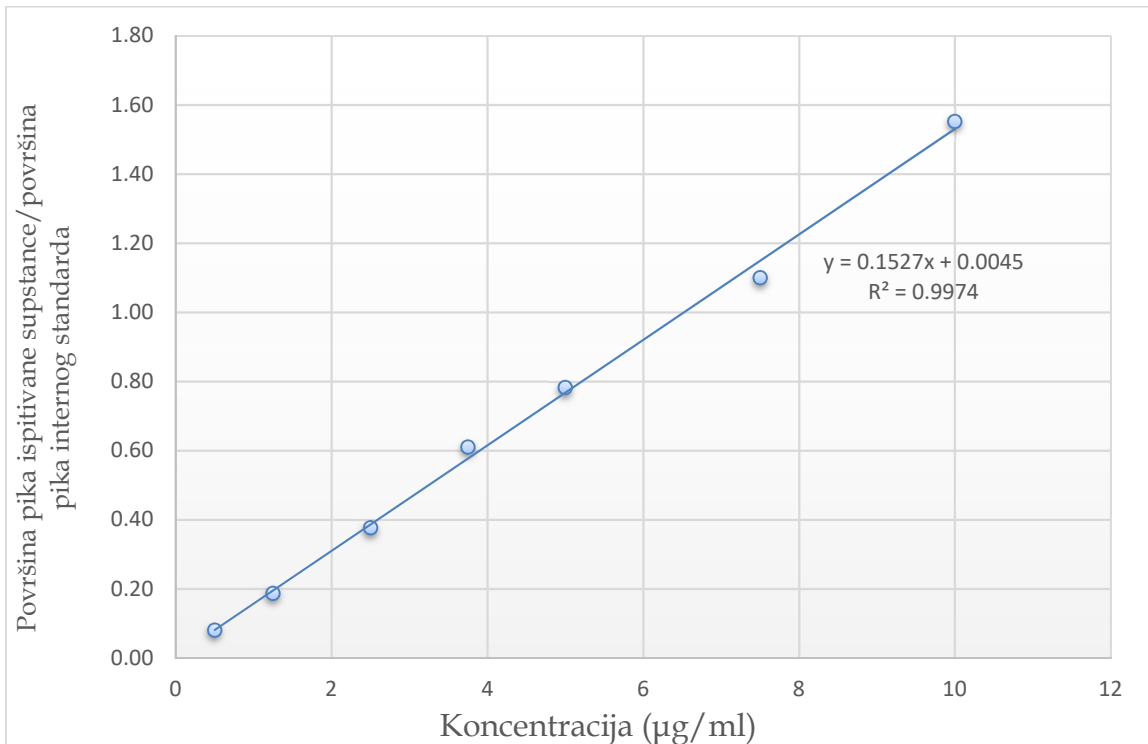
Tabela 4.4: Parametri linearnosti bioanalitičke metode

Parametri linearnosti	DE-EDCP	EDCP
Koncentracioni opseg	0,18 – 3,64 ng/ml	0,045 – 0,91 µg/ml
Jednačina linearne krive	$y=0,0461 \cdot x+0,0895$	$y=0,1527 \cdot x+0,0045$
Koeficijent korelacije	$r^2=0,9956$; $r=0,998$	$r^2=0,9974$; $r=0,999$

gde y predstavlja odnos površine pika ispitivane supstance i internog standarda, a x predstavlja deklarisanе koncentracije ispitivane supstance u serumu miša. Prikazan koeficijent korelacije (r) viši je od 0,99 na osnovu čega je pokazano da je UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitička metoda linearna u posmatranom koncentracionom opsegu.



Slika 4.8: Linearna regresiona jednačina i kriva za DE-EDCP



Slika 4.9: Linearna regresiona jednačina i kriva za EDCP

Tačnost i preciznost

Tabela 4.5 sadrži pregled vrednosti statističkih parametara kojima se ocenjuje tačnost i preciznost predložene UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitičke metode. Rezultati su dobijeni analizom kontrolnih uzoraka (QC) u 4 koncentracije i u 6 replikata. Koeficijent varijacije za ocenu preciznosti metode (%CV) i relativna greška za procenu tačnosti metode (%RE) kreću se u rasponu 3,5% - 16,0%, odnosno 1,8% - 14,4 %, na osnovu čega je zaključeno da predložena UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitička metoda ima zadovoljavajuću tačnost i preciznost.

Tabela 4.5: Preciznost (%CV) i tačnost (%RE) za DE-EDCP i EDCP

DE-EDCP				
Deklarisana koncentracija (ng/ml)	Izmerena koncentracija (ng/ml)	CV (%)	RE (%)	Recovery (%)
0,18 - LLOQ	0,17 ±0,6	15,99	3,0	90
0,45	0,51 ±1,0	13,68	12,6	97
1,36	1,44 ±0,4	2,25	6,3	92
2,73	2,78 ±1,1	3,49	1,8	99
EDCP				
Deklarisana koncentracija (µg/ml)	Izmerena koncentracija (µg/ml)	CV (%)	RE (%)	Recovery (%)
0,045 - LLOQ	0,054 ±0,1	5,58	6,1	76
0,11	0,11 ±0,1	4,43	-2,4	101
0,34	0,33 ±0,2	5,32	-3,2	98
0,41	0,35 ±0,3	4,01	-14,4	106

Recovery %

U tabeli 4.5. prikazane su vrednosti validacionog parametra *Recovery*, dobijene kvantitativnom analizom QC u sve 4 koncentracije. *Recovery* je u opsegu 90% - 99% za ispitivanu supstancu DE-EDCP, odnosno, u opsegu 76% - 106% za ispitivanu supstancu EDCP. Za interni standard vrednost *recovery*-a je 98%.

Donji limit kvantifikacije (LLOQ)

Donji limit kvantifikacije je najmanja koncentracija koju je predloženom UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitičkom metodom moguće kvantifikovati sa odgovarajućom tačnošću i preciznošću. Ujedno, LLOQ je i najniža tačka na kalibracionoj krivoj. Za ispitivanu supstancu DE-EDCP vrednost za LLOQ je 0,18 ng/ml, dok je za ispitivanu supstancu EDCP 0,045 µg/ml. Navedene koncentracije određene su sa tačnošću koja je unutar opsega ± 15 % i sa preciznošću od 16 % u odnosu na deklarisanu koncentraciju, što je prihvatljivo u odnosu na definisane granice važećim smernicama.

Uticaj matriksa

Za svaku ispitivanu supstancu i interni standard računa se faktor matriksa (MF) koji predstavlja odnos površine pikova dobijenih analizom matriksa, koji je podvrgnut postupku ekstrakcije pa tek onda opterećen ispitivanim supstancama u niskoj i visokoj koncentraciji i matriksa koji je bez prethodne obrade opterećen istim koncentracijama. Izračunat efekat matriksa kreće se u opsegu 95,5–108,2%. Iz navedenog je izveden zaključak da upotrebljeni i testirani biološki matriks – serum od miša ima zanemarljiv uticaj na supresiju jona ili na povećanje jona pod definisanim uslovima predložene UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitičke metode.

Stabilnost

Rezultati dobijeni analizom stabilnosti rastvora ispitivanih supstanci i rastvora internog standarda pokazuju sledeće:

- ⇒ Osnovni rastvori DE-EDCP, EDCP i IS u metanolu stabilni su na sobnoj temperaturi, na temperaturama 5°C i -20°C tokom 7 dana;
- ⇒ Radni rastvori DE-EDCP, EDCP i IS u metanolu stabilni su na sobnoj temperaturi, na temperaturama 5°C i -20°C tokom 3 dana;
- ⇒ Supernatanti DE-EDCP, EDCP i IS dobijeni opisanom metodom ekstrakcije iz biološkog materijala, stabilni su u *autosampler*-u tokom 24 sata na temperaturi od 4°C i svim koncentracijama kalibracionih rastvora.

Sagledavajući dobijene i prikazane rezultate, odnosno vrednosti ispitanih validacionih parametara, zaključeno je da je razvijena i validirana predložena bioanalitička metoda - hromatografija pod ultravisokim pritiskom u sprezi sa masenom spektrometrijom (UHPLC-ESI-MS/MS) primenjiva za pretklinička ispitivanja nosintetisanih supstanci, kao i za njihovu biofarmaceutsku karakterizaciju primenom *in vitro* metoda za određivanje parametara lipofilnosti, rastvorljivosti i permeabilnosti.

4.1.4 Međulaboratorijski transfer UHPLC-MS/MS metode

Praksa upućuje na potrebu ispitivanja međulaboratorijske ponovljivosti (reproducibilnosti) bioanalitičke metode. U velikom broju slučajeva, validirane i publikovane bioanalitičke metode ne mogu biti reprodukovane u drugoj laboratoriji. Ova činjenica predstavlja veliki problem, posebno uzimajući u obzir da se pretklinička i klinička ispitivanja izvode u više različitih centara, odnosno u različitim laboratorijama. Iz navedenih razloga potrebno je ispitati u sklopu validacije bioanalitičke metode koliko je metoda ponovljiva, kao i rezultati dobijeni njenom primenom. Ponovljivost treba ispitati u situacijama kada se promeni analitičar unutar iste laboratorije, kada se promeni oprema i laboratorija ili i jedno i drugo.

U ovoj doktorskoj disertaciji je pored razvoja i validacije predložene UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitičke metode izvršen i međulaboratorijski transfer, pri čemu je dokazana ponovljivost i robusnost. Transfer je izveden iz laboratorije u kojoj je metoda razvijena i validirana na *Thermo* sistemu od strane jednog analitičara (originalna ili *sender* laboratorija) u laboratoriju u kojoj se rade biohemijska ispitivanja i u kojoj je metoda ponovljena i validirana od strane drugog analitičara na *Agilent* sistemu (prijemna laboratorija) slika 4.10.

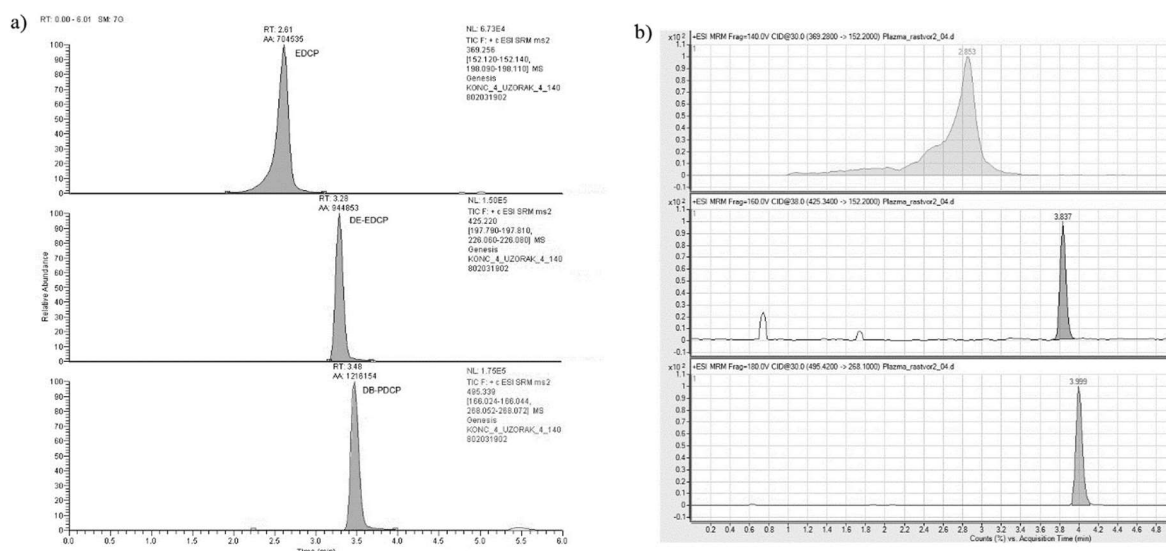


Slika 4.10: Slika originalne laboratorije (gornja) i prijemne laboratorije (donja)

Validacija prikazane UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitičke metode u prijemnoj laboratoriji urađena je pri hromatografskim uslovima i sa rastvorima koji su pripremljeni na opisan način, kao i u originalnoj laboratoriji. Detekcija fragmentnih jona vršena je primenom metode praćenja više reakcija (MRM) koristeći sledeće jonske tranzicije:

- ⇒ DE-EDCP: m/z 425,2 \rightarrow 197,8 i 226,1;
- ⇒ EDCP: m/z 369,3 \rightarrow 152,1 i 198,1;
- ⇒ DB-PDCP (IS): m/z 495,3 \rightarrow 166,0 i 268,1

Na dobijenim hromatogramima uočavaju se slična retencionna vremena ispitivanih supstanci i internog standarda na oba primenjena sistema i u obe laboratorije, kao i njihovo uspešno razdvajanje (slika 4.11)



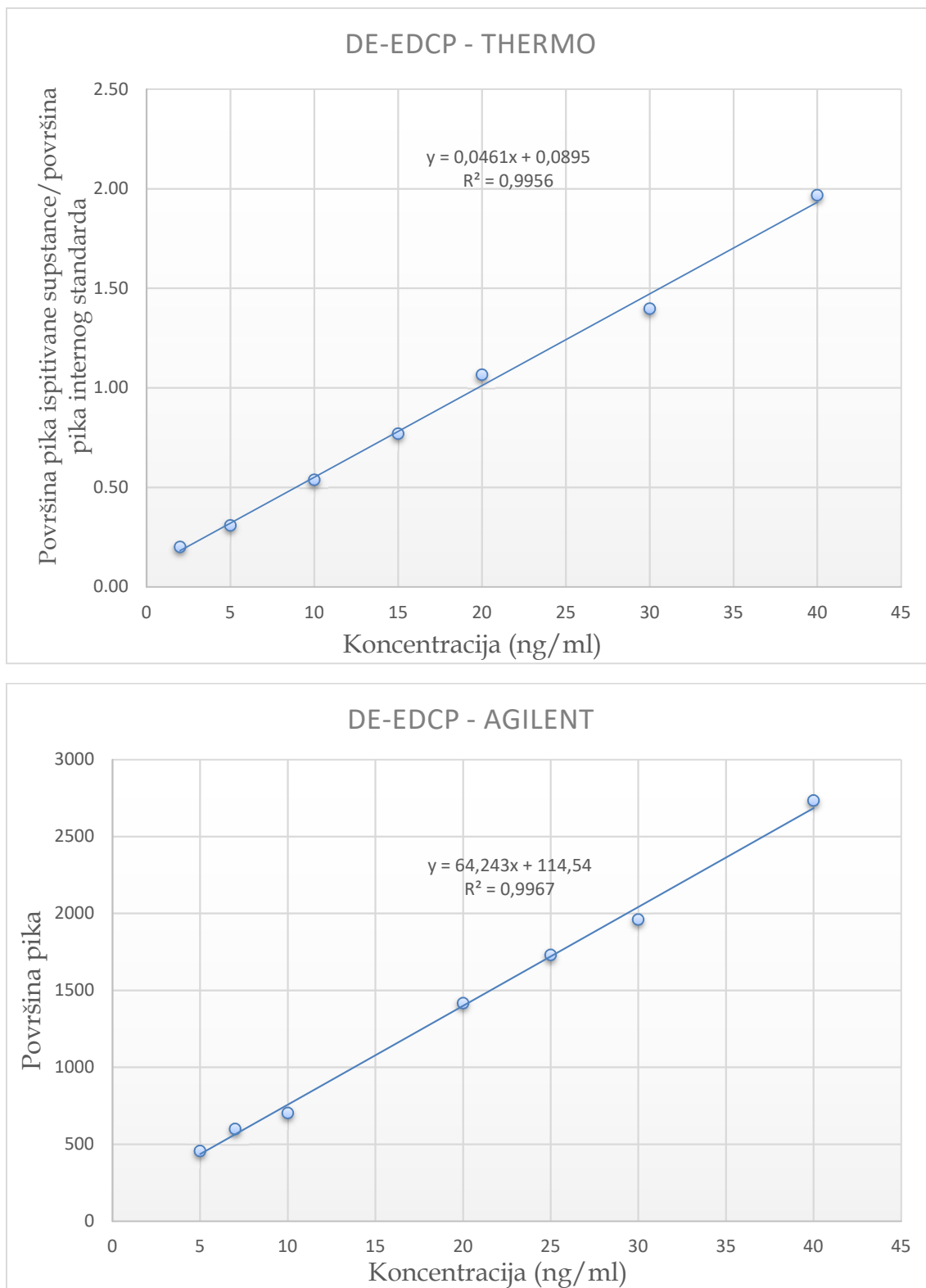
Slika 4.11: Paralelni prikaz hromatograma ispitivanih supstanci i internog standarda dobijenih na *Thermo* sistemu (levo) i *Agilent* sistemu (desno)

Ispitani su sledeći validacioni parametri: selektivnost, linearnost, donji limit kvantifikacije, *recovery* (%), uticaj matriksa, tačnost i preciznost. Uporedni prikaz vrednosti validacionih parametara dobijenih u originalnoj i prijemnoj laboratoriji dat je u tabeli 4.6, a dobijenih kalibracionih krivih na slikama 4.12a) za DE-EDCP i 4.12b) za EDCP.

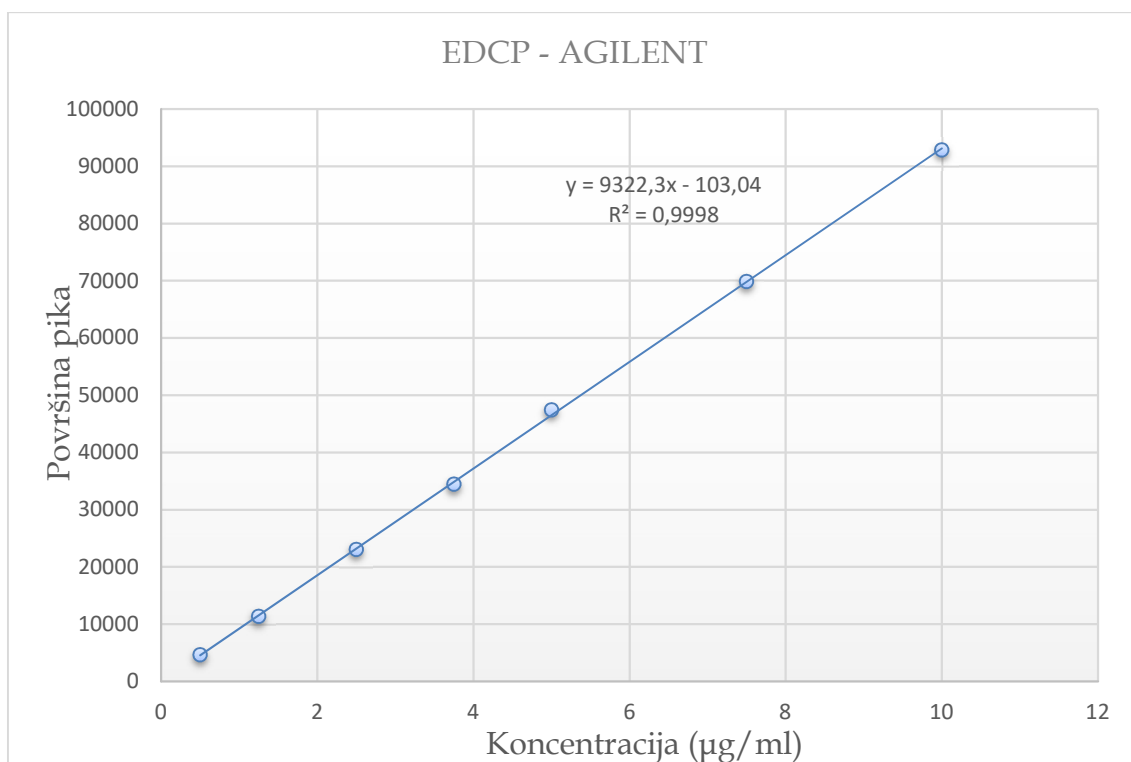
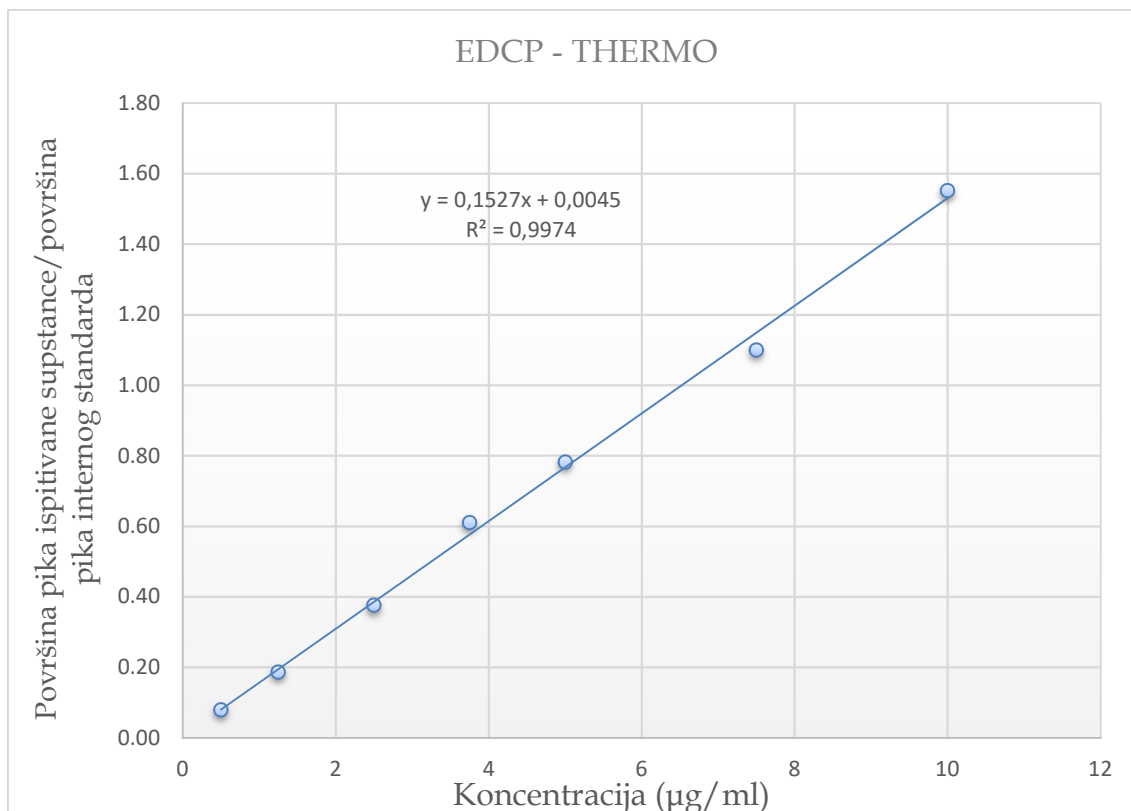
Tabela 4.6: Vrednosti validacionih parametara za DE-EDCP i EDCP dobijenih na *Thermo ACCELA* i na *Agilent 1290 UHPLC* sistemima

Validacioni parametar	Sending laboratory (<i>Thermo ACCELA</i>)		Receiving laboratory (<i>Agilent 1290 UHPLC</i> sistem)	
	DE-EDCP	EDCP	DE-EDCP	EDCP
Linearnost kalibracione krive	0,18 – 3,64 ng/ml $y^*=0,0461 \cdot x+0,0895$ $r=0,9978$	0,045 – 0,91 µg/ml $y^*=0,1527 \cdot x+0,0045$ $r=0,9987$	0,45 – 3,64 ng/ml $y^{**}=64,243 \cdot x+114,54$ $r=0,9983$	0,045 – 0,91 µg/ml $y^{**}=9322,3 \cdot x-103,4$ $r=0,9989$
LLOQ	0,18 ng/ml	0,045 µg/ml	0,45 ng/ml	0,045 µg/ml
Recovery %	90,0 – 99,3	75,8 – 100,3	91,0 – 99,8	77,8 – 101,5
Uticaj matriksa	95,5–108,2 %		96,7–109,4%	
Preciznost (%CV)	15,99	5,58	3,22	4,00
	13,68	4,43	3,36	2,05
	2,25	5,32	3,97	3,95
	3,49	4,01	1,87	2,00
Tačnost (%RE)	3,01	6,06	17,05	-9,93
	12,61	-2,41	11,50	-14,52
	6,30	-3,20	5,20	-13,13
	1,80	-14,40	1,73	-14,20

* y predstavlja odnos površina pikova analizirane supstance i internog standarda; ** y predstavlja površinu pika analizirane supstance



Slika 4.12a) Usporedni prikaz linearnosti kalibracione krive za DE-EDCP

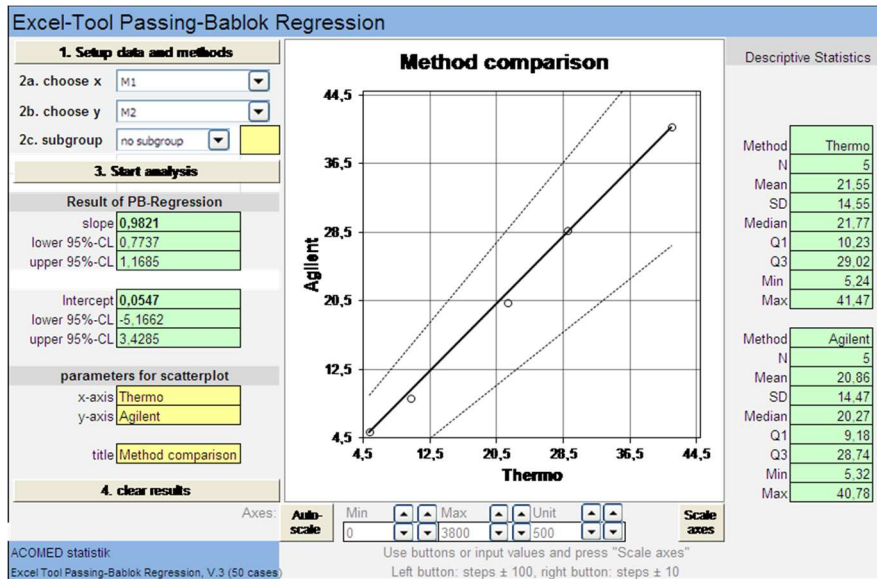
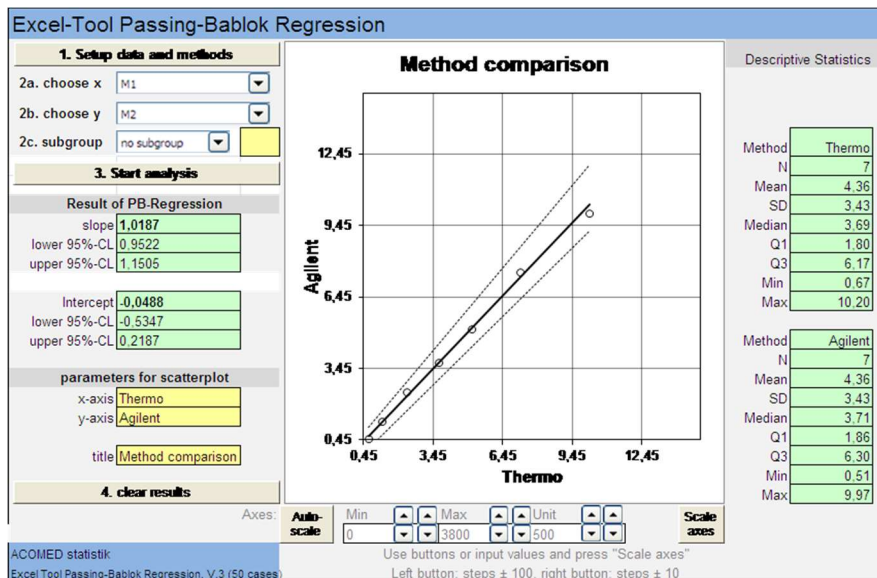


Slika 4.12b) Uporedni prikaz linearnosti kalibracione krive za EDCP

Ponovljivost je ocenjena na osnovu dobijenih vrednosti *cross*-validacionih parametara i vrednosti statističkih parametara *Passing and Bablok* regresione analize. *Cross*-validacioni uzorci analizirani su dodatno primenom *Passing and Bablok* regresione analize sa ciljem ocene stepena ponovljivosti i transferabilnosti rezultata kvalitativne i kvantitativne analize dobijenih na dva instrumenta i u dve laboratorije (tabela 4.7) i slike 4.13 i 4.14. Ocena ponovljivosti vrši se na osnovu vrednosti odsečka i vrednosti nagiba krive uz interval poverljivosti (CI). Interval poverljivosti (CI) od 95% za odsečak i za nagib objašnjavaju da li se njihove vrednosti razlikuju od 0 (za odsečak) i od 1 (za nagib) slučajno, dozvoljavajući zaključak o ponovljivosti (transferabilnosti) metode.

Tabela 4.7: Vrednosti statističkih parametara *Passing and Bablok* regresione analize

<i>Passing and Bablok</i> statistički parametar	Ispitivana supstanca	
	DE-EDCP	EDCP
Nagib	0,9821	1,0187
donji 95 %-CI	0,7737	0,9522
gornji 95 %-CI	1,1685	1,1505
Odsečak	0,0547	-0,0488
donji 95 %-CL	5,1662	-0,5347
gornji 95 %-CL	3,4285	0,2187

Slika 4.13: Prikaz ekrana - *Passing and Bablok* regresiona analiza za DE-EDCPSlika 4.14: Prikaz ekrana - *Passing and Bablok* regresiona analiza za EDCP

Prikazane dobijene vrednosti ispitanih *cross-validation*ih parametara i vrednosti statističkih parametara *Passing and Bablok* regresione analize pokazuju da je razvijena i validirana UHPLC-MS/MS bioanalitička metoda uspešno ponovljena u drugoj laboratoriji, sa drugim analitičarem i na drugom UHPLC-MS/MS sistemu. Metoda je ponovljiva i transferibilna, odnosno robusna i može se primenjivati u različitim laboratorijama i na različitim UHPLC-MS/MS sistemima tokom pretkliničkih i kliničkih ispitivanja.

4.2 RASTVORLJIVOST I LIPOFILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA

4.2.1 Rezultati ispitivanja rastvorljivosti

Rastvorljivost ispitivanih supstanci DE-EDCP i EDCP određena je u vodenim rastvorima sledećih pH vrednosti: 3, 5, 9 i 12, primenom razvijene i validirane metode (tabela 4.8).

Tabela 4.8: Eksperimentalno dobijene vrednosti za S i LogS za DE-EDCP i EDCP

DE-EDCP				
pH	Koncentracija zasićenog rastvora (mg/ml)	S (mol/l)	LogS	Zapremina rastvarača u ml po 1 g supstance
3	0,255	0,00051	-3,29243	3,9
5	0,021	0,000042	-4,37675	47,6
9	0,104	0,00021	-3,67778	9,6
12	0,023	0,000046	-4,33724	43,5
EDCP				
pH	Koncentracija zasićenog rastvora (mg/ml)	S (mol/l)	LogS	Zapremina rastvarača u ml po 1 g supstance
3	0,084	0,00019	-3,72125	11,9
5	0,041	0,000093	-4,03152	24,4
9	0,009	0,00002	-4,69897	111,1
12	0,425	0,00096	-3,01773	2,4

Na osnovu dobijenih vrednosti za obe ispitivane supstance iscrtane su 2 krive zavisnosti: kriva zavisnosti rastvorljivosti od pH vodenog rastvora i kriva zavisnosti LogS od pH vodenog rastvora.

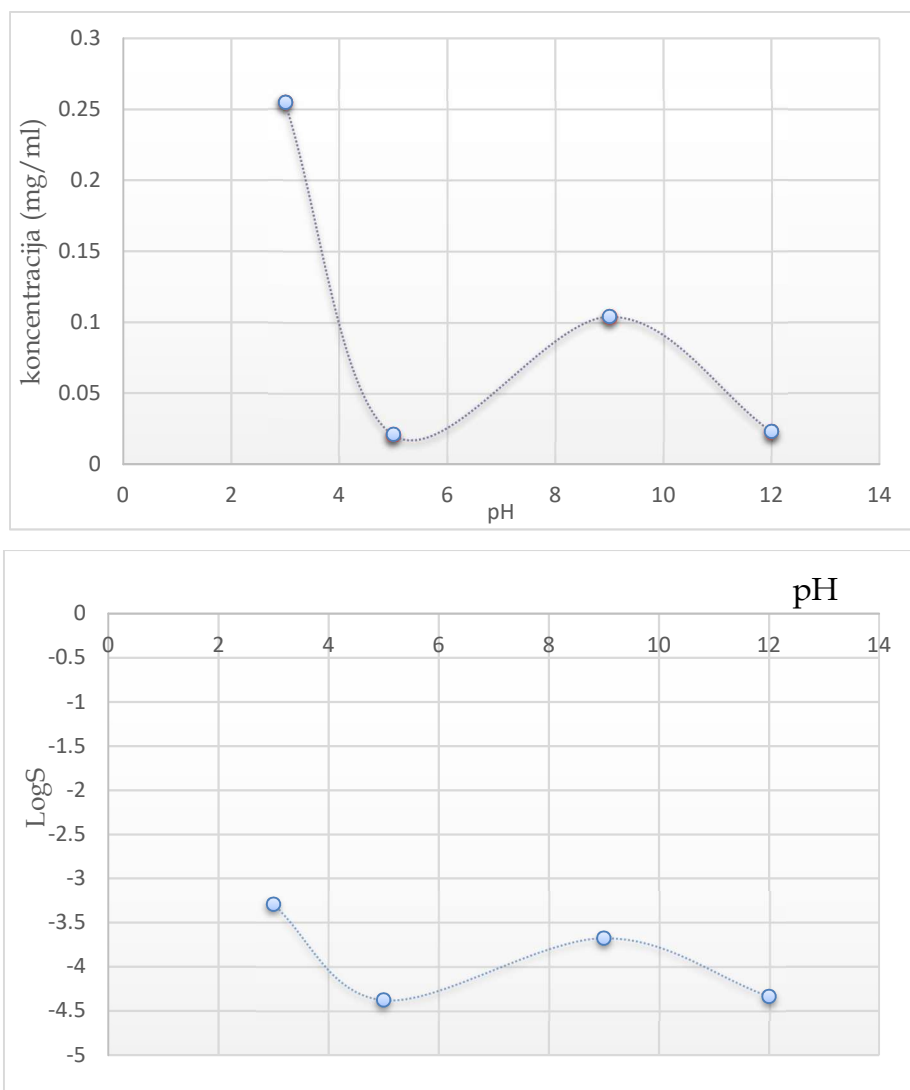
Dobijene krive upoređene su sa odgovarajućim krivama, koje su dobijene primenom računarskog programa *MarvinSketch*-a (slike 4.15 - 4.17).

Profil rastvorljivosti kiseline razlikuje se od profila rastvorljivosti estera. Kiselina (EDCP) zbog prisustva slobodnih karboksilnih grupa i sekundarnih amina pokazuje različitu krivu zavisnosti rastvorljivosti od pH vodenog rastvora, nego što je to kod ispitivane supstance DE-EDCP kod koje su estarskim vezama blokirane karboksilne grupe.

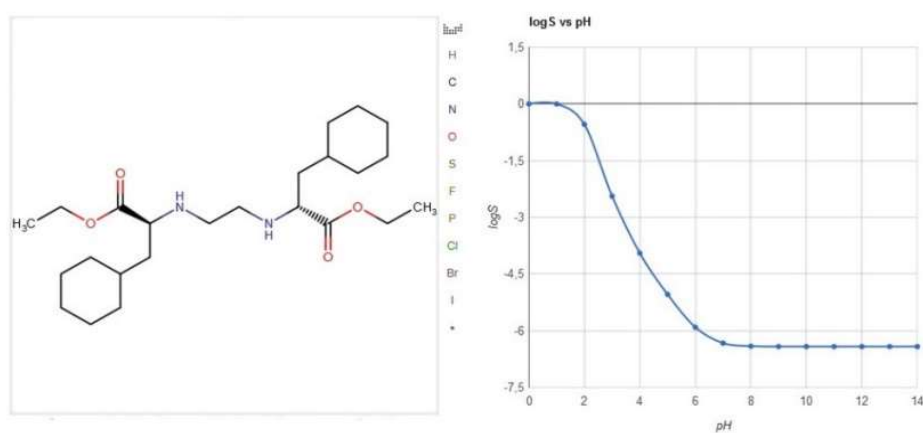
Kiselina pokazuje najbolju rastvorljivost u izrazito baznoj sredini (slika 4.17). U izrazito kiseloj sredini pokazuje zadovoljavajuću rastvorljivost, a najslabiju rastvorljivost kiselina pokazuje u vodenoj sredini čiji je pH=7-9.

Za razliku od kiseline, DE-EDCP sa estarskim funkcionalnim grupama i sekundarnim aminima ima drugačiji profil rastvorljivosti. Najbolju rastvorljivost pokazuje u izrazito kiseloj sredini, zadovoljavajuću rastvorljivost pokazuje u vodenom rastvoru čiji je pH ≈ 9 , a slabu rastvorljivost u vodenom rastvoru pH=4-6 i u izrazito baznoj sredini (slika 4.15).

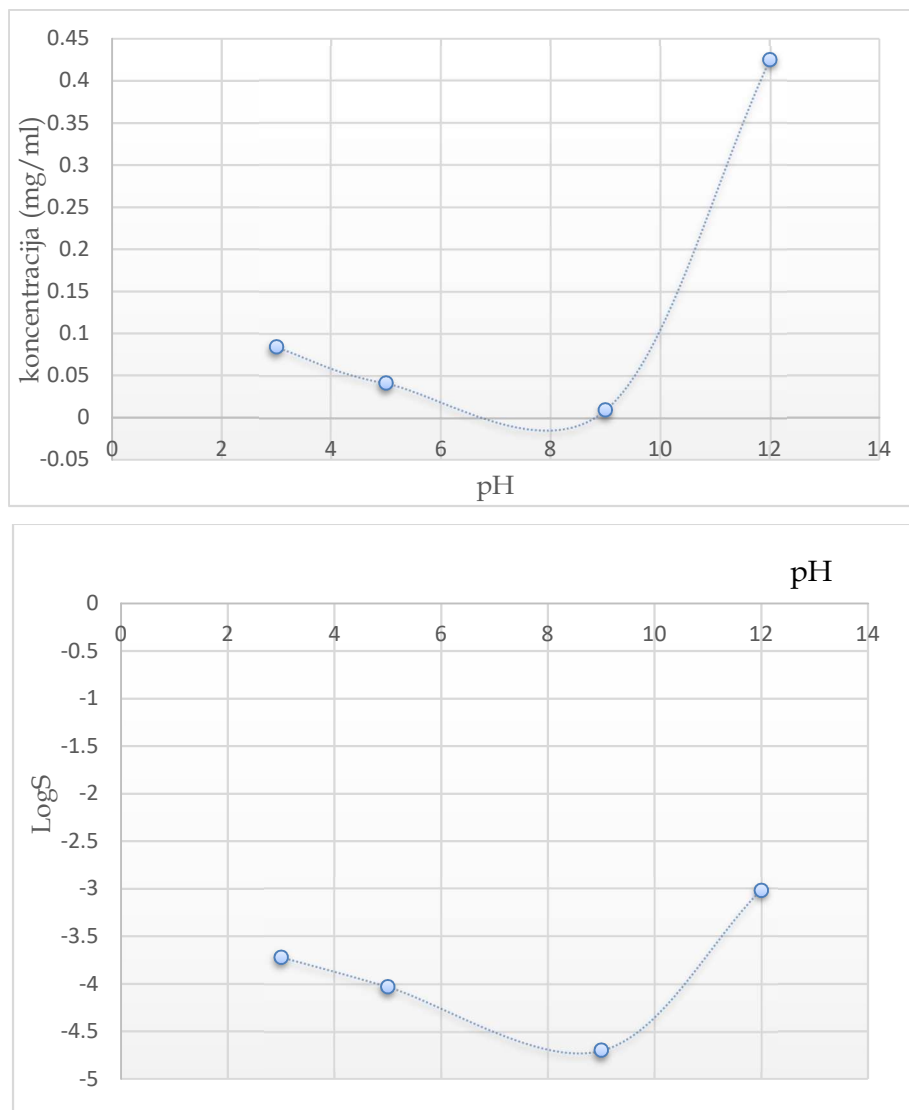
Prema Lemke-ovom pravilu navedenom u poglavlju 1.4.1. ispitivane supstance zadovoljavaju uslov da budu rastvorljive u vodi, jer je kod svih broj potencijalnih vodoničnih veza veći od broja ugljenikovih atoma.



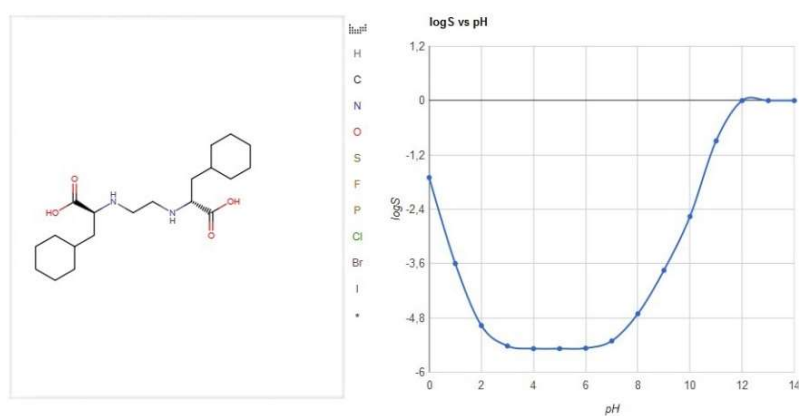
Slika 4.15: Kriva zavisnosti S od pH (gornja) i LogS od pH (donja) dobijena na osnovu eksperimentalnih rezultata za DE-EDCP



Slika 4.16: Kriva zavisnosti LogS od pH dobijena *MarvinSketch*-om za DE-EDCP

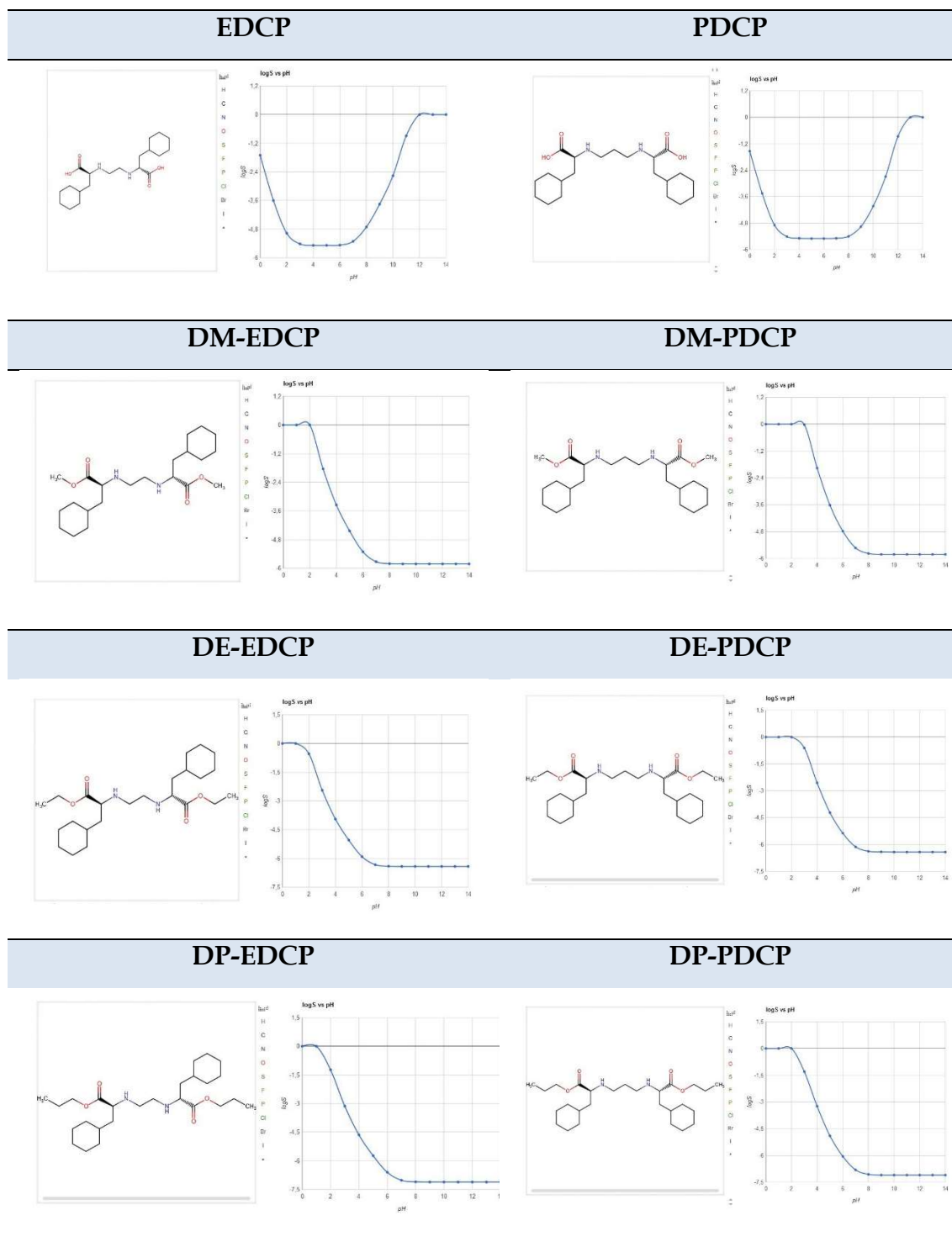


Slika 4.17: Kriva zavisnosti S od pH (gornja) i LogS od pH (donja) dobijena na osnovu eksperimentalnih rezultata za EDCP

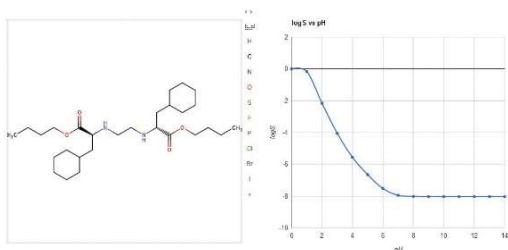


Slika 4.18: Kriva zavisnosti LogS od pH dobijena MarvinSketch-om za EDCP

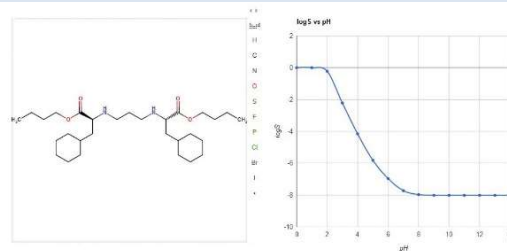
Tabela 4.9: : Kriva zavisnosti LogS od pH dobijena MarvinSketch-om



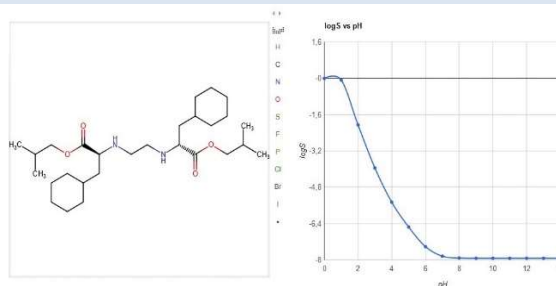
DB-EDCP



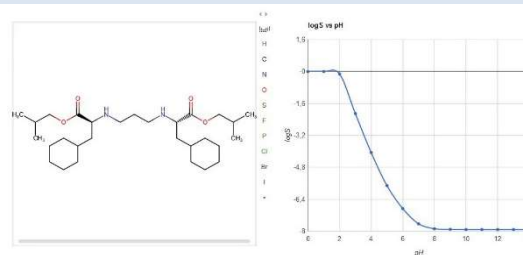
DB-PDCP



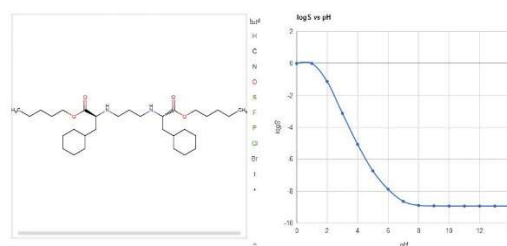
DIB-EDCP



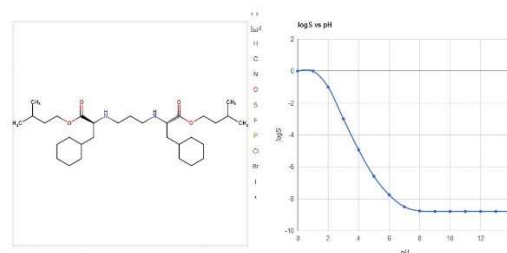
DIB-PDCP



DPE-PDCP



DIPE-PDCP



Na osnovu prikazanih rezultata (tabela 4.9) uočava se da kiseline (EDCP i PDCP) imaju slične profile rastvorljivosti. Ujedno i svi prikazani estri imaju slične profile rastvorljivosti. Profili pH zavisne rastvorljivosti dobijeni eksperimentalno i *in silico* su upoređeni i pokazana je zadovoljavajuća podudarnost. Najveća rastvorljivost kiselina se postiže u izrazito baznoj i izrazito kiseloj sredini, dok je rastvorljivost estara povećana u izrazito kiseloj sredini.

4.2.2 Rezultati ispitivanja lipofilnosti

Nakon razvoja i validacije bioanalitičke metode u daljim istraživanjima prešlo se na fizičko-hemijsku karakterizaciju svih 14 novosintetisanih supstanci, za koje je u prethodnim istraživanjima pokazana antiproliferativna aktivnost.

U sklopu ovog poglavlja prikazani su rezultati ispitivanja lipofilnosti primenom *shake-flask* metode i primenom hromatografske metode. Ustanovljena je zavisnost između vrednosti particionog koeficijenta ($\log D_{7,4}$) dobijenih primenom *shake-flask* metode i hromatografskih parametara (CHI , φ_0) dobijenih UHPLC-MS metodom, kao i zavisnost između $\log D_{7,4}$ i retencionog vremena. Razvijen je matematički model kojim se mogu predvideti vrednosti particionog koeficijenta ($\log D_{7,4}$) za potencijalne metabolite ispitivanih supstanci ili za novosintetisane supstance iz kategorije derivata (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline.

U skladu sa preporukama *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 107 and Test No. 117*, *shake-flask* metoda je adekvatan izbor za određivanje lipofilnosti jedinjenja čiji particioni koeficijent *n*-oktanol/voda ima vrednosti u rasponu od -2 do 4, dok se HPLC metoda može primeniti za određivanje lipofilnosti jedinjenja čiji particioni koeficijent *n*-oktanol/voda ima vrednosti u rasponu od 0 do 6.¹²⁰

4.2.2.1 Vrednosti particionog koeficijenta ($\log D_{7,4}$) dobijene primenom *shake-flask* metode

Vrednosti particionog koeficijenta $\log D_{7,4}$ ispitivanih supstanci određene su primenom *shake-flask* metode. Metoda je izvedena u skladu sa OECD smernicama.¹²⁰ Polarnu fazu, odnosno vodenu fazu predstavljao je 0,1 M rastvor natrijum-fosfatnog pufera pH=7,4. Nepolarnu fazu, odnosno organsku fazu predstavljao je organski rastvarač *n*-oktanol. Svaka od ispitivanih supstanci rastvarana je u vodenoj fazi do postizanja zasićenog rastvora. Potom je u

staklenoj viali izmešan 1 ml zasićenog vodenog rastvora ispitivane supstance sa 1 ml *n*-oktanola i postupano je na način opisan u poglavlju 3.3.1.1.

Nakon sprovedenog postupka, kvantitativna analiza ispitivanih supstanci u polarnoj i nepolarnoj fazi sistema, urađena je primenom razvijene i validirane UHPLC/MS-MS metode. Dobijene vrednosti particionog koeficijenta ($\text{Log}D_{7,4}$) kreću se u rasponu 0,03 – 3,40 (tabela 4.10) i pokazuju da lipofilnost supstanci raste sa produžavanjem alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama. Ujedno, vrednosti za $\text{Log}D_{7,4}$ kod derivata 1,3-propandiamina veće su u odnosu na odgovarajuće analoge 1,2-etandiamina zbog 1C atoma više u diaminskom mostu.

Tabela 4.10: Vrednost paricionog koeficijenta *n*-oktanol-voda određen *shake-flask* metodom ($\text{log}D_{7,4}$)

Ispitivana supstanca	$\text{Log}D_{7,4}$ (<i>shake-flask</i>)
EDCP	0,03
DM-EDCP	1,32
DE-EDCP	1,68
DP-EDCP	1,77
DB-EDCP	1,80
DIB-EDCP	2,95
PDCP	0,57
DM-PDCP	1,93
DE-PDCP	2,90
DP-PDCP	3,00
DB-PDCP	3,04
DIB-PDCP	3,15
DPE-PDCP	3,29
DIPE-PDCP	3,40

4.2.2.2 Vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti dobijene primenom UHPLC-MS metode

Za određivanje hromatografskih parametara lipofilnosti primenjena je metoda izokratskog eluiranja i metoda gradijentnog eluiranja.

4.2.2.2.1 Vrednosti hromatografskog parametra $\log k$ dobijene metodom izokratskog eluiranja

Primenom metode izokratskog eluiranja izračunava se retencioni faktor k ($\log k$). Naziv retencioni proizilazi iz činjenice da se navedeni parametar izračunava na osnovu dobijenog retencionog vremena ispitivane supstance u primenjenim hromatografskim uslovima (t_R) i retencionog vremena mobilne faze (t_0) na osnovu jednačine 2 iz poglavlja 1.4.2.

Vrednosti retencionog faktora ($\log k$) za svaku od 14 ispitivanih supstanci izračunate su na osnovu retencionih vremena dobijenih primenom 6 različitih sastava mobilne faze:

⇒ pufer A:pufer B = 10:90; 20:80; 30:70; 35:65; 40:60 i 50:50 (v/v).

Rastvori derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina injektovani su u triplikatu za svaki od navedenih sastava mobilne faze. Vrednost retencionog vremena za svaku od ispitivanih supstanci i za svaki od sastava mobilne faze dobijena je kao prosečna vrednost iz tri merenja.

Vrednost retencionog parametra $\log k_w$ dobijena je ekstrapolacijom linearne krive. Kriva predstavlja zavisnosti između $\log k$ i procentualne zastupljenosti organske faze (metanola) u sastavu mobilne faze (slika 4.19).

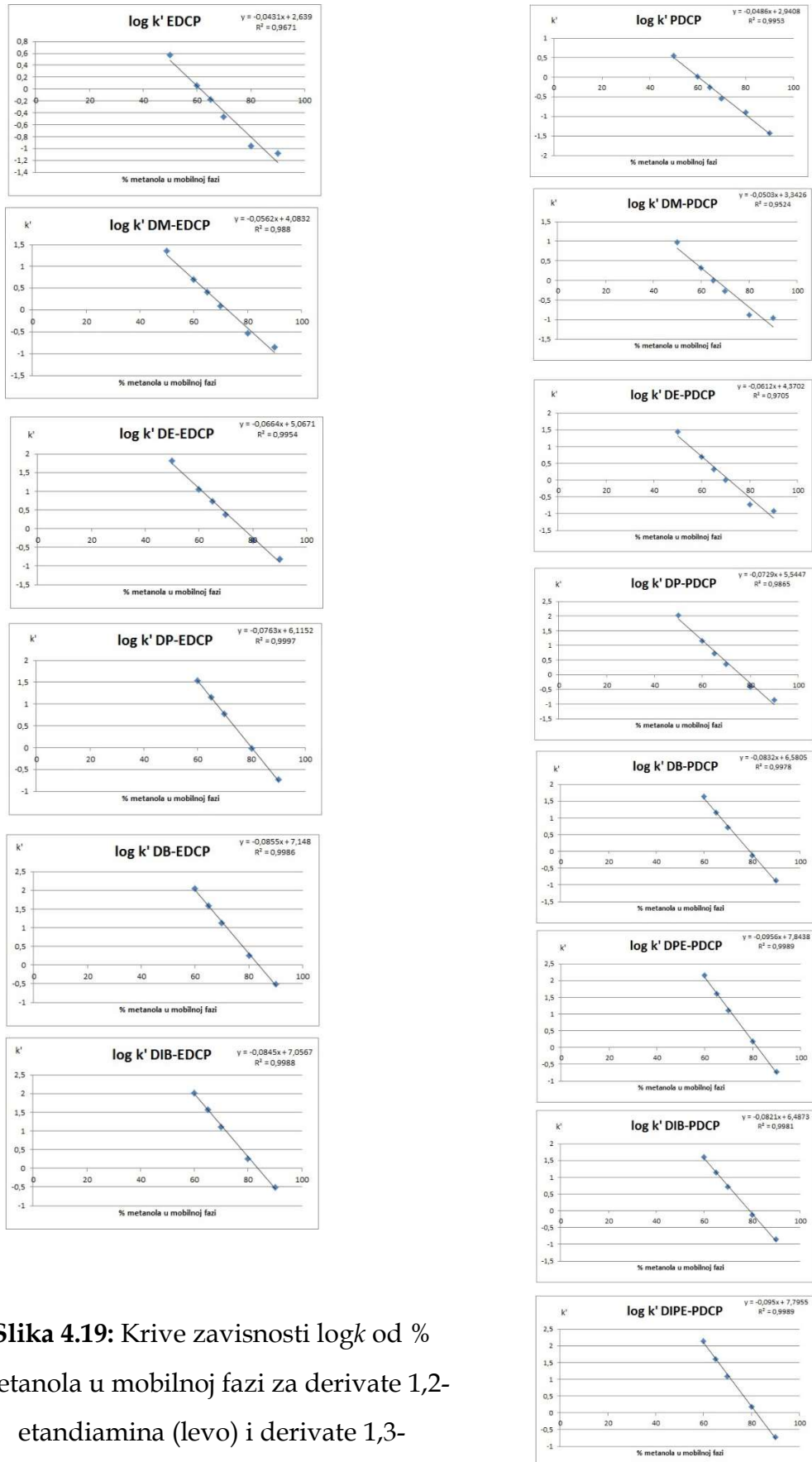
Ispitivane supstance: DP-EDCP, DB-EDCP, DIB-EDCP, DB-PDCP, DPE-PDCP, DIB-PDCP i DIPE-PDCP izuzete su iz merenja retencionog vremena u uslovima kada je % metanola u mobilnoj fazi bio 50 % iz razloga što je dužina *run*-a bila više od 150 minuta.

Tabela 4.11: Vrednosti retencionih vremena ispitivanih supstanci derivata 1,2-etandiamina metodom izokratskog eluiranja

% metanola u mobilnoj fazi	Retenciono vreme t_R (min)					
	DE-		DB-		DIB-	
	EDCP	DM-EDCP	EDCP	DP-EDCP	EDCP	EDCP
90%	1,17	1,23	1,24	1,28	1,42	1,42
80%	1,20	1,40	1,61	2,12	3,07	3,07
70%	1,45	2,41	3,60	6,98	15,52	14,96
65%	1,79	3,89	6,91	16,32	43,22	41,32
60%	2,33	6,51	13,54	38,41	121,35	114,25
50%	5,07	25,49	72,16			

Tabela 4.12: Vrednosti retencionih vremena ispitivanih supstanci derivata 1,3-propandiamina metodom izokratskog eluiranja

% metanola u mobilnoj fazi	Retenciono vreme t_R (min)							
	PDCP	DM- PDCP	DE- PDCP	DP- PDCP	DB- PDCP	DPE- PDCP	DIB- PDCP	DIPE- PDCP
90%	1,12	1,2	1,21	1,23	1,23	1,28	1,23	1,28
80%	1,22	1,22	1,29	1,50	1,89	2,71	1,89	2,71
70%	1,39	1,64	2,16	3,51	6,78	15,15	6,57	14,48
65%	1,69	2,17	3,40	6,93	16,74	45,40	15,96	45,19
60%	2,22	3,33	6,37	16,25	47,93	156,53	45,36	151,45
50%	4,94	11,17	31,56	117,95				

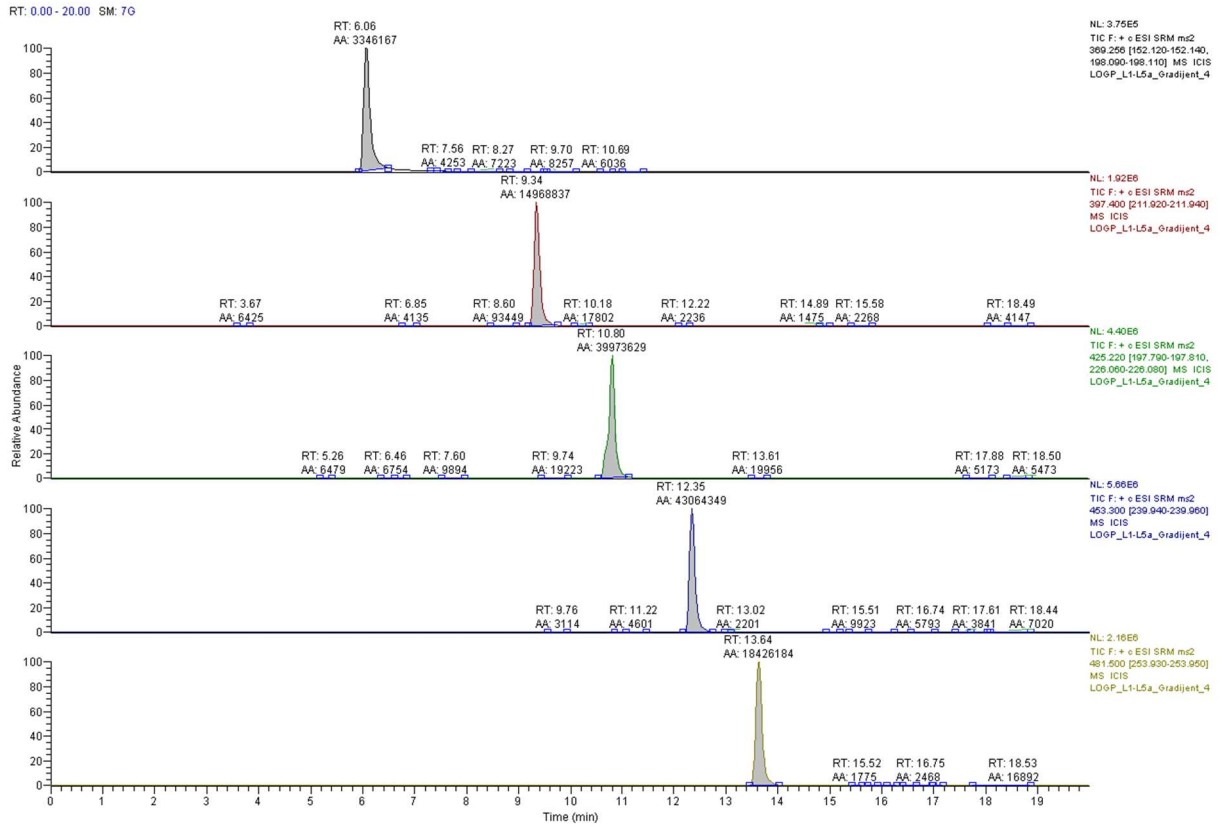


Slika 4.19: Krive zavisnosti $\log k'$ od % metanola u mobilnoj fazi za derivate 1,2-etandiamina (levo) i derivate 1,3-propandiamina (desno)

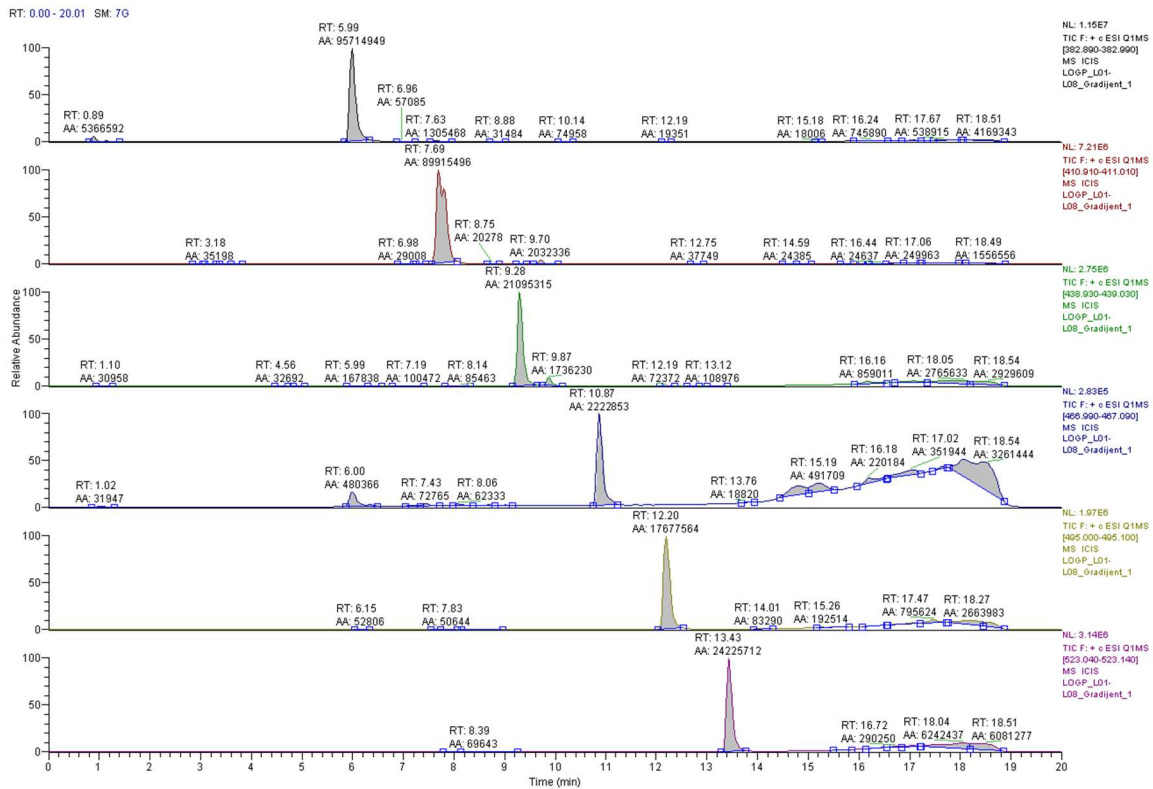
4.2.2.2.2 Vrednosti hromatografskog parametra CHI dobijene metodom gradijentnog eluiranja

Metodu gradijentnog eluiranja karakteriše gradijent mobilne faze koji je unapred definisan na način da % organske faze (metanola, odnosno pufera B) linearno raste od 5 % do 95 % tokom prvih 15 minuta, a onda da se linearno smanjuje do 40 % metanola u periodu od 17,20 min do 20 min. Ukupno vreme *run*-a je 20 minuta uključujući i vreme za re-ekvilibraciju kolone.

Od podataka dobijenih primenom metode izokrastkog eluiranja izračunate su vrednosti za hromatografski parametar φ_0 . Indeks hidrofobnosti (CHI) izračunat je na osnovu vrednosti retencionog vremena ispitivanih supstanci dobijenih primenom metode gradijentnog eluiranja (Slika 4.20 i 4.21).

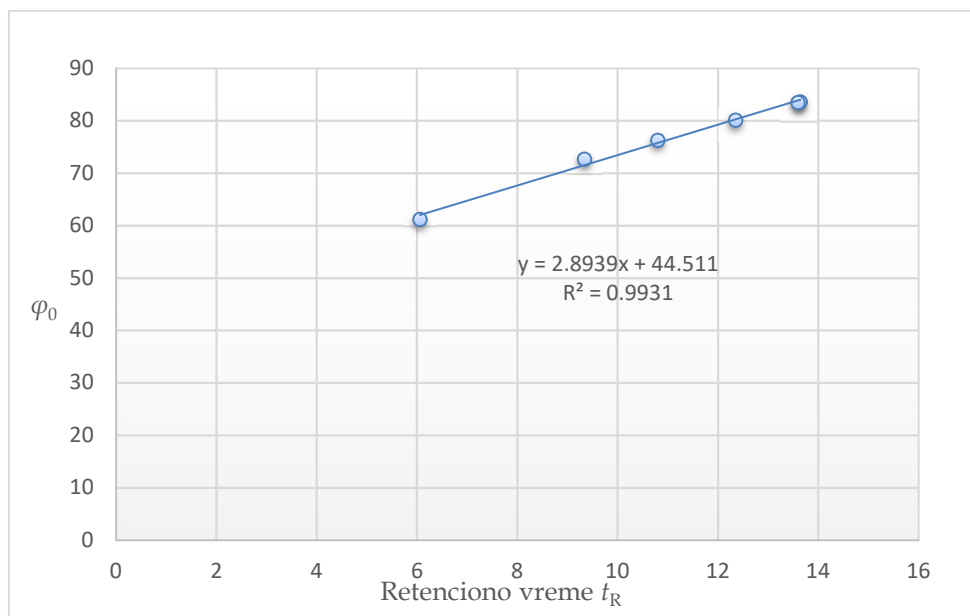


Slika 4.20: Hromatogram derivata 1,2-etandiamina (gradijent)

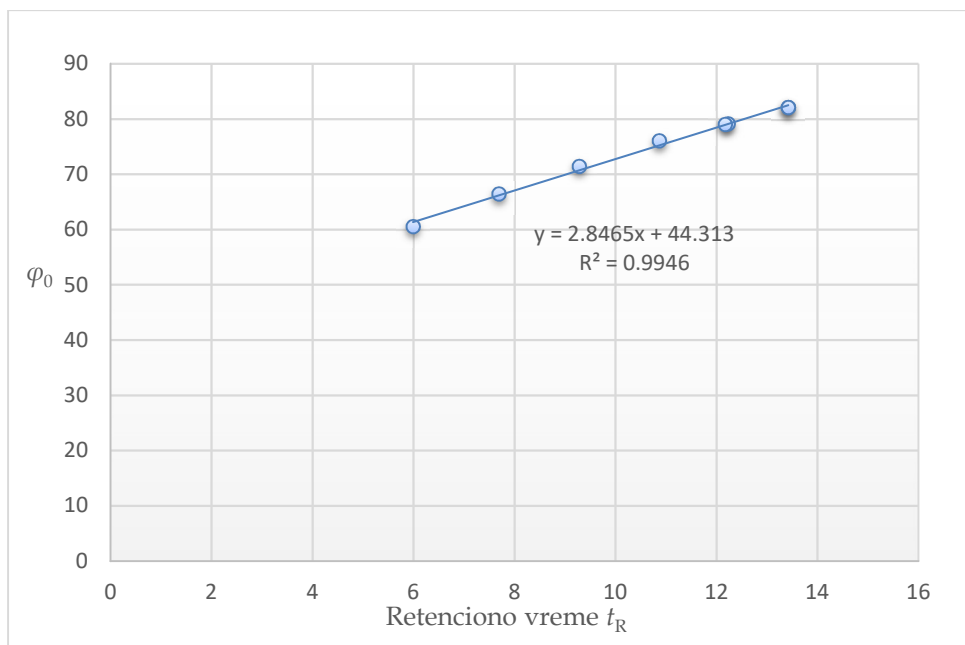


Slika 4.21: Hromatogram derivata 1,3-propandiamina (gradijent)

Značajna korelacija postignuta je između vrednosti retencionog vremena (t_R) i vrednosti hromatografskog parametra φ_0 za sve ispitivane supstance (slika 4.22 i 4.23). Na osnovu dobijenih krivi zavisnosti za svaku ispitivanu supstancu izračunat je indeks hidrofobnosti (CHI) (jednačina 4, poglavlje 1.4.2).



Slika 4.22: Linearna zavisnot φ_0 od t_R za derivate 1,2-etandiamina



Slika 4.23: Linearna zavisnot φ_0 od t_R za derivate 1,3-propandiamina

Retenciono vreme ispitivanih supstanci DP-EDCP, DB-EDCP, DIB-EDCP, DB-PDCP, DPE-PDCP, DIB-PDCP i DIPE-PDCP imalo je vrednosti preko 120 minuta, odnosno 150 minuta kada je pri opisanim uslovima gradijentnog eluiranja učešće metanola u mobilnoj fazi bilo 50 %. Za njih je $\log k$ izračunat na osnovu učešća metanola u mobilnoj fazi od 60 %, 65 %, 70 %, 80 % i 90 %.

Hromatografski parametri lipofilnosti ispitivanih supstanci $\log k$ (izokratsko eluiranje), $\log k_w$, φ_0 i CHI (gradijentno eluiranje) dobijeni primenom UHPLC-MS metode dati su u tabeli 4.13.

Tabela 4.13: Pregled hromatografskih parametara lipofilnosti ispitivanih supstanci

Supstanca	$y=a \cdot x + b$	Metoda izokraskog eluiranja				Metoda gradijentnog eluiranja	
	$y=\log k; x=\varphi^{***}$	$\log k_w^{*****}$	-s	r^2	φ_0	t_R	CHI
EDCP	$Y=-0,0431 \cdot x+2,639$	2,64	0,04	0,9671	61,23	6,06	61,73
DM-EDCP	$Y=-0,0562 \cdot x+4,0832$	4,08	0,06	0,9880	72,65	9,34	71,16
DE-EDCP	$Y=-0,0664 \cdot x+5,0671$	5,07	0,07	0,9954	76,31	10,80	75,37
DP-EDCP	$Y=-0,0763 \cdot x+6,152$	6,12	0,08	0,9997	80,15	12,35	79,82
DB-EDCP	$Y=-0,0855 \cdot x+7,148$	7,15	0,09	0,9986	83,60	13,64	83,53
DIB-EDCP	$Y=-0,0845 \cdot x+7,0567$	7,06	0,08	0,9988	83,51	13,60	83,42
PDCP	$Y=-0,0486 \cdot x+2,9408$	2,94	0,05	0,9953	60,51	5,99	61,53
DM-PDCP	$Y=-0,0503 \cdot x+3,3426$	3,34	0,05	0,9524	66,45	7,69	66,42
DE-PDCP	$Y=-0,0612 \cdot x+4,3702$	4,37	0,06	0,9705	71,41	9,28	70,99
DP-PDCP	$Y=-0,0729 \cdot x+5,5447$	5,54	0,07	0,9865	76,06	10,87	75,56
DB-PDCP	$Y=-0,0832 \cdot x+6,5805$	6,58	0,08	0,9978	79,09	12,23	79,48
DIB-PDCP	$Y=-0,0821 \cdot x+6,4873$	6,49	0,08	0,9981	79,02	12,17	79,30
DPE-PDCP	$Y=-0,0956 \cdot x+7,8438$	7,84	0,10	0,9989	82,05	13,42	82,90
DIPE-PDCP	$Y=-0,095 \cdot x+7,7955$	7,80	0,10	0,9989	82,06	13,42	82,90

*** φ =koncentracija organske faze u mobilnoj fazi (vol %); a=nagib (-s); b=odsečak (logkw)

*****logk izračunat je na osnovu retencionog vremena ispitivane supstance i retencionog vremena mobilne faze (jednačina 2, poglavlje 1.4.2)

U tabeli 4.14. dat je prikaz vrednosti particionog koeficijenta (LogP) izračunatog na osnovu hromatografskog parametra φ_0 i prema jednačini 5 iz poglavlja 1.4.2. Vrednosti particionog koeficijenta za ispitivane supstance, dobijenog *shake-flask* metodom ($\text{Log}D_{7,4}$) upoređene su sa vrednostima particionog koeficijenta dobijenog na osnovu hromatografskog parametra lipofilnosti (LogP). U tabeli 4.14 pokazana je pomenuta razlika.

Tabela 4.14: Vrednost particionog koeficijenta *n*-oktanol-voda određen *shake-flask* metodom ($\text{Log}D_{7,4}$) i vrednost LogP izračunata na osnovu hromatografskih parametara

Supstanca	$\text{Log}D_{7,4}$ (<i>shake-flask</i>)	LogP	Razlika $\text{Log}D_{7,4} - \text{LogP}$
EDCP	0,03	1,48	-1,45
DM-EDCP	1,32	2,36	-1,04
DE-EDCP	1,68	2,64	-0,96
DP-EDCP	1,77	2,93	-1,16
DB-EDCP	1,80	3,20	-1,4
DIB-EDCP	2,95	3,19	-0,24
PDCP	0,57	1,50	-0,93
DM-PDCP	1,93	1,88	0,05
DE-PDCP	2,90	2,26	0,64
DP-PDCP	3,00	2,62	0,38
DB-PDCP	3,04	2,85	0,19
DIB-PDCP	3,15	2,85	0,3
DPE-PDCP	3,29	3,08	0,21
DIPE-PDCP	3,40	3,08	0,32

U reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji raspodela supstance između stacionarne faze (nepolarne) i mobilne faze (polarne) zavisi od hidrofobnosti supstance, kao i njenog kapaciteta za ostvarivanjem interakcija sa funkcionalnim grupama stacionarne faze.

Za derivate 1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline razlika ima negativni predznak, odnosno, vrednosti za LogP više su od vrednosti za $\text{Log}D_{7,4}$. Ova razlika je najdominatnija kod neesterifikovanog derivata 1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (EDCP), ali je primetna i kod neesterifikovanog derivata 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (PDCP). Više vrednosti za LogP ukazuju na duže zadržavanje ispitivanih supstanci na stacionarnoj fazi reverzno-fazne hromatografije, odnosno na duže retenciono vreme. Razlog za navedeno može biti veći broj interakcija koje se ostvaruju između 1,2-etandiaminskih derivata i silanolnih grupa stacionarne faze, u poređenju sa brojem interakcija koje ostvaruju derivati 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline, osim PDCP-a. Zbog većeg broja interakcija sa silanolnim grupama stacionarne faze ispitivane supstance se duže zadržavaju na koloni i retenciono vreme im je duže.

Razlika između vrednosti $\text{Log}D_{7,4}$ i LogP za derivate 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline je pozitivna, osim za supstancu PDCP. Ovo ukazuje da ispitivane supstance koje su derivati 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline ostvaruju manji broj interakcija sa stacionarnom fazom, na njoj se kraće zadržavaju i imaju kraće retenciono vreme.

Razlog manjeg broja interakcija sa stacionarnom fazom može biti sterne prirode, jer se 1,2-etandiaminski derivati od 1,3-propandiaminskih derivata razlikuju samo u broju ugljenikovih atoma između dve amino grupe. Derivati 1,3-propandiamina su viši homolozi 1,2-etandiamina. Može se pretpostaviti da upravo rastojanje između dve amino grupe utiče na broj interakcija ispitivanih jedinjenja sa funkcionalnim grupama stacionarne faze.

Kada je u pitanju apsolutna vrednost razlike $\text{Log}D_{7,4} - \text{LogP}$ ista je niža kod derivata 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline.

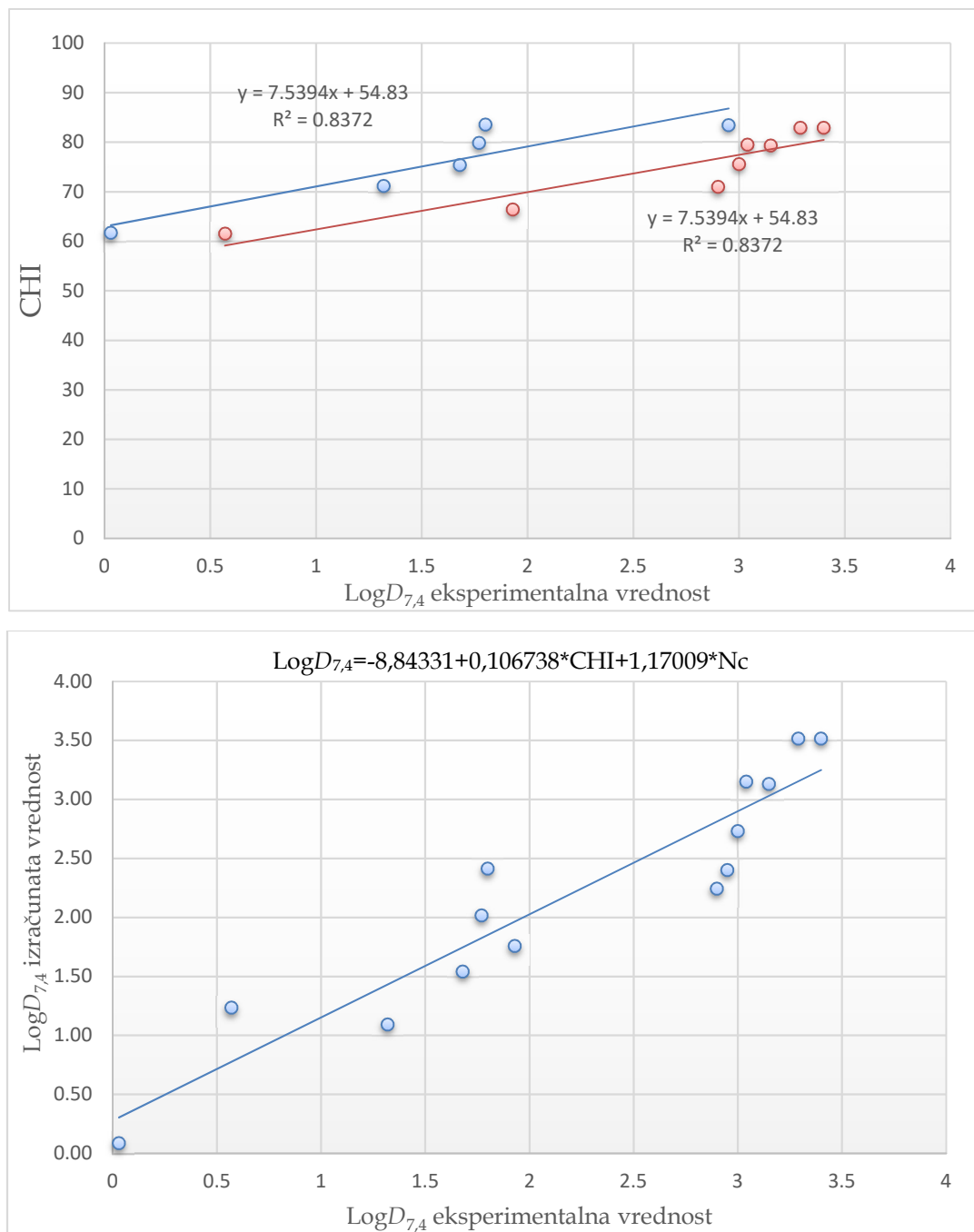
Takođe, uočeno je da su vrednosti LogP jako slične kod dipentil i diizopentil estara: DPE-PDCP i DIPE-PDCP, kao i kod dibutil i diizobutil estara: DB-PDCP i DIB-PDCP i DB-EDCP i DIB-EDCP. To pokazuje da račvanje pentil, odnosno butil radikala ne utiče na broj interakcija ispitivanog jedinjenja sa silanolnim grupama stacionarne faze, jer se retenciono vreme ne menja, pa time ni vrednost za LogP. Račvanje pentil, odnosno butil radikala utiče na vrednost n -oktanol/voda particionog koeficijenta dobijenog *shake-flask* metodom, odnosno, utiče na raspodelu supstance između organske i vodene faze. Izopentil i izobutil estri 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline imaju niže vrednosti n -oktanol/voda particionog koeficijenta ($\text{Log}D_{7,4}$) u odnosu na n -butil i n -pentil estre 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline.

Sagledavajući vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti može se primetiti da derivati 1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline imaju više vrednosti CHI i φ_0 u odnosu na odgovarajuće derivate 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline. Sa ciljem da se objasni navedena razlika uključen je uticaj različitih faktora, odnosno deskriptora koji proizilaze iz strukturnih razlika između derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina, kao što su: zapremina molekula, površina molekula, molekulska masa itd. Razlog uočenih i pokazanih razlika može biti u broju ugljenikovih atoma između dve amino grupe: 2C kod 1,2-etandiaminskih derivata i 3C kod 1,3-propandiaminskih derivata. Rastojanje između dve amino grupe utiče na broj interakcija ispitivanih jedinjenja sa funkcionalnim grupama stacionarne faze.

4.2.3 Razvoj i validacija matematičkog modela

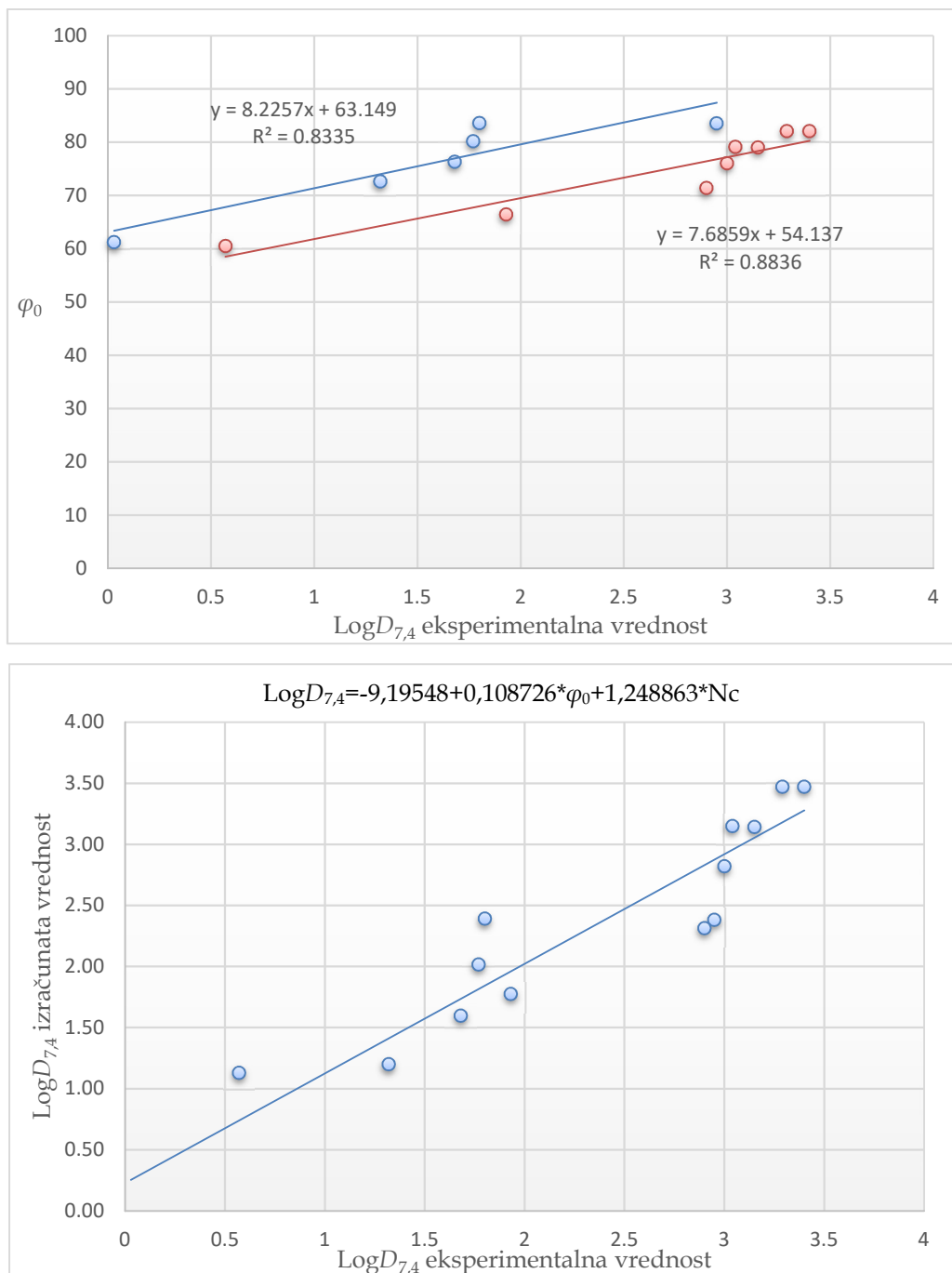
Navedena hipoteza zasnovana je na utvrđenoj korelaciji između vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti (CHI i φ_0) i vrednosti partitionog koeficijenta $\text{Log}D_{7,4}$, kao i između vrednosti retencionih vremena i vrednosti partitionog koeficijenta $\text{Log}D_{7,4}$, koja je postignuta kada je u regresionu analizu uključen broj ugljenikovih atoma između dve amino grupe (slike 4.24-4.26)

Uspostavljena korelacija prikazana je u tri razvijena matematička modela: Model 1, Model 2 i Model 3. Modeli su razvijeni sa ciljem predviđanja partitionog koeficijenta potencijalnih metabolita ispitivanih supstanci i novih derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina koji mogu biti sintetisani, a na osnovu vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti dobijenih UHPLC-MS metodom. Sva tri razvijena modela validirana su primenom *cross*-validacije, *leave-one-out* (LOO) tehnikom.



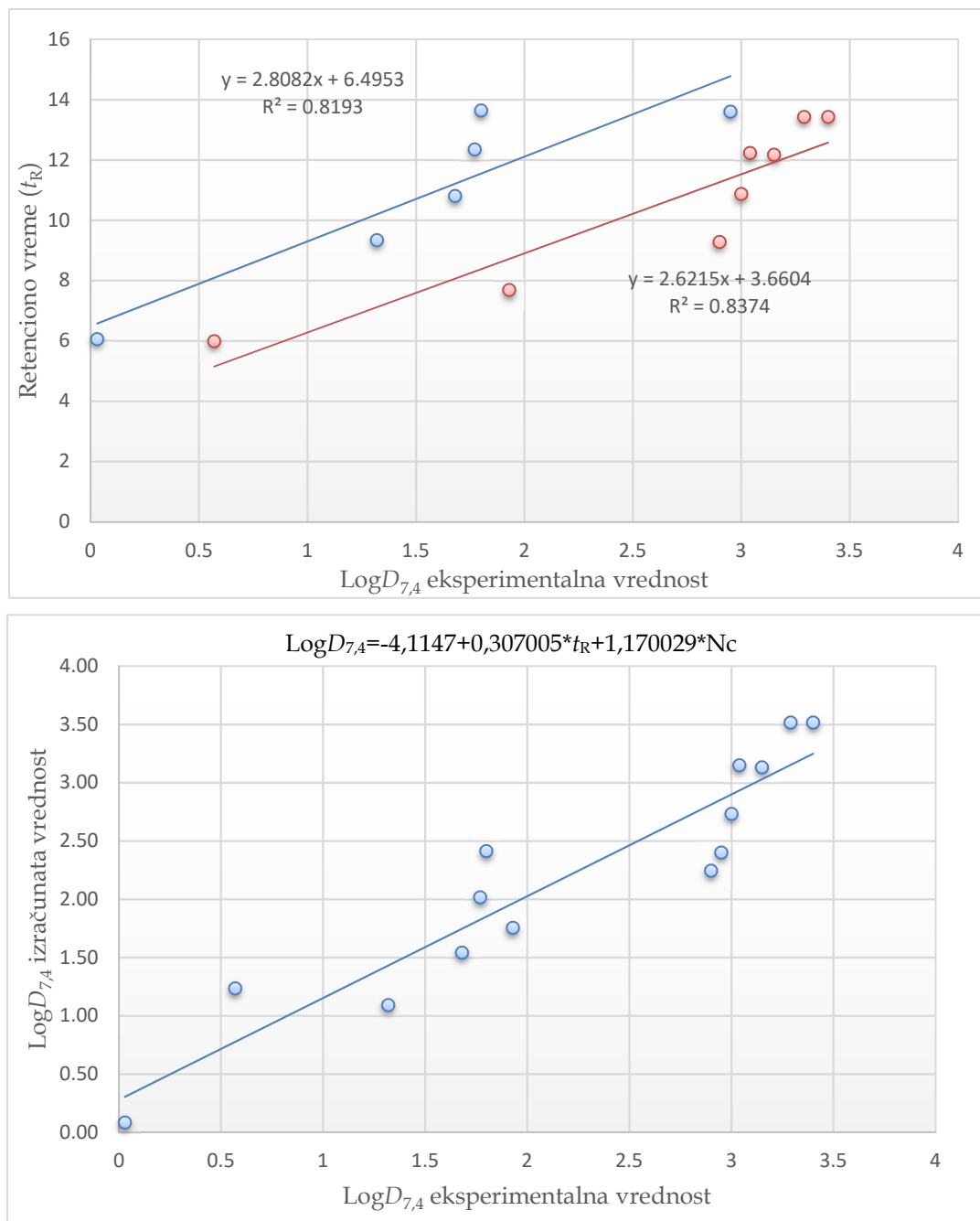
Slika 4.24: Matematički model - Model 1

gornji grafikon prikazuje krivu zavisnosti uspostavljenu između vrednosti dobijenih za hromatografski parametar CHI (primenom UHPLC-MS/MS metode) i particioni koeficijent $\text{LogD}_{7,4}$ (primenom *shake-flask* metode) - plava linija se odnosi na derivate 1,2-etandiamina, a narandžasta na derivate 1,3-propandiamina



Slika 4.25: Matematički model - Model 2

gornji grafikon prikazuje krivu zavisnosti uspostavljenu između vrednosti dobijenih za hromatografski parametar φ_0 (primenom UHPLC-MS/MS metode) i particioni koeficijent $\text{Log}D_{7,4}$ (primenom *shake-flask* metode) - plava linija se odnosi na derivate 1,2-etandiamina, a narandžasta na derivate 1,3-propandiamina



Slika 4.26: Matematički model - Model 3

gornji grafikon prikazuje krivu zavisnosti uspostavljenu između vrednosti retencionog vremena - t_R (primenom UHPLC-MS/MS metode) i partitionog koeficijenta $\text{Log}D_{7,4}$ (primenom *shake-flask* metode) - plava linija se odnosi na derivate 1,2-etandiamina, a narandžasta na derivate 1,3-propandiamina

Validacija razvijenih matematičkih modela vrši se radi ocene njihove robustnosti (stabilnost parametara modela), kao i prediktivne moći. Prediktivnost modela ocenjuje se u odnosu na vrednosti parametara: PRESS i Q^2 . Statistički parametri korelacije i prediktivne moći Modela 1, Modela 2 i Modela 3 dati su u tabeli 4.15.

Tabela 4.15: Kalibracioni i statistički parametri razvijenih matematičkih modela, uz statističke parametre *leave-one-out* za validaciju prediktivne moći modela

Model	Kalibracioni i statistički parametri					<i>Leave-one-out</i> validacija	
	Kalibraciona kriva (Log $D_{7,4}$ izračunata vrednost)	r^2	r	F	Significance F	PRESS	Q^2
Model 1	$\text{Log}D_{7,4} = (0,11 \pm 0,01) \cdot \text{CHI} + (1,17 \pm 0,22) \cdot N_c^{*****} - (8,84 \pm 1,28)$	0,8738	0,9348	38,09	$1,14 \times 10^{-5}$	3,28	0,78
Model 2	$\text{log}D_{7,4} = (0,11 \pm 0,01) \cdot \varphi_0 + (1,25 \pm 0,20) \cdot N_c^{*****} - (9,19 \pm 1,18)$	0,8969	0,9470	47,84	$3,74 \times 10^{-6}$	1,62	0,89
Model 3	$\text{log}D_{7,4} = (0,31 \pm 0,04) \cdot t_R + (1,17 \pm 0,22) \cdot N_c^{*****} - (4,11 \pm 0,76)$	0,8738	0,9348	38,09	$1,14 \times 10^{-5}$	3,28	0,78

***** N_c =broj ugljenikovih atoma između dve amino grupe ($N_c=2$ za 1,2-etandiaminske i $N_c=3$ za 1,3-propandiaminske derivate)

Model 1 pokazuje ustanovljenu korelaciju između hromatografskog parametra CHI i $\text{Log}D_{7,4}$ (slika 4.24).

Model 3 pokazuje ustanovljenu pozitivnu korelaciju između vrednosti retencionog vremena ispitivanih supstanci dobijenih primenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod ultra-visokim pritiskom (t_R) i vrednosti particionog koeficijenta *n*-oktanol-voda ($\text{Log}D_{7,4}$) dobijenog *shake-flask* metodom (slika 4.26).

Najbolji statistički parametri dobijeni su za Model 2, korelaciju ustanovljenu između vrednosti particionog koeficijenta *n*-oktanol-voda ($\text{Log}D_{7,4}$) i hromatografskog parametra φ_0 dobijenog primenom UHPLC-MS metode (slika 4.25). Za ovaj model je zaključeno da ima najbolju prediktivnu moć, a na osnovu vrednosti dobijene za $Q^2 = 0,89$.

Rezultati ispitivanja lipofilnosti ispitivanih supstanci, predstavljeni u ovom odeljku pokazuju da dužina alkil radikala na estarskim grupama ima uticaj na lipofilnost/hidrofobnost istih.

Takođe, vrednosti parametara lipofilnosti dobijeni primenom *shake-flask* metode i UHPLC-MS metode u saglasnosti su sa *in vitro* rezultatima citotoksične aktivnosti ispitivanih supstanci. EDCP i PDCP imaju najmanje izraženi lipofilni karakter i najmanju aktivnost *in vitro* na ćelijskim linijama.¹

Može se pretpostaviti da supstance sa najvećom citotoksičnom aktivnošću, koja je ustanovljena u ranijim istraživanjima DE-EDCP i DB-PDCP, aktivnost ostvaruju na membranskom nivou ili u intracelularnom prostoru.

Razvijen i odabran matematički model (Model 2) pokazuje dobre karakteristike i visoku prediktivnu moć. Može se primeniti za predviđanje vrednosti particionog koeficijenta ($\text{Log}D_{7,4}$) novosintetisanih derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina, kao i potencijalnih metabolita ispitivanih supstanci, na osnovu vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti.

4.3 PERMEABILNOST DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA

U ovom poglavlju predstavljeno je ispitivanje membranske permeabilnosti derivata 1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa ciljem predviđanja njihove bioraspoloživosti.

Prikazani su rezultati dobijeni na veštačkoj membrani – modelu za gastrointestinalnu (GIT) resorpciju i na veštačkoj membrani – modelu krvno-moždane barijere (BBB).

Za sve ispitivane supstance izračunati su sledeći parametri membranske permeabilnosti:

- ⇒ P_{app} (koeficijent permeabilnosti);
- ⇒ $C_{A(t)}/C_{D(0)}$ (parametar permeabilnosti);
- ⇒ Pe (koeficijent efektivne permeabilnosti);
- ⇒ % R (retencija, odnosno zadržavanje ispitivane supstance u membrani);
- ⇒ J -flux (proticanje - brzina prenosa).

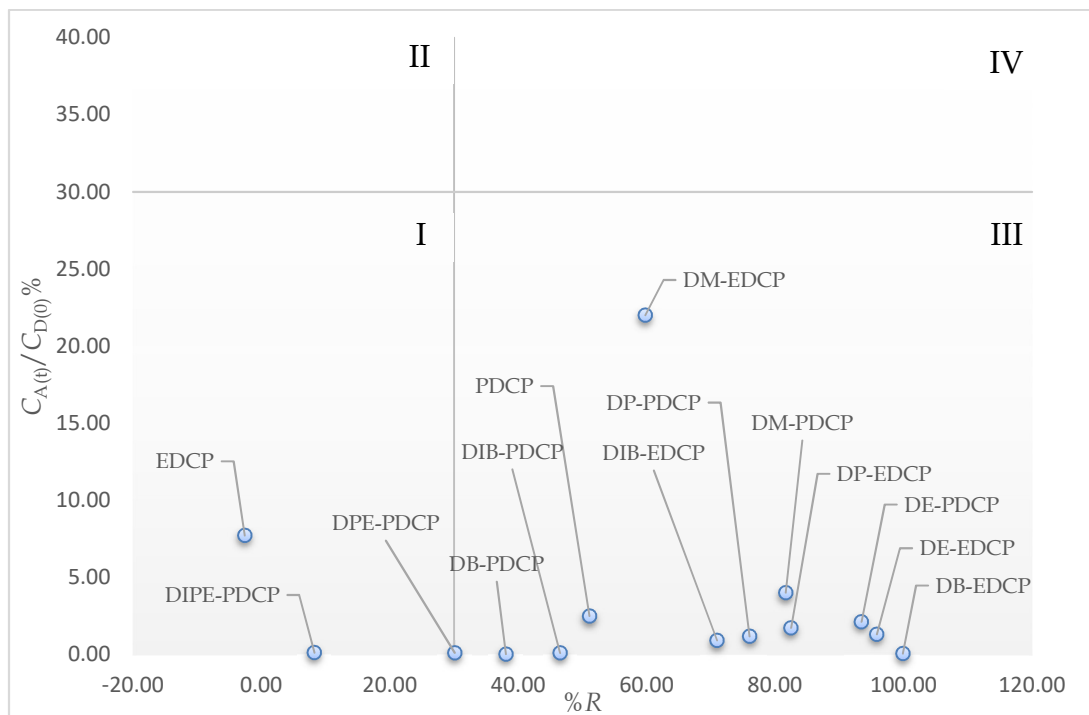
4.3.1 Rezultati ispitivanja permeabilnosti na veštačkoj membrani GIT-a

Rezultati ispitivanja permeabilnosti ispitivanih supstanci dobijenih primenom PAMPA metode na veštačkoj membrani - modelu GIT-a (1% lecitin u dedekanu) dati su u tabeli 4.16.

Na osnovu prikazanih rezultata urađen je grafički prikaz zavisnosti % $C_{A(t)}/C_{D(0)}$ i % R (slika 4.27).

Tabela 4.16: Vrednosti parametara membranske permeabilnosti ispitivanih supstanci dobijenih primenom PAMPA metode na veštačkoj membrani GIT-a

Jedinjenje	Koncentracija rastvora ispitivane supstance	P_{app}	Pe	$C_{A(t)}/C_{D(0)}$	% R	J - flux
EDCP	21 μ M	$2749,9 \cdot 10^{-6}$	$1930,4 \cdot 10^{-6}$	7,73	2,61	$13744,7 \cdot 10^{-6}$
DM-EDCP	17 μ M	$11540,0 \cdot 10^{-6}$	$4710,0 \cdot 10^{-6}$	22,00	59,78	$-6248,9 \cdot 10^{-6}$
DE-EDCP	20 μ M	$419,3 \cdot 10^{-6}$	$13423,1 \cdot 10^{-6}$	1,32	95,83	$25,6 \cdot 10^{-6}$
DP-EDCP	19 μ M	$555,8 \cdot 10^{-6}$	$2626,5 \cdot 10^{-6}$	1,74	82,46	$403,1 \cdot 10^{-6}$
DB-EDCP	20 μ M	$20,6 \cdot 10^{-6}$	$7560,010^{-6}$	0,07	99,89	$-0,05 \cdot 10^{-6}$
DIB-EDCP	20 μ M	$293,9 \cdot 10^{-6}$	$776,1 \cdot 10^{-6}$	0,93	70,94	$442,6 \cdot 10^{-6}$
PDCP	20 μ M	$810,6 \cdot 10^{-6}$	$1269,7 \cdot 10^{-6}$	2,50	51,08	$1956,0 \cdot 10^{-6}$
DM-PDCP	20 μ M	$1335,1 \cdot 10^{-6}$	$7140,0 \cdot 10^{-6}$	4,02	81,64	$672,4 \cdot 10^{-6}$
DE-PDCP	20 μ M	$686,0 \cdot 10^{-6}$	$14117,0 \cdot 10^{-6}$	2,13	93,43	$61,7 \cdot 10^{-6}$
DP-PDCP	20 μ M	$376,4 \cdot 10^{-6}$	$1225,8 \cdot 10^{-6}$	1,19	76,01	$447,3 \cdot 10^{-6}$
DB-PDCP	20 μ M	$9,6 \cdot 10^{-6}$	$11,7 \cdot 10^{-6}$	0,03	38,07	$33,4 \cdot 10^{-6}$
DIB-PDCP	23 μ M	$33,6 \cdot 10^{-6}$	$47,2 \cdot 10^{-6}$	0,11	46,50	$115,4 \cdot 10^{-6}$
DPE-PDCP	17 μ M	$37,1 \cdot 10^{-6}$	$39,8 \cdot 10^{-6}$	0,12	30,09	$126,7 \cdot 10^{-6}$
DIPE-PDCP	22 μ M	$38,6 \cdot 10^{-6}$	$31,5 \cdot 10^{-6}$	0,12	8,25	$217,6 \cdot 10^{-6}$



Slika 4.27: Klase permeanata ispitivanih derivata 1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline na GIT membrane

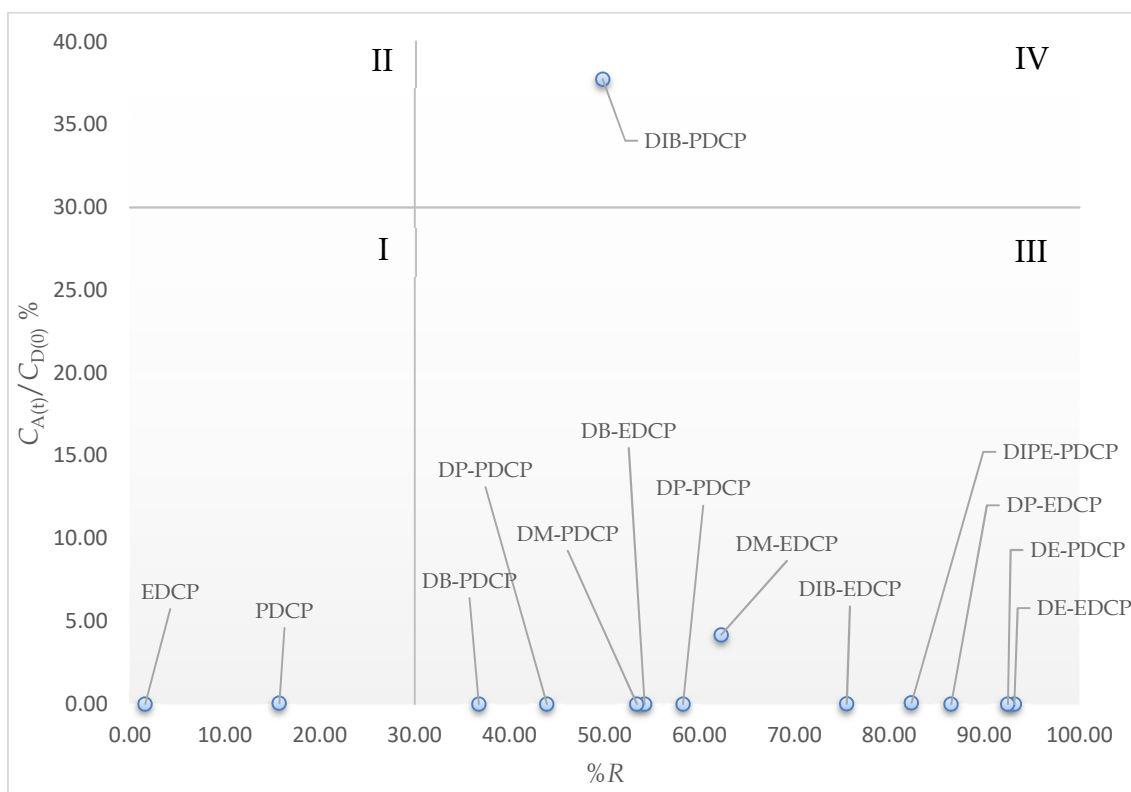
Na osnovu grafičkog prikaza zavisnosti retencije u membrani i parametra permeabilnosti (slika 4.27) utvrđeno je da sve ispitivane supstance pripadaju klasi III permeanata (visok % zadržavanja u membrani, a nizak % prolaznosti kroz membranu), osim ispitivanih supstanci EDCP, DPE-PDCP i DIPE-PDCP koje pripadaju klasi I permeanata (nizak % zadržavanja u membrani i nizak % prolaznosti kroz membranu).

Poređenjem rezultata, utvrđeno je da se derivati 1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline u većem % zadržavaju u membrani, kao i da imaju više vrednosti P_{app} u odnosu na derivate 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline. Najviše vrednosti za parametre %R i Pe dobijene su za dietil estre (DE-EDCP i DE-PDCP). Najveća antiproliferativna aktivnost u *in vitro* testovima na kulturama ćelija određena je za navedene derivate.¹ Navedeno ukazuje da se potencijalno ciljno mesto delovanja nalazi na nivou membrana malignih ćelija.

4.3.2 Rezultati ispitivanja permeabilnosti na veštačkoj membrani BBB-a

Dobijene vrednosti za parametre membranske permeabilnosti primenom PAMPA-e na veštačkoj membrani koja je u svom sastavu ima polarne lipide svinjskog mozga i kojom se simulira krvno-moždana barijera (BBB) dati su u tabeli 4.17.

Na osnovu prikazanih rezultata urađen je grafički prikaz zavisnosti $C_{A(t)}/C_{D(0)}$ i $\%R$ (slika 4.28).



Slika 4.28: Klase permeanata ispitivanih derivata 1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i 1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline na BBB membrani

Tabela 4.17: Vrednosti parametara membranske permeabilnosti ispitivanih supstanci dobijenih primenom PAMPA metode na veštačkoj membrani BBB-a

Jedinjenje	Koncentracija rastvora ispitivane supstance	P_{app}	Pe	$C_{A(t)}/C_{D(0)}$	% R	J - flux
EDCP	100 μ M	$7,7 \cdot 10^{-7}$	$8,4 \cdot 10^{-7}$	0,01	1,59	$2,1 \cdot 10^{-5}$
DM-EDCP	100 μ M	$7,9 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	4,19	63,66	$6,2 \cdot 10^{-3}$
DE-EDCP	100 μ M	0	0	<0,01	93,15	0
DP-EDCP	100 μ M	0	0	<0,01	86,48	0
DB-EDCP	100 μ M	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$8,8 \cdot 10^{-7}$	0,01	54,21	$4,9 \cdot 10^{-6}$
DIB-EDCP	100 μ M	$3,1 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	0,017	75,49	$2,1 \cdot 10^{-7}$
PDCP	100 μ M	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	0,06	15,74	$2,5 \cdot 10^{-4}$
DM-PDCP	100 μ M	0	0	<0,001	53,38	0
DE-PDCP	100 μ M	0	0	<0,01	92,45	0
DP-PDCP	100 μ M	0	0	<0,01	58,25	0
DB-PDCP	100 μ M	0	0	<0,01	36,74	0
DIB-PDCP	100 μ M	$1,2 \cdot 10^{-2}$	0	37,75	62,25	0
DPE-PDCP	100 μ M	0	0	<0,01	43,91	0
DIPE-PDCP	22 μ M	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^{-5}$	0,08	82,33	$7,3 \cdot 10^{-5}$

Na osnovu grafičkog prikaza zavisnosti koeficijenta permeabilnosti i retencije u membrani ustanovljeno je da ispitivane supstance pripadaju klasi III permeanata (visok % zadržavanja u membrani i nizak % prolaznosti kroz membranu), osim supstanci EDCP i PDCP koje pripadaju klasi I permeanata (nizak % zadržavanja u membrani i nizak % prolaznosti kroz membranu) i supstance DIB-PDCP za koju je određeno da pripada klasi IV permeanata (visok % zadržavanja u membrani i visok % prolaznosti kroz membranu).

Najviše vrednosti za %R dobijene su za DE-EDCP i DE-PDCP, za DIB-EDCP i DIPE-PDCP. Sa produžavanjem alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama ne postiže se veći % zadržavanja u membrani ili permeabilnosti. Uočeno je da su vrednosti zadržavanja ispitivanih supstanci u membrani više kod derivata 1,2-etandiamina nego kod derivata 1,3-propandiamina. Takođe, ispitivane supstance sa računastim alkil nizom u estarskoj funkcionalnoj grupi imaju veći % zadržavanja u membrani u odnosu na iste sa normalnim alkil nizom.

Obe kiseline (EDCP i PDCP) pokazuju nisku permeabilnost i mali % retencije na obe ispitane veštačke membrane (klasa I permeanata). Esterifikacijom karboksilnih grupa dobijaju se više vrednosti parametara permeabilnosti. Kod dietilestra obe kiseline (DE-EDCP i DE-PDCP) značajno se povećava zadržavanje u membrani, a raste i efektivna membranska permeabilnost. Međutim, sa daljim produžavanjem alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama nije zabeleženo povećanje zadržavanja u membrani ili povećanje permeabilnosti.

Navedeni rezultati ukazuju da ispitivane supstance svoj citotoksični efekat potencijalno mogu ostvarivati na nivou ćelijske membrane, membrane mitohondrija ili na nivou transmembranskih receptora.

Treba istaći visok stepen i permeabilnosti i prolaska kroz membranu za supstancu DIPE-PDCP, što je posebno izraženo na veštačkoj membrani BBB-a.

Pored toga, za supstancu DB-PDCP za koju je u *in vitro* testovima na ćelijskim linijama pokazana zapažena citotoksična aktivnost na glioma ćelijama, pokazan je visok stepen prolaznosti kroz membranu.

Dodatno, urađen je paralelni prikaz dobijenih vrednosti parametra P_{app} na veštačkim membranama GIT-a i BBB-a (tabela 4.18).

Tabela 4.18: Paralelni prikaz dobijenih vrednosti parametra P_{app} na veštačkim membranama GIT-a i BBB-a

Jedinjenje	P_{app} (GIT)	P_{app} (BBB)
EDCP	$2749,9 \cdot 10^{-6}$	$7,7 \cdot 10^{-7}$
DM-EDCP	$11540,0 \cdot 10^{-6}$	$7,9 \cdot 10^{-4}$
DE-EDCP	$419,3 \cdot 10^{-6}$	0
DP-EDCP	$555,8 \cdot 10^{-6}$	0
DB-EDCP	$20,6 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-7}$
DIB-EDCP	$293,9 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$
PDCP	$810,6 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
DM-PDCP	$1335,1 \cdot 10^{-6}$	0
DE-PDCP	$686,0 \cdot 10^{-6}$	0
DP-PDCP	$376,4 \cdot 10^{-6}$	0
DB-PDCP	$9,6 \cdot 10^{-6}$	0
DIB-PDCP	$33,6 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$
DPE-PDCP	$37,1 \cdot 10^{-6}$	0
DIPE-PDCP	$38,6 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$

Rezultati pokazuju da ispitivane supstance imaju bolju membransku permeabilnost na veštačkoj membrani GIT-a, u odnosu na BBB. Na veštačkoj membrani BBB-a ispitivane supstance DIB-EDCP, PDCP i DIPE-PDCP pokazuju visoku permeabilnost, kao i sve ispitivane supstance na veštačkoj membrani GIT-a (prema kriterijumu iz poglavlja 1.4.3, $P_{app} > 20 \cdot 10^{-6}$).^{77,147,148}

Na osnovu navoda da permeabilnost u rasponu $3-20 \cdot 10^{-6}$ cm/s^{77,147,148} ukazuje da supstanca može biti kandidat za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, među ispitivanim supstancama kandidati su DIB-EDCP, PDCP i DIPE-PDCP.

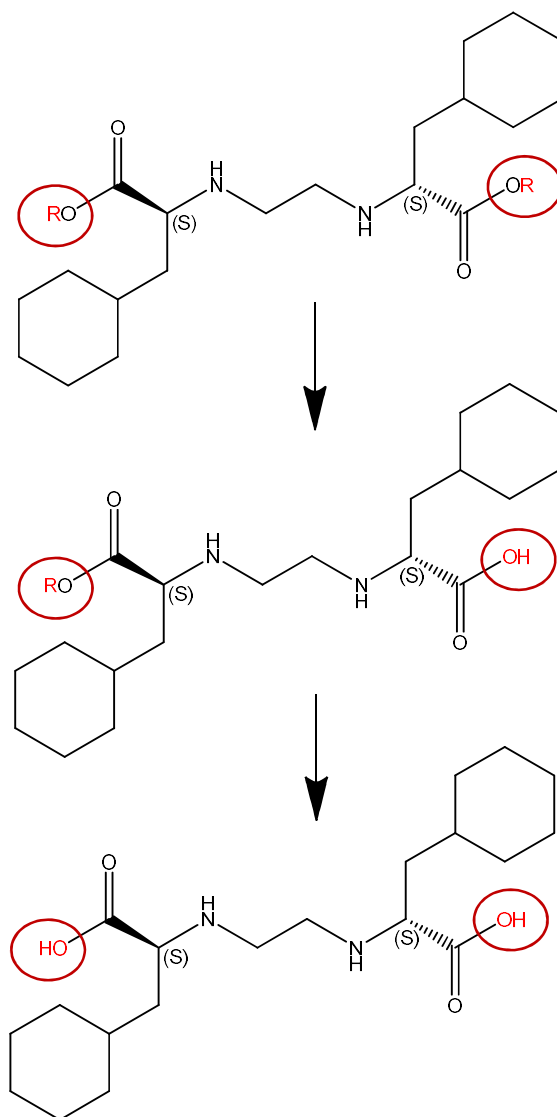
4.4 IN SILICO BIOFARMACEUTSKA KARAKTERIZACIJA DERIVATA 1,2-ETANDIAMINA I 1,3-PROPANDIAMINA

Uporedo sa *in vitro* biofarmaceutskom karakterizacijom ispitivanih supstanci pristupilo se primeni odgovarajućih računarskih programa za njihovu *in silico* biofarmaceutsku karakterizaciju. Primenom računarskih programa izvršena su predviđanja najverovatnijih metaboličkih reakcija (primenom *Metabolizer-a*); apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije, toksičnosti (primenom *ADME(T) predictor-a*) i molekularnog mehanizma dejstva ispitivanih supstanci (primenom Molekulskog *docking-a*).

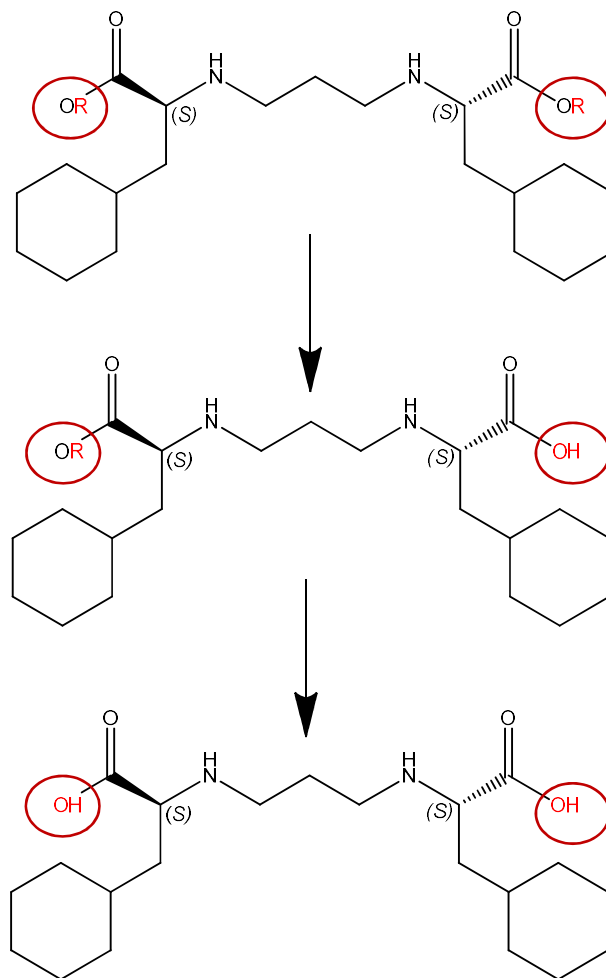
4.4.1 Rezultati predviđanja primenom *Metabolizer-a*

Metabolizam ispitivanih supstanci predviđen je primenom programa *Metabolizer*.

Najverovatnija metabolička reakcija i kod derivata 1,2-etandiamina i kod derivata 1,3-propandiamina je hidroliza jedne ili obe estarske grupe pri čemu se dobija odgovarajuća kiselina (slika 4.29 i slika 4.30).

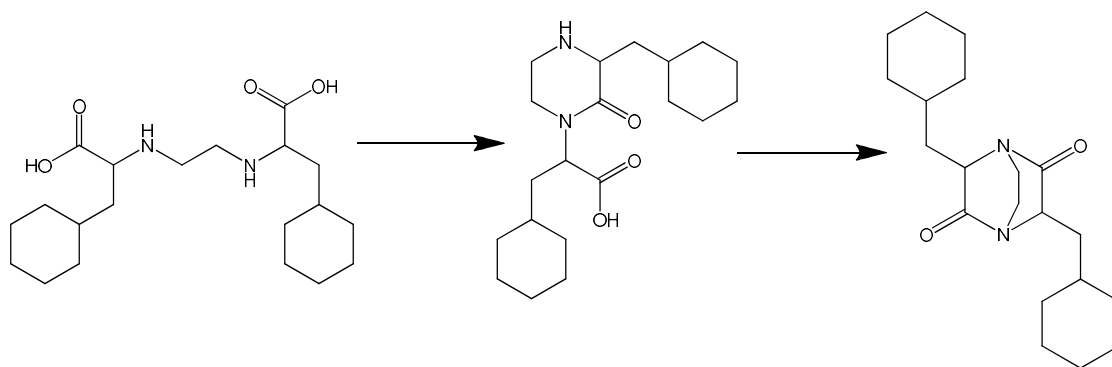


Slika 4.29: Dominantni metabolički put za derivate 1,2-etandiamina

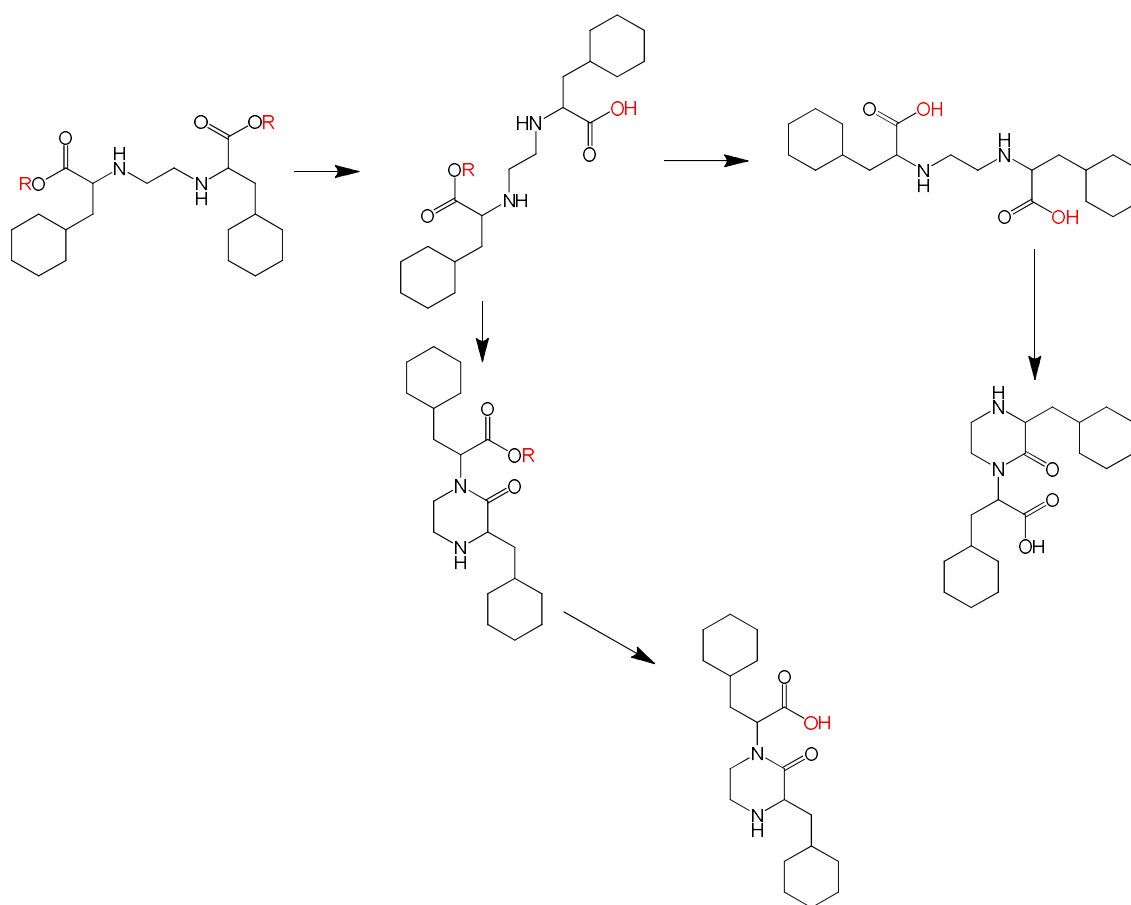


Slika 4.30: Dominantni metabolički put za derivate 1,3-propandiamina

Primenom računarskog programa *Metabolizer* za derivate 1,2-etandiamina predviđena su još dva metabolička puta. Radi se o metaboličkoj reakciji kojoj podleže kiselina EDCP, kao potencijalni metabolit svih estarskih derivata 1,2-etandiamina (slika 4.31). Tokom ove metaboličke reakcije dolazi do intramolekulske ciklizacije i nastaje laktam-alkilestar, odnosno, daljom hidrolizom i druge estarske grupe nastaje laktam-karboksilat (slika 4.32).



Slika 4.31: Dominantni metabolički put EDCP-a (nastanak laktam-karboxilata)



Slika 4.32: Dominantni metabolički put za nastanak odgovarajućeg laktam-alkilestra od alkilestra derivata 1,2-etandiamina

Metaboliti predviđeni primenom računarskog programa *Metabolizer* i prikazani na slikama 4.29-4.32, uključeni su u predviđanje primenom *ADME(T) predictor*-a i u Molekulsku *docking* studiju.

4.4.2 Rezultati predviđanje primenom *ADME(T) predictor-a*

Primenom *ADME(T) predictor-a* određeni su biofarmaceutski parametri, parametri metabolizma, toksičnosti i ukupnog *ADMET* rizika za ispitivane supstance, potencijalne metabolite i oficinalne lekove - citostatike iz grupe platinskih derivata: cisplatin, karboplatin, oksaliplatin i satraplatin.

Rezultati dobijeni za ispitivane supstance i potencijalne metabolite upoređeni su sa rezultatima dobijenim za navedene oficinalne lekove.

Biofarmaceutski parametri (tabela 4.19):

- a) $\log P$ -particioni koeficijent $\log P$;
- b) *BBB_Filter* - verovatnoća prolaska kroz krvno-moždanu barijeru;
- c) *LogBBB* - particioni koeficijent krvno-moždane barijere $\log(C_{\text{mozak}}/C_{\text{krv}})$;
- d) *PrUnbnd* - procenat (%) supstance koji nije vezan za proteine plazme;
- e) *Vd* - zapremina distribucije (L/kg);
- f) *RBP* - odnos koncentracija leka u krvi i plazmi;
- g) *Pgp* - verovatnoća izlaska posredstvom P-glikoproteina.

Tabela 4.19: Pregled vrednosti biofarmaceutskih parametara određenih primenom *ADME(T) predictor-a*

Ispitivana supstanca	logP	BBB_ Filter	LogBBB	PrUnbnd	Vd	RBP	Pgp
EDCP	1,31	nizak	-1,2	31,04	0,29	0,70	Ne
DM-EDCP	4,27	visok	0,49	45,36	0,98	0,76	Ne
DE-EDCP	5,08	visok	0,44	44,59	0,81	0,79	Ne
DP-EDCP	5,82	nizak	0,46	40,83	0,84	0,76	Ne
DB-EDCP	6,57	nizak	0,55	38,86	0,79	0,72	Ne
DIB-EDCP	6,56	visok	0,80	36,78	1,57	0,67	Da
PDCP	0,93	nizak	-1,03	47,46	0,64	0,84	Ne
DM-PDCP	4,62	nizak	0,46	45,49	0,8	0,74	Ne
DE-PDCP	5,42	nizak	0,39	45,05	0,76	0,77	Ne
DP-PDCP	6,14	nizak	0,41	41,38	0,76	0,74	Ne
DB-PDCP	6,87	nizak	0,51	39,51	1,01	0,71	Ne
DIB-PDCP	6,88	visok	0,75	42,31	1,41	0,65	Da
DPE-PDCP	6,92	visok	0,81	37,56	1,31	0,67	Da
DIPE-PDCP	6,90	visok	0,88	42,01	1,53	0,65	Da
laktam-karboksilat ^a	0,67	visok	-0,81	49,22	0,75	0,90	Ne
laktam-metilestar ^b	4,03	visok	0,58	48,6	0,94	0,79	Ne
laktam-etilestar ^c	4,49	visok	0,56	48,31	1,0	0,84	Ne
laktam-propilestar ^d	4,93	visok	0,57	45,93	1,09	0,82	Ne
laktam-butilestar ^e	5,37	visok	0,61	44,53	1,06	0,79	Ne
Cisplatin	-0,60	visok	0,52	100,00	0,81	1,99	Ne
Karboplatin	-1,40	visok	0,31	100,00	0,89	1,52	Ne
Oksaliplatin	-0,95	visok	0,60	100,00	0,93	1,64	Da
Satraplatin	0,31	visok	0,89	67,47	1,66	1,07	Da

a = potencijalni metabolit EDCP-a; b = potencijalni metabolit DM-EDCP-a; c = potencijalni metabolit DE-EDCP-a;
d = potencijalni metabolit DP-EDCP-a i e = potencijalni metabolit DB-EDCP-a

U tabeli 4.19 dati su rezultati predviđanja biofarmaceutskih parametara za ispitivane supstance, potencijalne metabolite i posmatrane oficinalne lekove.

Predviđene vrednosti partitionog koeficijenta za obe kiseline (EDCP i PDCP) kao i za potencijalni metabolit laktam-karboksilat niže su u odnosu na ostale ispitivane supstance i potencijalne metabolite. Sa povećanjem alkil niza u estarskim funkcionalnim grupama rastu i vrednosti odgovarajućih partitionih koeficijenata. Svi posmatrani oficinalni lekovi imaju niže vrednosti partitionog koeficijenta u odnosu na ispitivane supstance i potencijalne metabolite.

Verovatnoća prolaska krvno-moždane barijere (BBB) visoka je za sledeće ispitivane supstance: DM-EDCP, DE-EDCP, DIB-EDCP, DIB-PDCP, DPE-PDCP i DIPE-PDCP. Od nabrojanih supstanci jedino za DM-EDCP i DE-EDCP ne postoji verovatnoća izlaska posredstvom P-glikoproteina (Pgp), koji utiče na razvoj rezistencije. Za potencijalne metabolite predviđena je visoka verovatnoća prolaska BBB i odsustvo verovatnoće izlaska posredstvom Pgp. Za posmatrane oficinalne lekove predviđena je visoka verovatnoća prolaska BBB. Za cisplatin i karboplatin predviđeno je odsustvo verovatnoće izlaska posredstvom Pgp, dok je za oksaliplatin i satraplatin predviđena verovatnoća izlaska posredstvom Pgp.

Ispitivane supstance i potencijalni metaboliti vezuju se za proteine plazme, ali ne u visokom % (oko 50%), za razliku od oficinalnih lekova (cisplatin, karboplatin, oksaliplatin) koji se ne vezuju za proteine plazme. Ispitivane supstance i potencijalni metaboliti raspodeljuju se između krvi i plazme na način da su zastupljeniji u plazmi, za razliku od oficinalnih lekova koji su zastupljeniji u krvi.

Parametri metabolizma (tabela 4.20):

ADME(T) predictor-om predviđen je metabolizam ispitivanih supstanci posredstvom enzima iz familije citohroma P450: CYP_{1A2}, CYP_{2A6}, CYP_{2D6}, CYP_{3A4}. Određeni su sledeći parametri:

- a) *MET_{1A2_Inh}* - inhibitorna aktivnost ispitivane supstance prema CYP_{1A2};
- b) *CYP_{1A2_Substr}* - verovatnoća da je ispitivana supstanca supstrat za CYP_{1A2};
- c) *CYP_{2A6_Substr}* - verovatnoća da je ispitivana supstanca supstrat za CYP_{2A6};
- d) *MET_{2D6_Inh}* - inhibitorna aktivnost ispitivane supstance prema CYP_{2D6};
- e) *CYP_{2D6_Substr}* - verovatnoća da je ispitivana supstanca supstrat za CYP_{2D6};
- f) *MET_{3A4_Inh}* - inhibitorna aktivnost ispitivane supstance prema CYP_{3A4};
- g) *CYP_{3A4_Substr}* - verovatnoća da je ispitivana supstanca supstrat za CYP_{3A4};
- h) *CYP-Risk* - rizik od oksidacije ispitivanih jedinjenja posredstvom enzima P450. Vrednost parametra označava se brojem potencijalnih problema, koji mogu biti izazvani metabolizmom ispitivane supstance posredstvom enzima iz familije citohroma P450 ili pak inhibicijom enzima iz familije citohroma P450 od strane ispitivane supstance;
- i) *CYP-Code* - ukupni rizik koji je vezan za metabolizam ispitivane supstance. Cifrom i slovom označen je enzim koji učestvuje u rizičnoj metaboličkoj reakciji - oznaka 3A potiče od enzima CYP_{3A4}, a 1A potiče od enzima CYP_{1A2} dok oznaka CL ukazuje na značajan uticaj klirensa u metabolizmu ispitivane supstance, odnosno da je klirens > 30 %.

Tabela 4.20: Pregled vrednosti metaboličkih parametara određenih primenom *ADME(T) predictor-a*

(broj u zagradi označava stepen verovatnoće prikazanog predviđanja)

Ispitivana supstanca	CYP_1A2_		CYP_2A6	CYP_2D6_		CYP_3A4_		Risk	CYP_ Code
	MET_Inh	Substr	_Substr	MET_Inh	Substr	MET_Inh	Substr		
EDCP	Ne (98%)	Ne (95%)	Ne	Ne	Ne (88%)	Ne (77%)	Ne (87%)	0	-
DM-EDCP	Ne (64%)	Ne (96%)	Ne	Da	Ne (74%)	Da (57%)	Ne (53%)	0	-
DE-EDCP	Ne (84%)	Ne (97%)	Ne	Da	Ne (82%)	Da (56%)	Da (79%)	1	3A
DP-EDCP	Ne (84%)	Ne (97%)	Ne	Da	Ne (86%)	Da (57%)	Da (92%)	1	3A
DB-EDCP	Ne (88%)	Ne (97%)	Ne	Da	Ne (88%)	Da (58%)	Da (92%)	1	3A
DIB-EDCP	Ne (90%)	Ne (98%)	Ne	Da	Ne (88%)	Da (60%)	Da (91%)	3	3A, CL
PDCP	Ne (98%)	Ne (97%)	Ne	Ne	Ne (79%)	Ne (77%)	Ne (66%)	0	-
DM-PDCP	Ne (64%)	Ne (96%)	Ne	Da	Ne (72%)	Da (56%)	Ne (52%)	0	-
DE-PDCP	Ne (84%)	Ne (97%)	Ne	Da	Ne (82%)	Da (56%)	Da (76%)	1	3A
DP-PDCP	Ne (84%)	Ne (99%)	Ne	Da	Ne (86%)	Da (57%)	Da (90%)	1	3A
DB-PDCP	Ne (88%)	Ne (97%)	Ne	Da	Ne (86%)	Da (58%)	Da (90%)	1	3A
DIB-PDCP	Ne (90%)	Ne (96%)	Ne	Da	Ne (86%)	Da (56%)	Da (89%)	3	3A, CL
DPE-PDCP	Ne (88%)	Ne (97%)	Ne	Da	Ne (88%)	Da (57%)	Da (88%)	3	3A, CL
DIPE-PDCP	Ne (92%)	Ne (96%)	Ne	Da	Ne (86%)	Da (58%)	Da (92%)	3	3A, CL

Ispitivana supstanca	CYP_1A2_		CYP_2A6	CYP_2D6_		CYP_3A4_		CYP_	
	MET_Inh	Substr	_Substr	MET_Inh	Substr	MET_Inh	Substr	Risk	Code
laktam-karboksilat ^a	Ne (98%)	Ne (96%)	Ne	Ne	Ne (71%)	Ne (83%)	Da (60%)	1	3A
laktam-metilestar ^b	Ne (80%)	Ne (97%)	Ne	Da	Da (65%)	Ne (65%)	Da (69%)	1	3A
laktam-etilestar ^c	Ne (98%)	Ne (97%)	Ne	Da	Da (67%)	Ne (65%)	Da (90%)	1	3A
laktam-propilestar ^d	Ne (98%)	Ne (99%)	Ne	Da	Ne (71%)	Ne (63%)	Da (95%)	1	3A
laktam-butilestar ^e	Ne (98%)	Ne (99%)	Ne	Da	Ne (71%)	Da (61%)	Da (94%)	1	3A
Cisplatin	Ne	Da (81%)	Ne	Ne	Ne (95%)	Ne (92%)	Da	0	-
Karboplatin	Ne (98%)	Da (81%)	Ne	Ne	Ne (88%)	Ne (92%)	Da (98%)	1	1A
Oksaliplatin	Ne (98%)	Da (61%)	Da	Ne	Ne (84%)	Ne (92%)	Da (99%)	0	-
Satraplatin	Ne (98%)	Da (71%)	Ne	Ne	Ne	Da (57%)	Da (99%)	1	1A

a = potencijalni metabolit EDCP-a; b = potencijalni metabolit DM-EDCP-a; c = potencijalni metabolit DE-EDCP-a; d = potencijalni metabolit DP-EDCP-a i

e = potencijalni metabolit DB-EDCP-a

U tabeli 4.20 dati su rezultati predviđanja parametara metabolizma za ispitivane supstance, potencijalne metabolite i posmatrane oficinalne lekove.

Prema izvršenom predviđanju, ispitivane supstance i potencijalni metaboliti nemaju inhibitornu aktivnost prema enzimu **CYP1A2**, a ujedno nisu ni supstrat za enzim CYP1A2. I navedeni oficinalni lekovi nemaju inhibitornu aktivnost prema posmatranom enzimu, ali su supstrati za isti.

Kada je u pitanju enzim **CYP2A6** ispitivane supstance, potencijalni metaboliti i navedeni oficinalni lekovi nisu supstrat za isti.

Ispitivane supstance i potencijalni metabolit sa najnižim vrednostima particionog koeficijenta (EDCP, PDCP i laktam-karboksilat) nemaju inhibitornu aktivnost prema **CYP2D6** enzimu. Kao što je ranije naglašeno i posmatrani oficinalni lekovi imaju niske vrednosti particionog koeficijenta i, takođe, nemaju inhibitornu aktivnost prema CYP2D6 enzimu. Međutim, supstrat za navedeni enzim su sve ispitivane supstance, oficinalni lekovi i potencijalni metaboliti, osim laktam-metilestara i laktam-etilestara.

Ispitivane supstance sa najnižim vrednostima particionog koeficijenta, (EDCP i PDCP) kao i potencijalni metaboliti (osim laktam-butilestra) i svi oficinalni lekovi (osim satraplatine) nemaju inhibitornu aktivnost prema enzimu **CYP3A4**. Nadalje, EDCP, PDCP i DM-EDCP nisu supstrat za CYP3A4. Sa povećanjem lipofilnih karakteristika ispitivanih supstanci one postaju supstrat za CYP 3A4. Svi potencijalni metaboliti i posmatrani oficinalni lekovi takođe su supstrat za enzim CYP3A4.

Rizik od oksidacije ispitivanih jedinjenja posredstvom enzima P450 je nizak, osim za ispitivane supstance sa izobutil, pentil i izopentil estarskim funkcionalnim grupama. Rizik od oksidacije posredstvom enzima P450 nizak je i za sve posmatrane oficinalne lekove i potencijalne metabolite.

Sve ispitivane supstance osim onih koje imaju izobutil-, pentil- ili izopentil alkil niz na estarskim funkcionalnim grupama pokazuju nizak broj potencijalnih problema, koji su u vezi sa metaboličkim reakcijama. Nizak broj je predviđen i za sve potencijalne metabolite i oficinalne lekove.

Rezultati predviđanja ukupnog metaboličkog rizika pokazuju da za ispitivane supstance: EDCP, DM-EDCP, PDCP i DM-PDCP ne postoji metabolički rizik. Za ostale ispitivane supstance sa višim vrednostima particionog koeficijenta, kao i za sve potencijalne metabolite predviđen je metabolički rizik posredovan enzimom CYP3A4. Za ispitivane supstance sa izobutil-, pentil- ili izopentil alkil nizom na estarskim funkcionalnim grupama uz navedeno u ukupnom metaboličkom riziku dominira i klirens. Kod oficinalnih lekova dominira metabolizam posredstvom enzima CYP1A2.

Parametri toksičnosti (tabela 4.21):

- a) *Tox_hERG_Filter* – potencijalna inhibitorna aktivnost ispitivanih supstanci prema hERG humanim kalijumovim kanalima;
- b) *TOX_hERG* – mera afiniteta ispitivanih supstanci za hERG kalijumove (K⁺) kanale i potencijalna kardotoksičnost izražena kao pIC₅₀ (mol/L) (pIC₅₀ je negativni logaritam od vrednosti IC₅₀);
- c) *Tox_Risk* - broj potencijalnih problema koje sa toksičnošću mogu imati ispitivane supstance;
- d) *Tox_Code* - Ukupni rizik kada je toksičnost u pitanju (oznaka Hp označava hepatotoksičnost; oznaka hE označava afinitet za kalijumove kanale; oznaka ra označava akutnu toksičnost merenu na pacovima; oznaka Xr označava kardiotoksičnost kod pacova; oznaka Mu označava mutagenost).

Tabela 4.21: Pregled vrednosti parametara toksičnosti određenih primenom *ADME(T) predictor-a* (broj u zagradi označava stepen verovatnoće prikazanog predviđanja)

Ispitivana supstanca	TOX_hERG_Filter	TOX_hERG	TOX_Risk	TOX_Code
EDCP	Netoksičan (97%)	3,94	1	Hp
DM-EDCP	Toksičan (76%)	5,41	1	Hp
DE-EDCP	Toksičan (80%)	5,62	1	Hp
DP-EDCP	Toksičan (83%)	5,72	1	Hp
DB-EDCP	Toksičan (93%)	6,02	2	hE, Hp
DIB-EDCP	Toksičan (94%)	6,03	2	hE, Hp
PDCP	Netoksičan (82%)	4,11	1	Hp
DM-PDCP	Toksičan (80%)	5,51	1	Hp
DE-PDCP	Toksičan (85%)	5,73	0	
DP-PDCP	Toksičan (88%)	5,82	1	Hp
DB-PDCP	Toksičan (96%)	6,12	2	hE, Hp
DIB-PDCP	Toksičan (97%)	5,89	1	hE, Hp
DPE-PDCP	Toksičan (94%)	6,02	2	hE, Hp
DIPE-PDCP	Toksičan (96%)	6,12	2	hE, Hp
laktam-karboksilat ^a	Netoksičan (82%)	3,42	1	Hp
laktam-metilestar ^b	Netoksičan (67%)	5,0	1	Hp
laktam-etilestar ^c	Netoksičan (67%)	5,16	1	Hp
laktam-propilestar ^d	Netoksičan (67%)	5,22	1	Hp
laktam-butilestar ^e	Toksičan (71%)	5,38	1	Hp
Cisplatin	Netoksičan (98%)	4,03	3	ra, Hp, Mu
Karboplatin	Netoksičan (97%)	2,61	3	ra, Xr, Mu
Oksaliplatin	Netoksičan (97%)	2,87	3	ra, Hp, Mu
Satraplatin	Toksičan (96%)	4,36	2	ra, Mu

a = potencijalni metabolit EDCP-a; b = potencijalni metabolit DM-EDCP-a; c = potencijalni metabolit DE-EDCP-a;

d = potencijalni metabolit DP-EDCP-a i e = potencijalni metabolit DB-EDCP-a

U tabeli 4.21 dati su rezultati predviđanja parametara toksičnosti za ispitivane supstance, potencijalne metabolite i posmatrane oficinalne lekove.

Rezultati predviđanja ukazuju da ispitivane supstance karakteriše toksičnost, međutim, *ADME(T) predictor*-om za iste nije predviđen visok stepen rizika.

Za većinu ispitivanih supstanci, kao i za potencijalni metabolit laktam-butilestar predviđena je inhibitorna aktivnost prema hERG humanim kalijumovim kanalima. Za kiseline EDCP i PDCP, potencijalne metabolite (osim laktam-butilestra) i oficinalne lekove (osim leka satraplatin) nije predviđena navedena inhibitorna aktivnost.

Kada je u pitanju mera afiniteta ispitivanih supstanci za hERG kalijumove (K^+) kanale i potencijalna kardotoksičnost, uočava se da su za oficinalne lekove karboplatin i oksaliplatin predviđene najniže vrednosti parametra pIC_{50} . Predviđene su niže vrednosti ovog parametra i za ispitivane supstance i potencijalne metabolite sa niskim vrednostima particionog koeficijenta: EDCP, PDCP i laktam-karboksilat.

Broj potencijalnih problema koje sa toksičnošću mogu imati ispitivane supstance i potencijalni metaboliti je nizak i niži je u odnosu na posmatrane oficinalne lekove. Ovo ukazuje na potencijalno veću bezbednost ispitivanih supstanci u odnosu na oficinalne lekove, odnosno na manji broj neželjenih efekata što predstavlja prednost u odnosu na opšte prihvaćen princip odobravanja lekova *risk-based approach*.

Rezultati predviđanja ukupnog rizika ukazuju na hepatotoksičnost svih ispitivanih supstanci i potencijalnih metabolita, osim ispitivane supstance DE-PDCP. Takođe, rezultati ukazuju na interakciju sa kalijumovim kanalima i hERG toksičnost, odnosno na poremećaj srčanog ritma koji mogu izazvati supstance sa butil-, izobutil-, pentil- i izopentil estrom: DB-EDCP, DIB-EDCP, DB-PDCP, DIB-PDCP, DPE-PDCP i DIPE-PDCP. Za sve posmatrane oficinalne lekove predviđen je viši stepen ukupnog rizika u odnosu na ispitivane supstance i potencijalne metabolite.

Ujedno, za sve oficinalne lekove predviđena je i akutna toksičnost merena na pacovima. Za karboplatin je predviđena i kardiotoksičnost, a za cisplatin i oksaliplatin hepatotoksičnost.

⇒ **Parametri ukupnog ADMET-a (tabela 4.22):**

- a) *ADMET_Risk* - broj potencijalnih rizika u ukupnom ADMET-u;
 b) *ADMET_Code* - ukupni ADMET rizik (oznake 1A , 3A, hE, ra, Hp, Mu su napred objašnjene).

Tabela 4.22: Pregled vrednosti ukupnih ADMET parametara određenih primenom *ADME(T) predictor-a*

Ispitivana supstanca	<i>ADMET_Risk</i>	<i>ADMET_Code</i>
EDCP	1	Hp
DM-EDCP	1	Hp
DE-EDCP	2	3A, Hp
DP-EDCP	2	3A, Hp
DB-EDCP	3	3A, hE, Hp
DIB-EDCP	3	3A, hE, Hp
PDCP	1	Hp
DM-PDCP	1	Hp
DE-PDCP	1	3A
DP-PDCP	2	3A, Hp
DB-PDCP	3	3A, hE, Hp
DIB-PDCP	3	3A, hE, Hp
DPE-PDCP	3	3A, hE, Hp
DIPE-PDCP	3	3A, hE, Hp
laktam-karboksilat ^a	2	3A, Hp
laktam-metilestar ^b	2	3A, Hp
laktam-etilestar ^c	2	3A, Hp

Ispitivana supstanca	ADMET_Risk	ADMET_Code
laktam-propilestar ^d	2	3A, Hp
laktam-butilestar ^e	2	3A, Hp
Cisplatin	3	ra, Hp, Mu
Karboplatin	4	1A, ra, Xr, Mu
Oksaliplatin	3	ra, Hp, Mu
Satraplatin	3	1A, ra, Mu

a = potencijalni metabolit EDCP-a; b = potencijalni metabolit DM-EDCP-a; c = potencijalni metabolit DE-EDCP-a;

d = potencijalni metabolit DP-EDCP-a i e = potencijalni metabolit DB-EDCP-a

U tabeli 4.22 dati su rezultati predviđanja ukupnih *ADMET* parametara za ispitivane supstance, potencijalne metabolite i posmatrane oficinalne lekove.

Predviđeni broj *ADMET* rizika za ispitivane supstance i potencijalne metabolite nije visok i kreće se u rasponu 1-3, a raste uz porast dužine alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama ispitivanih supstanci – najviši je za ispitivane supstance sa butil-, izobutil-, pentil- i izopentil alkil radikalima: DB-EDCP, DIB-EDCP, DB-PDCP, DIB-PDCP, DPE-PDCP i DIPE-PDCP. Za posmatrane oficinalne lekove predviđen broj *ADMET* rizika je 3 i 4.

Kada je u pitanju ukupni *ADMET* rizik, sve ispitivane supstance i potencijalni metaboliti pokazuju hepatotoksičnost, osim DE-PDCP. Ujedno, ispitivane supstance i potencijalni metaboliti, osim onih sa najnižim vrednostima particionog koeficijenta (EDCP, DM-EDCP, PDCP i DM-PDCP) pokazuju rizik u metaboličkim reakcijama povezan sa enzimom CYP3A4.

4.4.3 Rezultati molekulskih *docking* studija

Docking studijama su bile obuhvaćene sve ispitivane supstance i potencijalni metaboliti predviđeni primenom *Metabolizer-a*.

Cilj *docking* studija bio je da se otkrije ciljno mesto putem kojeg ispitivane supstance ostvaruju citotoksični efekat.

Odabir ciljnih mesta vršen je u odnosu na rezultate prethodno izvedenih *in vitro* ispitivanja na ćelijskim linijama sa ispitivanim supstancama (ćelijska linija akutne promijelocitne leukemije HL-60 i ćelijska linija humanog glioma U251 su se pokazale kao najosetljivije na citotoksično delovanje nosintetisanih supstanci) i na osnovu podataka iz literature o ostvarivanju antiproliferativnog dejstva dostupnih terapeutika.

Ispitana su ciljna mesta čije su kristalografske strukture dostupne u proteinskoj bazi podataka (PDB). Iz navedene baze podataka preuzimane su kristalografske strukture odgovarajućeg ciljnog mesta u pdb formatu, a potom su obrađivane. Prvi korak u obradi bio je razdvajanje strukture liganda koji je kokristalisao sa ciljnim mestom u preuzetoj kristalografskoj strukturi i ciljnog mesta. Razdvojene strukture liganda i ciljnog mesta sačuvane su u pdbqt formatu. *Grid box* je definisan na osnovu pozicije liganda u strukturi kokristala. Prikazane koordinate su korišćene za *docking* studiju svih ispitivanih supstanci i predviđenih metabolita.

Primećeno je da je afinitet vezivanja među ispitivanim supstancama najveći za kiseline ili estre sa račvastim alkil nizom, a posebno visok afinitet vezivanja za ispitana ciljna mesta pokazali su potencijalni metaboliti laktam-karboksilat i laktam-izobutil estar. Afinitet vezivanja je bio vrlo sličan ligandima, a za matriks-metaloproteaze pokazan je veći afinitet vezivanja ispitivanih supstanci nego što je afinitet vezivanja liganada iz kokristalografske strukture.

Navedena ciljna mesta grupisana su na sledeći način:

- ⇒ ciljna mesta uključena u signalne ćelijske puteve (različite protein kinaze),
- ⇒ ciljna mesta - matriks-metaloproteaze i
- ⇒ ciljna mesta uključena u mitohondrijalni put smrti (tabela 4.23).

Ispitivane supstance, koje su u interakciji sa posmatranim ciljnim mestima pokazale najveći afinitet vezivanja (*binding affinity* < - 8 kcal/mol) uz zadovoljavajuću vrednost validacionog parametra (RMSD < 2 Å) date su u tabeli 4.23. Vrednost RMSD predstavlja meru preklapanje konformacije liganda iz kokristala sa ciljnim mestom (koja je određena primenom *X-ray* difrakcije) sa konformacijom iz *docking*-studije (dokovana poza).

Sa ciljem otkrivanja značajnih interakcija i farmakofora koje u njima učestvuju urađena je vizuelizacija uz pomoć računarskog programa *Discovery Studio Visualizer*-a. Za vizuelizaciju su odabrane interakcije između ispitivanih supstanci i ciljnog mesta, koje imaju najviši afinitet vezivanja. Paralelno, u cilju poređenja, urađena je vizuelizacija interakcije između ciljnog mesta i liganda iz kokristalografske strukture.

Na slikama koje slede mogu se videti navedene interakcije uz sledeće podatke: koje funkcionalne grupe na ispitivanim supstancama i na ligandu ulaze u interakciju sa odgovarajućim ciljnim mestom, kao i koji aminokiselinski ostaci na ciljnom mestu učestvuju u interakciji.

Tabela 4.23: Rezultati *docking*-studija

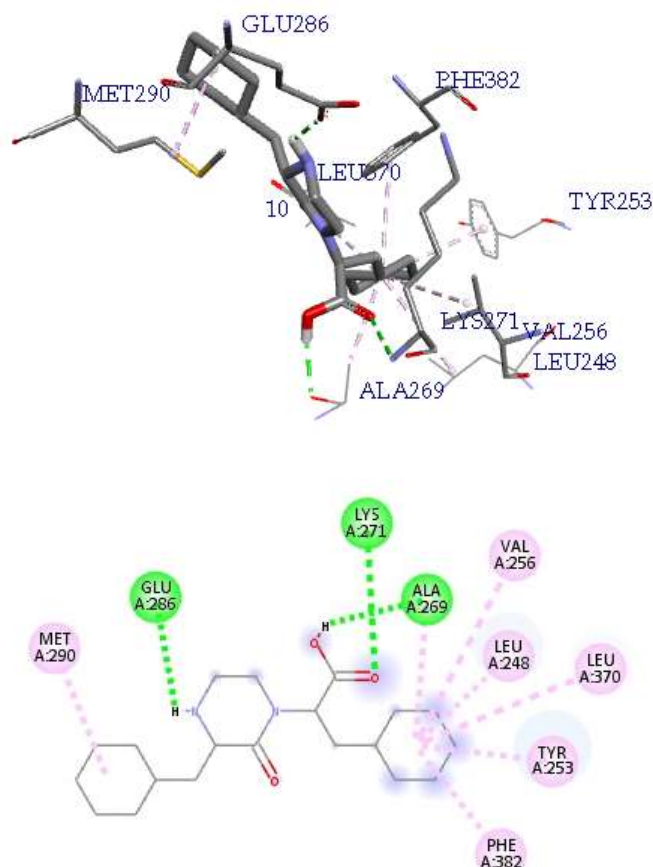
PDB	Ligand	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	Ispitivana supstanca	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	Metabolit (Metabolizer)	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	RMSD
Signalni putevi							
3IK3	Ponatinib	-11,3	PDCP	-8,1	/	/	1,4
			PDCP	-8,7			
2HYY	Imatinib	-12,6	EDCP	-8,5	Laktam-karboksilat	-10,3	1,1
			DM-PDCP	-8,4			
1OPK	Ligand	-11,1	PDCP	-8,1	Laktam-karboksilat	-9,0	0,9
			EDCP	-8,1			
3CS9	Nilotinib	-14,6	PDCP	-9,2	Laktam-karboksilat	-9,1	0,2
			DIB-PDCP	-8,9			
3MS9	Imatinib	-14,0	PDCP	-8,7	Laktam-karboksilat	-10,2	0,3
			DM-PDCP	-8,7			
4R5Y	Ligand	-14,1	DIPE-PDCP	-8,2	/	/	0,4
3O96	Ligand	-14,3	DIB-EDCP	-8,7	Laktam-izobutilestar	-9,9	0,4

PDB	Ligand	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	Ispitivana supstanca	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	Metabolit (Metabolizer)	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	RMSD
Signalni putevi							
3HEC	Imatinib	-12,2	PDCP	-8,2	/	/	1,9
			DE-EDCP	-8,1			
			DIB-PDCP	-8,1			
3BV2	Ligand	-14,8	DM-PDCP	-8,3	/	/	0,5
			DIB-PDCP	-8,3			
2QYQ	Ligand	-7,0	EDCP	-7,1	Laktam-metilestar	-7,7	1,9
			PDCP/DP-PDCP	-7,0	Laktam-karboksilat	-7,6	
3OG7	Ligand	-11,5	DIB-PDCP	-8,7	/	/	0,4
			DIPE-PDCP	-8,6			
4XEO	Idelalisib	-10,8	DIB-EDCP	-8,6	Laktam-izobutilestar	-9,9	1,2
			EDCP	-8,7			
Matriks-metaloproteaze							
2JIH	Marimastat	-7,6	EDCP	-8,7	/	/	1,9
			PDCP	-8,6			

PDB	Ligand	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	Ispitivana supstanca	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	Metabolit (Metabolizer)	<i>binding affinity</i> (kcal/mol)	RMSD
Matriks-metaloproteaze							
1RMZ	Ligand	-5,2	EDCP	-8,7	Laktam-karboksilat	-9,8	1,2
			PDCP	-8,5			
1GKD	Ligand	-6,8	EDCP	-8,5	/	/	1,1
1GKC	Ligand	-7,0	PDCP	-8,8	/	/	1,6
			EDCP	-8,4			
5CUH	Ligand	-9,9	PDCP	-9,2	/	/	1,2
			EDCP	-8,7			
Mitochondrijalni put apoptoze							
1M6I	Ligand	-14,6	DIB-EDCP	-8,7	Laktam-izobutilestar	-9,2	0,6
4BV6	Ligand	-14,5	PDCP	-8,4	Laktam-izobutilestar	-9,8	0,8
			DIPE-PDCP	-8,5			

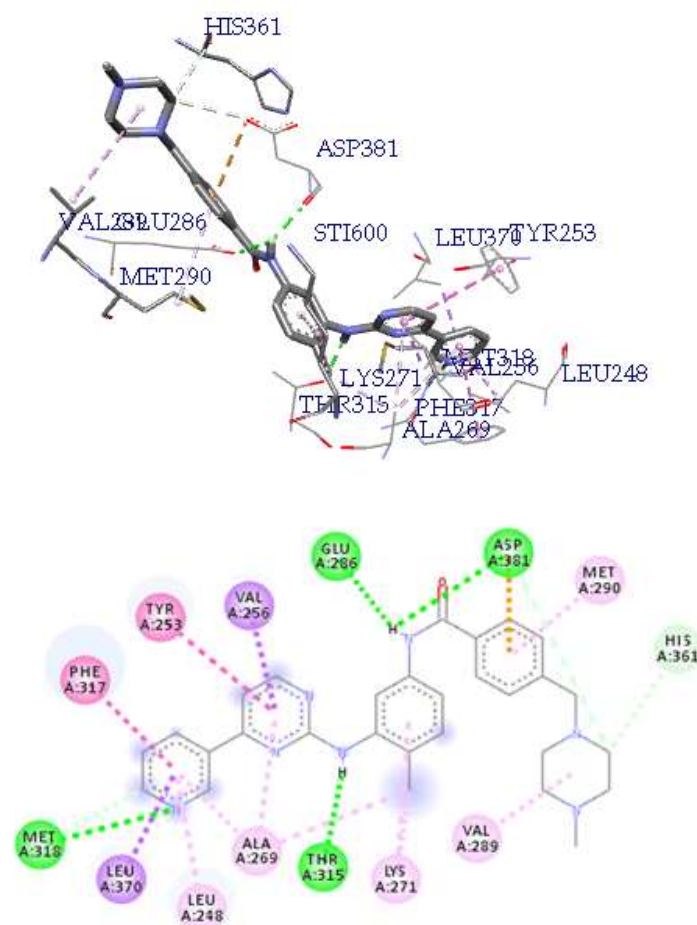
4.4.3.1 Signalni put

a) **Ciljno mesto PDB: 2HYY** (proto-onkogen tirozin kinaze) - među ispitivanim supstancama i potencijalnim metabolitima najjači afinitet vezivanja za navedeno ciljno mesto ima laktam-karboksilat, koji je predviđeni metabolit derivata 1,2-etandiamina. U interakciji sa ciljnim mestom, laktam-karboksilat ostvaruje vodonične veze između slobodne karboksilne grupe i aminokiselinskih ostataka ALA269 i LYS271, kao i između sekundarnog amina koji nije sterno zaklonjen i aminokiselinskog ostatka GLU286 (slika 4.33). Ostalih 6 interakcija su hidrofobne alkil i π -alkil interakcije koje se ostvaruju između cikloheksanskih prstenova i aminokiselinskih ostataka: MET290, VAL256, LEU248, LEU370, TYR253, PHE382. Od 6 ostvarenih hidrofobnih interakcija 5 su na sterno dostupnijem cikloheksanskom prstenu.



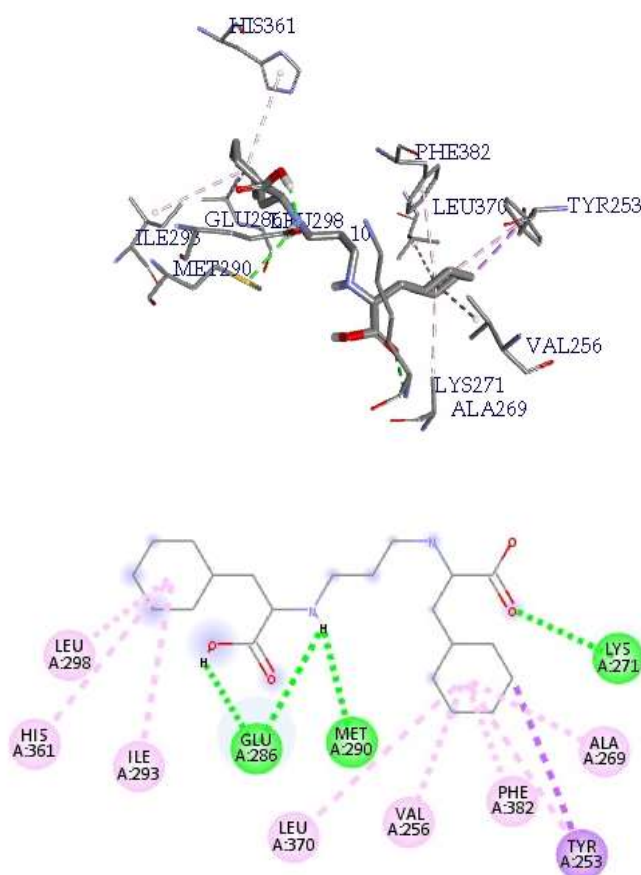
Slika 4.33: Laktam-karboksilat u interakciji sa ciljnim mestom PDB 2HYY

Ligand - Imatinib ima nešto jači afinitet vezivanja u odnosu na laktam-karboksilat. Vodonične veze ostvaruju se između amidskih i aaminskih grupa ili između azota (N) u aromatičnom prstenu liganda i aminokiselinskih ostataka GLU286, ALA269 i LYS271, kao i kod laktam-karboksilata. Hidrofobna C-H interakcija ostvaruje se između ugljenikovog atoma na poziciji C2 piperidina i aminokiselinskog ostatka HIS361. Kod imatiniba je primetan veći broj hidrofobnih interakcija: π -alkil interakcije sa aminokiselinskim ostacima MET290, LEU248, ALA269, LYS271, VAL289 i π - π interakcije sa aminokiselinskim ostacima TYR253, PHE317 i π -sigma interakcije sa aminokiselinskim ostacima VAL256, LEU370 (slika 4.34).



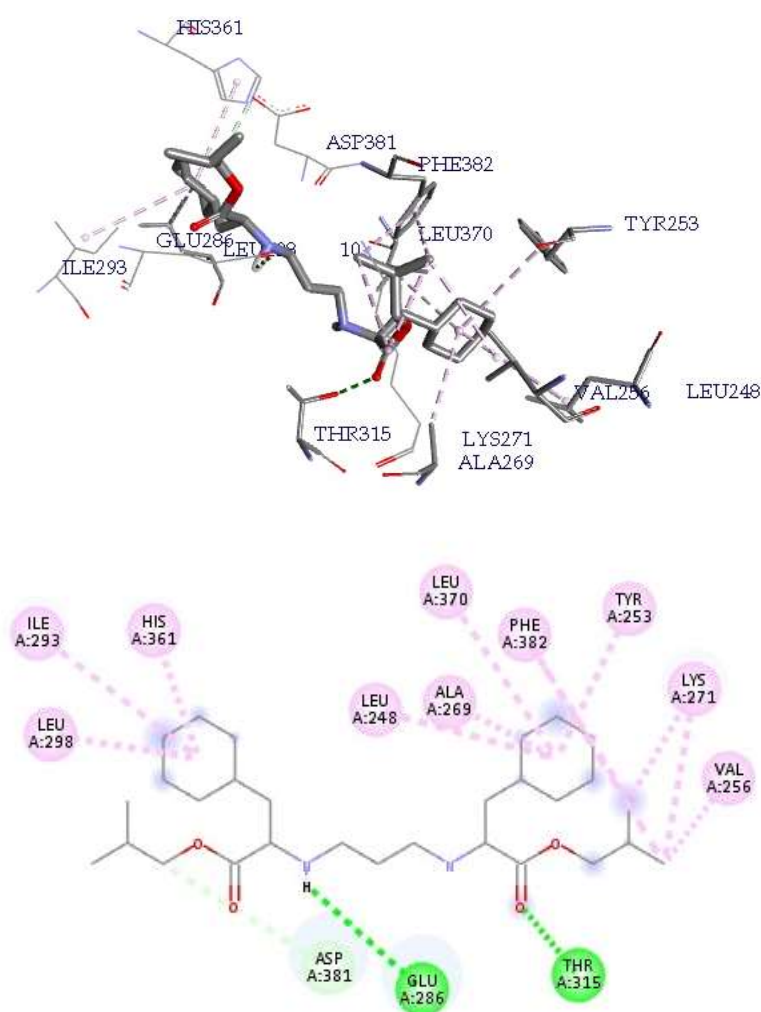
Slika 4.34: Imatinib u interakciji sa ciljnim mestom PDB 2HYY

b) **Ciljno mesto PDB: 3CS9** (proto-onkogen tirozin kinaze) - među ispitivanim supstancama najjači afinitet vezivanja pokazale su PDCP i DIB-PDCP. U interakciji sa ciljnim mestom, PDCP ostvaruje vodonične veze između slobodne karboksilne grupe i aminokiselinskih ostataka GLU286 i LYS271, kao i između sekundarnog amina koji nije sterno zaklonjen i aminokiselinskih ostataka MET290 i GLU286 (slika 4.35). Aminokiselinski ostatak GLU286 ostvaruje vodonične veze i sa karboksilnom grupom i sa sekundarnim aminom istovremeno. Ostalih 8 interakcija su hidrofobne π -alkil interakcije koje se ostvaruju između cikloheksanskih prstena i aminokiselinskih ostataka: LEU298, HIS361 i LEU293, LEU370, VAL256, PHE382, ALA269 i hidrofobne π -sigma interakcije sa aminokiselinskim ostatkom TYR253.



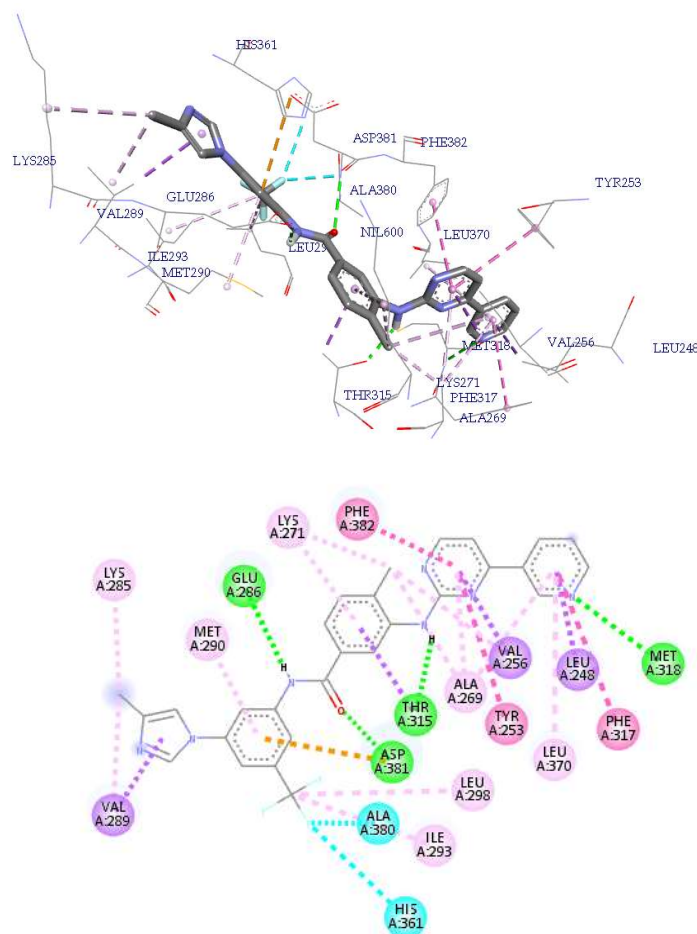
Slika 4.35: PDCP u interakciji sa ciljnim mestom PDB 3CS9

Između ispitivane supstance DIB-PDCP i posmatranog ciljnog mesta ostvaruju se vodonične veze između sekundarnog amina i aminokiselinskog ostatka GLU286 i između kiseonika na estarskoj vezi i aminokiselinskog ostatka THR325. Potom, ostvaruje se hidrofobna C-H interakcija između alfa C atoma estraske veze i aminokiselinskog ostatka ASP381. Prisutno je ukupno 10 hidrofobnih alkil i π -alkil interakcija sa aminokiselinskim ostacima: LEU298 i LEU293, HIS361, LEU248, ALA269, LEU370, PHE382, TYR253, LYS271, VAL256 (slika 4.36).



Slika 4.36: DIB-PDCP u interakciji sa ciljnim mestom PDB 3CS9

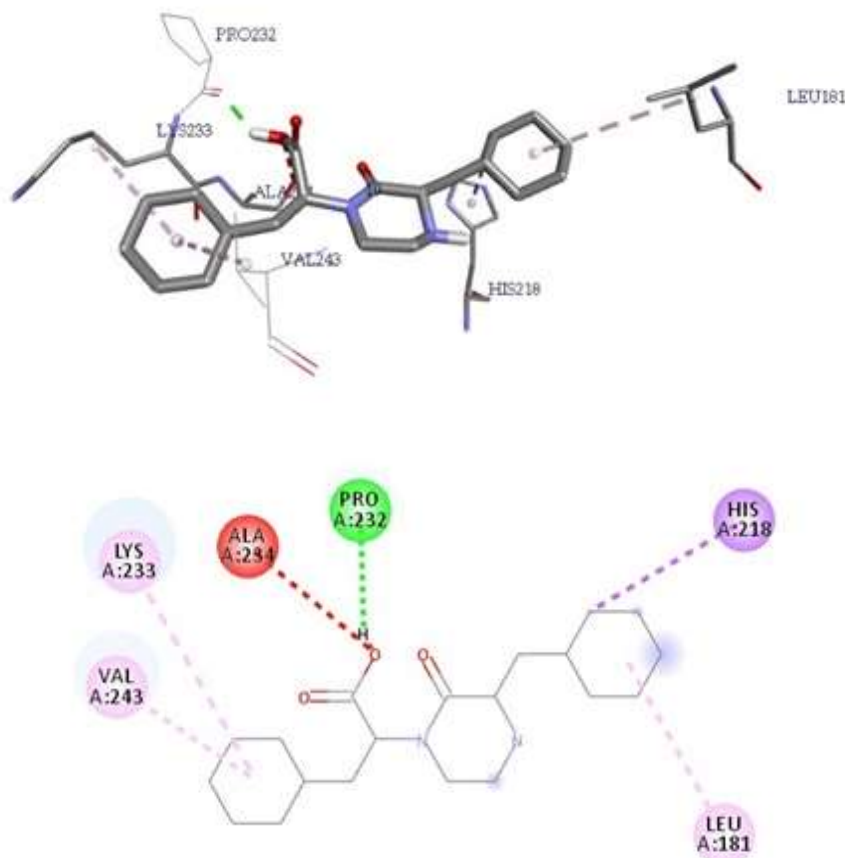
Nilotinib ima veći broj interakcija sa posmatranim ciljnim mestom (slika 4.37). Vodonične veze uspostavljaju se između azota na amidskoj grupi i između kiseonika na istoj amidskoj grupi sa aminokiselinskim ostacima GLU286 i ASP381, potom, između azota na sekundarnom aminu i aminokiselinskog ostatka THR315 i između azota na piridinu i aminokiselinskog ostatka MET318. Prisutne su dve halogene interakcije između fluora i aminokiselinskih ostataka ALA380 i HIS361, potom hidrofobne interakcije alkil i π -alkil sa aminokiselinskim ostacima: ILE293, LEU298, ALA269, LEU370, LYS271, MET290, LYS285, zatim hidrofobne alkil i π -sigma interakcije sa aminokiselinskim ostacima VAL289, VAL256 i LEU248 i π - π interakcije sa aminokiselinskim ostacima PHE382, TYR253 i PHE317 (slika 4.37).



Slika 4.37: Nilotinib u interakciji sa ciljnim mestom PDB 3CS9

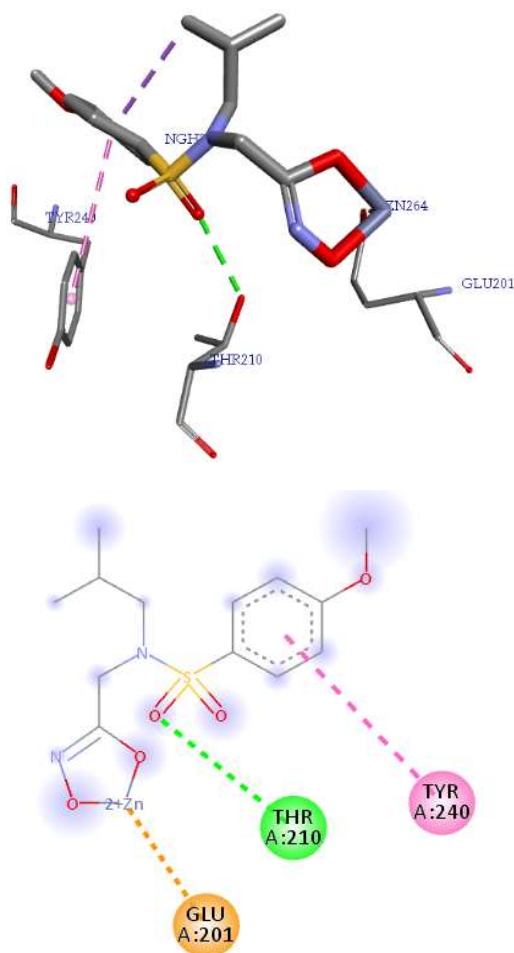
4.4.3.2 Matriks-metaloproteaze

a) Ciljno mesto **makrofagna metaloelastaza (PDB:1RMZ)** – među ispitivanim supstancama najjači afinitet vezivanja pokazao je potencijalni metabolit laktam-karboksilat. U interakciji sa posmatranim ciljnim mestom ostvaruje vodoničnu vezu između slobodne karboksilne grupe i aminokiselinskog ostatka PRO232. Ostale interakcije sa ciljnim mestom su hidrofobne: nepovoljna akceptor-akceptor interakcija sa aminokiselinskim ostatkom ALA234, potom π -sigma interakcija sa aminokiselinskim ostatkom HIS218 i alkil interakcije sa LEU181, VAL243 i LYS233 (slika 4.38).



Slika 4.38: Laktam karboksilat u interakciji sa ciljnim mestom PDB 1RMZ

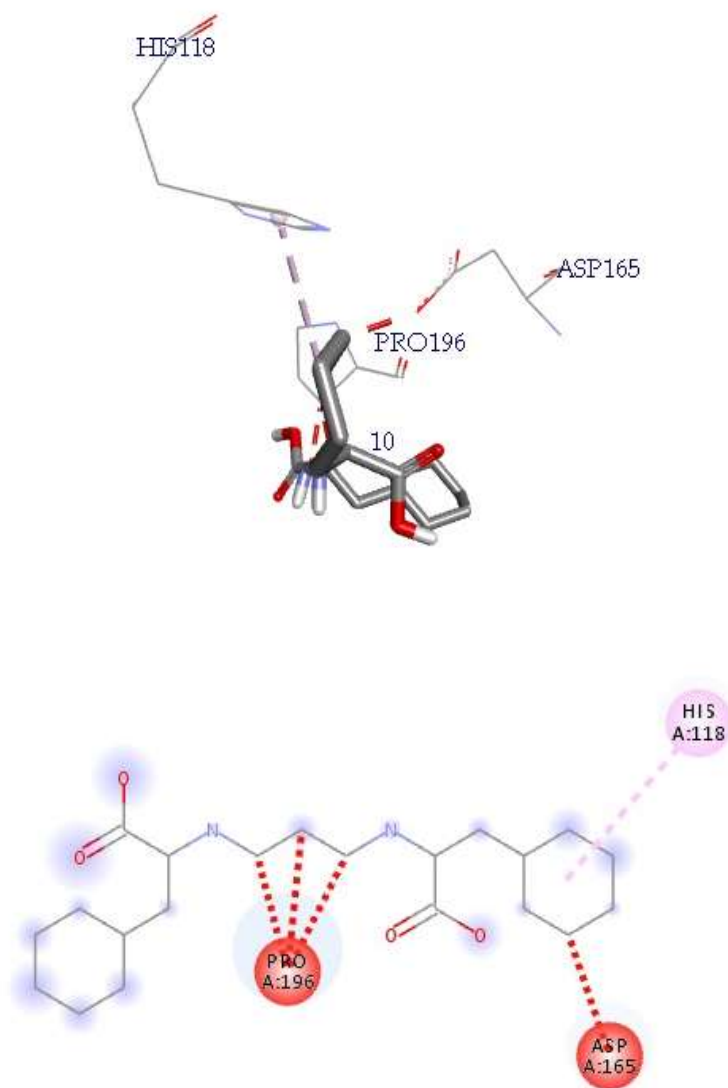
Ligand izdvojen iz kristalografske strukture sa ciljnim mestom ostvaruje vodoničnu vezu sa aminokiselinskim ostatkom THR210, potom hidrofobnu π - π interakciju sa aminokiselinskim ostatkom TYR240 i jonsku interakciju sa aminokiselinskim ostatkom GLU201 (slika 4.39).



Slika 4.39: Ligand u interakciji sa ciljnim mestom PDB 1RMZ

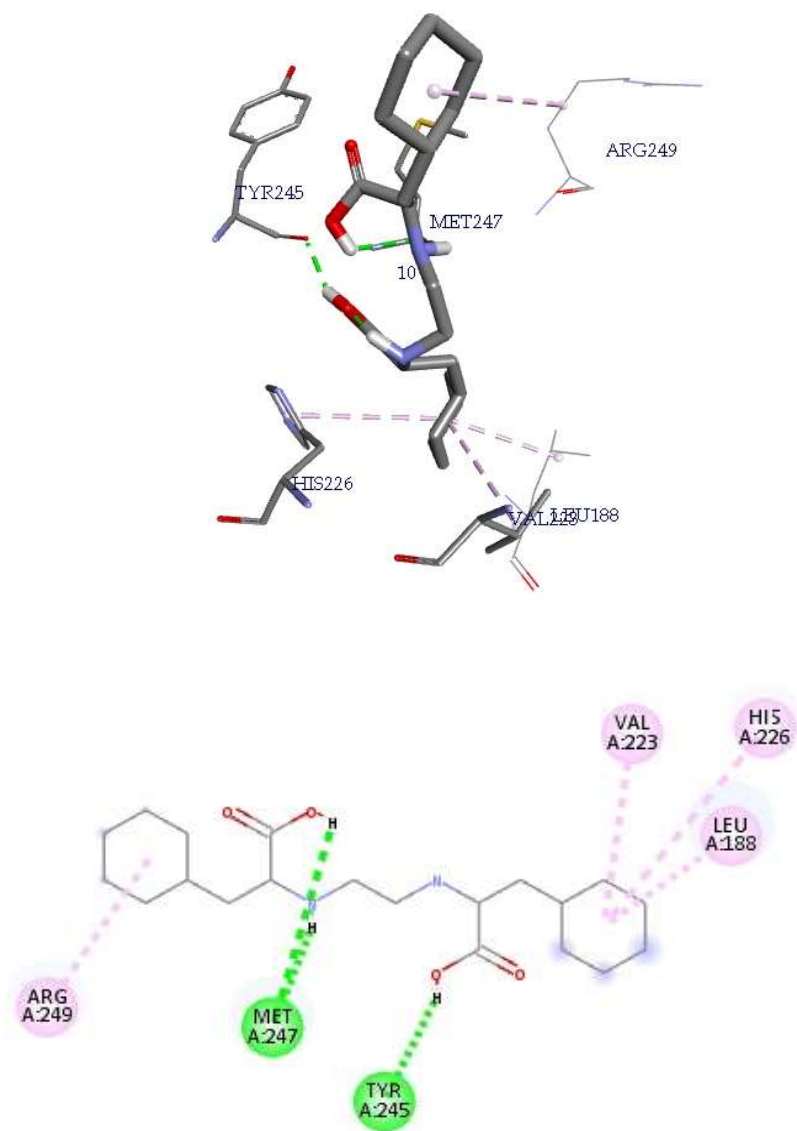
Laktam-karboksilat ostvaruje veći broj interakcija sa ciljnim mestom i ima veći afinitet vezivanja za ciljno mesto u odnosu na ligand koji je sa ciljnim mestom kokristalisao.

b) Ciljno mesto **matriks-metaloproteaza MMP-9 (PDB:5CUH)** – među ispitivanim supstancama najjači afinitet vezivanja pokazuju PDCP i EDCP. PDCP pokazuje veći afinitet vezivanja iako ne ostvaruje vodonične veze sa ciljnim mestom. Ostvaruje jednu hidrofobnu alkil inetrakciju sa aminokiselinskim ostatkom HIS118 i dve energetski nepovoljne interakcije sa aminokiselinskim ostacima PRO196 i ASP165 (slika 4.40).



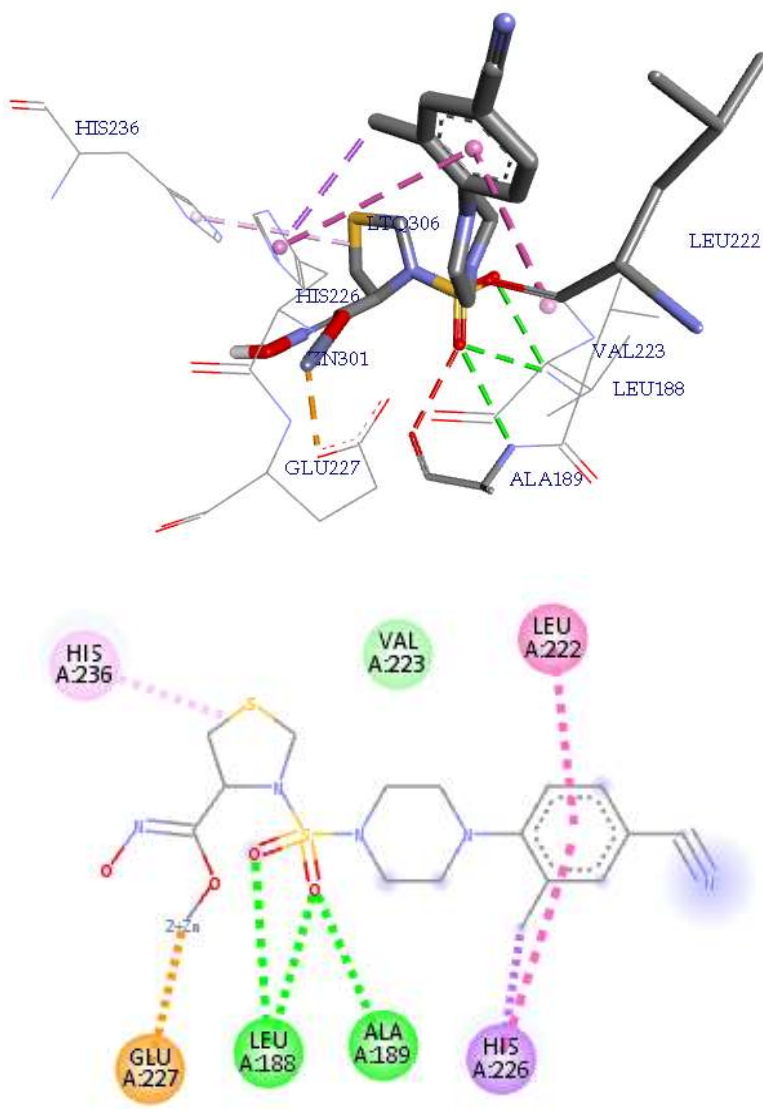
Slika 4.40: PDCP u interakciji sa ciljnim mestom PDB 5CUH

EDCP ostvaruje vodonične veze između karboksilne grupe i aminokiselinskog ostatka MET247, odnosno TYR245. Hidrofobne alikil interakcije ostvaruju se između cikloheksanskog prstena i aminokiselinskog ostatka ARG249, odnosno, između sterno dostupnijeg cikloheksanskog prstena i aminokiselinskih ostataka: VAL223, HIS226 i LEU188 (slika 4.41).



Slika 4.41: EDCP u interakciji sa ciljnim mestom PDB 5CUH

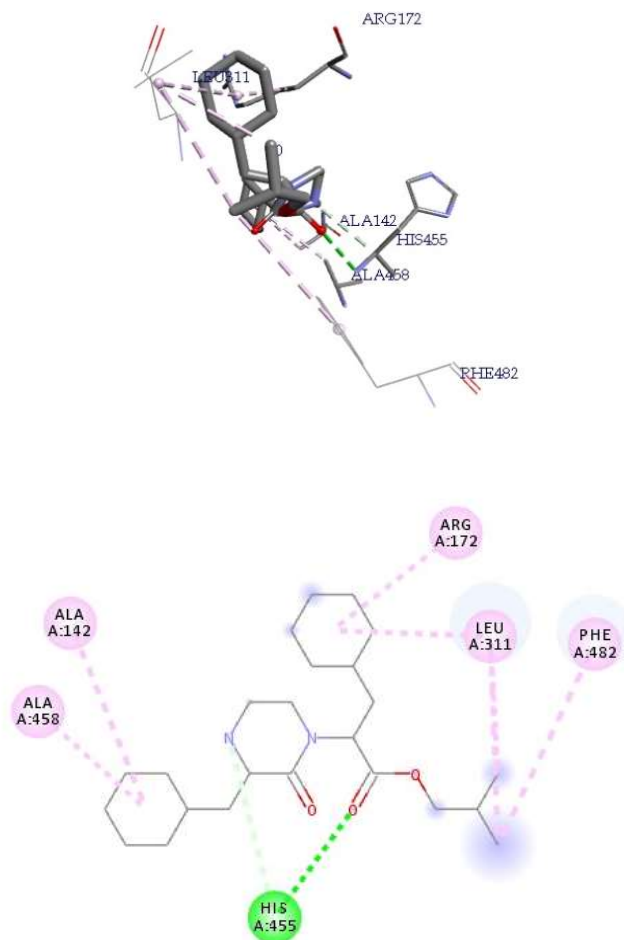
Ligand izdvojen iz kristalografske strukture sa ciljnim mestom ostvaruje van der Valsove interakcije sa aminokiselinskim ostatkom VAL223, potom hidrofilne vodonične interakcije sa aminokiselinskim ostacima LEU188 i ALA189. Hidrofobnu π -sigma interakciju ostvaruje sa aminokiselinskim ostatkom HIS226, amidsku π -interakciju sa aminokiselinskim ostatkom LEU222 i π -alkil interakciju sa aminokiselinskim ostatkom HIS236 (slika 4.42).



Slika 4.42: Ligand u interakciji sa ciljnim mestom PDB 5CUH

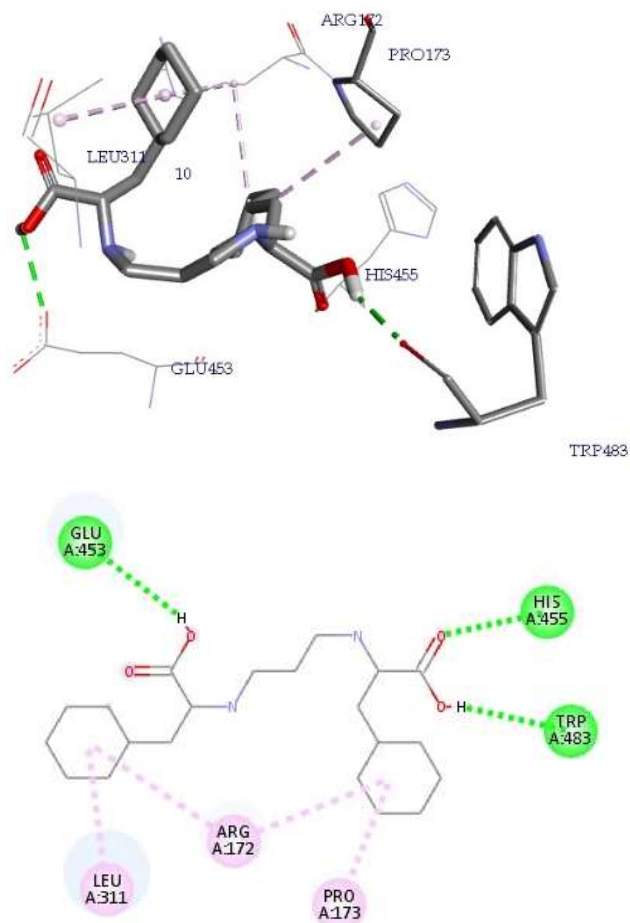
4.4.3.3 Mitohondrijalni put

Ispitan je afinitet vezivanja za ciljno mesto AIF (PDB: 4BV6) zbog pretpostavljenog mitohondrijalnog puta apoptoze od strane autora koji su ispitivali citotoksičnu aktivnost novosintetisanih supstanci na ćelijskim linijama.^{1,2} Među ispitivanim supstancama, najveći afinitet vezivanja pokazao je predviđeni metabolit laktam-izobutilestar (predviđeni metabolit ispitivane supstance DIB-EDCP). Ovo jedinjenje ostvaruje vodonične veze sa aminokiselinskim ostatkom HIS455, a u ovim interakcijama učestvuju azot iz laktamskog prstena i kiseonik iz karboksilne grupe. Ostale interakcije su hidrofobne alkil i π -alkil interakcije sa sledećim aminokiselinskim ostacima: ALA458, ALA142, ARG172, LEU311 i PHE482 (slika 4.43).



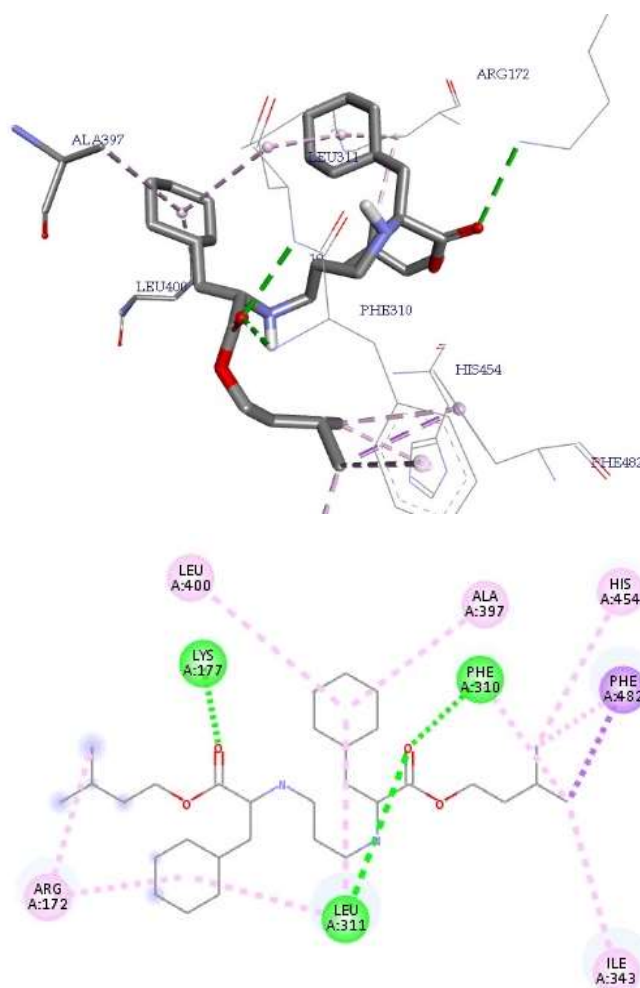
Slika 4.43: Laktam izobutilestar u interakciji sa ciljnim mestom PDB 4BV6

Kiselina PDCP takođe pokazuje afinitet vezivanja za posmatrano ciljno mesto. U interakciji PDCP i ciljnog mesta ostvaruju se vodonične veze između obe karboksilne grupe i aminokiselinskih ostataka GLU453, HIS455 i TRP483. Hidrofobne alkil i π -alkil interakcije ostvaruju se između cikloheksanskih prstena i sledećih aminokiselinskih ostataka: LEU311, ARG172 i PRO173 (slika 4.44).



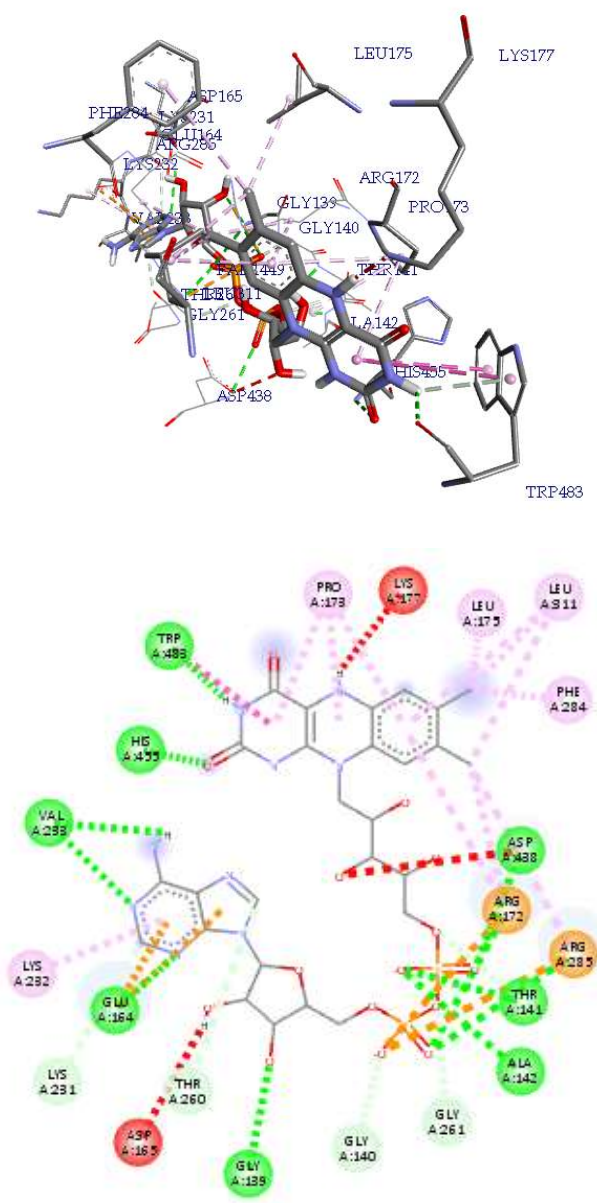
Slika 4.44: PDCP u interakciji sa ciljnim mestom PDB 4BV6

Ispitivana supstanca DIPE-PDCP pokazala je specifičnu permeabilnost na veštačkoj membrani BBB-a. U sprovedenim *docking* studijama pokazala je visok afinitet vezivanja za posmatrano ciljno mesto (PDB 4BV6). U interakciji sa navedenim ciljnim mestom ostvaruje vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima LYS177, LEU311 i PHE310. Takođe, ostvaruje i hidrofobne alkil i π -alkil interakcije sa sledećim aminokiselinskim ostacima: ARG172, LEU400, ALA397, HIS454 i LE343 i π -sigma interakciju sa aminokiselinskim ostatkom PHE482 (slika 4.45).



Slika 4.45: DIPE-PDCP u interakciji sa ciljnim mestom PDB 4BV6

Ligand izdvojen iz kristalografske strukture ostvaruje brojne interakcije sa ciljnim mestom. Vodonične veze uspostavlja sa sledećim aminokiselinim ostacima: TRP483, THR141, ALA142, VAL233, ASP438, GLU164, GLY139 i HIS455. Energetski nepovoljne interakcije ostvaruje sa aminokiselinim ostacima LYS177 i ASP165. Hidrofilne π -donor interakcije ostvaruje sa aminokiselinim ostacima LYS231, THR260, GLY140, GLY261. Hidrofobne alkil i π -alkil interakcije ostvaruje sa sledećim aminokiselinim ostacima: PRO173, LEU175, LEU311, PHE284, LYS232 (slika 4.46).



Slika 4.46: Ligand u interakciji sa ciljnim mestom PDB 4BV6

- U izvedenim *docking* studijama identifikovane su ključne interakcije:
- ⇒ Vodonične veze karboksilnih grupa i sekundarnog amina sa aminokiselinskim ostacima na ciljnim mestima;
 - ⇒ Hidrofobne alkil i π -alkil interakcije između cikloheksil funkcionalne grupe i aminokiselinskih ostataka na ciljnim mestima;
 - ⇒ Nespecifične interakcije između CH- grupa i aminokiselinskih ostataka na ciljnim mestima.

Na osnovu prikazanih rezultata dobijenih u sprovedenim *docking* studijama može se pretpostaviti da ispitivane supstance antiproliferativno dejstvo ostvaruju putem više mehanizama (ćelijski signalni put, matriks-metaloproteaze i mitohondrijalni put).

4.4.4 Predviđanje bioraspoloživosti i molekularnog mehanizma citotoksičnog dejstva ispitivanih supstanci na osnovu rezultata *in vitro/in silico* karakterizacije

U ranije sprovedenim ispitivanjima sa 1,2-etandiaminskim derivatima nije pokazana direktna veza između antiproliferativnog/citotoksičnog potencijala i dužine alkil radikala na estarskoj funkcionalnoj grupi (DB-EDCP ima istu aktivnost kao i EDCP).^{1,38}

Kod derivata 1,3-propandiamina u ranije sprovedenim istraživanjima, zapažena je direktna zavisnost antiproliferativnog/citotoksičnog potencijala i dužine alkil radikala na estarskoj funkcionalnoj grupi sve do *n*-butil radikala. Daljim produžavanjem alkil radikala na estarskoj funkcionalnoj grupi aktivnost je opadala.^{2,80}

Na osnovu izvedenih ispitivanja u sklopu ove doktorske disertacije i dobijenih rezultata, može se pretpostaviti da je esterifikacija ispitivanih supstanci neophodna kako bi se osigurala njihova optimalna lipofilnost. Produžetak niza radikala na estarskoj funkcionalnoj grupi otežava hidrolizu, estri su stabilniji, a aktivnost takvih jedinjenja je manja.

Ujedno, ni membranska permeabilnost ispitivanih supstanci ne raste sa uvećanjem dužine alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama. Navedeno ukazuje na hipotezu da su aktivne kiseline i neki od potencijalnih metabolita (laktam-karboksilat i laktam-alkilestar), a estri su *pro drug* supstance.

Na oba membranska modela (GIT i BBB) ispitivane supstance DE-EDCP i DE-PDCP pokazale su značajno zadržavanje u membrani ($\approx 99\%$), a u niskom procentu su prolazile kroz membranu. U ranijim istraživanjima pokazano je njihovo citotoksično dejstvo na ćelijskoj liniji HL-60. Navedeno ukazuje na mehanizam dejstva na membranskom nivou ćelija ili membranskom nivou mitohondrija ili pak na transmembranskom nivou.

U sprovedenim *docking* studijama pokazano je sledeće:

- a) Sa ciljnim mestima u ćelijskim signalnim putevima najjače interakcije ostvaruju EDCP, DE-EDCP i DIB-EDCP (među derivatima 1,2-etandiamina), potom PDCP, DM-PDCP, DP-PDCP, DIB-PDCP i DIPE-PDCP (među derivatima 1,3-propandiamina), kao i *Metabolizer*-om predviđeni metaboliti derivata 1,2-etandiamina: laktam karboksilat i laktam-izobutilestar.
- b) Sa ciljnim mestom AIF u mitohondrijalnom putu apoptoze najjače interakcije ostvaruju DIB-EDCP (među derivatima 1,2-etandiamina) i njegov potencijalni metabolit laktam-izobutilestar, kao i PDCP i DIPE-PDCP (među derivatima 1,3-propandiamina).
- c) Sa ciljnim mestima matriks-metaloproteaze najjače interakcije ostvaruju kiseline PDCP, EDCP i potencijalni metabolit 1,2-etandiaminskih derivata: laktam-karboksilat.

Afinitet vezivanja ispitivanih supstanci za posmatrana ciljna mesta je visok što ukazuje na hipotezu da ispitivane supstance svoje antiproliferativno delovanje ispoljavaju putem nekoliko mehanizama. Treba naglasiti i ograničenost *docking* studija, jer u PDB bazi nisu dostupne kristalografske strukture svih potencijalnih ciljnih mesta.

Primenom pravila iz poglavlja 1.1.2 za predviđanje CNS aktivnosti, sve ispitivane supstance imaju po 6 atoma azota i kiseonika ($2N + 2 \times 2O$) što ukazuje na njihovu manju CNS aktivnost. Ujedno, razlika: $\text{LogP} - (\text{broj atoma kiseonika i azota u molekuli})$ nije pozitivna što takođe ukazuje na manju CNS aktivnost ispitivanih supstanci. Međutim, poznato je da su ispitivane supstance pokazale citotoksičnu aktivnost u *in vitro* ispitivanjima na ćelijskim linijama glioma.

U budućim istraživanjima potrebno je:

- ⇒ ispitati citotoksičnu aktivnost derivata 1,2-etandiamina na ćelijskoj liniji U251;
- ⇒ ispitati citotoksičnu aktivnost svih derivata 1,3-propandiamina na posmatranim ćelijskim linijama, posebno derivata DIPE-PDCP na ćelijskim linijama glioma;
- ⇒ ispitati postojanje metabolita laktam-karboksilata i laktam-alkilestra u biološkom materijalu;
- ⇒ izvršiti preklinička ispitivanja sa dietilestarskim derivatima 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina.

5 ZAKLJUČAK

↻ Izvršen je razvoj i validacija bioanalitičke metode za fazu pretkliničkih ispitivanja dietil estra 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i potencijalnog metabolita 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline uz primenu internog standarda dibutil estra 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline:

- a) Ispitano je više načina za ekstrakciju ispitivanih supstanci iz biološkog materijala i odabrana je metoda precipitacije proteina, koja je i primenjena u postupku njihove kvalitativne i kvantitativne analize;
- b) Razvijena je i validirana nova UHPLC-ESI-MS/MS bioanalitička metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivanih supstanci.
- c) Dobijene vrednosti ispitanih *cross*-validacionih parametara i vrednosti statističkih parametara *Passing and Bablok* regresione analize pokazuju da je razvijena i validirana UHPLC-MS/MS bioanalitička metoda robusna i transferabilna.

↻ Ispitana je rastvorljivost i određeni su parametri lipofilnosti za derivate 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline:

- a) Razvijena metoda uspešno je primenjena za ispitivanje rastvorljivosti ispitivanih supstanci. Na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata rastvorljivosti i rezultata rastvorljivosti dobijenih primenom računarskog programa *MarvinSketch* date su krive zavisnosti kojima je pokazan uticaj pH vodenog rastvora na stepen rastvorljivosti ispitivanih supstanci. Profili rastvorljivosti kiselina i njihovih estara se značajno razlikuju. Kiseline imaju slične profile rastvorljivosti i dobro se rastvaraju u izrazito kiseloj sredini i izrazito baznoj sredini. Profili rastvorljivosti svih estara su takođe slični i estri se dobro rastvaraju u izrazito kiseloj sredini.
- b) Vrednosti particionog koeficijenta *n*-oktanol-voda ($\text{Log}D_{7,4}$) određene su primenom *shake-flask* metode, a kvantitativna analiza u polarnoj i nepolarnoj fazi sistema urađena je primenom razvijene i validirane UHPLC-MS/MS metode.

- c) Hromatografski parametri lipofilnosti (CHI , $\log k$ i φ_0) određeni su primenom razvijene i validirane UHPLC-MS metode.
- d) Uspostavljena je linearna zavisnost između vrednosti partitionog koeficijenta koje su dobijene primenom *shake-flask* metode ($\text{Log}D_{7,4}$) i vrednosti partitionog koeficijenta koje su izračunate na osnovu prethodno određenih hromatografskih parametara lipofilnosti ($\text{Log}P$). Razvijen je matematički model kojim se mogu predvideti vrednosti partitionog koeficijenta ($\text{Log}D_{7,4}$) za potencijalne metabolite ispitivanih supstanci ili za novosintetisane derivate (S,S)-1,2-etandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i (S,S)-1,3-propandiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline na osnovu hromatografskih parametara lipofilnosti. Validacija modela izvršena je primenom *leave-one-out* metode i pokazana je dobra prediktivna moć istog ($Q^2 = 0,89$).

↻ **Određeni su parametri membranske permeabilnosti ispitivanih supstanci:**

- a) Ispitana je membranska permeabilnost na veštačkim membranama GIT-a i BBB-a primenom PAMPA testa. Obe kiseline (EDCP i PDCP) pokazuju nisku permeabilnost i nizak % zadržavanja na obe ispitane veštačke membrane (klasa I permeanata). Esterifikacijom karboksilnih grupa dobijaju se više vrednosti parametara permeabilnosti. Kod dietilestra obe kiseline (DE-EDCP i DE-PDCP) značajno se povećava zadržavanje u membrani, a raste i efektivna membranska permeabilnost. Međutim, sa daljim produžavanjem alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama nije zabeleženo povećanje zadržavanja u membrani ili povećanje permeabilnosti.

↻ **Izvršena je *in silico* biofarmaceutska karakterizacija ispitivanih supstanci:**

- a) Primenom računarskog programa *Metabolizer* predviđeni su dominantni metaboliti i metabolički putevi. Dobijeni potencijalni metaboliti su uključeni u *docking* studiju;
- b) Primenom programa *ADME(T)-predictor* određeni su parametri apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije, toksičnosti, kao i ukupnog *ADMET*

rizika za ispitivane supstance, potencijalne metabolite i oficinalne lekove (cisplatin, karboplatin, oksaliplatin i satraplatin).

Utvrđena je toksičnost ispitivanih supstanci, ali bez visokog stepena rizika. Najmanje lipofilne supstance su okarakterisane kao netoksične.

Za ostale ispitivane supstance predviđena je hepatotoksičnost. Za ispitivane supstance sa butil radikalima na estraskim funkcionalnim grupama predviđena je interakcija sa kalijumovim kanalima i hERG toksičnost. Ukupni *ADMET* rizik nije visok i kreće se u rasponu 1-3, a uvećava se sa produžetkom alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama ispitivanih supstanci.

- c) U izvedenim *docking* studijama identifikovane su ključne interakcije:
- ⇒ Vodonične interakcije karboksilnih grupa i sekundarnog amina sa aminokiselinskim ostacima na ciljnim mestima;
 - ⇒ Hidrofobne alkil i π -alkil interakcije između cikloheksil funkcionalne grupe i aminokiselinskih ostataka na ciljnim mestima;
 - ⇒ Nespecifične interakcije između CH-grupa i aminokiselinskih ostataka na ciljnim mestima.
- d) Za ispitivane supstance je na osnovu dobijenih rezultata postavljen hipotetički mehanizam antiproliferativnog dejstva putem više mehanizama: ćelijski signalni put, matriks-metaloproteaze i mitohondrijalni put.
- e) Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je esterifikacija ispitivanih supstanci neophodna kako bi se osigurala njihova optimalna lipofilnost. Produžavanje alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama nije značajno uticalo ni na membransku peremabilnost ni na citotoksičnu aktivnost. Navedeno ukazuje na hipotezu da citotoksičnu aktivnost ostvaruju kiseline i potencijalni metaboliti derivata 1,2-etandiamina (laktam-karboksilat i laktam-alkilestar), a da su estri *pro drug* supstance. Supstanca DIPE-PDCP pokazala je specifičnu retenciju u membrani BBB-a, kao i interakcije sa ciljnim mestima u *docking* studijama pa bi trebalo njenu aktivnost ispitati i na glioma ćelijama.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da u daljim istraživanjima treba ispitati postojanje metabolita laktam-karboksilata i laktam-alkilestra u biološkom materijalu. Takođe, rezultati opravdavaju inicijativu da se izvrše pretklička ispitivanja sa dietilestarskim derivatima 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina. Za derivate 1,3-propandiamina, posebno za DIPE-PDCP, utvrđen je tokom *in vitro* ispitivanja zadovoljavajući stepen prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, što ukazuje da treba detaljno ispitati njihovu citotoksičnu aktivnost na glioma ćelijama.

Ujedno, dobijeni rezultati predstavljaju adekvatne smernice za dalji pretklički razvoj ispitivanih supstanci u cilju razumevanja mehanizma citotoksičnog dejstva, selekcije najboljih kandidata za nastavak I faze kliničkih ispitivanja, za proučavanje metabolita u *in vivo* uslovima, kao i za sintezu novih derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina.

6 LITERATURA

1. Misirlic Dencic S., Poljarevic J., Vilimanovich U., Bogdanovic A., Isakovic A.J., Kravic Stevovic T., Dulovic M., Zogovic N., Isakovic A.M., Grguric-Sipka S., Bumbasirevic V., Sabo T., Trajkovic V., Markovic I. Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem Res Toxicol.* **2012**, *25*, 931-939.
2. Savić A., Misirlić-Denčić S., Dulović M., Mihajlović-Lalić L.E., Jovanović M., Grgurić-Šipka S., Marković I., Sabo T.J. Synthesis, characterization and ROS-mediated cytotoxic action of novel (S, S)-1, 3-propanediamine-N, N'-di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid and corresponding esters. *Bioorg. Chem.* **2014**, *54*, 73-80.
3. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **2011**, *144*, 646-674.
4. Pavlović D., Kocić G., Đorđević V. Ćelijska signalizacija u kontroli ćelijskog ciklusa, apoptoze i maligne transformacije. *Acta Fac.Med.Naiss.* **2002**; *19 (1)*, 12-18.
5. Pavelić K. Genetski čimbenici i infektivni agensi u etiologiji zloćudnih tumora. *Arh Hig Rada Toksikol.* **2000**, *51*, 23-29.
6. Vučićević L.M. Uloga inhibicije protein-kinaze aktivirane adenozin-monofosfatom u indukciji apoptoze i autofagije u tumorskim ćelijskim linijama. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; **2013**.
7. Sieber O., Heinemann K., Tomlinson I. Genomic stability and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* **2005**, *15(1)*, 61-66. (DOI: [10.1016/j.semcancer.2004.09.005](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.09.005))
8. Hohšteter M., Popović M., Grabarević Ž., Džaja P. Oncogenes and protooncogenes—review of recent researches. *Hrvatski veterinarski vjesnik-Hrvatsko veterinarsko društvo.* **2007**, *30*, 20-24.

9. Čarić A. Caspase 3 immunohistochemical expression in apoptotic cells of serous ovarian tumours, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu; **2009**.
10. Norbury C.J., Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. **2004**, *23*, 2797-2808.
11. Ravindran J., Prasad S., Aggarwal B.B. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *The AAPS journal*. **2009**, *11*, 495-510.
12. Wyllie A.H., Kerr J.R., Currie A. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **1980**, *68*, 251-306.
13. Clarke P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* **1990**, *181*, 195-213.
14. Stromhaug P.E., Klionsky D.J. Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*. **2001**, *2*, 524-531.
15. Overholtzer M., Mailleux A.A., Mouneimne G., Normand G., Schnitt S.J., King R.W., Cibas E.S., Brugge J.S. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*. **2007**, *131*, 966-979.
16. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 2207-2216.
17. Sperandio S., Poksay K., De Belle I., Lafuente M., Liu B., Nasir J., Bredesen D. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, 1066-1075.
18. Wang Y., Li X., Wang L., Ding P., Zhang Y., Han W., Ma D. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *J. Cell. Sci.* **2004**, *117*, 1525-1532.
19. Frisch S.M., Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 619.
20. Meredith J., Fazeli B., Schwartz M. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.* **1993**, *4*, 953-961.

21. Mailloux A.A., Overholtzer M., Schmelzle T., Bouillet P., Strasser A., Brugge J.S. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev. Cell.* **2007**, *12*, 221-234.
22. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **1972**, *26*, 239.
23. Reyland M.E. Protein kinase C and apoptosis. *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases, Molecular Mechanisms, Volume 2*; Springer, **2006**, pp. 31-55.
24. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods.* **2000**, *243*, 167-190.
25. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and molecular immunology. ed. 8th, Elsevier Health Sciences, **2014**.
26. Nieto-Sampedro M., Valle-Argos B., Gómez-Nicola D., Fernández-Mayoralas A., Nieto-Díaz M. Inhibitors of glioma growth that reveal the tumour to the immune system. *Clin. Med. Insights Oncol.* **2011**, *5*, 265.
27. Lavrik I.N., Golks A., Krammer P.H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2665-2672.
28. Reed J.C. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 1415-1430.
29. Lewin B., Dover G. Genes v. Vol 1110. Oxford University Press Oxford, **1994**.
30. Đan I. Radiobiološki efekti niskih pre-iradijacionih doza jonizujućeg zračenja na humane ćelijske linije HT29 i MRC5. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet; **2016**.
31. Mire-Sluis A.R., Thorpe R. Cytokines (Handbook of Immunopharmacology): Boston: Academic Press. ISBN 0-12-498340-5; **1998**.
32. Waring P., Müllbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol. Cell Biol.* **1999**, *77*, 312-317.

33. Qiu M., Chen L., Tan G., Ke L., Zhang S., Chen H., Liu J. A reactive oxygen species activation mechanism contributes to JS-K-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*:15104, 1-12. (DOI: 10.1038/srep15104)
34. Jones B.E., Lo C.R., Liu H., Srinivasan A., Streetz K., Valentino K.L., Czaja M.J. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor- α cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 705-712.
35. Kuwana T., Newmeyer D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 691-699.
36. Cory S., Huang D.C., Adams J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* **2003**, *22*, 8590-8607.
37. Cocco L., Bortul R., Martelli A., Tabellini G., Tazzari P., Billi A., Cappellini A. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol.* **2005**, 239-252.
38. Misirlić-Denčić S.T. Molekularni mehanizmi citotoksičnog dejstva estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na leukemijske ćelije *in vitro*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet; **2012**.
39. Esteve P.-O., Tremblay P., Houde M., St-Pierre Y., Mandeville R. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *BBA - Molecular Cell Research.* **1998**, *1403*, 85-96.
40. Klein G., Vellenga E., Fraaije M.W., Kamps W.A., de Bont E.S. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, *50*, 87-100.
41. Curran S., Murray G.I. Matrix metalloproteinases. *Eur. J. Cancer.* **2000**, *36*, 1621-1630.
42. Vihinen P., Kahari V.M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer.* **2002**, *99*, 157-166.

43. Westermarck J., Kahari V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* **1999**, *13*, 781-792.
44. Fridman R., Fuerst T., Bird R., Hoyhtya M., Oelkuct M., Kraus S., Komarek D., Liotta L., Berman M., Stetler-Stevenson W. Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15398-15405.
45. Morgunova E., Tuuttila A., Bergmann U., Isupov M., Lindqvist Y., Schneider G., Tryggvason K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* **1999**, *284*, 1667-1670.
46. Nagase H., Woessner J.F. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21491-21494.
47. Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal.* **2011**, *278*, 16-27.
48. Sympson C.J., Talhouk R.S., Alexander C.M., Chin J.R., Clift S.M., Bissell M.J., Werb Z. Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 681-693.
49. Konnecke H., Bechmann I. The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013:914104*, 1-15.
50. Hanisch U.K., Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1387-1394.
51. Rao J.S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer.* **2003**, *3*, 489-501.

52. Nguyen M. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *The Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, 33, 960-970.
53. Stetler-Stevenson W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, 1237-1241.
54. John A., Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* **2001**, 7, 14-23.
55. Rundhaug J.E. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 551-554.
56. Choe G., Park J.K., Jouben-Steele L., Kremen T.J., Liau L.M., Vinters H.V., Cloughesy T.F., Mischel P.S. Active Matrix Metalloproteinase 9 Expression Is Associated with Primary Glioblastoma Subtype. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 2894-2901.
57. Jacobsen J.A., Jourden J.L.M., Miller M.T., Cohen S.M. To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *BBA-Molecular Cell Research.* **2010**, 1803, 72-94.
58. Štrukelj B., Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, **2007**.
59. Byrum S.D., Larson S.K., Avaritt N.L., Moreland L.E., Mackintosh S.G., Cheung W.L., Tackett A.J. Quantitative proteomics identifies activation of hallmark pathways of cancer in patient melanoma. *J. Proteomics. Bioinform.* **2013**, 6(3), 43-50.
60. Campbell S.D., Regina K.J., Kharasch E.D. Significance of lipid composition in a blood-brain barrier-mimetic pampa assay. *J. Biomol. Screen.* **2014**, 19, 437-444.
61. Mensch J., Jaroskova L., Sanderson W., Melis A., Mackie C., Verreck G., Brewster M.E., Augustijns P. Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2010**, 395, 182-197.

62. Abbott N.J. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J. Anat.* **2002**, *200*, 523-534.
63. Abbott N.J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*, 5-23.
64. Brownson E., Abbruscato T., Gillespie T., Hruba V., Davis T. Effect of peptidases at the blood brain barrier on the permeability of enkephalin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 675-680.
65. Di L., Kerns E.H., Fan K., McConnell O.J., Carter G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223-232.
66. Pardridge W.M. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1781-1792.
67. Tamai I., Tsuji A. Transporter-mediated permeation of drugs across the blood–brain barrier. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1371-1388.
68. Pardridge W.M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *15*, 5-36.
69. Georges E., Tsuruo T., Ling V. Topology of P-glycoprotein as determined by epitope mapping of MRK-16 monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1792-1798.
70. Hitchcock S.A., Pennington L.D. Structure– brain exposure relationships. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7559-7583.
71. Lipinski C.A. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug. Discov. Today. Technol.* **2004**, *1*, 337-341.
72. Clark D.E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood–brain barrier penetration. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 815-821.
73. van de Waterbeemd H., Camenisch G., Folkers G., Chretien J.R., Raevsky O.A. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J. Drug Target.* **1998**, *6*, 151-165.

74. Jeffrey P., Summerfield S. Challenges for blood–brain barrier (BBB) screening. *Xenobiotica*. **2007**, *37*, 1135-1151.
75. Hammarlund-Udenaes M., Fridén M., Syvänen S., Gupta A. On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1737-1750.
76. Maurer T.S., DeBartolo D.B., Tess D.A., Scott D.O. Relationship between exposure and nonspecific binding of thirty-three central nervous system drugs in mice. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 175-181.
77. Summerfield S.G., Stevens A.J., Cutler L., del Carmen Osuna M., Hammond B., Tang S.-P., Hersey A., Spalding D.J., Jeffrey P. Improving the in vitro prediction of in vivo central nervous system penetration: integrating permeability, P-glycoprotein efflux, and free fractions in blood and brain. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *316*, 1282-1290.
78. Norinder U., Haeberlein M. Computational approaches to the prediction of the blood–brain distribution. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 291-313.
79. Kaluđerović G.N., Schmidt, H., Steinborn, D., Sabo, T. J. Inorganic Biochemistry, Research progress, 1st Edn. Nova Science Publisher, Inc, New York, **2008**, p. 305.
80. Savić A.R. Kompleksi platine (II) i rutenijuma (II) sa diaminskim ligandima: sinteza, karakterizacija i citotoksičnost. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet; **2014**.
81. Lazić J.M., Vučićević L., Grgurić-Šipka S., Janjetović K., Kaluđerović G.N., Misirkić M., Gruden-Pavlović M., Popadić D., Paschke R., Trajković V. Synthesis and in vitro Anticancer Activity of Octahedral Platinum (IV) Complexes with Cyclohexyl-Functionalized Ethylenediamine-N, N'-Diacetate-Type Ligands. *Chem.Med.Chem.* **2010**, *5*, 881-889.
82. Estrada E., Uriarte E., Montero A., Teijeira M., Santana L., De Clercq E. A novel approach for the virtual screening and rational design of anticancer compounds. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1975-1985.

83. Poljarević J.M. Kompleks Pt (II) i Pt (IV) sa novim diaminskim ligandima: sinteza, karakterizacija i antitumorska aktivnost. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet; **2015**.
84. Sabo T.J., Kaluđerović G.N., Grgurić-Šipka S.R., Heinemann F.W., Trifunović S.R. Complex compounds of platinum (IV) and O, O-dialkyl-ethylenediamine-N, N'-di-3-propanoate ligands. A structural evidence for geometry of hydrolytic product of some esters. *Inorg. Chem. Commun.* **2004**, 7, 241-244.
85. Krajčinović B.B., Kaluđerović G.N., Steinborn D., Schmidt H., Wagner C., Žižak Ž., Juranić Z.D., Trifunović S.R., Sabo T.J. Synthesis and in vitro antitumoral activity of novel O, O'-di-2-alkyl-(S, S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-propanoate ligands and corresponding platinum (II/IV) complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 892-900.
86. Atoh M., Kashiwabara K., Fujita J. Preparation and Stereochemistry of Cobalt (III) Complexes Containing (3 S, 8 S)-3, 8-Dimethyl-1, 1, 10, 10-tetraphenyl-4, 7-diaza-1, 10-diphosphadecane or (4 S, 9 S)-2, 4, 9, 11-Tetramethyl-5, 8-diaza-2, 11-diphosphadodecane (SS-Me₂-mm-PNNP). Molecular Structure of (+) 589-Λ-cis β-[Co (acac)(SS-Me₂-mm-PNNP)](ClO₄)₂ · H₂O (acac=C₅H₇O₂⁻). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, 58, 3492-3499.
87. Haydock D., Mulholland T. Some derivatives of NN'-biscarboxymethyl- and NN'-bis-(β-carboxyethyl)-ethylenediamine. *J.Chem.Soc.C.* **1971**, P003-P004, 2389-2395.
88. Prabu S.L., Suriyaprakash T. Extraction of drug from the biological matrix: a review. Applied biological engineering-principles and practice: InTech; **2012**.
89. Otašević B., Protić A., Golubović J., Zečević M., Cerović M., Bralović L. Razvoj metode čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje mikofenolne kiseline iz uзорaka salive. *Arh. Farm. (Belgr).* **2014**, 64, 247-260.

90. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. Solid phase extraction technique–trends, opportunities and applications. *Pol. J. Environ. Stud.* **2006**, *15*, 677-690.
91. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons, **2011**.
92. Kang J.-S. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles, Dr Jeevan Prasain (Ed.), InTech, **2012**, 441-492. (DOI: 10.5772/32085)
93. Watson J.T., Sparkman O.D. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation. John Wiley & Sons, **2007**.
94. <https://www.thermofisher.com/ba/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html> (pristupljeno 20.08.2017)
95. <http://www.chromedia.org/> (pristupljeno 20.08.2017)
96. Viswanathan C., Bansal S., Booth B., DeStefano A.J., Rose M.J., Sailstad J., Shah V.P., Skelly J.P., Swann P.G., Weiner R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1962-1973.
97. Zimmer D. New US FDA draft guidance on bioanalytical method validation versus current FDA and EMA guidelines: chromatographic methods and ISR. *Bioanalysis.* **2014**, *6*, 13-19.
98. Bansal S., DeStefano A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *The AAPS journal.* **2007**, *9*, E109-E114.
99. Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.; TrAC.* **2004**, *23*, 535-552.

100. Peters F.T., Maurer H.H. Review: Bioanalytical method validation–How, how much and why? *Toxichem Krimtech.* **2001**, 68, 116-126.
101. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D., McDowall R. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, 17, 193-218.
102. Branch S.K. Guidelines from the international conference on harmonisation (ICH). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38, 798-805.
103. Rozet E., Dewé W., Morello R., Chiap P., Lecomte F., Ziemons E., Boos K., Boulanger B., Crommen J., Hubert P. Risk-based approach for the transfer of quantitative methods: Bioanalytical applications. *J. Chromatogr. A.* **2008**, 1189, 32-41.
104. Shah K.A., Karnes H.T. A proposed “fixed” range decision criteria for transfer of bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B.* **2009**, 877, 2270-2274.
105. Berry I.R., Harpaz D. Validation of active pharmaceutical ingredients. CRC Press, **2001**.
106. Schepers U., Wätzig H. Application of the equivalence test according to a concept for analytical method transfers from the International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39, 310-314.
107. Dewé W., Govaerts B., Boulanger B., Rozet E., Chiap P., Hubert P. Using total error as decision criterion in analytical method transfer. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2007**, 85, 262-268.
108. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Penninckx W., Heyden Y., Vankeerberghen P., Massart D.L. Reappraisal of hypothesis testing for method validation: detection of systematic error by comparing the means of two methods or of two laboratories. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4491-4499.
109. Chambers D., Kelly G., Limentani G., Lister A., Lung K.R., Warner E. Analytical Method Equivalency. *Pharmaceutical Technology.* **2005**. p. 64-80.

110. Schepers U., Wätzig H. Application of the equivalence test for analytical method transfers: Testing precision using the United States Pharmacopoeia concept (1010). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 290-292.
111. Feng S., Liang Q., Kinser R.D., Newland K., Guilbaud R. Testing equivalence between two laboratories or two methods using paired-sample analysis and interval hypothesis testing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 975-981.
112. Vial J., Jardy A., Anger P., Brun A., Menet J.-M. Methodology for transfer of liquid chromatography methods based on statistical considerations. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *815*, 173-182.
113. de Fontenay G. Analytical method transfer: new descriptive approach for acceptance criteria definition. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 104-112.
114. Hill H.M., Smith G. Method transfer between bioanalytical laboratories. *Bioanalysis.* **2015**, *7(7)*, 783-787.
115. Lin Z.J., Li W., Weng N. Capsule review on bioanalytical method transfer: opportunities and challenges for chromatographic methods. *Bioanalysis.* **2011**, *3*, 57-66.
116. Bilic-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb).* **2011**, *21*, 49-52.
117. Bašić J.V. Ispitivanje korelacije između hemijske strukture, fizičko-hemijskih i retencionih parametara i antimikrobne aktivnosti novosintetisanih derivata propiofenona. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet; **2016**.
118. Foye W.O., Lemke T.L., Williams D.A. Foye's principles of medicinal chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, **2008**.
119. Lemke T.L. Review of organic functional groups: introduction to medicinal organic chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, **2003**.
120. OECD. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. OECD Publishing.

121. Mannhold R., Kubinyi H., Folkers G., van de Waterbeemd H., Testa B. Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability. Vol 40. John Wiley & Sons, **2009**.
122. Xuan X., Xu L., Li L., Gao C., Li N. Determination of drug lipophilicity by phosphatidylcholine-modified microemulsion high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* **2015**, *490*, 258-264.
123. Morikawa G., Suzuka C., Shoji A., Shibusawa Y., Yanagida A. High-throughput determination of octanol/water partition coefficients using a shake-flask method and novel two-phase solvent system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *117*, 338-344.
124. Sangster J. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. John Wiley & Sons, **1997**.
125. Poole S.K., Poole C.F. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Chromatogr. B.* **2003**, *797*, 3-19.
126. Berthod A., Carda-Broch S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1037*, 3-14.
127. Hermens J.L., de Bruijn J.H., Brooke D.N. The octanol-water partition coefficient: strengths and limitations. *Environ. Toxicol. Chem.* **2013**, *32*, 732-733.
128. Andrés A., Rosés M., Ràfols C., Bosch E., Espinosa S., Segarra V., Huerta J.M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181-191.
129. Odovic J.V., Markovic B.D., Injac R.D., Vladimirov S.M., Karljikovic-Rajic K.D. Correlation between ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and reversed-phase thin-layer chromatography hydrophobicity data for evaluation of angiotensin-converting enzyme inhibitors absorption. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1258*, 94-100.

130. Escuder-Gilabert L., Martinez-Pla J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R., Medina-Hernández M. Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. *J. Chromatogr. B.* **2003**, 797, 21-35.
131. Henchoz Y., Bard B., Guillarme D., Carrupt P.-A., Veuthey J.-L., Martel S. Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 707-729.
132. Kotecha J., Shah S., Rathod I., Subbaiah G. Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors. *Int. J. Pharm.* **2008**, 360, 96-106.
133. Liu X.-Y., Nakamura C., Yang Q., Kamo N., Miyake J. Immobilized liposome chromatography to study drug-membrane interactions: correlation with drug absorption in humans. *J. Chromatogr. A.* **2002**, 961, 113-118.
134. Corti G., Maestrelli F., Cirri M., Furlanetto S., Mura P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: I. Assessment of artificial membrane composition. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 27, 346-353.
135. van Balen G.P., Caron G., Bouchard G., Reist M., Carrupt P.A., Fruttero R., Gasco A., Testa B. Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications. *Med. Res. Rev.* **2004**, 24, 299-324.
136. Du C.M., Valko K., Bevan C., Reynolds D., Abraham M.H. Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: A solvation equation based comparison with isocratic methods. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4228-4234.
137. Valko K. Application of high performance liquid chromatography for the measurements of lipophilicity and bio-mimetic binding properties in drug discovery: IAPC Publishing: Zagreb, Croatia; **2012**:70-72.
138. Ojha P.K., Roy K. Comparative QSARs for antimalarial endochins: importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2011**, 109, 146-161.

139. Dobričić V.D. Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine amida kortičkih kiselina antiinflamatornih steroida. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet; 2014.
140. Todeschini R., Consonni V. Molecular descriptors for chemoinformatics, volume 41 (2 volume set). Vol 41. John Wiley & Sons, **2009**.
141. Zhu C., Jiang L., Chen T.-M., Hwang K.-K. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 399-407.
142. Kansy M., Senner F., Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007-1010.
143. Sugano K., Hamada H., Machida M., Ushio H. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*, 189-196.
144. Wohnsland F., Faller B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 923-930.
145. Könczöl A.r.d., Müller J., Földes E.l., Béni Z.n., Végh K., Kéry A.g., Balogh G.r.T. Applicability of a blood-brain barrier specific artificial membrane permeability assay at the early stage of natural product-based CNS drug discovery. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 655-663.
146. Pelisch N., Dan T., Ichimura A., Sekiguchi H., Vaughan D.E., de Strihou C.v.Y., Miyata T. Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5484 attenuates demyelination and axonal degeneration in a mice model of multiple sclerosis. *PloS one.* **2015**, *10(4)*, 1-17. (DOI:10.1371/journal.pone.0124510)

147. Wang Q., Rager J.D., Weinstein K., Kardos P.S., Dobson G.L., Li J., Hidalgo I.J. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood–brain barrier. *Int. J. Pharm.* **2005**, *288*, 349-359.
148. Doan K.M.M., Humphreys J.E., Webster L.O., Wring S.A., Shampine L.J., Serabjit-Singh C.J., Adkison K.K., Polli J.W. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 1029-1037.
149. Liu H., Sabus C., Carter G.T., Du C., Avdeef A., Tischler M. In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1820-1826.
150. Markovic B.D., Vladimirov S.M., Cudina O.A., Odovic J.V., Karljikovic-Rajic K.D. A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters. *Molecules.* **2012**, *17*, 480-491.
151. Avdeef A., Strafford M., Block E., Balogh M.P., Chambliss W., Khan I. Drug absorption in vitro model: Filter-immobilized artificial membranes: 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 271-280.
152. Avdeef A., Nielsen P.E., Tsinman O. PAMPA – a drug absorption in vitro model: 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *22*, 365-374.
153. Dagenais C., Avdeef A., Tsinman O., Dudley A., Beliveau R. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood–brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *38*, 121-137.

154. Russell W.M.S., Burch R.L., Hume C.W. The principles of humane experimental technique. Johns Hopkins University, Methuen & Co.: London, **1959**.
155. <http://www.daburresearch.in/Alternates-to-Animal-Testing.aspx>.
Pristupljeno 20.08., 2017.
156. Atanasov A.G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.-M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Heiss E.H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1582-1614.
157. Giuliatti S. Computer-Based Methods of Inhibitor Prediction, An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications, Prof. Gandhi Radis-Baptista (Ed.), InTech, **2013**. (DOI: 10.5772/52334)
158. Perović V. Razvoj multifunkcionalne bioinformatičke platforme zasnovane na potencijalu elektron-jon interakcije bioloških molekula. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Matematički fakultet; **2013**.
159. Berman H., Henrick K., Nakamura H., Markley J.L. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic. Acids. Res.* **2007**, *35*, D301-D303.
160. Dean R.A., Christian C.D., Sample R., Bosron W.F. Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *The FASEB journal.* **1991**, *5*, 2735-2739.
161. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.
162. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455-461.

163. Jia L., Tomaszewski J.E., Noker P.E., Gorman G.S., Glaze E., Protopopova M. Simultaneous estimation of pharmacokinetic properties in mice of three anti-tubercular ethambutol analogs obtained from combinatorial lead optimization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 793-799.

7 PRILOZI

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

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, S. Savić, J. Poljarević, T. Sabo, A new model to determine lipophilicity of 1,2-ethanediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and 1,3-propanediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid derivatives with antiproliferative activity by combining shake flask procedure and UHPLC-MS method, *Pharmazie* **2017** (72): 317-323.
2. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, S. Ristić, B. Ivković, M. Savić, J. Poljarević, T. Sabo, Highly sensitive UHPLC-MS/MS method for quantification of ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid derivatives in mouse serum, *Acta Chromatographica* **2017** (29)2: 235-252.

Usmena saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u celini

1. **B. Tubić**, S. Vladimirov, B. Marković, Inter-laboratory reproducibility of bioanalytical UHPLC-MS/MS method, The 9th International Working Conference - Total quality management - advanced and intelligent approaches, Belgrade, 5th - 7th June 2017:
 - a. *Total quality management - advanced and intelligent approaches - proceedings*; **2017**: 59-63 (UDC 005.334:615),
 - b. *International Journal of advanced quality*; **2017** (45)2: 49-53.

Radovi prezentovani na međunarodnim naučnim skupovima štampani u celini

1. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, A. Savić, J. Poljarević, T. Sabo, Estimation of lipophilicity data for derivatives of alkandiamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid with potential antineoplastic activity, UHPLC-MS method, IFMBE Proceedings **2017** (62): 402-409.

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu

1. **B. Tubić**, B. Marković, J. Vučković, V. Dobričić, S. Vladimirov, *In vitro/in silico* characterisation of novel substances with cytotoxic activity: 1,2-ethanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and 1,3-propanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid derivatives, Book of abstracts of the Conference on the 65th Anniversary of Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava - 46th EuroCongress on Drug Synthesis and Analysis, **2017**; 21-22.
 2. **B. Tubić**, S. Pilipović, M. Petrović, O. Petrović, B. Ivković, B. Marković, S. Vladimirov, Estimation of permeability on artificial membrane for derivatives of alkanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid, *Arh.farm.* **2016**; 66/Special Issue/161-162.
 3. **B. Tubić**, S. Vladimirov, B. Marković, Inter-laboratory transfer of new UHPLC-MS/MS bioanalytical method for non-clinical, 21st International Symposium on Separation Sciences June 30th - July 3rd, **2015**, Ljubljana, Slovenia, Book of Abstracts, p. 71
 4. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, D. Stanković, S. Ristić, M. Savić, B. Ivković, S. Vladimirov, T. Sabo, Highly sensitive ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of DE-EDCP and EDCP in mouse serum, 21st International Symposium on Separation Sciences June 30th - July 3rd, **2015**, Ljubljana, Slovenia, Book of Abstracts, p. 70
- B. Tubić**, B. Marković, S. Ristić, S. Vladimirov, B. Ivković, D. Stanković, T. Sabo, Highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of L3 in mouse serum, 2nd International Conference on Label Free Technologies Conference information, Mart, **2015**, <https://elsevier.conference-services.net/secureProgramme.asp?conferenceID=3795&uID=697936>

PRILOG 2: Biografija

Biljana Tubić je rođena u Kragujevcu 1974. Diplomirala je 1999. na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 8,65. Magistrirala je 2007. sa tezom: „Ispitivanje nimesulida, njegovih nečistoća i praćenje stabilnosti u farmaceutskim preparatima RP-HPLC metodom“. Zdravstvenu specijalizaciju iz ispitivanja i kontrole kvaliteta lekova završila je 2013. sa specijalističkim radom na temu: „Razvoj HPLC metode za određivanje brzine rastvaranja nimesulida u farmaceutskim preparatima“.

Nakon obavljenog pripravničkog staža i trogodišnjeg rada u apoteci, od 2002. živi u Banjaluci i radi u Agenciji za lijekove i medicinska sredstva. Istovremeno od školske 2002/03. radi kao asistent/viši asistent u praktičnoj nastavi na predmetu Farmaceutska hemija II na Medicinskom fakultetu – studijski program Farmacija, Univerziteta u Banjaluci.

Koautor je 17 stručnih knjiga, autor i koautor je 6 radova objavljenih u celini u časopisima međunarodnog značaja, 1 rada objavljenog u celini u časopisu nacionalnog značaja, 12 radova saopštenih na međunarodnim naučnim skupovima koji su štampani u izvodu u knjizi izvoda ili u posebnom broju naučnog časopisa i 15 radova usmeno saopštenih na međunarodnim stručnim skupovima koji su štampani u izvodu u knjizi izvoda ili u posebnom broju naučnog časopisa.

Bila je član mnogih radnih grupa za kreiranje zakonskih i podzakonskih akata iz oblasti lekova i medicinskih sredstava. Radi kao spoljni ekspert u oceni dokumentacije za aktivnu supstancu u postupku izdavanja CEP-a (*certificate of suitability*) pri Evropskom direktorijatu za kvalitet lekova i zdravstvenu zaštitu (EDQM) od 2015.

Bila je član komisije za odbranu 15 diplomskih radova na Medicinskom fakultetu – studijski program Farmacija, Univerziteta u Banjoj Luci.

Majka je jednog deteta.

PRILOG 3.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: Biljana Tubić

Broj upisa //

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

„Derivati etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa potencijalnim citotoksičnim dejstvom - *in silico* / *in vitro* fizičko-hemijska i ADME karakterizacija“

- Rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- Da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- Da su rezultati korektno navedeni i
- Da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica

U Beogradu, 08.11.2017.

Potpis doktoranda



PRILOG 4.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Biljana Tubić
Broj upisa: //
Studijski program: Farmacija
Naslov rada: „Derivati etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa potencijalnim citotoksičnim dejstvom - *in silico* / *in vitro* fizičko-hemijska i ADME karakterizacija“

Mentor: Vanredni profesor Bojan Marković

Potpisani: Biljana Tubić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

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

U Beogradu, 08.11.2017.

Potpis doktoranda



PRILOG 5.

Izjava o korišćenju

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

„Derivati etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa potencijalnim citotoksičnim dejstvom - *in silico* / *in vitro* fizičko-hemijska i ADME karakterizacija“

koja je moje autorsko delo.

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

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (*Creative Commons*) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - dati pod istim uslovima
5. Autorstvo bez prerade
6. Autorstvo deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 08.11.2017.

Potpis doktoranda

