

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."

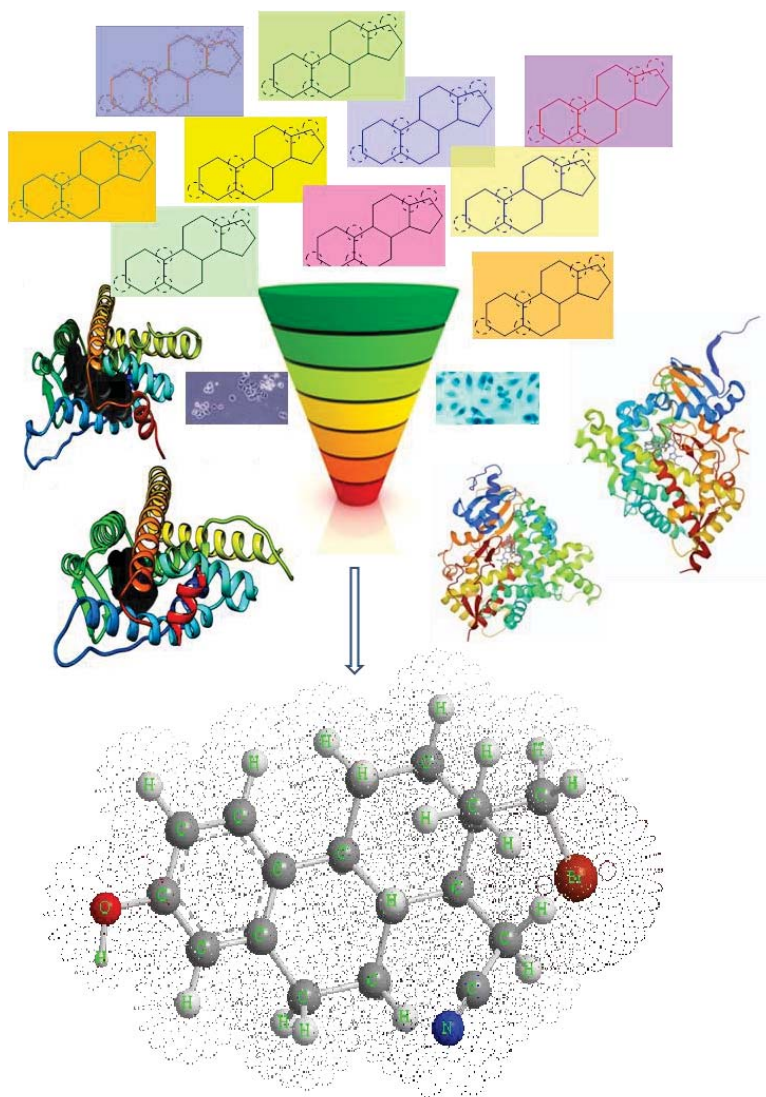


Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju i
zaštitu životne sredine

Suzana Jovanović-Šanta

***MEDICINSKA HEMIJA STEROIDA U RAZVOJU LEKOVA
ZA HORMONSKI ZAVISNE BOLESTI***

MONOGRAFIJA



Novi Sad, 2020



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju i
zaštitu životne sredine

Suzana Jovanović-Šanta

***MEDICINSKA HEMIJA STEROIDA U RAZVOJU LEKOVA
ZA HORMONSKI ZAVISNE BOLESTI***

MONOGRAFIJA

Novi Sad, 2020

Naslov monografije: Medicinska hemija steroida u razvoju lekova za hormonski zavisne bolesti

Autor: Prof. dr Suzana Jovanović-Šanta, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Recenzenti: Prof. dr Radmila Kovačević, profesor emeritus Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Prof. dr Julijana Petrović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, u penziji
dr Gordana Bogdanović, naučni savetnik Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, u penziji

Izdavač: Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad, www.dh.uns.ac.rs

Glavni i odgovorni urednik: Prof. dr Milica Pavkov Hrvojević, redovni profesor, dekan Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Redaktor: Anadol Gegić

Monografija je odobrena za štampu i upotrebu odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu na 26. sednici održanoj 15.10.2020. godine (rešenje broj 0602-464/9 od 21.10.2020.)

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

61:577.1

ЈОВАНОВИЋ-Шанта, Сузана, 1971-

Medicinska hemija steroida u razvoju lekova za hormonski zavisne bolesti
[Elektronski izvor] : monografija / Suzana Jovanović-Šanta. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, 2020

Način pristupa (URL):

https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/jovanovicsanta_medicinska_hemija_steroida_hormonski_zavisne_bolesti.pdf. - Opis zasnovan na stanju na dan 22.10.2020. - Nasl. s naslovnog ekrana. - Bibliografija. - Summary.

ISBN 978-86-7031-564-8

a) Медицинска биохемија - Стероиди

COBISS.SR-ID 23815689

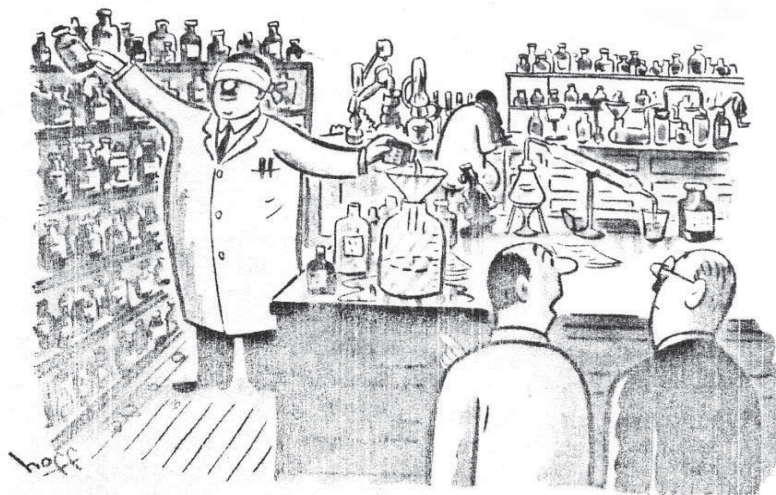
© Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2020. Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni licencom Kreativne zajednice navedene na početku publikacije.

Sadržaj

PREDGOVOR	1
MEDICINSKA HEMIJA	3
Otkrivanje lekova na osnovu hemijskih osobina novosintetisanih jedinjenja	5
Otkrivanje lekova na osnovu ispitivanja bioloških efekata jedinjenja	8
Razvoj lekova	11
Klasifikacija lekova	11
Razvoj i odobravanje leka	17
HTS tehnologija	19
MEDICINSKA HEMIJA STEROIDA	22
Hemijom vođen razvoj lekova za lečenje obolelih od hormonski zavisnih bolesti	28
Biomedicinski potencijal estranskih derivata	31
Estranski derivati koji pokazuju antiestrogenu aktivnost i utiču na aktivnost aromataze	31
Estranski derivati koji inhibiraju izoenzime	
17 β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β -HSD)	37
Biomedicinski potencijal androstanskih derivata	41
Androstanski derivati kao inhibitori aromataze (CYP19)	41
Androstanski derivati kao inhibitori 17 α -hidroksilaze/17,20-lijaze (CYP17A1)	45
Androstanski derivati kao inhibitori izoenzima	
17 β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β HSD)	48
Molekularni doking u medicinskoj hemiji modifikovanih steroida	51
Biologijom vođen razvoj lekova za lečenje obolelih od hormonski zavisnih bolesti	62
Ispitivanje antiproliferativnog dejstva modifikovanih steroida	64
D-Seko steroidi	65
Heterociklični steroidi sa kuplovanim D prstenom	68
Heterociklični steroidi sa proširenim laktonskim D prstenom	69
17-Supstituisani steroidi sa heterocikličnim supstituentom	71
Steroidni salicilati	74
Ispitivanje mehanizama koji su u osnovi antiproliferativnog efekta jedinjenja na ćelije kancera	77
ZAKLJUČAK	85
SUMMARY	87
LITERATURA	89
BIOGRAFIJA AUTORA	101

PREDGOVOR

Ranije se do otkrića lekovitih svojstava nekih jedinjenja ili preparata najčešće dolazilo slučajno, tj. uočavanjem nekih bioloških ili farmakoloških odgovora nakon tretmana prilikom ispitivanja njihovih osobina radi potpuno različite namene. Često su slučajna otkrića nastala prilikom razvoja lekova za druge bolesti ili probleme. Tako je upotreba NO i etra za narkozu prilikom operacija proizašla iz zapažanja da osobe koje su ih udahnule ne osećaju bol od povrede. Vazodilatorno delovanje amilnitrita i nitroglicerina uočili su hemičari koji su imali jaku glavobolju nakon unošenja ovih supstanci u organizam. Za acetilsalicilnu kiselinu smatralo se da je organizam kao prolek (*engl. prodrug*) supstancu bolje podnosi od salicilne kiseline. Međutim, ispostavilo se da ova dva jedinjenja imaju potpuno različit biološki efekat, kao i mehanizam delovanja. Varfarin, antikoagulans, korišćen je prvo za trovanje glodara.



‘That’s Dr Arnold Moore. He’s conducting an experiment to test the theory that most great scientific discoveries were hit on by accident.’

*Drawing by Hoff ; © 1957
The New Yorker Magazine, Inc.*

Otkrivanje lekova, međutim, ni slučajno nije nasumično. Razvojem lekova danas se bave veliki interdisciplinarni timovi istraživača. Medicinska hemija, po definiciji, povezuje različite oblasti hemije, biohemije, biologije, farmakologije, toksikologije i medicine, čiji udruženi rezultati istraživanja mogu da doprinesu razvoju lekova (*engl. drug discovery*), na opštu korist.

Problemi i bolesti u čijoj osnovi je hipo- ili hiperprodukcija androgenih, odnosno estrogenih hormona ili poremećaj njihove fiziološke funkcije su brojni i raznorodni, od neplodnosti muškaraca i žena do karcinoma reproduktivnih tkiva. Stoga postoji veliki broj istraživačkih timova koji se bave ovom veoma interesantnom i aktuelnom problematikom - medicinskom hemijom steroida, čiji rezultati bi trebalo da doprinesu otkrivanju novih i efikasnijih lekova za lečenje bolesti zavisnih od steroidnih hormona. Ova studija obuhvata deo takvih istraživanja istraživačke grupe na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu (UNS PMF). Posvećena je ranijim i sadašnjim istraživačima.

Autor

MEDICINSKA HEMIJA

Potreba za lečenjem ljudi postoji od kada postoji i čovek. Preteča primene lekova kakve poznamo danas svakako je tradicionalna medicina koja je hiljadama godina pre nove ere koristila prirodne proizvode radi lečenja ljudi i životinja, o čemu postoje brojni istorijski zapisi. Tokom perioda renesanse alhemičari su otpočeli sa pripremanjem preparata namenjenih za lečenje ili smanjivanje tegoba. Posle II svetskog rata napredak u razumevanju farmakologije na molekularnom nivou omogućio je da se biološka aktivnost izrazi kao merljiva osobina nekog molekula. Tako, na primer, IC_{50} vrednost pokazuje sposobnost supstance da smanji aktivnost ciljnog molekula za 50%. U razvoju racionalnog dizajna lekova naučnici su počeli da manipulišu pojedinim delovima molekula i da uočavaju promene nastale u biološkim aktivnostima tih novih molekula. Ovo je omogućilo naučnicima da utvrde ključne strukturne karakteristike molekula koje doprinose njegovoj biološkoj aktivnosti. To je bila dobra osnova za razvoj popularne i informativne studije odnosa strukture i aktivnosti (*engl. Structure–Activity Relationship studies, SAR*), koje su i dalje među najčešće korišćenim tehnikama u otkrivanju i razvoju lekova, te dugoročno i za razvoj posebne oblasti nauke – medicinske hemije.

Medicinska hemija bavi se interdisciplinarnim istraživanjima, koja obuhvataju različite oblasti hemije i biologije u cilju otkrivanja novih i boljih lekova. Često se poistovećuje sa racionalnim dizajnom lekova (*engl. Rational Drug Discovery*). Medicinska hemija obuhvata sintezu novih jedinjenja, ispitivanje njihovog efekta u biološkim sistemima, menjanje strukture jedinjenja tako da se postigne optimalni biološki ili farmakološki efekat uz minimalne sporedne efekte, proučavanje unosa, distribucije, metabolizma, ekskrecije i toksičnosti kandidata za lekove i samih lekova. Klinička ispitivanja se takođe mogu klasifikovati u oblast medicinske hemije, pri čemu je uloga lekara u razvoju lekova veoma važna (Holbrook i Garneau-Tsodikova, 2017).

Medicinska hemija mogla bi se definisati na više načina. Tako, na primer Patrick (2013) definiše medicinsku hemiju kao nauku koja se bavi otkrivanjem i dizajniranjem novih i boljih terapijskih supstanci i razvojem tih supstanci u lekove. Ova definicija je pojednostavljena, ali sveobuhvatna, jer ne navodi sve oblasti nauke uključene u razvoj lekova. IUPAC u Rečniku pojmova iz 1988. godine Medicinsku hemiju definiše kao disciplinu zasnovanu na hemiji, koja takođe uključuje aspekte bioloških, medicinskih i farmaceutskih nauka. Bavi se pronalaskom, otkrićem, dizajnom, identifikacijom i dobijanjem biološki aktivnih jedinjenja, proučavanjem njihovog metabolizma, tumačenjem njihovog načina delovanja na molekularnom nivou i definisanjem odnosa strukture i aktivnosti (Wermuth i sar., 1998). Ovaj rečnik sadrži veliki broj pojmova koji se koriste u istraživanjima iz oblasti medicinske hemije. IUPAC u Rečniku pojmova iz 2013. godine, međutim, značajno proširuje rečnik izraza, jer se sa otkrićem i korišćenjem novih tehnika, klasa jedinjenja i aspekata istraživanja kontinualno uvode novi izrazi (Buckle i sar., 2013).

Evropsko udruženje za medicinsku hemiju (*engl. The European Federation for Medicinal Chemistry, EFMC*) osnovano je 1970. godine. Njegov cilj je unapređivanje nauke u oblasti medicinske hemije i hemijske biologije stimulisanjem povezivanja i saradnje pojedinih istraživačkih grupa. EFMC definiše medicinsku hemiju na sličan način kao IUPAC, kao nauku koja se bazira na dizajnu i sintezi novih biološki aktivnih molekula, u cilju kreiranja jedinjenja koja omogućavaju bolje razumevanje i kontrolu fizioloških i patoloških procesa (http://www.efmc.info/content.php?langue=english&cle_menus=1201086391).

Lekovi danas više nisu ograničeni na male molekule, nego se paleta mogućih terapijskih pristupa proširila na oblast biologije, uključujući, između ostalih, terapiju proteinima i konjugatima antitela i leka. Osim toga, brojne nove tehnike i naučni pristupi omogućavaju sintezu novih jedinjenja, pri čemu ekološki aspekt svakodnevno dobija na značaju, pa se jedinjenja sve više sintetišu uz korišćenje mikrotalasa i ultrazvuka ili hemoenzimskim transformacijama. Nove tehnike omogućavaju bržu i/ili automatizovanu

sintezu i prečišćavanje. Sa razvojem tehnologija oštra granica između mogućeg i nemogućeg polako blede. U težnji da se izbegnu sporedni efekti terapije, sve češće se koristi personalizovana medicina, zasnovana na velikom broju podataka u okviru svih istraživanja koje obuhvata medicinska hemija (Holbrook i Garneau-Tsodikova, 2017).

Otkrivanje lekova na osnovu hemijskih osobina novosintetisanih jedinjenja

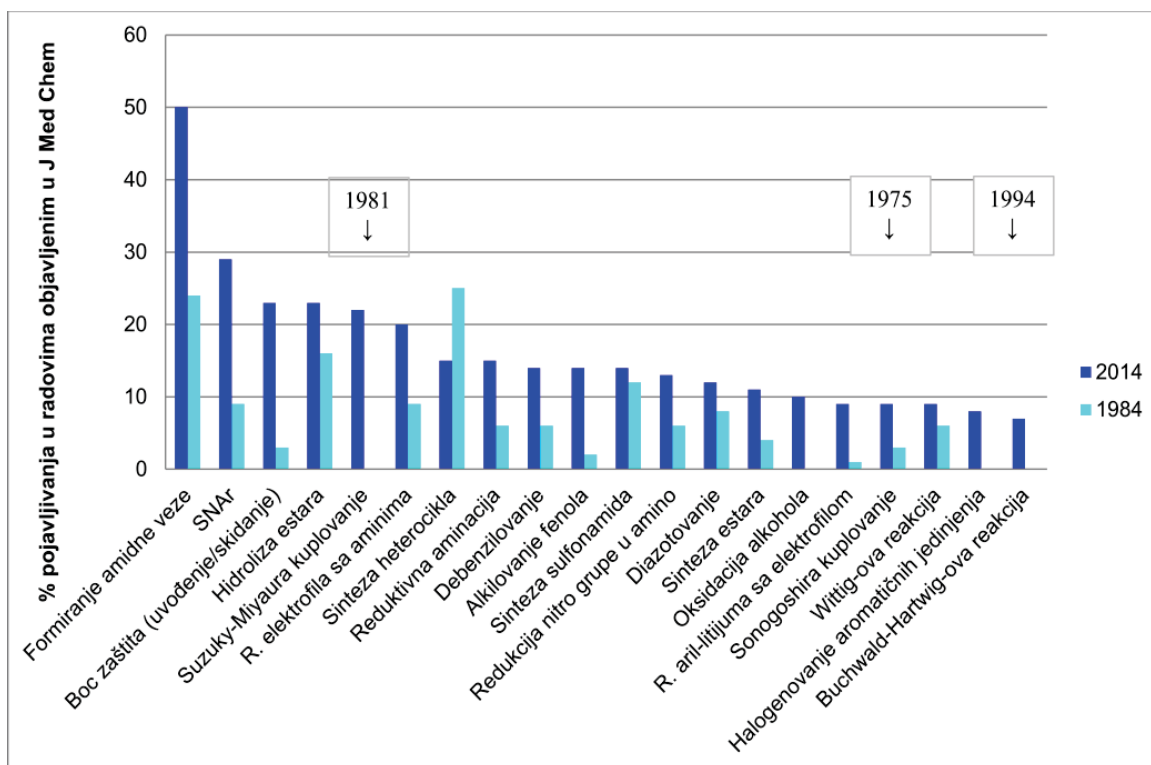
Sinteza novih jedinjenja predstavlja osnovu razvoja terapeutika, odnosno otkrivanje lekova bazirano na hemiji (*engl. Chemistry-driven drug discovery*). Stoga se dosta često organska sinteza poistovećuje sa medicinskom hemijom. Međutim, tokom poslednjih nekoliko dekada stavovi u nauci su se donekle promenili, tako da se medicinska hemija smatra interdisciplinarnom naukom (Lombardino i Lowe, 2004).

Medicinska hemija, kao nauka koja se bavi otkrićem i dizajniranjem novih terapijskih agenasa i njihovim razvojem do medicinske upotrebe obuhvata različite oblasti nauke (Thomas, 2007; Patrick, 2013). Tu spadaju:

- dizajniranje i sinteza novih jedinjenja, potencijalnih terapeutika;
- računarski proračuni i simulacije;
- farmakološke i toksikološke studije;
- praćenje metabolizma i farmakokinetike, te merenje apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (*engl. absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME*);
- razvoj formulacije;
- kliničke studije.

Sinteza novih organskih molekula može da bude vođena ranijim rezultatima, sličnošću sa strukturama koje su se pokazala kao aktivne ili predikcijom mogućnosti kompleksiranja (*engl. docking*) sa ciljnim molekulom na osnovu korelacije između strukture i aktivnosti (*engl. Structure-activity relationship, SAR*) molekula ili *in silico* eksperimenata.

Analizom tipova reakcija koje se koriste za sintezu organskih molekula u medicinskoj hemiji u toku 1984. i 2014. godine, u periodu u kojem je sinteza novih molekula, potencijalnih lekova, u ekspanziji, došlo se do zaključka da se najčešće koriste reakcije amidacije, S_NAr i još neke, dok se retko otkrivaju nove reakcije u organskoj sintezi (Slika 1) (Brown i Boström, 2016).



Slika 1 Najčešće reakcije u sintezi novih organskih jedinjenja 1984. i 2014. godine, prema procentu pojavljivanja u odabranim reprezentativnim radovima objavljenim u J Med Chem; strelice i godine označavaju prvi rad u kojem se pojavila određena nova reakcija (prerađeno iz Brown i Boström, 2016)

Dakle, u ovom periodu medicinski hemičari koji se bave organskom sintezom više su pažnje usmerili na broj i strukturu raznovrsnost novih jedinjenja, nego na razvoj novih reakcija. To se možda i moglo očekivati, s obzirom na stalno povećanje broja obolelih od različitih bolesti širom sveta i stoga povećanoj potrebi za bržim razvojem novih lekova, za šta je osnova pronalaženje novih aktivnih molekula i/ili farmakofora važnih za ispoljavanje biološke, odnosno farmakološke aktivnosti (Campbell i sar., 2018). Sinteza novih organskih jedinjenja vrlo se često zasniva na kombinatorijalnoj hemiji i

paralelnim sintezama (Maltais i sar., 2004; Maryanoff, 2009), a sintetiše se i sve više organometalnih kompleksa, od kojih su neki u upotrebi kao lekovi.

Kompjuterska hemija i *in silico* eksperimenti su u ekspaniziji već dugi niz godina. Veoma korisne tehnike i programi omogućavaju bržu obradu eksperimentalno prikupljenih podataka, ali i dizajniranje i proučavanje interakcija organski molekul-terapijska meta (Jorgensen, 2004; Deeb, 2012). Postoji ogroman broj baza podataka koje istraživači mogu da koriste za sve tipove istraživanja. Na primer, baze koje sadrže podatke o svim do sada sintetisanim molekulima, o mehanizmu delovanja različitih jedinjenja, njihovoj toksičnosti, o strukturi proteina koji su terapeutske mete, ćelijskoj signalizaciji, rezultate vezane za proteomiku, genomiku i metabolomiku (*engl.* 'omics' istraživanja), rezultate *in vitro* i *in vivo* eksperimenata i drugo. Mnoge baze sadrže rezultate *in silico* eksperimenata za sve navedene oblasti, kao i za mnoge druge (Pawar i sar., 2019).

In silico tehnike omogućavaju:

- Ispitivanje polarnosti molekula;
- Virtualni skrining velikog broja jedinjenja i *de novo* dizajn (*engl. Library Screening and De Novo Design*); ima za cilj da jedinjenja sa IC₅₀ vrednosti reda μM sintezom sličnih jedinjenja smanji na red nM, te da sa osnovnih istraživanja razvoj lekova dovede u fazu farmakoloških studija i daljih prekliničkih, pa i kliničkih istraživanja (Hüser, 2006);
- Predikciju osobina dizajniranih molekula i njihovog vezivanja za ciljne molekule, te, na osnovu toga, i mogućnosti da posluže kao osnova za razvoj leka (*engl. prediction of properties and drug-likeness*). Ovi eksperimenti povezani su sa *in silico* ADME ispitivanjima: po Lipinskom i saradnicima (1997), da bi neko jedinjenje bilo upotrebljivo kao lek za oralnu administraciju, treba da zadovoljava neka pravila: da je $M < 500$, da je $\log P < 5$, da ima manje od 5 donora, a manje od 10 akceptora vodonične veze (pravilo „5R“, *engl. „rule of five“*) (Lipinski i sar., 1997; Jorgensen, 2004); u praksi se, pak, često vodeća jedinjenja

traže među molekulima manje molekulske mase (<350) i manje lipofilnosti ($\log P < 3$);

- Monte Carlo (MC) statističko-mehaničke i molekularno-dinamičke simulacije (MD) (engl. advanced treatments of protein-ligand binding) kompleksa protein-ligand, kojima se mogu proučavati promene proteina i leka u uslovima bliskim onima u organizmu (Jorgensen, 2004);
- Koreliranja strukture i aktivnosti (SAR);
- Proučavanje interakcija molekula sa receptorom, enzimom ili drugim biomolekulom koji predstavlja metu terapije, kao i druge *in silico* eksperimente.

Što se tiče bioloških eksperimenata koji se izvode da bi se ispitala potencijalna farmakološka primena jedinjenja, oni su brojni i veoma raznovrsni, a koji će se eksperimenti izvoditi, zavisi od prethodno postavljenog cilja, tako da je odabir biološkog cilja od izuzetnog značaja (Zheng i sar., 2013; Ekinci, 2012).

Na osnovu rezultata *in vitro* i/ili *in vivo* bioloških eksperimenata odabiraju se vodeća jedinjenja - jedinjenja sa najvećim efektom na zadati ciljni molekul ili model-sistem, te se ispituje njihova opšta toksičnost i genotoksičnost, koje bi mogle da prouzrokuju neželjena dejstva ako bi se takva supstanca koristila kao lek. Osim toksikoloških ispitivanja, takođe se ispituju i mogućnosti da se u živom organizmu takvo jedinjenje dopremi do ciljnog tkiva, gde bi ispoljilo svoj farmakološki efekat, te da se ono ili njegovi metaboliti izluče iz organizma (ADME ispitivanja; <https://www.rsb.org.uk/>).

Otkrivanje lekova na osnovu ispitivanja bioloških efekata jedinjenja

U razvoju lekova za neke bolesti nije neophodno prethodno poznavanje biomolekula koji bi bio cilj u terapiji. U razvoju lekova vođenom biologijom (engl. *Biology-driven drug discovery*) taj ciljni molekul se može identifikovati nakon uočenog i kvantifikovanog biološkog ili farmakološkog efekta ispitivanog jedinjenja u određenom model-sistemu. Tako se, na

primer, aktivne supstance mogu identifikovati na osnovu promene fenotipa ćelije koju izazovu: ubijanju patogena ili ćelija kancera, aktiviranju ili inhibiranju signalnog puta ili drugih efekata. Promena fenotipa ili mehanizam delovanja aktivne supstance često se proučavaju automatizovanim i minijaturizovanim HTS testovima (*engl. High Throughput Screening*).

Medicinska hemija vođena biologijom obuhvata čitavu paletu bioloških testova, od kojih se neki odabiraju za preliminarne ili napredne skrininge. Neki od testova su:

- Fenotipski testovi na ćelijama (*engl. Cell-based phenotypic assays*), koji koriste primarne, imortalizovane ili ćelije diferencirane iz pluripotentnih matičnih ćelija;
- Testovi vijabilnost ćelija;
- Ispitivanje signalnih puteva u ćeliji;
- Fenotipski testovi za određene bolesti;
- Testovi za ispitivanje i kvantifikaciju apoptoze, nekroze, autofagije i drugih tipova ćelijske smrti;
- Analiza ćelijskog ciklusa;
- Promene citoskeleta, membrana, organela i jedra;
- Ispitivanje nuklearne translokacije biomolekula i raspodele po različitim delovima ćelije;
- Umesto ćelijskih linija, model-sistemi mogu biti i kulture patogena ili preparati tkiva, a testovi koji se primenjuju mogu biti slični kao testovi koji se izvode na ćelijskim kulturama, ili potpuno drugačiji, zavisno od tipa bolesti koja je predmet istraživanja i za koju se traži novi ili bolji lek.

Biologijom vođen razvoj lekova intenzivno se koristi u razvoju hemioterapeutika za lečenje kancera, tako da se skrining testovi za ispitivanje biološke i farmakološke aktivnosti izvode na ćelijskim linijama kancera. Biologija ćelija kancera je veoma dobro proučena i dobra je osnova za

istraživanja tog tipa. Međutim, istraživanja su preobimna i preskupa, tako da se kontinuirano iznalaze novi, alternativni pristupi, kao, na primer, kombinovane terapije ili terapija kombinovanjem lekovima sa različitim mehanizmima delovanja (Lord i Ashworth, 2010).

U suštini, period pronalaženja i razvoja leka je skoro podjednak u oba pristupa (hemijom vođen i biologijom vođen razvoj), kao i procenjena suma novca koji treba uložiti u istraživanja, s tim da je redosled istraživanja različit u početnim fazama istraživanja. S tim u vezi, za veliki broj efikasnih terapeutika dodatno se ispituju i neki drugi biološki ili farmakološki efekti, tako da se preusmerava ili proširuje mogućnost njihove primene u medicini (*engl. Drug repurposing*, Slika 2).



Slika 2 Faze u razvoju leka, procenjen period trajanja razvoja leka i novca potrebnog za istraživanja, za različite strategije u razvoju lekova: A Hemijom vođen razvoj lekova (na osnovu prepoznatog ciljnog molekula); B Biologijom vođen razvoj lekova (na osnovu biološkog odgovora); C Istraživanja radi preusmeravanja upotrebe postojećeg leka; D Ispitivanja postojećih lekova na nove ciljne molekule (preuzeto i adaptirano iz Zheng i sar., 2013).

Razvoj lekova

Klasifikacija lekova

Najčešći agensi za ublažavanje, lečenje ili prevenciju bolesti su organska jedinjenja, koja se prema poreklu mogu podeliti na:

- Jedinjenja izolovana iz prirodnih izvora – biljaka, životinja, gljiva, kao što su, na primer, vitamini, hormoni, antibiotici, alkaloidi, glikozidi;
- Sintetička jedinjenja – jedinjenja sintetisana po uzoru na prirodna jedinjenja ili prethodno dizajnirana jedinjenja (npr. morfin, atropin, steroidi, kokain);
- Semi-sintetička jedinjenja – jedinjenja koja se sintetišu modifikovanjem strukture jedinjenja izolovanih iz prirodnih izvora, do kojih se relativno lako može doći i koja su isplative polazne sirovine (npr. semi-sintetski penicilin).

Sveobuhvatnija je, verovatno, klasifikacija lekova prema njihovoj medicinskoj upotrebi, koja je povezana sa njihovim fizičko-hemijskim osobinama i načinom delovanja. Prema ovoj podeli razlikujemo *farmakodinamičke agense* i *hemioterapeutske agense*.

U prvu grupu spadaju lekovi koji utiču na fiziološke procese (npr. anestetici, hipnotici, sedativi, analgetici), a u drugu lekovi koji se bore protiv patogena ili izmenjenih ćelija (npr. antibiotici, antimalarici, antikancerski i antiviralni agensi).

Hemioterapeutski lekovi mogu se podeliti prema različitim tipovima bolesti:

1. Terapeutici koji se koriste za lečenje infektivnih bolesti, koje nastaju i prenose se delovanjem bakterija (pneumonija, salmonela), virusa (grip, AIDS), gljivica (mikoze) i parazita (malarija);

2. Terapeutici koji se koriste u terapiji obolelih od neinfektivnih bolesti, kao što su poremećaji organa ili organizma prouzrokovani genetskim

promenama, faktorima okoline, stresom, starošću (dijabetes, koronarne bolesti, astma, kancer, artritis i drugo);

3. Terapeutici koji se koriste u nekim stanjima, na primer za ublažavanje bola (analgetici), prevenciju trudnoće (kontraceptivna sredstva), anesteziju i drugo.

Sposobnost leka da ispolji svoj farmakološki - terapijski efekat povezan je sa njegovim fizičko-hemijskim osobinama. Delovanje leka zasnovano je na interakciji molekula leka (terapijskog agensa) sa ciljnim molekulom (proteinom, DNK, RNK) ili uticajem na ciljni (fiziološki ili patološki) proces. Fizičko-hemijske osobine od kojih zavisi biološka aktivnost organskih molekula koji se koriste kao lekovi (organskih medicinskih agenasa, OMA) su: rastvorljivost, kiselost, odnosno alkalnost i aktivnost (Radulović i Vladimirov, 2005).

Rastvorljivost organskih medicinskih agenasa koji se koriste kao lekovi omogućava pravljenje formulacije leka u odgovarajućoj formi za doziranje, kao i odgovarajuću bio-dispoziciju, tj. raspoređivanje OMA u tkivima nakon administracije. Ovim se bave tzv. ADME istraživanja. Većina OMA je umereno rastvorna (u izvesnoj meri rastvorna u vodi i lipidnim medijumima), odnosno umereno hidrofилna, tj. lipofilna. To je važno zbog njihovog prolaska kroz vodene (plazma, ekstracelularna tečnost, citoplazma) i lipidne (membrane) medijume bioloških sistema.

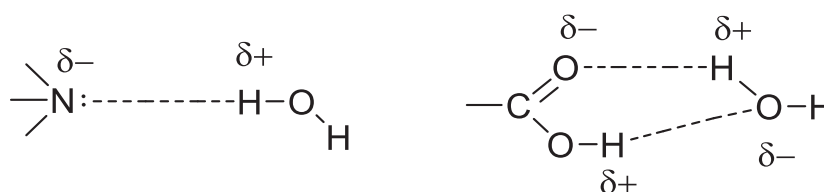
Rastvorljivost se može proceniti ili odrediti eksperimentalno. Rastvorljivost se procenjuje izračunavanjem hidrofилnosti, odnosno lipofilnosti, specifičnim kompjuterskim programima na osnovu strukture, pri čemu se uzimaju u obzir grupe i supstituenti koji su hidrofилni (negativna vrednost) ili lipofilni (pozitivna vrednost). Veličina koja govori o lipofilnosti je $\log P$, a izračunava se ($\log P_{calc}$) kao suma hidrofилnih i lipofilnih konstanti ($\Sigma\pi$):

$$\log P_{calc} = \Sigma\pi$$

Eksperimentalno se rastvorljivost kvantifikuje određivanjem podeonog koeficijenta (P) kao odnosa količine supstance rastvorene u nepolarnom (npr. *n*-oktanolu) i polarnom rastvaraču (npr. puferu pH 8).

Da bi se neka supstanca rastvorila u rastvaraču/medijumu, treba da ostvari privlačne interakcije sa molekulima rastvarača. Najvažnije intermolekulske privlačne sile (veze) važne za rastvaranje su:

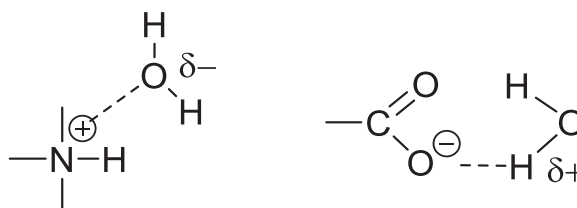
1. Van der Waals-ove sile – najslabije elektrostatičke sile (0,5-1,0 kcal/mol), uspostavljaju se između nepolarnih grupa; u velikoj meri zavise od udaljenosti i temperature;
2. Dipol-dipol veze – jače elektrostatičke sile (1.0 - 10 kcal/mol), javljaju se između elektron- deficitarnih i elektronima bogatih atoma (dipola); specifičan primer ovog tipa veze je vodonična veza:



3. Jonske veze – relativno jake veze (do 5 kcal/mol), nastaju elektrostatičkim privlačenjem između katjona i anjona; česte u neorganskim jedinjenjima i solima organskih molekula;



4. Jon-dipol veze – relativno jake veze (1-5 kcal/mol), nastaju elektrostatičkim privlačenjem između katjona, odnosno anjona i dipola; ne zavise mnogo od temperature i udaljenosti; veoma su važne za interakciju između OMA i vode.



Kiselost i/ili alkalnost organskih medicinskih agenasa važni su zbog rastvorljivosti jedinjenja, farmaceutske faze (za procenu doziranja formulacije i drugo) i farmakološke faze (za procenu dispozicije, strukture jedinjenja na mestu vezivanja sa ciljnim molekulom i drugo). Kvantitativna mera jačine kiseline u rastvoru je konstanta disocijacije kiseline, K_a (kiselinska konstanta ili konstanta jonizacije kiseline), dok se veličina pK (negativni dekadni logaritam K_a) češće koristi u praksi.

Najčešće kisele funkcije u OMA su: karboksilna, fenolna i sulfonamidna, dok su najčešće bazne funkcije alifatičnih primarnih, sekundarnih i tercijarnih amina, kao i aromatičnih i heterocikličnih amina. Rastvorljivost organskih kiselina i baza može se povećati prevođenjem u soli, i to sa neorganskim ili organskim jonom.

Aktivnost OMA može se klasifikovati na strukturno-nespecifičnu i strukturno-specifičnu.

Strukturno-nespecifična aktivnost zavisi od fizičkih osobina - rastvorljivosti, particionih koeficijenata i drugih, ali ne i od prisustva ili odsustva određenih hemijskih funkcija. Tako, na primer, neki amidi, etri, ketoni ispoljavaju narkotičko delovanje, a potencijal supstanci povezan je sa particionim koeficijentima. Ova aktivnost rezultat je nakupljanja jedinjenja u vitalnim delovima ćelije, lipidnih karakteristika. Strukturno-nespecifični OMA su anestetici, hipnotici i drugi, uglavnom farmakodinamički agensi. Nespecifični lekovi ne deluju preko receptora.

Strukturno-specifična aktivnost povezana je sa prisustvom ili odsustvom funkcionalnih grupa, intramolekulskim prostorom, oblikom molekula. Nije neposredno povezana sa fizičkim osobinama. Male izmene strukture često dovode do velike promene aktivnosti. Strukturno specifična aktivnost zavisi od interakcija molekula lekovitog agensa sa ćelijskim receptorom ili nekim drugim specifičnim molekulom.

Receptorom se uopšteno naziva deo biološkog sistema na kojem lek ispoljava svoj karakteristični efekat. To je najčešće neki enzim ili protein. Ima važnu regulatornu ulogu u ciljnom tkivu. Veliki broj lekova efekat

ispoljava preko receptora ili enzima, koji su konstituenti ćelije. Tako, na primer:

- Holinergički lekovi deluju preko acetilholinskog receptora;
- Sintetički kortikosteroidi deluju preko glukokortikoidnog receptora;
- Nesteroidni antiinflamatorni lekovi inhibiraju ciklooksigenazu, enzim koji inhibira sintezu prostaglandina, te time smanjuju osećaj bola.

Sposobnost leka da se veže za receptor obično se naziva afinitetom leka ka receptoru, mada su, zapravo, molekuli receptora ti koji prepoznaju strukturne karakteristike prirodnih liganada ili potencijalnih sintetičkih liganada, odnosno, oni su molekuli koji selektuju ligande među ostalim prisutnim molekulima. Pošto su receptori proteini, njih karakteriše dinamička priroda. Stoga se afinitet može izraziti kinetičkom konstantom kompleksa lek-receptor. Lek izaziva farmakološki odgovor tek nakon vezivanja za receptor, čime se pokreće signalni put ili menja aktivnost enzima, koji dovode do farmakološkog odgovora (Thomas, 2003; Thomas, 2007).

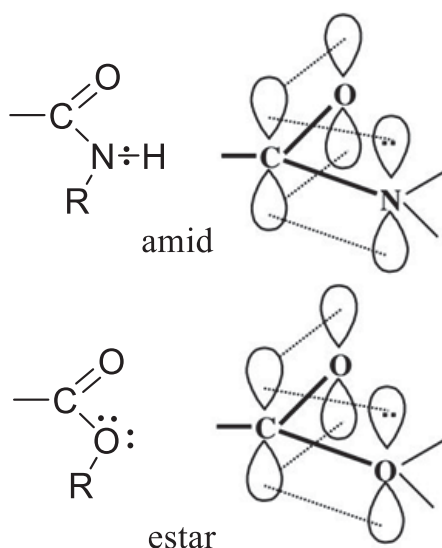
Neki lekovi se vezuju samo za jednu vrstu receptora te se nazivaju selektivnim lekovima, dok se drugi mogu vezati za više od jednog receptora, što umanjuje njihovu selektivnost. Lek koji ispoljava farmakološku aktivnost nakon vezivanja za receptor predstavlja agonistu. Nasuprot tome, lek koji ne izaziva farmakološki odgovor, nego blokira receptor, predstavlja antagonistu. Svaka od navedenih osobina može da se iskoristi za pravljenje farmakoloških formulacija na određeni način, zavisno od tipa bolesti, strukture i osobina aktivne supstance i drugog.

Strukturne osobine farmakološki aktivnih organskih supstanci od kojih zavisi njihova farmakološka aktivnost su u prvom redu stereohemija i mogućnost postojanja izomera. Stereohemija organskog molekula odnosi se na prostorni raspored atoma u trodimenzionalnoj strukturi molekula. Igra veoma važnu ulogu u farmakološkim svojstvima leka, zbog toga što svaka promena stereospecifičnosti leka utiče na njegovu farmakološku aktivnost. Takođe, parovi izomera imaju različite fizičke osobine (podeoni koeficijent, pKa i druge), pa se razlikuje i njihova farmakološka aktivnost.

Sterni faktori koji utiču na farmakološku aktivnost OMA su:

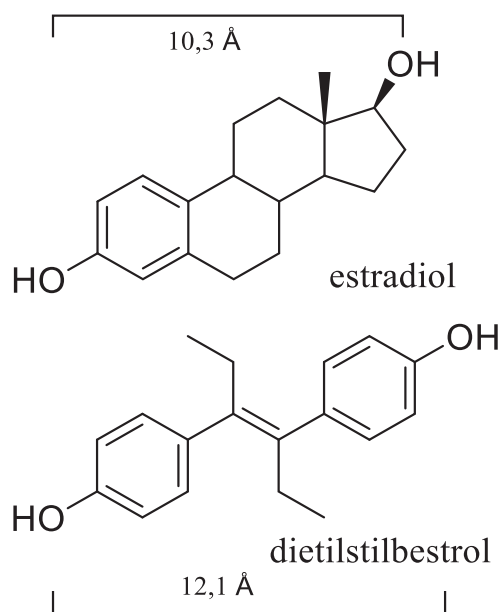
- Optička i geometrijska izomerija (enantiomeri, kao ni cis/trans izomeri nisu podjednako aktivni);
- Konformaciona izomerija (različiti konformeri se vezuju za različit tip receptora, npr. acetilholin);
- Postojanje hemijskih i bioloških izostera.

Hemijska izosterija predstavlja zamenu jednog strukturnog dela molekula (koji se sastoji od jednog ili više atoma) drugim atomom ili grupom atoma, koji imaju sličnu elektronsku konfiguraciju u poslednjoj orbitali, kao i elektronsku gustinu. Primer za hemijske izostere su amidi i estri:



Biološka izosterija (bioizosterija) se odnosi na interakciju izostera u biološkoj sredini sa odgovarajućim receptorima. Obično se u bioizostere svrstavaju biološki aktivna jedinjenja koja konkurišu za isti tip receptora, te uslovljavaju isti biološki odgovor. Bioizosterizam je u medicinskoj hemiji veoma važan zbog zadržavanja bioloških osobina molekula sa bioizosterama različite efektivnosti, sporednih efekata, drugih bioloških aktivnosti i dužine delovanja bioizosternih molekula.

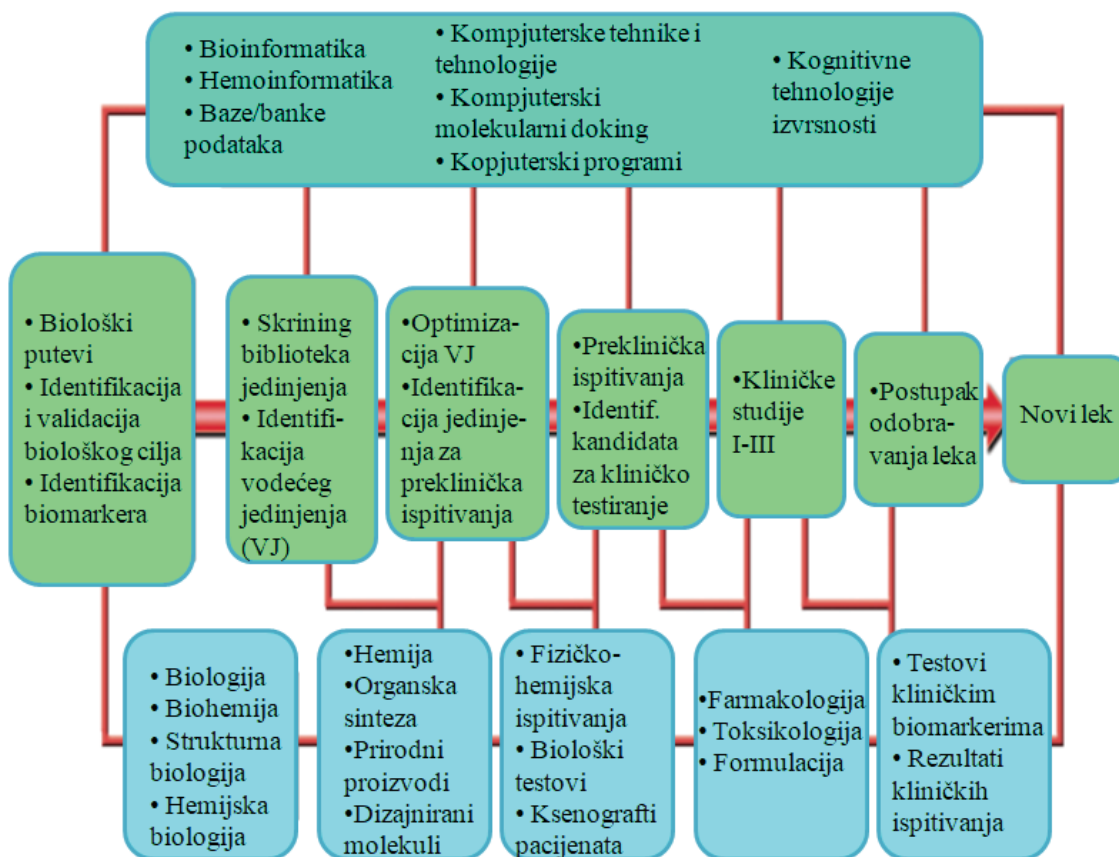
Veoma dobar primer bioizostera su estradiol, endogeni estrogenski hormon, i dietilstilbestrol, sintetički molekul, koji takođe ispoljava estrogenski efekat vezivanjem za estrogenski receptor, kao i estradiol:



Izosterna i bioizosterna zamena su veoma korisne u medicinskoj hemiji i često se koriste za pronalaženje vodećeg jedinjenja, i to zbog povećanja selektivnosti, smanjivanja sporednih efekata, obično usled smanjivanja generalne toksičnosti, poboljšanja farmakokinetičkih osobina (rastvorljivost, zasnovana na hidrofilnosti/hidrofobnosti), povećanja stabilnosti i pojednostavljivanja sintetskih puteva (Patrick, 2013; Radulović i Vladimirov, 2005; Thomas, 2003; Thomas, 2007).

Razvoj i odobravanje leka

Značaj i uloga istraživača u različitim oblastima nauke, kao i uloga različitih metoda i tehnika, predstavljeni su na Slici 3 (Nicolaou, 2014). Šema procesa razvoja lekova počinje patogenezom bolesti, identifikacijom i validacijom biološkog cilja povezanog sa njim, kao i identifikacijom biomarkera koji su neophodni u personalizovanoj medicini. Sledi skrining velikog broja jedinjenja iz baza (biblioteka) u kombinaciji sa ciljnim biomolekulima da bi se identifikovala vodeća jedinjenja.

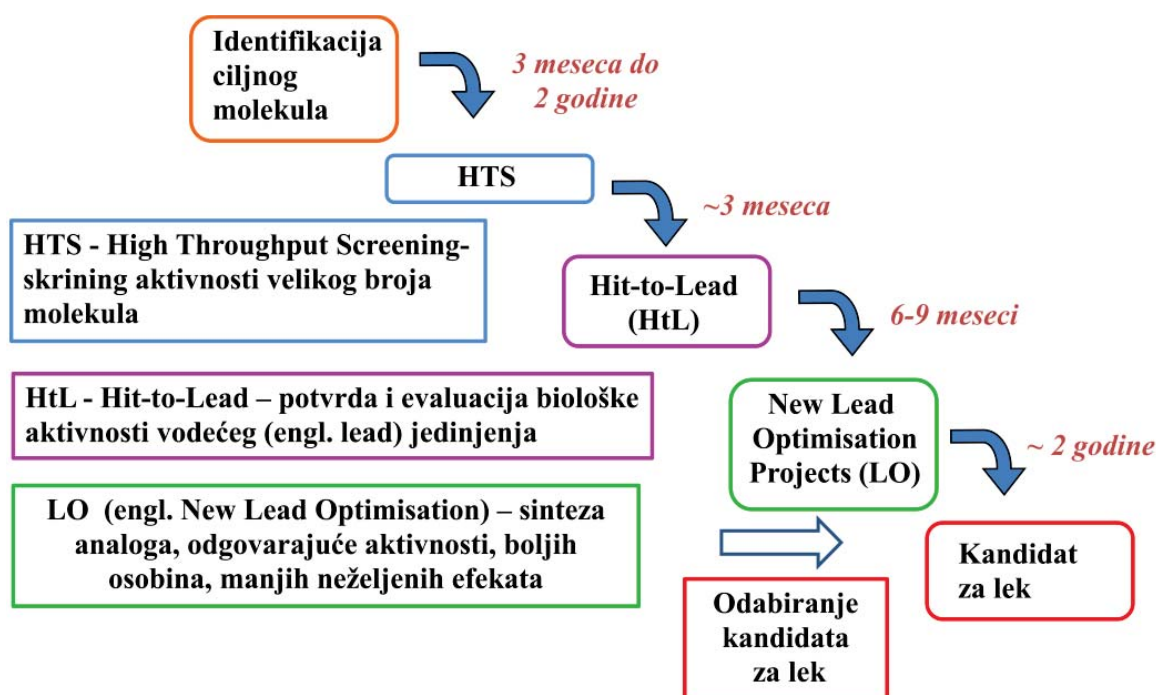


Slika 3 Oblasti nauke i tipovi istraživanja u okviru pronalaženja i razvoja lekova (prerađeno iz Nicolaou, 2014).

Nakon toga sledi optimizacija i izbor kandidata za preklinička, pa izvođenje prekliničkih ispitivanja, koja vode ka identifikaciji kandidata za klinička ispitivanja. Alternativno, fenotipski skrining biblioteke jedinjenja u biološkom i farmakološkom ispitivanju ćelija, tkiva ili celih organizama mogu da rezultuju identifikacijom vodećih jedinjenja. Slede klinička ispitivanja faze I, II i III, pa, ako budu uspešna, podnosi se prijava za odobranje novog leka odgovarajućoj agenciji. Na šemi su takođe navedene discipline, korisne tehnologije i sredstva koja se koriste u procesu otkrića leka, na putu od patogeneze bolesti do odobranja nove formulacije (leka). Ono što je najvažnije za postizanje cilja, a to je razvoj novog i/ili boljeg leka, jeste bliska saradnja istraživača kompetentnih u različitim oblastima nauke, dopunjavanja i nadgradnja rezultata pojedinačnih istraživanja.

HTS tehnologija

Biološki aktivni mali molekuli otkrivani su pojedinačnim ispitivanjem, međutim, trka s vremenom, odnosno bolestima, nameće potrebu za mnogo većom brzinom otkrivanja lekova. Stoga je razvijen veliki broj brzih, efikasnih i pouzdanih testova za preliminarno ispitivanje različitih bioloških ili farmakoloških aktivnosti novosintetisanih molekula *in vitro*. Danas postoje i automatizovani biološki testovi kojima se ispituje ogroman broj jedinjenja za kratko vreme, tzv. HTS tehnologija. U mikrotitar pločama sa velikim brojem bunarčića (i do više hiljada) inkubira se odgovarajući biološki sistem (protein, ćelija ili neki drugi model-sistem) sa test supstancama, a detekcija promene ciljnog molekula bazira se na merenju luminiscencije, fluorescencije, apsorbance ili, sve ređe, radioaktivnosti. Inkubacija biološkog sistema i ispitivanje delovanja jedinjenja vrši se u vrlo malim zapreminama, ceo postupak je automatizovan korišćenjem robota, tako da u relativno kratkom vremenu može da se ispita ogroman broj jedinjenja. Za veoma veliki broj jedinjenja se ispituju različita biološka ili farmakološka svojstva. Često se u poslednje dve decenije pre korišćenja HTS testova pristupa odabiru biološkog cilja (*engl. target*) fenotipskim skriningom (Zheng i sar., 2013). Od jedinjenja koja su pokazala zadovoljavajuću aktivnost odabiraju se vodeća jedinjenja, sintetiše veliki broj njihovih analoga (najčešće izostera i bioizostera, paralelnim sintezama i kombinatorijalnom hemijom), zatim ispituje njihov biološki ili farmakološki odgovor na istom ciljnom molekulu, te odabira kandidat za lek (Slika 4). Sa odabranim jedinjenjima se dalje sprovode ostala istraživanja, preklinička, pa klinička (Hüser, 2006).



Slika 4 Uloga HTS u otkrivanju i razvoju leka i procena trajanja pojedinih faza

Laboratorije sa potrebnom opremom i dovoljno kvalifikovanog osoblja uglavnom imaju velike farmaceutske kuće, dok se za potrebe naučnika dostupne manje laboratorije, sa jednostavnijom (i jeftinijom) opremom, kao i ograničeni broj istraživača.

Veoma je interesantna činjenica da za stvaranje jednog novog odobrenog leka treba ispitati oko milion jedinjenja, kao i činjenica da automatizovanom HTS tehnologijom nove generacije jedna laboratorija može da testira milion jedinjenja za manje od mesec dana. Najveći problem je cena ovih laboratorija - postoje samo u farmaceutskoj industriji, dok su istraživačke, odnosno akademske mnogo manje i skromnije. Stoga od sinteze novih jedinjenja do primene nekog od njih kao terapeutika razvoj traje i po više od deset godina (Slika 4, Zheng i sar., 2013).

Postavlja se pitanje: Zašto je tako teško, dugotrajno, mukotrpno i skupo otkriti i formulirati novi lek?! Odgovor je, verovatno, u ogromnom broju jedinjenja koja mogu da postoje, te u vremenu potrebnom da se sva ispitaju na sve potencijalne biološke mete i/ili bolesti. Naime, broj mogućih

jedinjenja se teško može proceniti, odnosno procene variraju u velikom opsegu. Najčešća procena je da je moguć broj molekula, potencijalnih lekova, 10^{40} . Da bi se shvatila veličina toga broja mogućih jedinjenja, može se, poređenja radi, uzeti u obzir podatak da je od Velikog praska prošlo 'samo' 10^{17} s. To bi značilo da je do sada sintetisan i ispitan veoma mali deo od svih potencijalnih jedinjenja, a da ni najobimnijim istraživanjima, čak ni sa *in silico* odabirom vodećih jedinjenja, sva ne mogu biti obuhvaćena u jako dugom periodu... (Valler i Green, 2000; Reymond i Awale, 2012).

MEDICINSKA HEMIJA STEROIDA

Medicinska hemija steroida obuhvata interdisciplinarna istraživanja iz nekoliko oblasti, međusobno veoma povezanih, pa i umreženih. To su:

- Sinteza steroidnih jedinjenja, bilo totalnom sintezom steroidnog sistema iz malih polaznih molekula ili modifikacijom prirodnih ili dostupnih steroida; ovom oblašću se bave organski hemičari-sintetičari, koji molekule dizajniraju na osnovu sličnosti u prisutnim farmakoforama sa poznatim lekovima ili supstratima enzima, odnosno ligandima receptora, ili na osnovu poznavanja delova proteina (receptora ili enzima) za koje bi takav molekul trebalo da se veže da bi delovao.
- Strukturna karakterizacija sintetisanih jedinjenja, kojom se mogu baviti hemičari, fiziko-hemičari i fizičari;
- Biohemijski i biološki testovi, kojima se ispituje uticaj odabranih steroida na ciljni molekul, metabolički put ili model-sistem; ovakve testove obično dizajniraju i izvode biolozi, molekularni biolozi ili biohemičari.
- Molekularni doking, kojim se dovode u vezu struktura jedinjenja i proteina (ili dela proteina, obično vezivnog/aktivnog centra enzima ili dela receptora koji vezuje ligand (*engl. ligand-binding domain, LBD*). S obzirom na specifičnost molekula i kompleksnost interakcija među njima, dokingom se mogu baviti svi istraživači koji dovoljno vladaju znanjem iz nekoliko naučnih disciplina neophodnim za ovakva studije: strukturni biolozi, hemičari, biohemičari i drugi.

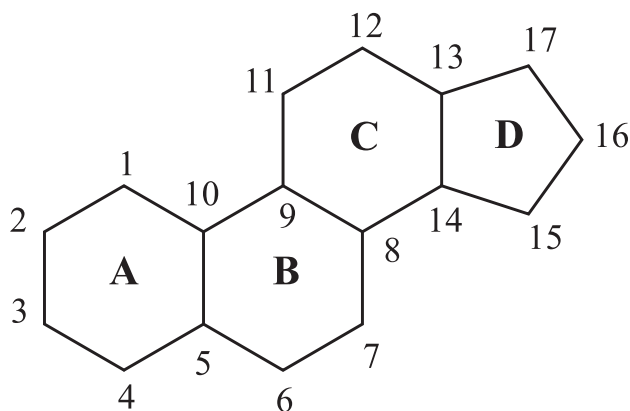
Molekularni doking obuhvata prepoznavanje proteina kao mogućih meta ključnih za proces otkrivanja lekova, kao i selekciju mogućih testova za proces otkrivanja i razvoja lekova. Ova istraživačka tehnika takođe omogućava prepoznavanje postojećih i dizajn novih molekula sa farmakoforama važnim za vezivanje za određene proteinske mete u različitim patološkim stanjima. Molekularnim dokingom obuhvaćena je mogućnost optimizacije strukture ispitivanih jedinjenja, tj. dizajniranje jedinjenja za koja

se predviđaju dobre biološke osobine, na osnovu predviđenih (prepoznatih) farmakofora koje treba da poseduju.

U nekim istraživačkim grupama ili laboratorijama sinteza steroidnih jedinjenja, strukturna karakterizacija novosintetisanih jedinjenja, ispitivanje biološke aktivnosti, molekularni doking i druga istraživanja podeljena su u okviru istraživačke grupe, dok u drugima jedan istraživač može da izvodi eksperimente iz različitih oblasti, zavisno od znanja, interesovanja i dostupne opreme. Tako se, na primer, interdisciplinarnost istraživača koji se bave sintezom i ispitivanjem biološke aktivnosti često naziva bioorganskom hemijom, dok se molekularnim dokingom i sintezom dizajniranih molekula bave organičari-sintetičari.

Medicinska hemija steroida obuhvata sve postojeće klase steroida, odnosno sintetišu se steroidi svih klasa koje postoje u prirodi i ispituje se njihova biološka i farmakološka aktivnost. Neke klase endogenih steroida su više zastupljene u medicinskoj hemiji, jer je više bolesti i problema koje se razvijaju usled poremećaja njihove biosinteze i/ili delovanja. Tako su, na primer, u velikoj meri zastupljeni derivati estrogenih, androgenih i kortikosteroidnih hormona, derivati holesterola i žučnih kiselina (Zeelen, 1997).

U molekulima steroida moguć je veliki broj strukturnih modifikacija, zahvaljujući osnovnoj strukturi steroidnog skeleta. Steroidni sistem u osnovi se kod većine jedinjenja iz ove ogromne familije sastoji od četiri kondenzovana prstena, i to tri šestočlana i jednog petočlanog (prstenovi A, B, C i D, Slika 5), mada neki prirodni steroidi imaju i dodatne prstenove ili druge strukturne karakteristike. Konformacije ovih prstenova i načini njihovog povezivanja, kao i prisutni supstituenti u različitim položajima ovog steroidnog sistema omogućavaju postojanje ogromnog broja jedinjenja. Međutim, u prirodi ipak postoji određeni/definitivan broj steroida, i to onih koji imaju neku određenu ulogu u organizmu u kojem se sintetišu, ili pak postoje kao intermedijeri u njihovoj biosintezi ili predstavljaju njihove metabolite.



Slika 5 Steroidni sistem prstenova sa oznakama prstenova i numeracijom ugljenikovih atoma

Intenzivna istraživanja u oblasti izolovanja i karakterizacije steroida započela su krajem XIX veka i bila su u ekspanziji 40-tih godina XX veka, zajedno sa istraživanjima u oblasti endokrinologije i medicine (Rasmussen, 2002). Heinrich Wieland i Adolf Windaus dobili su 1927. i 1928. godine Nobelovu nagradu za otkriće strukture holesterola (Windaus), odnosno deoksiholne kiseline (Wieland). Adolf Butenandt i Leopold Ružička su Nobelovu nagradu 1939. godine dobili za izuzetna otkrića u oblasti polnih hormona. Veliki doprinos nauci u ovim istraživanjima dao je i Edward C. Kendall, koji je 1950. godine dobio Nobelovu nagradu za otkrića u oblasti kortikosteroidnih hormona. Steroidi su nastavili da budu atraktivna i aktuelna oblast istraživanja, o čemu govori čitav niz laureata Nobelove nagrade za hemiju, fiziologiju i medicinu. Konrad Bloch i Feodor Lynen su 1964. godine takođe dobili ovu prestižnu nagradu, i to za značajne rezultate u utvrđivanju mehanizma biosinteze i metabolizma holesterola i masnih kiselina. Robert B. Woodward je 1965. godine dobio Nobelovu nagradu za totalnu sintezu holesterola i drugih jedinjenja steroidne ili nesteroidne strukture, dok su Odd Hassel i Derek Barton laureati te nagrade za 1969. godinu za značajna otkrića u oblasti konformacione analize organskih molekula, izneđu ostalih i steroida (Slater, 2000).

Sintezom i transformacijama jednih steroida u druge organski hemičari bave se odavno. Neki radovi koji se bave transformacijama steroida datiraju

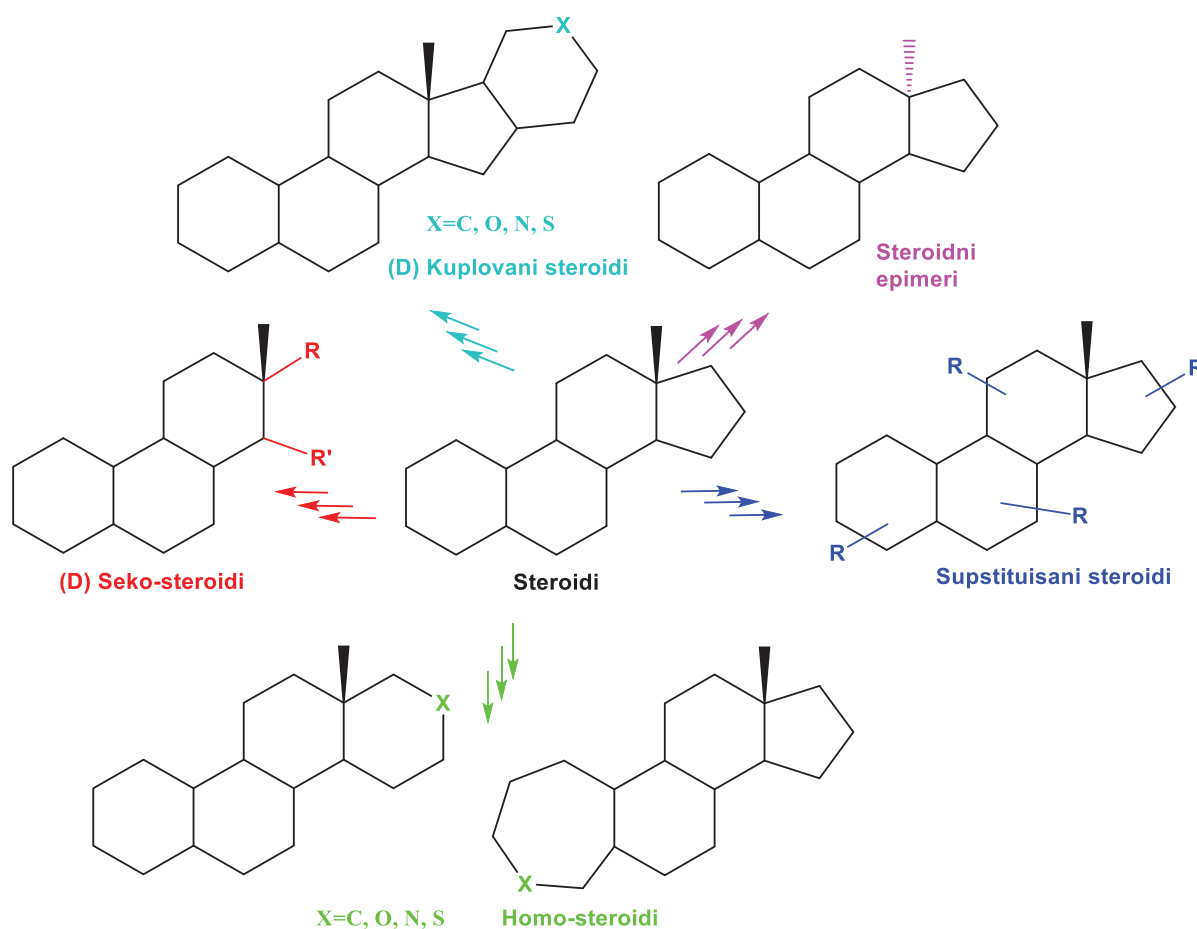
iz 1920-tih godina, dok totalne sinteze steroida datiraju nešto kasnije (Velluz i sar., 1965). Bachmann i saradnici su 1940. godine izveli totalnu sintezu ekvilenina, prirodnog estrogenog hormona prisutnog u organizmu životinja. Od tada je sintetisan ogroman broj steroidnih molekula, kako poznatih, koji su ranije izolovani iz prirodnih izvora i okarakterisani, tako i novih, koji ne postoje u prirodi ili ranije nisu bili poznati. Tačan broj steroidnih molekula čija je struktura poznata se ne zna pouzdano, što je u skladu sa činjenicom da se svakodnevno sintetišu nova jedinjenja ove brojne i šarolike familije (Hanson 2005, Hanson 2006, Hanson 2010). Ranije su sinteze novih jedinjenja uglavnom izvođene sa ciljem proučavanja strukture, reaktivnosti jedinjenja i mehanizama reakcija, dok se danas dosta često jedinjenja sintetišu sa ciljem njihove primene – većinom u oblasti razvoja lekova, mada neka steroidna jedinjenja mogu da budu potencijalno primenljiva i u druge svrhe, pretežno medicinske. Tako, na primer, neki steroidi mogu da se koriste u dijagnostici ili kao dopanti holestericima u senzorima, jer im snižavaju temperaturne opsege faznih prelaza na temperature bliske sobnoj, što se zasniva na njihovoj hiralnosti i niskoj tački topljenja (Shlens i sar., 1975; Vallamkondu i sar., 2018; Obadović i sar., 2000; Obadović i sar., 2001; Obadović i sar., 2006; Obadović i sar., 2009; Obadović i sar., 2011). Međutim, primena steroida je dosta ograničena, prvenstveno zbog cene polaznih jedinjenja.

Postoje pokušaji da se neke klase steroida sveobuhvatnije opišu i popišu sa različitih stanovišta i/ili na osnovu različitih osobina/podela, ali je veoma teško to izvesti zbog veoma velikog broja jedinjenja, kao i njihove raznolikosti u strukturi, fizičko-hemijskim karakteristikama, hemijskoj i biološkoj aktivnosti (Singh i Panda 2013; Ibrahim-Ouali 2010, Ibrahim-Ouali 2011a, Ibrahim-Ouali 2011b, Penov Gaši i sar., 2014, Frank i Schneider, 2013, Patel i Savjani 2015; Tarkovská 2019; Grbović i sar., 2019). Osim toga, sa uvođenjem tehničkih inovacija radovi u naučnim časopisima su postali “vidljiviji” i dostupniji, ali je do velikog broja radova, pa i podataka o jedinjenjima sintetisanim i okarakterisanim ranije, teško doći. Takođe je teško doći i do podataka o jedinjenjima čija je sinteza i ispitivanje osobina

objavljeno u radovima u nacionalnum časopisima, na jezicima kojima se govori u državama u kojima su ti radovi objavljeni.

Najviše steroida je sintetisano transformacijama prirodnih ili industrijski dostupnih steroida, dok su totalne sinteze steroida od manjih, nesterodnih molekula kao polaznih jedinjenja, ređe. Modifikovani steroidi su strukturno slični prirodnim steroidima, ali je promena stukture, neposredno povezana sa fizičko-hemijskim karakteristikama jedinjenja, često povezana i sa promenom njihove biološke/farmakološke aktivnosti. Neki modifikovani steroidi menjaju aktivnost nekih od enzima uključenih u steroidogenezu ili kancerogenezu, neki kompetituju sa receptorima, a neki prouzrokuju smrt ćelija kancera, najčešće indukovanjem apoptoze ili nekroze. Dizajniranje modifikovanih steroida može biti zasnovano na rezultatima bioloških testova prirodnih ili ranije sintetisanih jedinjenja, optimizacijom aktivnog molekula sintezom serije sličnih jedinjenja, sa različitim farmakoforama, izosterama ili bioizosterama, što je praćeno upoređivanjem strukture i aktivnosti jedinjenja (SAR), ili može da bude zasnovano na dizajniranju novih jedinjenja, na osnovu prepoznatog ciljnog molekula. Strukturna karakterizacija biološki aktivnih jedinjenja je najčešće osnova za dizajniranje drugih jedinjenja. U nastavku će biti predstavljena jedinjenja sintetisana u okviru istraživačke grupe PMF u Novom Sadu koja se bavi steroidima, sa osvrtom i na neke rezultate drugih grupa koje se bave sličnom oblašću istraživanja.

Na Slici 6 predstavljeni su neki primeri modifikovanih steroida, mada se u sintetisanim molekulima najčešće javljaju kombinacije modifikacija.



Slika 6 Primeri modifikovanih steroida

Istraživačka grupa na PMF u Novom Sadu bavi se dizajniranjem i sintezom novih steroidnih jedinjenja već više od 50 godina, što je započeto pionirskim radovima Miljkovića i saradnika 70-ih godina XX veka. Strukturne modifikacije prirodnih ili dostupnih industrijski sintetisanih steroida predmet su istraživanja velikog broja istraživača ove grupe od tada. Kao polazna jedinjenja u sintetskim putevima korišćeni su steroli (Miljković i sar., 1984; Penov Gaši i sar., 2015), steroidni alkaloidi (Gunić i sar., 1994; Penov Gaši i sar., 1996; Penov Gaši i sar., 1997), žučne kiseline (Miljković i sar., 1987b, Stanković i sar., 1990; Miljković i sar., 1996; Kuhajda i sar., 1996; Stanković i sar., 1998), kao i steroidi androstanske i estranske serije (Stefanović i sar., 1966; Stefanović i sar., 1970; Miljković i sar., 1973; Miljković i sar., 1977; Miljković i sar., 1978; Gaši i sar., 1983; Miljković i sar., 1987ba, Petrović i sar., 1990; Pejanović i sar., 1995; Miljković i sar.,

1997; Penov Gaši i sar., 1998; Pejanović i sar., 1999; Jovanović-Šanta i sar., 1999; Petrović i sar., 2001, Jovanović-Šanta i sar., 2002; Penov Gaši i sar., 2003; Petrović i sar., 2004, Jovanović-Šanta i sar., 2005). Naročito je veliki broj androstanskih i estranskih steroida sintetisan u svrhu ispitivanja biološke i farmakološke aktivnosti u biomedicinske svrhe. O biološkoj aktivnosti nekih od njih biće reči u daljem tekstu.

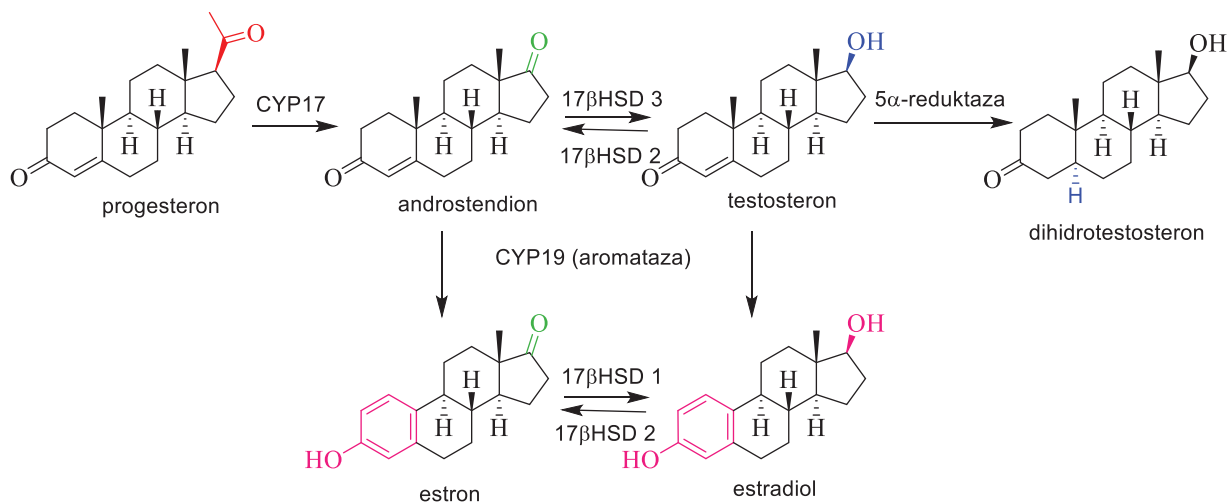
Hemijom vođen razvoj lekova za lečenje obolelih od hormonski zavisnih bolesti

Sva jedinjenja, pa i steroidi svih klasa, prirodni ili sintetički, mogu se, u principu, podvrći ispitivanju različitih bioloških i farmakoloških osobina, s tim da se u tzv. hemijom vođenom otkrivanju lekova za pojedina jedinjenja ili klase jedinjenja po pravilu ispituju efekti, pretpostavljeni na osnovu strukturne sličnosti datih molekula sa supstratima ili ligandima proteina-ciljeva u razvoju lekova (receptora steroidnih hormona ili enzima steroidogeneze) za specifične bolesti ili na osnovu strukturne sličnosti sa postojećim lekovima, koji se koriste u kliničkoj praksi ili molekulima u nekoj od podmaklih faza u razvoju lekova.

Šema steroidogeneze, steroidni intermedijeri i steroidni polni hormoni predstavljeni su na Slici 7. Progesteron, nastao iz holesterola skraćivanjem bočnog niza u položaju 17, supstrat je enzimu iz porodice citohroma P450, enzimu CYP17 (17 α -hidroksilaza/17,20-lijaza) i prekursor androstendiona, koji delovanjem izoenzima 3 17 β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β HSD3) daje androgeni hormon testosteron. Androstendion i testosteron demetilovanjem C-19, praćenim aromatizacijom A prstena delovanjem enzima CYP19 (aromataze) konvertuju se u odgovarajuće estrogene hormone, estron, odnosno estradiol. Delovanjem enzima 5 α -reduktaza testosteron se prevodi u androgeni hormon, dihidrotestosteron (DHT), koji je tri puta potentniji od testosterona. Dostupnost aktivnih oblika androgenih i estrogenih hormona reguliše se delovanjem različitih izoformi 17 β HSD.

Za svaku klasu steroidnih hormona postoje specifični receptori u ciljnim tkivima tih hormona. Progesteron deluje na ciljne ćelije preko

progesteronskog receptora (PR), estrogene hormoni, estradiol i estron, ispoljavaju efekat vezivanjem za estrogene receptore (ER), dok androgeni hormoni, testosteron i dihidrotestosteron, deluju preko androgenog receptora (AR).



Slika 7 Strukture steroidnih polnih hormona i enzimi koji učestvuju i njihovoj biosin-tezi i interkonverzijama

Za C-18 steroidna jedinjenja, koja su po strukturi estranski derivati, zapravo, najčešće derivati 1,3,5(10)-estratriena, obično se ispituju sledeće biološke i farmakološke aktivnosti (Miller i Auchus, 2011; Jordan i Furr, 2009; Avendano i Menendez, 2008; Ottow i Weinmann, 2008):

- *In vitro* ispitivanje sposobnosti jedinjenja da se vežu za estrogene receptore (α i/ili β izoformu estrogenog receptora), čime bi se smanjila mogućnost delovanja endogenog estradiola (E2);
- *In vivo* ispitivanje estrogene i antiestrogene aktivnosti, najčešće uterotrofnom metodom na eksperimentalnim životinjama ili na nekoj estrogen-zavisnoj ćelijskoj liniji kao model-sistemu; potencijalna primena aktivnih jedinjenja bila bi kao estrogena u terapiji hormonske dopune ili kao antiestrogena u terapiji stanja i bolesti prouzrokovanih hiperprodukcijom estradiola;

- *In vitro* ispitivanje sposobnosti da inhibiraju ili aktiviraju neki od izoenzima 17β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17β -HSD), pri čemu inhibiranje 17β -HSD1 vodi smanjenju produkcije E2, pa je takvo jedinjenje potencijalni kandidat za lek za endometriozu ili ER+ kancer dojke ili drugih ženskih reproduktivnih tkiva, dok inhibiranje 17β -HSD2 dovodi do povećanja produkcije E2, što bi ukazivalo na jedinjenje koje je potencijalni kandidat za lek za lečenje stanja ili bolesti prouzrokovanih deficitom estradiola (npr. osteoporoze);
- *In vivo* ispitivanja radi utvrđivanja bioloških i fizioloških efekata na tkiva koja ne učestvuju u reprodukciji (npr. na kosti i krvne sudove).

Za C-19 steroide, koji su po strukturi derivati androstana ili androstena ($\Delta 4$ ili $\Delta 5$ androstena), najčešće se ispituju sledeće biološke i farmakološke aktivnosti (Miller i Auchus, 2011; Jordan i Furr, 2009; Avendano i Menendez, 2008; Ottow i Weinmann, 2008; Furr, 2006):

- *In vitro* ispitivanje sposobnosti da se vežu za androgeni receptor (AR), čime bi se smanjila mogućnost delovanja endogenog testosterona (T), dok bi primena ovih jedinjenja bila u slučaju hiperprodukcije T u organizmu;
- *In vitro* ispitivanje sposobnosti da menjaju aktivnost nekog od izoenzima 17β -HSD; tako, na primer, inhibiranje 17β -HSD3 dovodi do smanjenja produkcije T, što takvo jedinjenje čini potencijalnim kandidatom za lek za AR+ tipove kancera;
- *In vitro* ispitivanje sposobnosti vezivanja i inhibiranja CYP17A1 enzima (17-hidroksilaze/17,20-lijaze), što bi vodilo smanjenju biosinteze svih polnih steroidnih hormona, pa i T, tako da bi jedinjenje ovakvog efekta moglo biti potencijalni kandidat za lek za lečenje AR+ tipova kancera;
- *In vitro* ispitivanje sposobnosti vezivanja i inhibiranja 5α -reduktaze, što bi vodilo smanjenju biosinteze dihidrotosterona, androgenog hormona potentnijeg od T, što bi na jedinjenje ovih osobina ukazalo kao na potencijalnog kandidata za lek za lečenje AR+ tipova kancera;

- *In vitro* ispitivanje sposobnosti vezivanja i inhibiranja CYP19 (aromataze), pri čemu jedinjenje koje izaziva smanjenje biosinteze E2 može da se smatra potencijalnim kandidatom za lek za ER+ tipove kancera ženskih reproduktivnih tkiva;
- *In vivo* ispitivanja radi utvrđivanja anaboličkih i androgenih efekata, zavisno od planirane primene androstanskih steroida.

Biomedicinski potencijal estranskih derivata

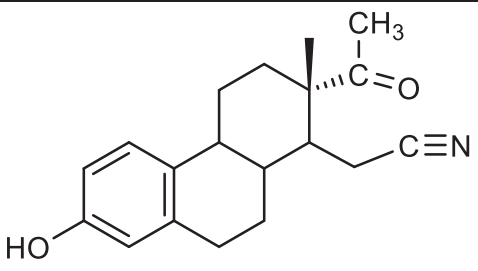
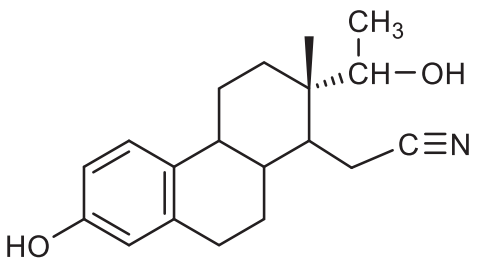
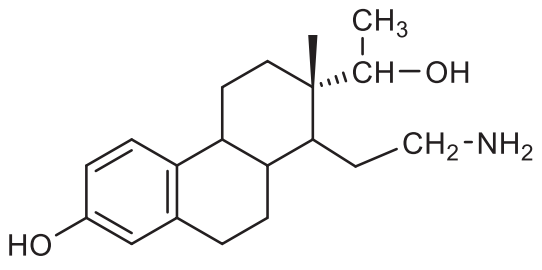
Estranski derivati koji pokazuju antiestrogenu aktivnost i utiču na aktivnost aromataze

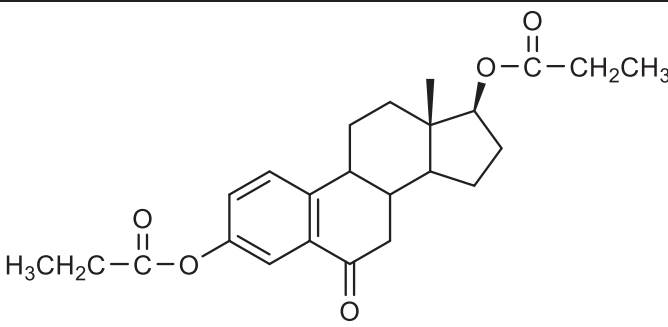
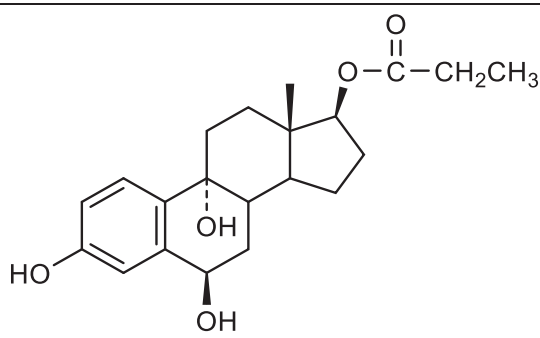
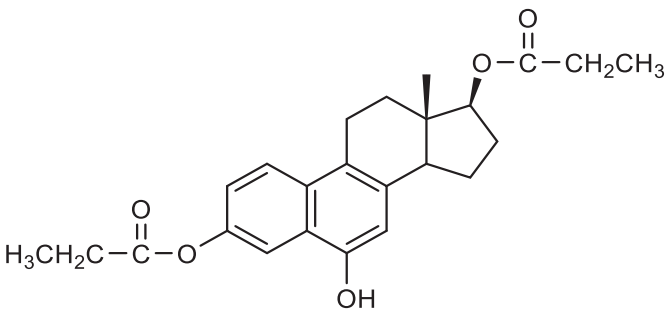
Jedinjenja koja se vezuju za estrogene receptore mogu da ispolje efekat sličan efektu estradiola – hormonski/estrogeni efekat, ili da ne ispolje taj agonistički efekat, ali da svojim vezivanjem spreče estradiol da se veže i izazove fiziološki efekat; u tom slučaju se takva jedinjenja nazivaju antihormonima ili antiestrogenima. Nekim *in vitro* testovima može da se detektuje i izmeri vezivanje jedinjenja za estrogene receptore, dok se *in vivo* testovima na eksperimentalnim životinjama može izmeriti efekat (estrogeni ili antiestrogeni) datog jedinjenja ispoljen nakon vezivanja za estrogene receptore.

Uterotrofnom metodom (Emmens, 1950; Wakeling i sar., 1984) ispitivan je estrogene i antiestrogene potencijal mnogih jedinjenja sintetisanih u našoj laboratoriji, polazeći od estradiola ili estrona. Estranski derivati imaju modifikovan– supstituisan ili raskinut– D prsten (tzv. D-sekoestranski derivati) i/ili modifikacije na drugim prstenovima steroidnog jezgra. Promena originalne strukture ili celovitosti D prstena u slučaju nekih jedinjenja dovela je do gubitka estrogene aktivnosti, dok su neki steroidi delovali kao antisterogeni (Petrović i sar., 1990; Petrović i sar., 1998; Sakač i sar., 2007). U Tabeli 1 navedene su strukture nekih od D-modifikovanih estranskih derivata, čije su estrogene i antiestrogene aktivnosti ispitivane među prvima, a dobijeni rezultati su ukazali na pravce daljih modifikacija prilikom sinteze novih jedinjenja, kao i na pravce mogućih ispitivanja biološke aktivnosti. Estrogeni efekat su uglavnom ispoljila jedinjenja koja su u organizmu mogla

da podlegnu delovanju hidrolitičkih enzima, čime bi nastali analozi prirodnih estrogenih hormona, tj. jedinjenja aromatičnog A prstena, od kojih neka sa proširenom konjugacijom, a očuvanim D prstenom (Sakač i sar., 2005b). S druge strane, jedinjenja kojima je izmenjen D prsten pokazala su malu estrogenu aktivnost ili je ona potpuno izostala (Sakač i sar., 2005a), dok su antiestrogenu aktivnost ispoljili u opsegu 30 - 40%, odnosno oko dva puta manju u odnosu na tamoksifen (Tabela 1).

Tabela 1 Estrogeni i antiestrogeni efekat odabranih D-seko i D-supstutuisanih estranskih derivata i tamoksifena, izmeren uterotrofnom metodom*

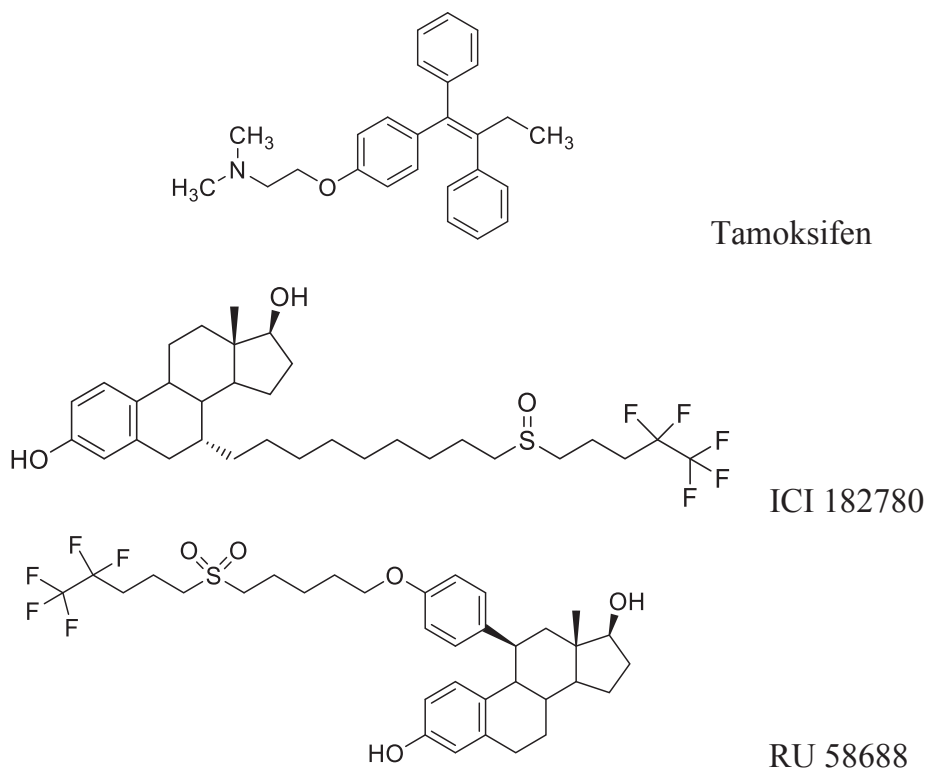
Struktura jedinjenja	Estrogena aktivnost (%)	Antiestrogena aktivnost (%)
 <p>(Sakač i sar., 2005a)</p>	-4	37,6
 <p>(Sakač i sar., 2005a)</p>	-	29,0
 <p>(Sakač i sar., 2005a)</p>	-9,7	38,1

Struktura jedinjenja	Estrogena aktivnost (%)	Antiestrogena aktivnost (%)
 <p>(Sakač i sar., 2005b)</p>	6	-
 <p>(Sakač i sar., 2005b)</p>	26,36	48,97
 <p>(Sakač i sar., 2005b)</p>	75,70	-
Tamoksifen (Sakač i sar., 2007)	39,8	62,4

* Nezrele ženke pacova (stare 21 dan) tretirane su estradiolom, ispitivanim jedinjenjima ili kombinacijom estradiola i ispitivanih jedinjenja u koncentraciji jedinjenja 5 mg/kg telesne mase životinje, nakon čega su poređene mase uterusu životinja tretiranih različitim agensima; '-' Nije testirano

Pored tamoksifena, koji ispoljava i estrogenu i antiestrogenu aktivnost, razvijeni su i tzv. čisti antiestrogeni, koji su steroidne strukture, tj. derivati estradiola sa supstuentima u položaju 7 α ili 11 β . Najveći antiestrogeni

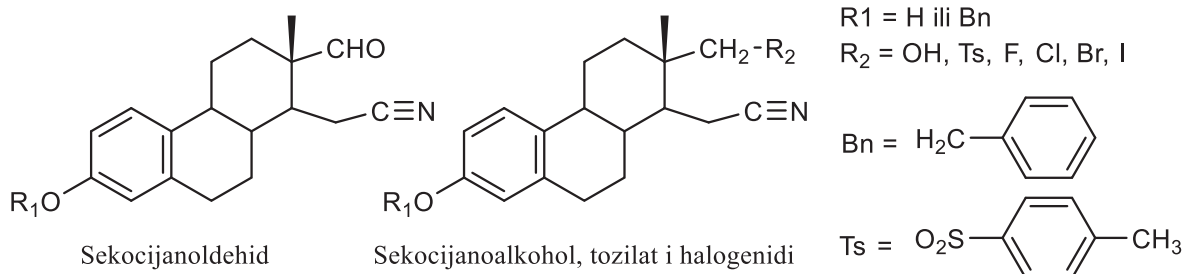
efekat na eksperimentalnim životinjama ili ćelijskim linijama ispoljila su jedinjenja ICI 182780 (Bowler i sar., 1989; Jin i sar., 1995) i RU 58688 (Teutsch i sar., 1988) (Slika 8).



Slika 8 Struktura parcijalnog antiestrogena tamoksifena i čistih antiestrogena ICI 182780 i RU 58688

D-Sekoestranski derivati sa aldehidnim, alkoholnim, tozilatnim ili halogenim supstuentima u položaju 17 (Slika 9) su se sa različitim afinitetom vezivali za estrogene receptore izolovane iz tkiva uterusa pacova. Najbolje su se vezivali D-seko bromid i jodid sa slobodnom OH grupom u položaju 3: Kd kompleksa E2-ER bio je u prisustvu ovih jedinjenja mnogo veći (10,4, odnosno 6,78 nM, redom), nego bez prisustva kompetitora ($2,61 \pm 0,74$ nM). D-Seko bromid i D-seko fluorid sa benziletarskom funkcijom u položaju 3 su takođe povećali vrednost Kd za kompleks E2-ER (6,87, odnosno 6,33 nM, redom). Ostala jedinjenja su se vezivala u manjoj meri, zavisno od strukture. Ova jedinjenja su formirala komplekse različite stabilnosti sa estrogenim receptorom, na hladno ili na sobnoj temperaturi. Kompleksi su se translocirali u jedro različitim brzinama i vezivali se sa

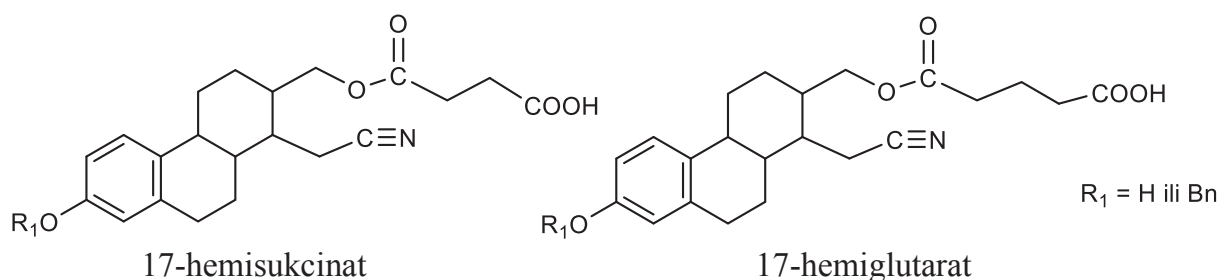
različitim afinitetima za DNK (Jovanović-Šanta 2000; Jovanović-Šanta i sar., 2006), pri čemu formiranje kompleksa, translociranje u jedro i vezivanje za DNK nisu uvek bili u srazmeri sa afinitetom vezivanja za receptor.



Slika 9 Struktura sekocijanoaldehida, sekocijanoalkohola, tozilata i halogenida estranske serije sa slobodnom ili benzilovanom hidroksilnom grupom u položaju 3

Jedinjenja koja su se u *in vitro* uslovima dobro vezivala za estrogene receptore, u testovima *in vivo* izazvala su antiestrogeni efekat: za receptore se najbolje vezivao sekocijano bromid, dok su najbolji antiestrogeni efekat ispoljili sekocijano bromid i sekocijano hlorid sa slobodnom fenolnom grupom u položaju 3 i sekocijano alkohol sa 3-benzil-etarskom funkcijom, kod kojih je uterotrofnim testovima *in vivo* izmerena antiestrogena aktivnost preko 30% pri primeni koncentracije od 5 mg/kg telesne mase životinja (Jovanović-Šanta 2000; Jovanović-Šanta i sar., 2000, Jovanović-Šanta i sar., 2003, Jovanović-Šanta i sar., 2006). Ni jedno od ispitivanih jedinjenja nije ispoljilo estrogenu aktivnost, što je jako značajno u razvoju antihormonskih lekova.

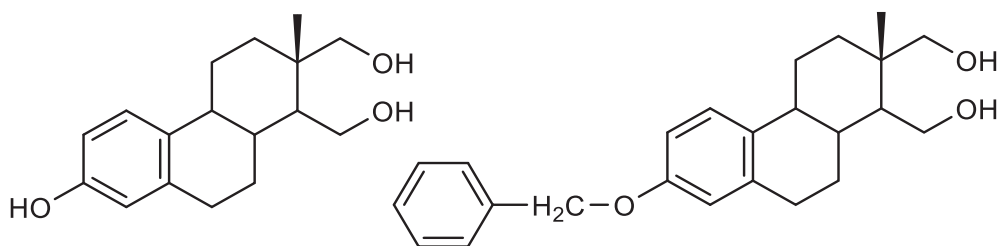
S obzirom na visoki potencijal D-seko-estranskih jedinjenja za vezivanje za receptor i, s tim u vezi, ispoljavanje antihormonske aktivnosti, sintetisana su i ispitana i druga jedinjenja tog tipa, tj. narušenog integriteta D prstena, od kojih su neka pokazala značajnu antiestrogenu aktivnost. Tako su D-seko-estranski derivati sa nitrilnom funkcijom u položaju 15, 17-hemisukcinat i 17-hemiglutarat (Slika 10), pokazali potpuni izostanak estrogene aktivnosti, dok je hemisukcinat sa slobodnom OH grupom ispoljio antihormonsku aktivnost od čak preko 40%.



Slika 10 Struktura sekocijanohemisukcinata i hemiglutarata estranske serije sa slobodnom ili benzilovanom hidroksilnom grupom u položaju 3

Dobrim inhibitorima aromataze su se pokazali derivati androstana. Međutim, imajući u vidu strukturne sličnosti sa fiziološkim proizvodima delovanja ovog enzima, kao i mogućnost za metaboličku inhibiciju krajnjim proizvodom, ipak je ispitivano vezivanje nekih jedinjenja estranske serije za ovaj enzim, kao i efekat na njegovu aktivnost. Oba navedena hemiglutaratna derivata, sa slobodnom 3-OH grupom ili sa benziletarskom funkcijom u položaju 3, pokazala su izuzetno značajan inhibitorni efekat na aromatazu iz mitohondrijalne frakcije ovarijuma: čak 67%, odnosno 88%, redom, u eksperimentu u kojem je test-koncentracija jedinjenja bila 50 μ M. Benziletarski derivat je ispoljio veći efekat, verovatno zbog boljeg vezivanja za hidrofobno mesto u aktivnom centru enzima, te sukcesivnog nastajanja 3-hidroksi derivata tokom eksperimenta, što je u skladu sa činjenicom da u ekstraktima tkiva postoje aktivni enzimi, u ovom slučaju eteraze (Jovanović-Šanta 2010; Jovanović-Šanta i sar., 2011).

D-sekoestranska jedinjenja koja nemaju nitrilnu funkciju, nego su po strukturi 16,17-seko-dioli (Slika 11), ispoljila su potpuni gubitak estrogene aktivnosti, značajan antiestrogeni efekat i aktivatorski efekat na aromatazu. S obzirom na to da je predmet istraživanja medicinske hemije obično dizajn inhibitora nekih enzima, ovakav rezultat može da dovede u nedoumicu značaj i vrednost rezultata. Međutim, u stanjima i bolestima nastalim usled smanjene produkcije estradiola, kao što su osteomalacija, osteoporoza i neplodnost žene, stimulacija enzima aromataze bi mogla biti od velikog značaja (Jovanović-Šanta 2010; Jovanović-Šanta i sar., 2015).



Slika 11 Struktura 16,17-sekoestranskih 16,17-diola sa hidroksilnom, odnosno benziletarskom funkcijom u položaju 3

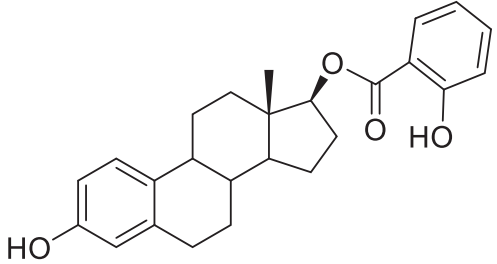
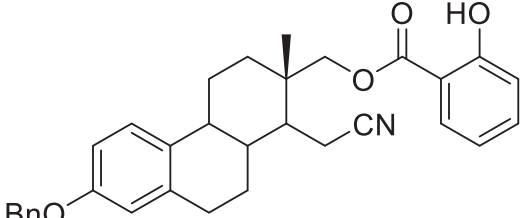
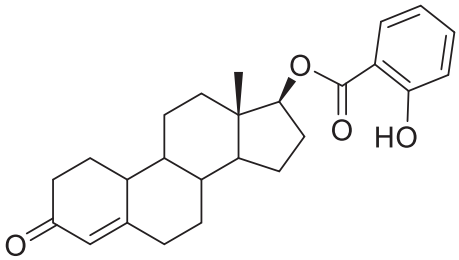
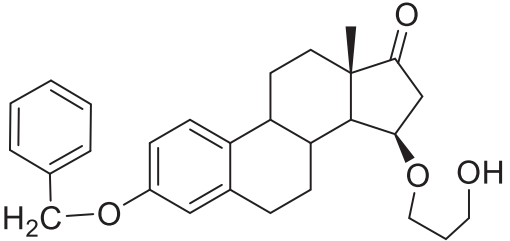
Poređenjem strukture nekih bioaktivnih jedinjenja i efekata u *in vivo* i/ili *in vitro* uslovima se može uočiti nitrilna funkcija kao značajna farmakofora (Fleming i sar., 2010).

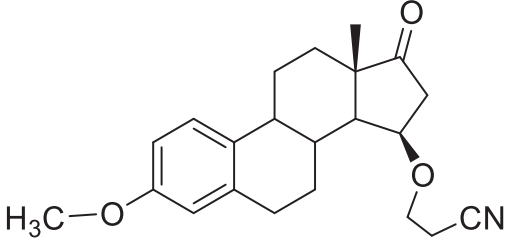
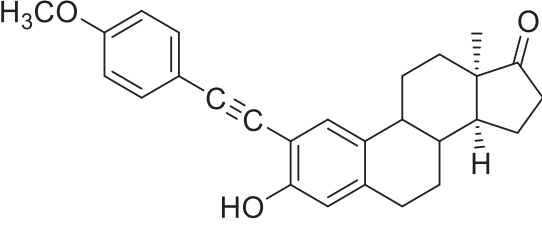
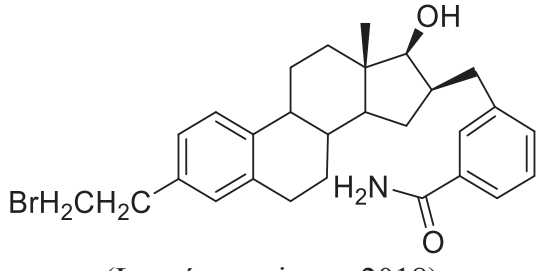
Estranski derivati koji inhibiraju izoenzime 17 β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β -HSD)

Danas se mnogo pažnje pridaje mogućnosti usmeravanja konverzije aktivnih hormona u manje aktivne analoge, ili obrnuto, zavisno od patologije. Tako inhibitori ili aktivatori 17 β -HSD ili nekog drugog enzima steroidogeneze mogu da povećaju ili smanje koncentraciju aktivne forme hormona u organizmu, što može da ima veliki klinički značaj (Lanišnik Rižner, 2013). *In vitro* ispitivanja sposobnosti estranskih derivata da inhibiraju ili aktiviraju neki od izoenzima 17 β -HSD izvođena su sa enzimima izolovanim iz humanih ili animalnih tkiva. S obzirom na činjenicu da 17 β -HSD1 prevodi estron u mnogo potentniji estradiol, dok 17 β -HSD2 katalizuje obrnuti proces (Slika 7), jedinjenja koja inhibiraju izoenzim 2 omogućavaju povećanje koncentracije estradiola u tkivima, što je veoma korisno u stanjima ili bolestima prouzrokovanim niskim nivoom estradiola, kao što su osteopenija, osteoporoza i sterilitet žena. Tako su submikromolarne koncentracije 17-saliciloiloksi derivata estradiola izazvale značajnu inhibiciju 17 β -HSD2 (IC_{50} = 0,59 μ M). 17-Saliciloiloksi derivat nortestosterona ispoljio je nešto slabiji efekat (IC_{50} = 13 μ M), dok je efekat 16,17-sekoestranskog 17-saliciloiloksi derivata bio veoma slab (Klisurić i sar., 2016; Tabela 2). S druge strane, jedinjenja estranske serije sa očuvanim D prstenom i 17-keto funkcijom i sa dugim supstituentima sa karboksilnom ili nitrilnom funkcijom u položaju 15 inhibirala su u značajnoj meri 17 β -HSD1

u prisustvu NADH kao kofaktora, sa submikromolarnim IC_{50} koncentracijama (Herman i sar., 2019). Takođe su se jedinjenja sa očuvanom estranskom strukturom i aromatičnim supstituentima u položaju 2 pokazala dobrim inhibitorima 17β -HSD1, što bi potencijalno moglo da ima primenu u razvoju lekova za tretman estrogen-zavisnih bolesti izazvanim hiperprodukcijom estradiola. Jedno od ispitivanih jedinjenja takvih karakteristika navedeno je u tabeli 2 (Bacsa i sar., 2017). Testovima na ćelijskoj liniji T-47D kancera dojke utvrđeno je da derivat estradiola sa etilenbromidnom funkcijom na C-3 umesto hidroksilne grupe i karbamoilbenzilnim supstituentom na C-16 u velikoj meri inhibira 17β -HSD1, i to mnogo više nego jedinjenja sa drugim funkcijama na C-3 (Lespérance i sar., 2018).

Tabela 2 Inhibicija izoenzima 17 β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β -HSD) estranskim derivatima* Efikasnost inhibicije izražena je kao procenat (%) aktivnosti enzima u prisustvu 50 μ M ispitivanog jedinjenja u odnosu na kontrolu (100%) i/ili kao IC₅₀ vrednost ispitivanih jedinjenja;

Struktura jedinjenja	Inhibicija aktivnosti 17 β HSD		
	17 β HSD1	17 β HSD2	17 β HSD3
	% aktivnosti u odnosu na kontrolu [IC ₅₀ , μ M]		
 (Klisurić i sar., 2016)	52	4,3 [0,59]	95
 (Klisurić i sar., 2016)	56	53 [51]	83
 (Klisurić i sar., 2016)	76	34 [13]	NI
 (Herman i sar., 2019)	[0,78]	NI	NI

Struktura jedinjenja	Inhibicija aktivnosti 17 β HSD		
	17 β HSD1	17 β HSD2	17 β HSD3
	% aktivnosti u odnosu na kontrolu [IC ₅₀ , μ M]		
 (Herman i sar., 2019)	[0,56]	NI	NI
 (Bacsá i sar., 2017)	[0,23]	NI	NI
 (Lespérance i sar., 2018)	[0,05]	-	-

*Prečišćen homogenat humane placente (17 β -HSD1), mikrozom jetre ženki pacova (17 β -HSD2) ili testisa pacova (17 β -HSD3) (osim karbamoilbenzilnog derivata, koji je testiran na T-47D ćelijama kancera dojke) inkubirani su u prisustvu C¹⁴-obeležениh steroidnih supstrata i odgovarajućih koenzima, u prisustvu i odsustvu estranskih derivata. Po završetku reakcije produkti reakcije detektovani su tankoslojnom hromatografijom. NI - nema inhibicije; '-' nije testirano

Biomedicinski potencijal androstanskih derivata

Androstanski derivati kao inhibitori aromataze (CYP19)

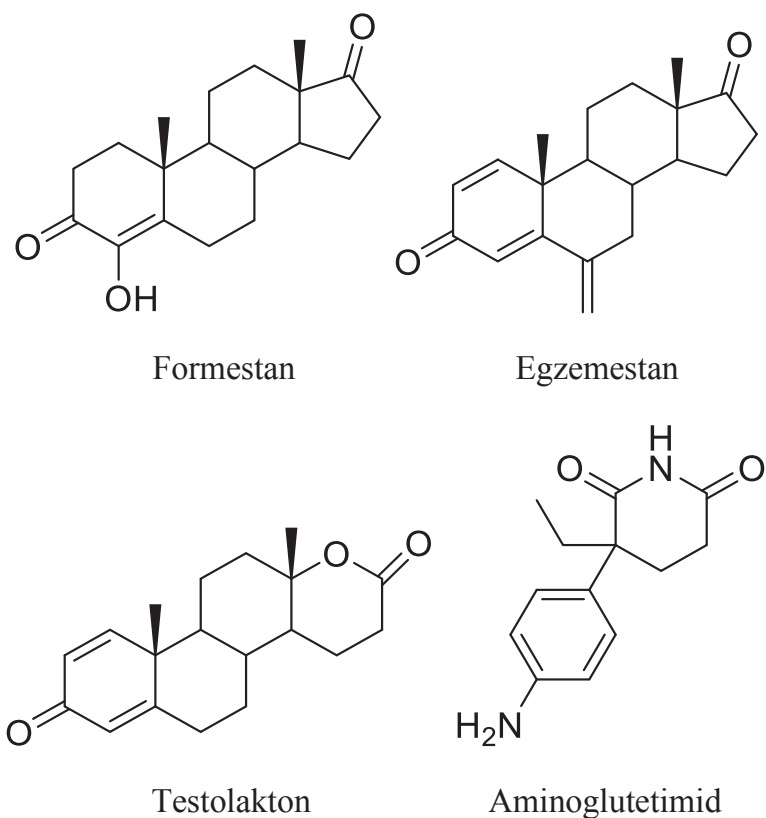
S obzirom na strukturnu sličnost sa prirodnim supstratom aromataze, jedinjenja koja u osnovi imaju androstanski, androst-4-enski ili androst-5-enski sistem dobri su kandidati za inhibitore ovoga enzima, te je stoga opravdano ispitivanje antiaromatazne aktivnosti modifikovanih C 19 steroida ovih klasa. Veliki broj strukturno vrlo sličnih jedinjenja androstanske serije pokazuje efekat smanjivanja aktivnosti aromataze. Slobodna hidroksilna ili keto grupa u položaju 3 najčešće učestvuju u vezivanju za enzim, dok efekat jedinjenja obično potiče od supstituenata ili modifikacija na D prstenu. Tako postoji čitava serija D-modifikovanih androstanskih derivata, koji inhibiraju aromatazu. Neka od njih navedena su u Tabeli 3. Proširivanje D prstena u šestočlani D-homo laktonski prsten dovodi do toga da ova jedinjenja značajno smanjuju aktivnost aromataze. Jedinjenja sa metil, fenil ili benzil grupom u položaju 17 α ispoljavaju veći efekat od nesupstituisanih analoga. Interesantno je takođe da višestruke nezasićene veze smanjuju aktivnost jedinjenja u odnosu na mononezasićeni androst-4-enski sistem (Penov Gaši i sar., 2005a, Penov Gaši i sar., 2005b).

Jedinjenja sa atomom azota u strukturi su često biološki aktivnija od svojih C- ili O-analoga. Androstanski derivati koji u položaju 17 imaju supstituente koji sadrže atom azota često ispoljavaju biološku ili farmakološku aktivnost. Aromatazu su inhibirali mnogi androstanski derivati sa piridinskim supstituentom u položaju 17. Tako postoji čitava serija jedinjenja sa piridinskom funkcijom na C-17, vezanom za steroidno jezgro preko metilenskog ili metenil mosta ('linkera') – to su 17 α -pikolil, odnosno 17-pikolinilidenski derivati (Penov Gaši i sar., 2003; Penov Gaši i sar., 2007; Djurendić i sar., 2008; Djurendić i sar., 2009), koji inhibiraju aromatazu, a od kojih su neki navedeni u Tabeli 3.

Različite druge modifikacije, kao što je, na primer otvaranje D prstena, te formiranje D-sekoandrostanskih jedinjenja, mogu značajno da utiču na aktivnost tih jedinjenja u smislu inhibiranja aromataze. Jedinjenja sa 4-en-3-onskim sistemom su po pravilu aktivnija od 5-en-3-olskih ili analoga sa

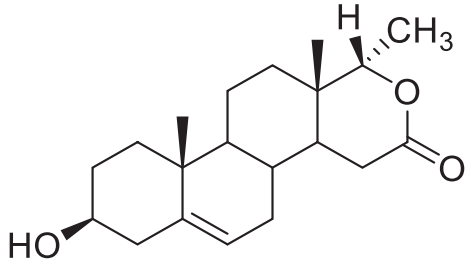
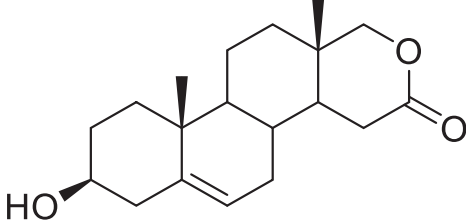
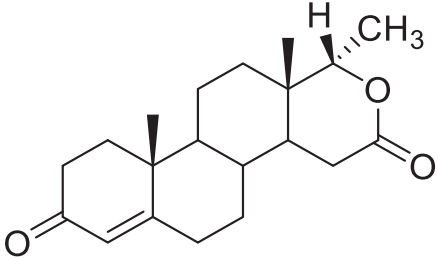
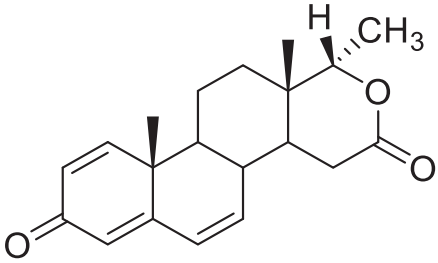
proširenom desaturacijom (dienski ili trienski A/B sistemi), dok se u položaju 17 mogu naći atomi halogenih elemenata ili neki drugi supstituenti (Penov Gaši i sar., 2001; Penov Gaši i sar., 2003; Sakač i sar., 2008).

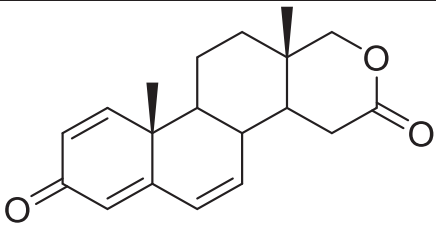
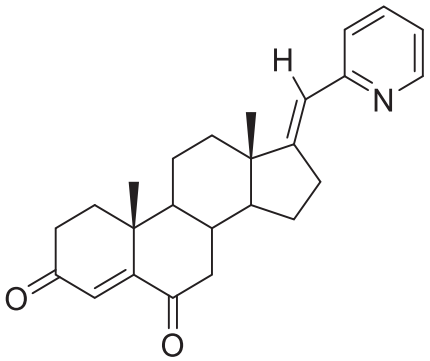
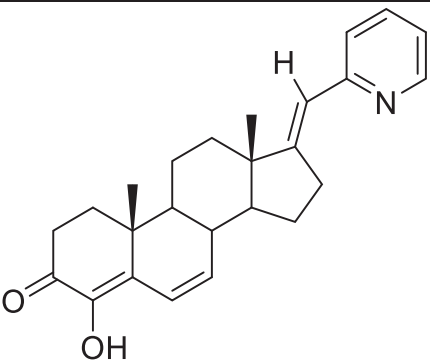
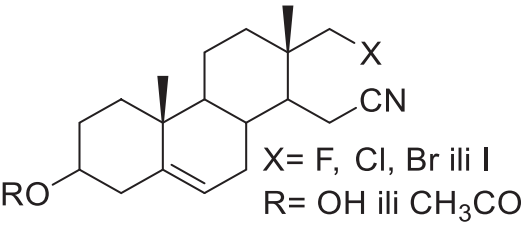
D-homolaktanski androstanski derivati su strukturni analozi testolaktona. Neka D-modifikovana jedinjenja sa A/B sistemom sličnim onom kod formestana, egzemestana ili testolaktona, inhibitora aromataze koji se koristi u terapiji estrogen-zavisnog karcinoma dojke (Pérez i sar., 1994), veoma efikasno su inhibirali aromatazu, slično kao formestan ili aminoglutetimid, nesteroidni inhibitor aromataze ranije generacije (Sakač i sar., 2008; Djurendić i sar., 2008) (Slika 12).

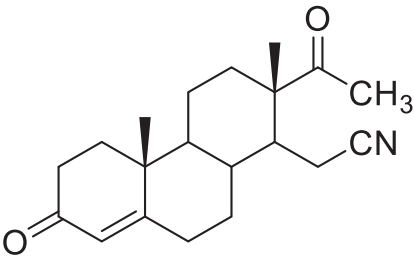


Slika 12 Struktura odabranih potentnih inhibitora aromataze

Tabela 3 Inhibitorni potencijal androstanskih derivata na aktivnost aromataze (CYP19)*; Rezultati su prikazani kao procenat (%) inhibicije u odnosu na kontrolu u prisustvu 1 μ M ispitivanog jedinjenja ili kao IC₅₀ vrednost ispitivanih jedinjenja.

Struktura jedinjenja	Inhibicija aktivnosti aromataze	
	% inhibicije u odnosu na kontrolu	IC ₅₀ [μ M]
 (Penov Gaši i sar., 2005a)	89	0,252
 (Penov Gaši i sar., 2005a)	49	0,702
 (Penov Gaši i sar., 2005a)	71	0,287
 (Penov Gaši i sar., 2005a)	68	0,397

Struktura jedinjenja	Inhibicija aktivnosti aromataze	
	% inhibicije u odnosu na kontrolu	IC ₅₀ [μM]
 <p>(Penov Gaši i sar., 2005a)</p>	85	0,277
 <p>(Djurendić i sar., 2009)</p>	65	-
 <p>(Djurendić i sar., 2009)</p>	65	-
 <p>X= F, Cl, Br ili I R= OH ili CH₃CO</p> <p>(Penov Gaši i sar., 2003)</p>	> 100**	-

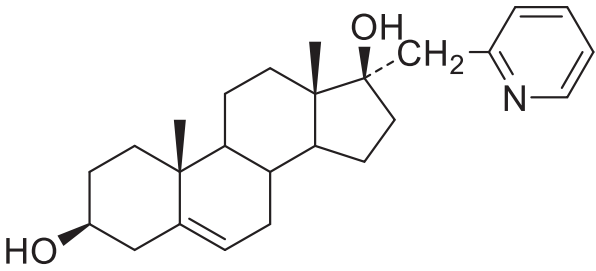
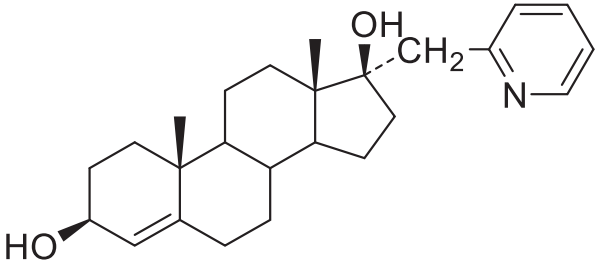
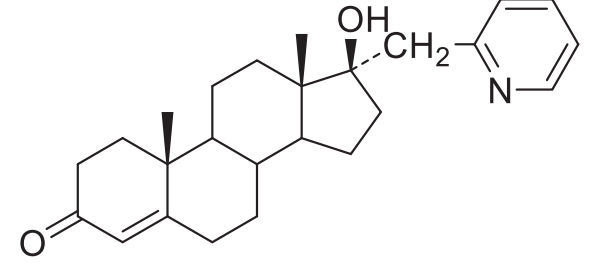
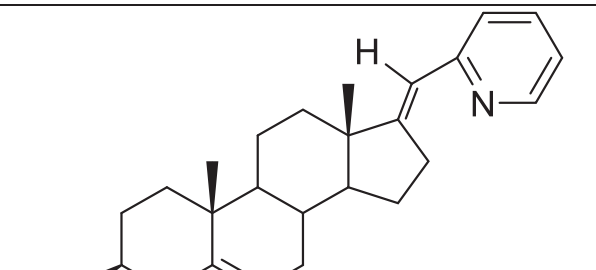
Struktura jedinjenja	Inhibicija aktivnosti aromataze	
	% inhibicije u odnosu na kontrolu	IC ₅₀ [μM]
 <p>(Penov Gaši i sar., 2001)</p>	-	0,42
Aminoglutetimid	-	0.14
Formestan	> 100	-

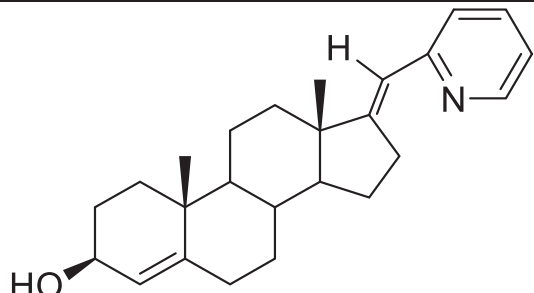
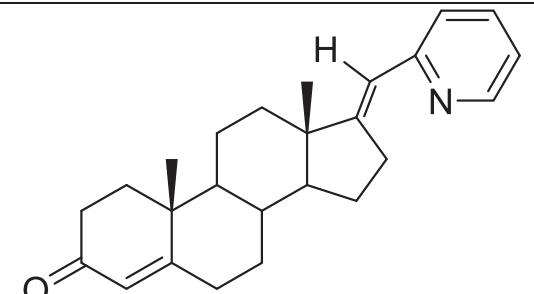
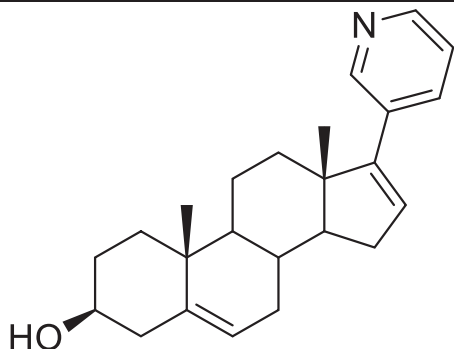
*Inhibitorni potencijal na aktivnost CYP19 ispitivan je u denukleiranoj frakciji ovarijuma ženki pacova, prethodno tretiranih sa PMSG (gonadotropin iz seruma ždrebne kobile; *engl.* Pregnant mare serum gonadotropin); ** jedinjenje primenjeno u koncentraciji od 5 μM

Androstanski derivati kao inhibitori 17α-hidroksilaze/17,20-lijaze (CYP17A1)

Modifikovana jedinjenja androstanske serije koja imaju A/B sistem prstenova sličan prirodnim supstratima enzima steroidogeneze mogu da se, zahvaljujući toj sličnosti, vežu za neki od enzima, čime izazivaju promenu njihove aktivnosti, i to najčešće smanjenje aktivnosti - inhibiraju ih. Najaktivniji i sa najviše poodmaklim prekliničkim i kliničkim ispitivanjima, kao i terapijskom primenom, su derivati sa supstituentima na D prstenu, koji u strukturi imaju bar jedan atom azota. Tako su abirateron i galeteron (Yin i Hu, 2014) (Tabela 4) izuzetno efektivni inhibitori CYP17A1 enzima, pa se već godinama koriste u terapiji kancera prostate. S obzirom na činjenicu da su supstituenti sa azotom prepoznati kao važne farmakofore, do sada je sintetisan veliki broj steroidnih jedinjenja sa atomom azota u vidu različitih supstituenata. Čitava serija 17α-pikolil ili 17-pikolinilidenskih derivata androstanske serije je sintetisana, a neka od tih jedinjenja su u manjoj ili većoj meri inhibirala ovaj enzim (Penov Gaši i sar., 2003; Penov Gaši i sar., 2007).

Tabela 4 Efikasnost inhibicije 17 α -hidroksilaze/17,20-lijaze (CYP17A1) 17-supstituisanim androstanskim derivatima, izražena kao procenat (%) aktivnosti enzima u prisustvu 50 μ M ispitivanog jedinjenja u odnosu na kontrolu (100%) i/ili IC₅₀ vrednostima ispitivanih jedinjenja (Szabó i sar., 2015).

Struktura i naziv jedinjenja	Inhibicija 17 α -hidroksilazne aktivnosti	Inhibicija C _{17,20} -lijazne aktivnosti
	% aktivnosti u odnosu na kontrolu [IC ₅₀ , μ M]	
 <p>17α-pikolil-androst-5-en-3β,17β-diol</p>	95	NI
 <p>17α- pikolil -androst-4-en-3β,17β-diol</p>	90	66
 <p>17β-hydroxy-17α- pikolil -androst-4-en-3-on</p>	87	73
 <p>17(E)-pikoliniliden-androst-5-en-3β-ol</p>	45 [38]	[8,2]

Struktura i naziv jedinjenja	Inhibicija 17 α -hidroksilazne aktivnosti	Inhibicija C _{17,20} -lijazne aktivnosti
	% aktivnosti u odnosu na kontrolu [IC ₅₀ , μ M]	
 <p>17(E)- pikoliniliden -androst-4-en-3β-ol</p>	48 [48]	23 [14]
 <p>17(E)- pikoliniliden -androst-4-en-3-on</p>	[5,9]	[25]
 <p>Abirateron</p>	[0,034]	[0,0125]

NI - nema inhibicije

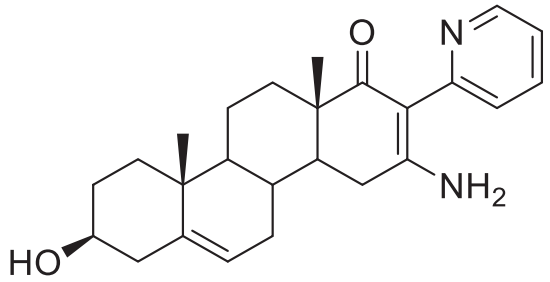
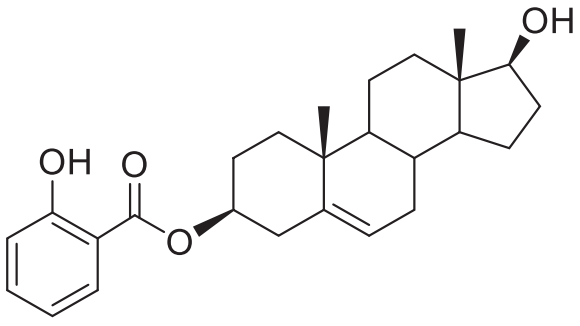
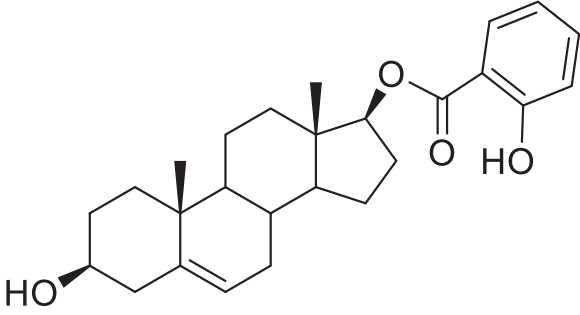
Interesantno je da su 17-pikolinilidenski derivati mnogo efektivniji u inhibiranju CYP17A1 enzima u odnosu na njihove 17 α -pikolil analoge, što se najverovatnije može objasniti činjenicom da je struktura ovih jedinjenja u velikoj meri slična abirateronu, naročito u delu molekula koji odgovara D prstenu; u slučaju 17-pikolinilidenskih derivata D prsten i supstituent u

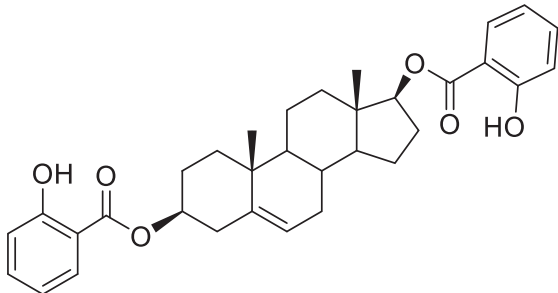
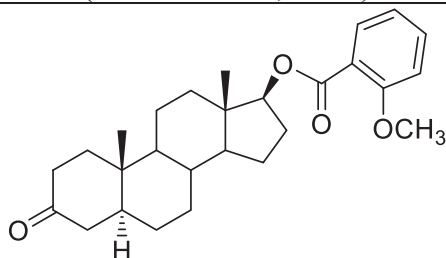
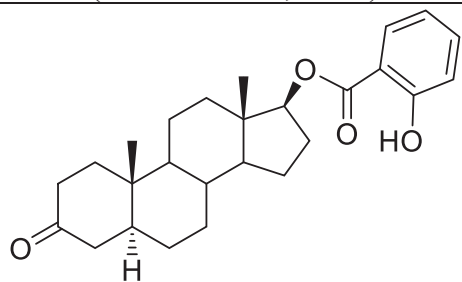
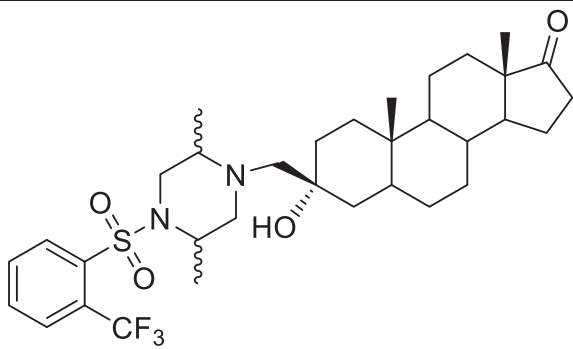
položaju 17 imaju rigidnu strukturu. Najpotentniji u inhibiciji obe aktivnosti bifunkcionalnog CYP17A1 enzima, i 17-hidroksilazne i 17,20-lijazne, bio je 17-pikoliniliden koji ima 4-en-3-onski sistem, karakterističan za fiziološki supstrat ovoga enzima, progesteron, dok je A/B strukturni analog drugog fiziološkog supstrata ovog enzima, pregnenolona, bio mnogo manje aktivan (Tabela 4) (Szabó i sar., 2015).

Androstanski derivati kao inhibitori izoenzima 17 β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β HSD)

Jedinjenja androstanske serije sa različitim modifikacijama pokazuju efekat inhibicije nekih izoenzima 17 β -HSD. Najčešće se radi o D-modifikovanim ili D-supstituisanim jedinjenjima (Penov Gaši i sar., 2003; Penov Gaši i sar., 2007). Tako 17a-pikoliniliden 16-amin androst-5-ena inhibira izoenzim 17 β -HSD2 u visokom procentu (Penov Gaši i sar., 2003) (Tabela 5). Androstanski estri salicilne kiseline sa saliciloiloksi grupom u različitom položaju pokazali su inhibiciju 17 β -HSD2 u različitom stepenu. Najpotentniji inhibitori bili su androst-5-enski derivat sa saliciloiloksi grupom u položaju 3 β , kao i 2-metoksibenzoil i saliciloiloksi estar androstana (Tabela 5) (Klisurić i sar., 2016). Inhibiranjem ovog izoenzima postiže se dugoročno viša koncentracija aktivnog androgenog hormona, testosterona, u krvi, što je važno u stanjima i bolestima smanjene produkcije ovog hormona. S druge strane, inhibicijom izoenzima 3, koji ima dejstvo suprotno dejstvu izoenzima 2, smanjuje se koncentracija aktivnog hormona, što je koristan efekat u tretmanu androgen zavisnog kancera. Postoji čitav niz potentnih inhibitora 17 β -HSD3, ali ih još uvek nema u kliničkoj primeni. Tako jedinjenje sa supstituisanim piperazinskim prstenom u položaju 3 pokazuje izuzetno jaku inhibiciju 17 β -HSD3 u mikrozomima testisa pacova, dok njegovi analozi sa različitim modifikacijama D prstena pokazuju manju aktivnost (Cortés-Benítez i sar., 2019). S obzirom na činjenicu da se jedinjenja testiraju u različitim koncentracijama i različitim metodama, njihova potentnost se ne može uvek uporediti.

Tabela 5 Efikasnost inhibicije izoenzima 17β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17β -HSD) androstanskim derivatima*, izražena kao procenat (%) aktivnosti enzima u prisustvu $50 \mu\text{M}$ ispitivanog jedinjenja u odnosu na kontrolu (100%) i/ili kao IC_{50} vrednost ispitivanih

Struktura jedinjenja	Inhibicija aktivnosti $17\beta\text{HSD3}$	Inhibicija aktivnosti $17\beta\text{HSD2}$
	% aktivnosti u odnosu na kontrolu [IC_{50} , μM]	
 <p>(Penov Gaši i sar., 2003)</p>	-	23
 <p>(Klisurić i sar., 2016)</p>	-	[1,83]
 <p>(Klisurić i sar., 2016)</p>	-	74

Struktura jedinjenja	Inhibicija aktivnosti 17βHSD3	Inhibicija aktivnosti 17βHSD2
	% aktivnosti u odnosu na kontrolu [IC ₅₀ , μM]	
 <p>(Klisurić i sar., 2016)</p>	76	88
 <p>(Klisurić i sar., 2016)</p>	77	[3,71]
 <p>(Klisurić i sar., 2016)</p>	80	[5,83]
 <p>(Cortés-Benítez i sar., 2019)</p>	0** [0,09]**	-

* Efikasnost inhibicije izonzima 17β-HSD merena je u homogenatu mikrozoama jetre ženki pacova (17β-HSD2) ili testisa pacova (17β-HSD3; '-' nije testirano; ** jedinjenje primenjeno u koncentraciji od 1 μM

Molekularni doking u medicinskoj hemiji modifikovanih steroida

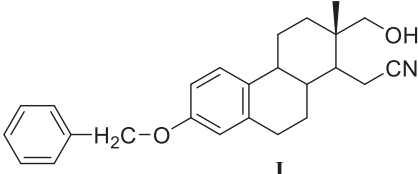
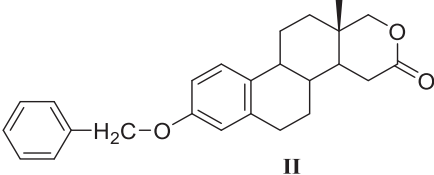
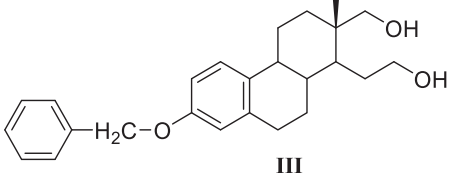
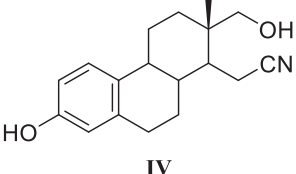
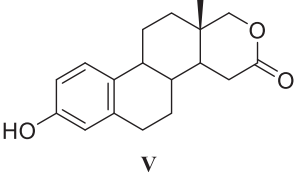
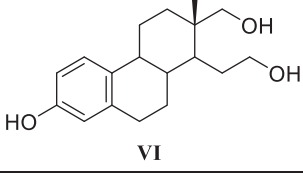
Doking u molekularnom modelovanju predstavlja metodu za predviđanje preferencijalne orijentacije jednog molekula ka drugom, kao npr. u formiranom kompleksu steroid-receptor. Molekularni doking se već decenijama koristi, a danas je takođe u ekspanziji, za proučavanje eksperimentalnih rezultata i koreliranje *in vitro* ili *in vivo* rezultata sa strukturom ispitivanih jedinjenja, tzv. SAR analizom (Lengauer i Rareyt, 1996; García-Godoy i sar., 2019). Osim toga, molekularni doking se koristi za procenu afiniteta i snage vezivanja novih (već sintetisanih ili tek dizajniranih) molekula za biomolekule koji predstavljaju ciljne molekule u terapiji određenih bolesti. Najčešće se u slučaju medicinske hemije steroida radi o proteinima - receptorima steroidnih hormona ili enzimima steroidogeneze. Proučavanje mesta i načina vezivanja, kao i tipova interakcija steroida i ciljnog molekula, osnova je ovakvih *in silico* eksperimenata, a sve u cilju virtuelnog pretraživanja (skrininga) sposobnosti vezivanja velikog broja, tačnije, čitavih biblioteka novih molekula za različite proteine i, na osnovu procene vezivanja, odabir kandidata za *in vitro* ili *in vivo* eksperimente. S obzirom na to da se konstantno traga za novim i efikasnijim lekovima za lečenje različitih bolesti, kao i na broj mogućih molekula i potencijalnih ciljnih proteina, rezultati *in silico* eksperimenata su veoma važni u prvoj liniji otkrivanja i razvoja lekova. S druge strane, samo validan *in vitro* ili *in vivo* eksperiment može da da potpuno pouzdan rezultat o ostvarenom vezivanju ispitivanog biološkog para molekula ligand – ciljni protein.

Proučavanje vezivanja liganda za supstrat molekularnim dokingom zasniva se na poznatim strukturama ciljnih biomolekula. Postoje različite baze sa podacima o strukturi ciljnih biomolekula. Jedna od najčešće korišćenih je Proteinska banka podataka (*engl.* Protein Data Bank, PDB).

Oko jednog veoma važnog pitanja nema u nauci jasnog stava: Da li su *in silico* eksperimenti potpuno pouzdani, odnosno, da li se njima možda ne eliminišu iz daljih prekliničkih istraživanja neka jedinjenja koja bi ipak u

ćeliji ili organizmu ispoljila željeni biološki, pa i terapijski, efekat, ili obrnuto, da li se za neka jedinjenja može dokingom predvideti jako vezivanje, a da u *in vitro* eksperimentu do tog vezivanja ne dođe. Tako je, na primer, u *in silico* eksperimentu molekularni doking sa kristalnim strukturama proteinskih meta iz PDB pokazao da se, među ostalim ispitivanim jedinjenjima, estranski D-homo lakton sa benziletarskom funkcijom u položaju 3 (II) (Tabela 6) snažno vezuje za aromatazu i 17,20-lijazu (CYP19 i CYP17), što ukazuje na ovaj lakton kao na potencijalni dualni inhibitor i vodeće jedinjenje u razvoju novog leka za lečenje hormonski zavisnih bolesti (Jovanović-Šanta i sar., 2015).

Tabela 6 Molekularnim dokingom predviđene energije vezivanja ispitivanih jedinjenja i referentnih jedinjenja (inhibitora CYP17A1 - abiraterona i fizioloških liganada ovih proteina) za proteinske mete za lečenje steroid-zavisnih kancera*

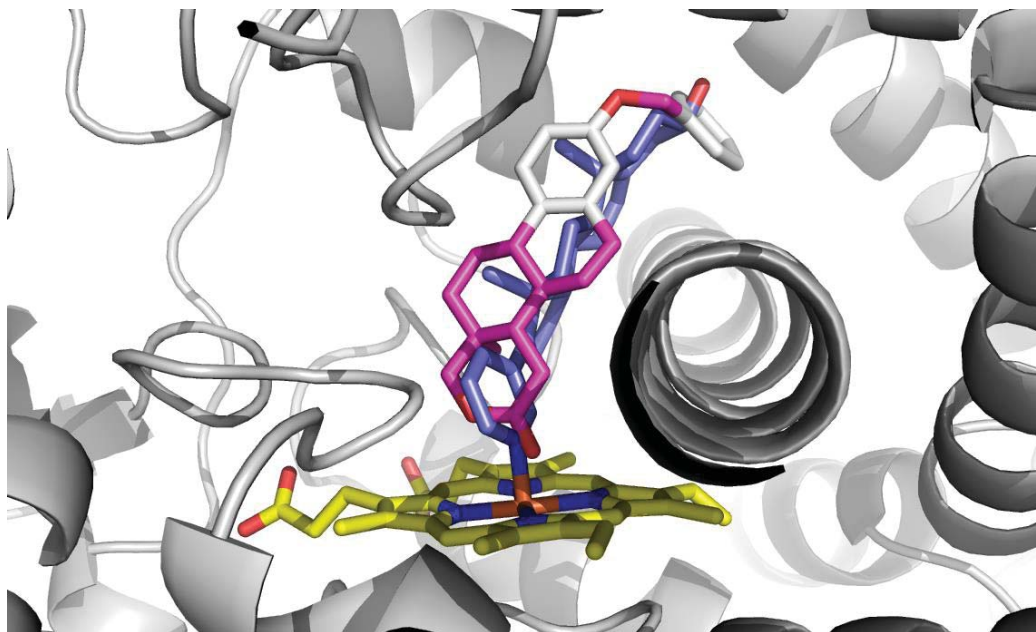
Jedinjenje	Relativna energija vezivanja (Autodock, kcal/mol)			
	CYP17A1	CYP19A1	ER α	AR
 <p>I</p>	-10.50	NV	NV	NV
 <p>II</p>	-12.48	-11.01	NV	NV
 <p>III</p>	-10.39	NV	NV	NV
 <p>IV</p>	NV	NV	NV	NV
 <p>V</p>	-10.17	-10.39	-10.10	-10.44
 <p>VI</p>	NV	NV	NV	NV

*CYP17A1 (17 α -hidroksilaza/17,20-lijaza); CYP19A1 (aromataza); estrogeni receptor α (ER α) i androgeni receptor (AR). Energije vezivanja koje postoje u eksperimentalno dobijenoj kristalnoj strukturi postojećeg kompleksa poslužile su za izračunavanje ovih energija re-dokingom. Detalji *in silico* eksperimenta dati su u radu Jovanović-Šanta i sar., 2015.

Jedinjenje	Relativna energija vezivanja (Autodock, kcal/mol)			
	CYP17A1	CYP19A1	ER α	AR
Abirateron	-11.66	-	-	-
Androstenedion	-	-11.47	-	-
Estradiol	-	-	-10.26	-
Testosteron	-	-	-	-10.99

NV: ne vezuje se; '-' nije testirano

Pretpostavljeno vezivanje laktona **II** za CYP17A1 na osnovu *in silico* molekularnog dokinga predstavljeno je na Slici 13.



Slika 13 Prikaz molekularnog dokinga aktivnog centra aromataze sa jedinjenjem **II**; predviđena energija vezivanja: -12.48 kJ/mol; jedinjenje **II** (ružičasto) pokazuje veliki potencijal za koordinaciju sa atomom gvožđa iz hem grupe CYP17A1, slično vezivanju abiraterona, klinički korišćenog inhibitora ovog enzima (plavo, Jovanović-Šanta i sar., 2015).

Ispitivanje uticaja modifikovanih steroida na CYP17A1 (tačnije, na njenu lijaznu aktivnost) izveden je u *in vitro* uslovima, tako što je homogenat tkiva testisa pacova tretiran ovim jedinjenjima u koncentraciji 50 μ M uz 17-hidroksiprogesteron kao fiziološki supstrat. Lakton **II** i sekocijanoalkohol **IV** inhibirali su u izvesnoj meri enzim, mada nedovoljno da ova jedinjenja postanu atraktivna kao vodeća jedinjenja u razvoju lekova za kancer prostate ili neku drugu steroid hormonski zavisnu bolest (Tabela 7). Interesantna je činjenica da se lakton **II** sa benziletarskom funkcijom u položaju 3 vezivao mnogo jače od jedinjenja **IV** u *in silico* eksperimentu, tj. da je za jedinjenje **IV** bila vrlo mala energija vezivanja, pa se praktično smatra da se ne vezuje, ali da su efekti ova dva jedinjenja na lijazu skoro jednaki. Ovo ide u prilog pretpostavci da se *in vitro* i *in silico* eksperimentalni rezultati dopunjuju, te da je dobro izvesti obe vrste eksperimenata radi donošenja ispravnih i potpunih zaključaka. Naime, lakton **II** ima veliku pretpostavljenu energiju vezivanja, a ne ispoljava veliki inhibitorni efekat na enzim. S druge strane, sekocijano alkohol **IV** se praktično ne vezuje *in silico*, a u izvesnoj meri inhibira lijaznu aktivnost CYP17A1. Da je izveden samo *in silico* eksperiment, jedinjenje **IV** bi bilo isključeno iz dalje analize, dok bi se **II** mogao smatrati potencijalno dobrim inhibitorom.

In vitro eksperiment ispitivanja uticaja odabranih steroida na CYP19 - aromatazu je izveden sa denukleiranom frakcijom ovarijuma ženki pacova pre-tretiranih PMSG-om (Brodie, 1976). Produkcija estradiola je merena u prisustvu subsaturacione koncentracije testosterona i dve koncentracije steroida (10 μ M i 50 μ M). Rezultati ovog eksperimenta su predstavljeni u Tabeli 7.

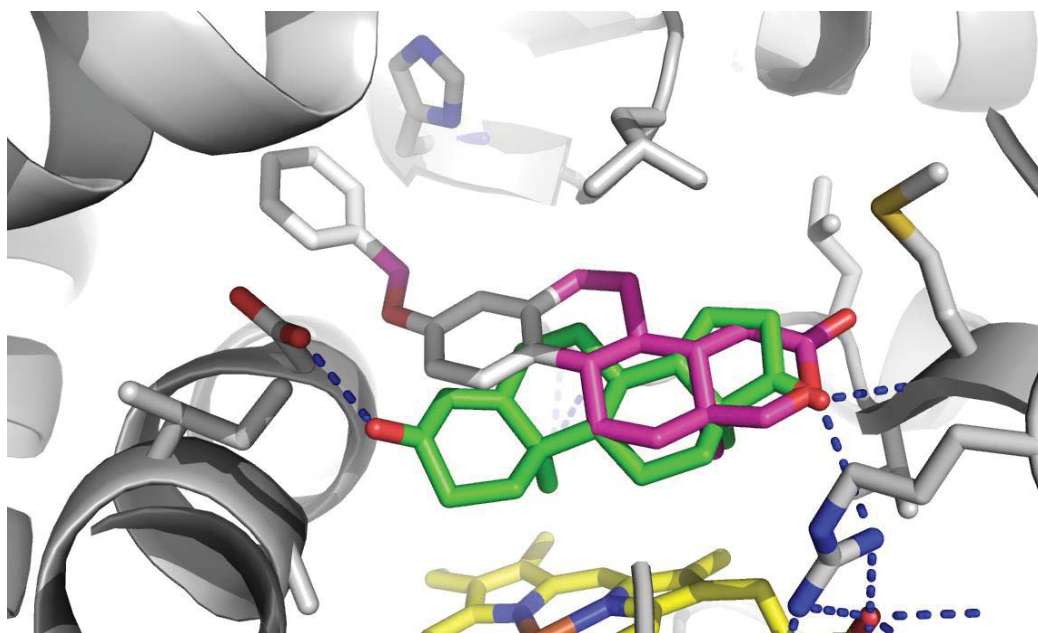
Tabela 7 Anti-aromatazna i anti-lijazna aktivnost jedinjenja **I-VI** i referentnih jedinjenja aminoglutetimida i ketokonazola (Jovanović-Šanta i sar., 2015)

Jedinjenje	Koncentracija (μM)	Inhibicija aromataze (%)	Inhibicija 17,20-lijaze (%)
I	50	-	NI
II	10	-14,81	-
	50	26,71	35
III	10	-6,51	-
	50	-23,02	NI
IV	50	-	36
V	10	1,50	-
	50	-29,28	17
VI	10	-39,36	-
	50	-34,52	14
Aminoglutetimid	0.1	41,33	-
Ketokonazol	-	-	$\text{IC}_{50}=0,32 \mu\text{M}$

NI - nema inhibicije; '-' nije testirano

Dobijeni rezultati su veoma interesantni:

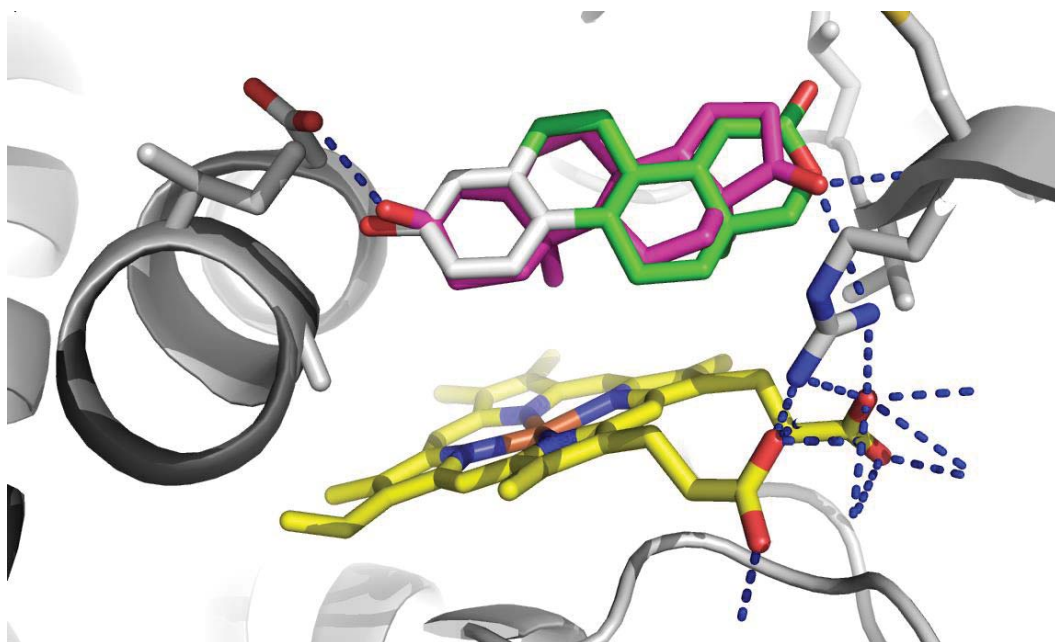
- D-homo lakton **II**, za koji je predviđena energija vezivanja za aromatazu najveća, pokazao je skromnu sposobnost da inhibira ovaj enzim. Dakle, velika energija vezivanja nije proporcionalna biološkom efektu u *in vitro* eksperimentalnom modelu. Jako vezivanje za aktivni centar enzima, jače nego vezivanje njegovog 3-hidroksi analoga **V**, moglo bi se objasniti dodatnim hidrofobnim interakcijama koje se uspostavljaju između benziletarske funkcije i nepolarnih ostataka aminokiselina koje se nalaze u aktivnom centru i formiraju hidrofobni 'džep' u koji može da se smesti ova nepolarna grupa (Slika 14).



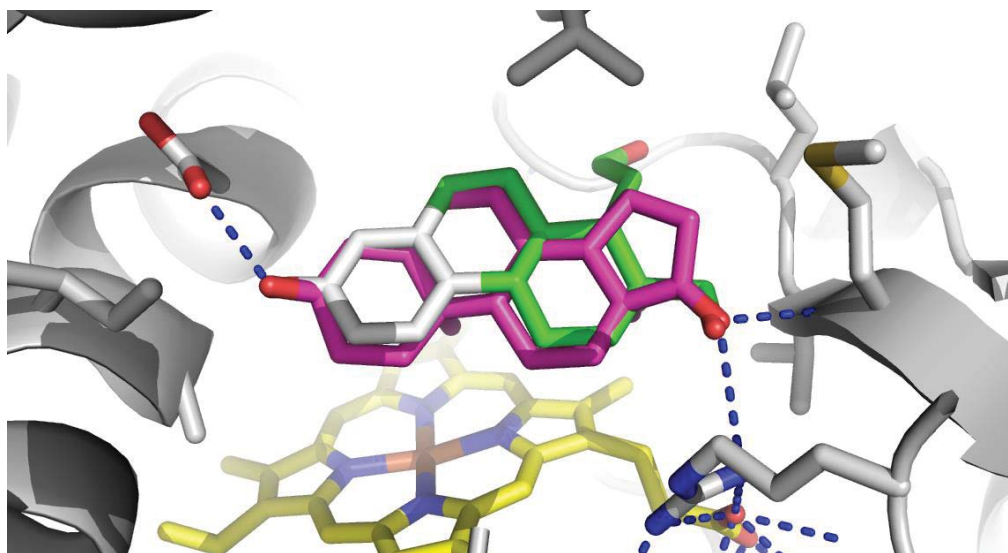
Slika 14 Prikaz molekularnog dokinga aktivnog centra aromataze sa jedinjenjem **II**; predviđena energija vezivanja: -11.01 kJ/mol; jedinjenje **II** (ružičasto) pokazuje sličan potencijal za uspostavljanje vodoničnih veza kao androstendion, fiziološki supstrat ovog enzima (zeleno), pri čemu aromatični prsten supstituenta na C-3 formira dodatne hidrofobne interakcije (Jovanović-Šanta i sar., 2015).

- 3-Hidroksi analog laktona **II** (**V**) i D-seko-diol sa slobodnom OH grupom u položaju 3 (**VI**) su čak aktivirali aromatazu. Ovaj rezultat je na prvi pogled negativan: obično se u razvoju lekova traga za jedinjenjima koja inhibiraju enzime. Međutim, ovaj rezultat bi, zapravo, mogao da bude dobra osnova za razvijanje lekova za lečenje stanja i bolesti nastalih kao posledica hipoprodukcije estradiola, kao što su, npr, neplodnost žene, osteopenija i osteoporoza. S druge strane, relativno velika energija vezivanja u *in silico* eksperimentu ukazuje samo na vezivanje potencijalnog liganda, ali ne i na vrstu biološkog efekta koji će eventualno izazvati na ovom proteinu u datom *in vitro* eksperimentanom modelu.

Pretpostavljeno vezivanje modifikovanih steroida **V** i **VI** za aromatazu na osnovu *in silico* molekularnog dokinga predstavljeno je na Slikama 15 i 16.



Slika 15 Prikaz molekularnog dokinga aktivnog centra aromataze sa jedinjenjem V; predviđena energija vezivanja: -10.39 kcal/mol. Vezivanje androstendiona (ružičasto) je predstavljeno na osnovu kristalne strukture njegovog kompleksa sa aromatazom; lakton V formira vodonične veze slično kao androstendion (Jovanović-Šanta i sar., 2015).



Slika 16 Prikaz molekularnog dokinga aktivnog centra aromataze sa jedinjenjem VI; predviđena energija vezivanja: -9.6 kcal/mol (međumolekularna energija -11.39 kcal/mol) Vezivanje androstendiona (ružičasto) je predstavljeno na osnovu kristalne strukture njegovog kompleksa sa aromatazom; Atomi kiseonika iz D-seko-sistema omogućavaju formiranje vodoničnih veza, slično kao u slučaju androstenediona (Jovanović-Šanta i sar., 2015).

U cilju ispitivanja estrogene i antiestrogene aktivnosti ovih jedinjenja, pa time i provere rezultata dobijenih *in silico* eksperimentom, izveden je *in vivo* eksperiment uterotrofnom metodom. Rezultati (Tabela 8) nisu potpuno u korelaciji sa rezultatima *in silico* eksperimenta, kao ni u slučaju merenja uticaja na aromatazu i lijazu. Naime, lakton **V** se nespecifično vezivao, sa skoro podjednako jakim pretpostavljenim energijama vezivanja za sve četiri proteinske mete (CYP17A1, CYP19A1, ER α i AR). Međutim, u *in vivo* eksperimentu ovo jedinjenje praktično nije ispoljilo efekat na aromatazu, dok je ispoljilo izvesnu antiestrogenu aktivnost (20.93 %). Ostala jedinjenja su takođe ispoljila izvesnu antiestrogenu aktivnost, mada prema predikciji molekularnim dokingom nemaju visok afinitet vezivanja za ostale ispitivane proteinske mete. Jedinjenje **III** je čak potenciralo efekat egzogenog estradiola koji je injektovan zajedno sa testiranom supstancom.

Tabela 8 Agonistički i antagonistički efekat modifikovanih steroida **I – VI** i tamoksifena (Jovanović-Šanta i sar., 2015)

Jedinjenje	Koncentracija (μ M)	Estrogeni efekat (%)	Antiestrogeni efekat (%)
I	5	0,71	31,47
II	5	-2,61	2,99
III	5	-1,67	-19,20
IV	5	-2,06	21,13
V	5	-7,92	20,93
VI	5	-8,49	26,57
Tamoksifen	5	39,78	62,80

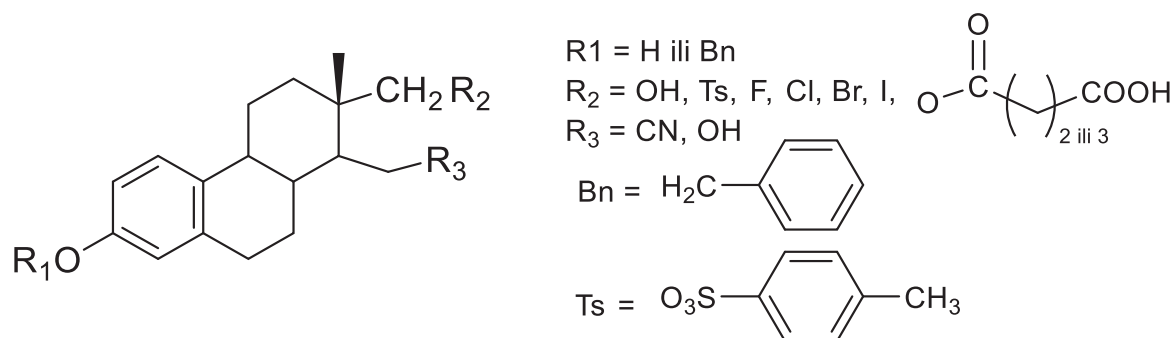
Osim u analizi rezultata *in vivo* i *in vitro* eksperimenata, kompjuterske analize i simulacije mogu da budu od velike pomoći, takođe, i u ADME ispitivanjima. Različitim tehnikama razdvajanja, kombinovanim sa kompjuterskom hemijom, se, osim podataka o mogućnostima razdvajanja

jedinjenja slične polarnosti, mogu dobiti i različiti parametri koji govore o lipofilnosti, odnosno hidrofilnosti jedinjenja, što je značajan doprinos ADME prekliničkim ispitivanjima; naime, lipofilnost je jedan od najvažnijih parametara za rastvoljivost u vodenom medijumu organizma, kao i mogućnost prolaska kroz nepolarni lipidni dvosloj ćelijske membrane, pa time i bioraspoloživost.

Da bi se sintetisana jedinjenja dobro razdvojila i prečistila, radi karakterizacije i ispitivanja bioloških efekata, moraju postojati načini za njihovo razdvajanje, bez obzira na sličnost u strukturi i polarnosti. Najčešće se jedinjenja nakon sinteze prečišćavaju kristalizacijom i/ili hromatografskim metodama. Hromatografske metode se takođe veoma mnogo koriste za proučavanje lipofilnosti molekula, što je osnova za studije bioraspoloživosti. Za meru lipofilnosti najčešće se koristi logaritam particionog koeficijenta ($-\log P$), što je praktično logaritam odnosa koncentracija nekog molekula rastvorenog u nepolarnom rastvaraču (npr. *n*-heksanu) i polarnom rastvaraču (najčešće vodi). Ova veličina se može izračunati posebnim programima, a može se dobiti i kao eksperimentalni podatak, mada je prva metoda dovoljno precizna, tj. podaci odgovaraju u velikoj meri eksperimentalno dobijenim podacima, dok je druga metoda veoma vremenski i eksperimentalno zahtevna.

Hromatografske tehnike mogu se izvoditi sa različitim nosačima, kolonama, eluentima, aparatima i detektorima, zavisno od klase jedinjenja koja se ispituje i efikasnosti razdvajanja. Serije jedinjenja relativno slične lipofilnosti se mogu razdvojiti na različitim nosačima, od kojih je ranije mnogo korišćen silikagel, a danas se najčešće koristi razdvajanje na tzv. reversnoj fazi. To su najčešće C-8 i C-18 modifikovani silikagelski nosači, koji su nepolarni, za razliku od silikagela, pa komponente smeše eluiraju obrnutim redosledom od onog na silikagelu. Po polarnosti, ali i efikasnosti razdvajanja i nekim drugim osobinama, postoje i neki nosači sa drugačijim modifikacijama: nosači sa nitrilnim grupama, nosači sa pentafluorofenil-propilnim modifikacijama i drugi.

Koje će se tehnike, nosači i eluenti koristiti, zavisi od osobina jedinjenja i postavljene hipoteze. Tako se jedinjenja slične polarnosti mogu sa različitom efikasnošću razdvojiti primenom nosača različite polarnosti. Kao primer za takva razdvajanja različite efikasnosti na kolonama različite polarnosti može se navesti razdvajanje sekoestranskih derivata, koji su slične polarnosti (Petrović i sar., 2000; Ačanski i sar., 2003; Ačanski i sar., 2009; Ačanski i sar., 2010; Ačanski i sar., 2011; Ilić i sar., 2020) (Slika 17).



Slika 17 Struktura sekoestranskih derivata efikasno razdvojenih hromatografijom na različitim nosačima

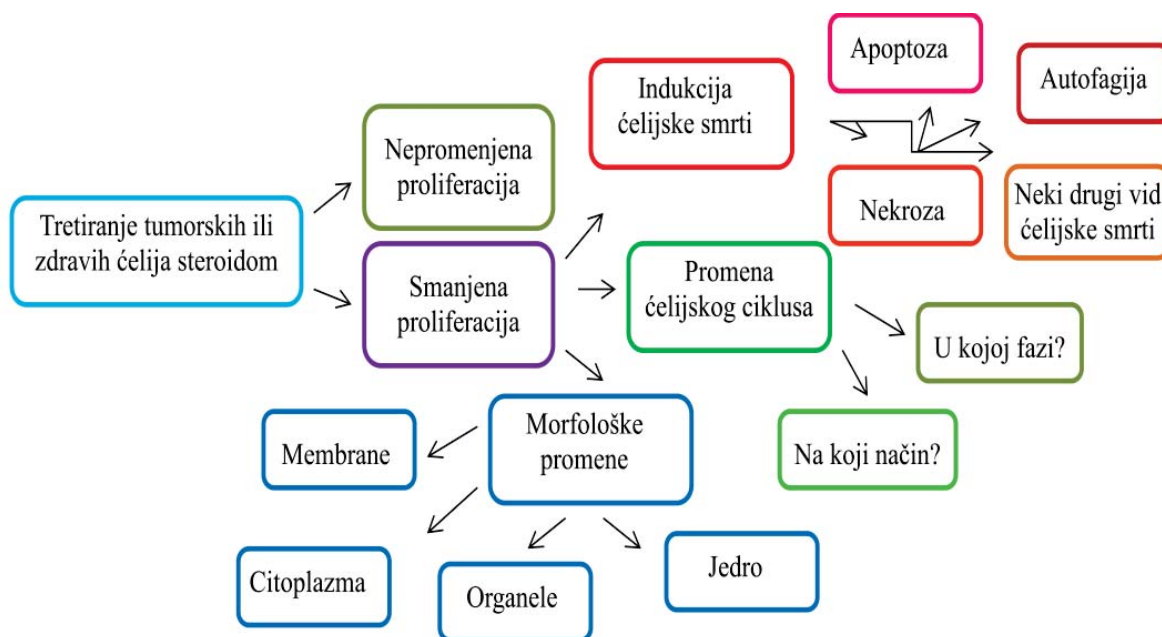
Podaci dobijeni u eksperimentima hromatografskog razdvajanja mogu, dakle, da imaju veliku primenu u planiranju polarnosti farmakofora prilikom dizajniranja novih molekula, tako da se kreiraju molekuli koji zadovoljavaju 'princip 5R'. U svakom slučaju, kompjuterskom obradom ekperimentalnih podataka se brže i jednostavnije dolazi do kvalitativnih i kvantitativnih zaključaka (Lipinski i sar., 1997; Jorgensen, 2004; Hüser, 2006).

Biologijom vođen razvoj lekova za lečenje obolelih od hormonski zavisnih bolesti

Biologijom vođen razvoj lekova zasniva se na merenju efekta nekog jedinjenja na model-sistemu, te kasnijem utvrđivanju mehanizma koji predstavlja osnovu toga ispoljenog efekta. S obzirom na to da se modifikovani steroidi ispituju i analiziraju u velikom broju u cilju pronalaženja lekova za lečenje kancera, najčešće reproduktivnih tkiva, model-sistemi za ovakva istraživanja su u prvom redu ćelijske linije potrebnih svojstava (poreklo, osobine, ekspresija određenih molekula, mogućnost gajenja i proliferacije i drugo).

Osnovu ispitivanja antikancerske aktivnosti u svakom slučaju predstavlja ispitivanje antiproliferativnog efekta jedinjenja. Ovi testovi su najčešće spektrofotometrijski, jednostavnih procedura i jeftini, tako da omogućavaju ispitivanje velikog broja jedinjenja za relativno kratko vreme, a zasnivaju se na merenju broja živih ćelija ili sadržaja proteina koji potiče od živih ćelija (Aslantürk, 2018). Njima se dobija informacija o tome da li se usled tretmana nekim jedinjenjem smanjuje broj živih ćelija, uključenih u eksperiment. Obično se nazivaju testovima za ispitivanje citotoksičnosti, mada se iz rezultata dobijenih ovim testovima ne vidi da li se radi o citotoksičnosti ili citostatičnom efektu jedinjenja. Da bi se došlo do takvih podataka, moraju se uraditi i drugi eksperimenti, a koji, to u prvom redu zavisi od postulirane hipoteze.

Generalna šema osnovnih eksperimenata koji bi se mogli izvoditi u skriningu antikancerskog efekta jedinjenja na tumorske i zdrave ćelije data je na Slici 18:



Slika 18 Šema najčešćih eksperimenata u razvoju antikancerskih lekova

Dakle, kada se preliminarnim testom proceni da neko jedinjenje smanjuje brojnost ćelija kancera, t.j. da je efektivno u smanjivanju proliferisanja ćelija kancera, pristupa se razjašnjavanju mehanizma kojim se smanjuje brojnost ćelija. Najčešće merilo za procenu efikasnosti jedinjenja kao antikancerskih agenasa je IC_{50} vrednost-koncentracija jedinjenja pri kojoj se postiže smanjenje broja ćelija za 50%. Za vodeća jedinjenja u razvoju antikancerskih lekova, tačnije u farmakološkim studijama, smatraju se ona, koja imaju vrlo niske vrednosti IC_{50} , u nanomolarnim koncentracijama. Za razjašnjavanje mehanizama delovanja na ćelije kancera i studije metabolizma u ćelijama kancera istraživači obično sami postavljaju granicu, tj. IC_{50} koncentraciju iznad koje jedinjenja prestaju da budu kandidatima za lek i/ili za proučavanje mehanizama delovanja (Hüser, 2006).

U okviru naše istraživačke grupe sintetisan je i ispitan antikancerski potencijal velikog broja modifikovanih steroida. Ovde će biti navedeni odabrani primeri, različitih bioloških efekata, strukturnih klasa i modifikacija. Osim modifikacija izvedenih u cilju pripadnosti jednoj seriji (npr. D-homo laktonima), neka jedinjenja imaju i dodatne modifikacije u odnosu na prirodne ili polazne steroide.

Ispitivanje antiproliferativnog dejstva modifikovanih steroida

Od androstanskih i estranskih derivata sintetisanih u našoj grupi, veliki je broj 16,17-seko steroida, D-homo laktona, D-supstituisanih, D-kuplovanih (fuzionisanih), D-homo aza ili oksa i drugih, sa različitim modifikacijama koje se odnose na mesto funkcionalizacije, funkcionalne grupe uvedene u molekule, konformaciju i druge modifikacije. Najčešće je antiproliferativna aktivnost ispitivana MTT testom (testom sa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolijum bromidom), kojim se meri broj vijabilnih ćelija, tj. ćelija koje svojim aktivnim mitohonrijalnim enzimom, sukcinat dehidrogenazom, transformišu MTT u obojeni formazan, čija se koncentracija meri spektrofotometrijski, pa se, na osnovu nje, indirektno određuje i smanjenje populacije ćelija nakon tretmana nekim jedinjenjem (Mosman, 1983). Antiproliferativni efekat jedinjenja je ispitivan u širem koncentracionom opsegu (0,01-100 μM), a za izražavanje aktivnosti korišćena je veličina IC_{50} . Za jedinjenja koja imaju IC_{50} vrednost veću od koncentracija u ispitivanom opsegu navodi se da je $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$.

Naročito je važno naglasiti da ispitivani steroidi po pravilu nisu bili toksični za zdrave ćelije korišćene u eksperimentima za ispitivanje selektivnosti citotoksičnosti jedinjenja, dok su citostatici koji se koriste u kliničkoj praksi za lečenje onkoloških pacijenata bili podjednako toksični na maligne i zdrave ćelije (Tabela 9).

Tabela 9 Antiproliferativni efekat referentnih jedinjenja nakon 48 h tretiranja, meren MTT testom i izražen u vidu IC₅₀ vrednosti; egzemestan je korišćen za kontrolu toksičnosti steroida, a cisplatina i doksorubicin (DOX) kao pozitivna kontrola.

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
Egzemestan (Nikolić i sar., 2015)	52,06	12,09	>100	>100	>100	> 100
Cisplatina (Nikolić i sar., 2015)	11,60	7,8	6,57	1,77	15,9	0,48
DOX (Oklješa i sar., 2013)	0,75	0,12	95,61	1,17	0,32	0,12

MCF-7: ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke; ekspirira estrogene i progesteronske receptore (ER+, PR+)

MDA-MB-231: ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke; ne ekspirira estrogene, progesteronske ni HER2 receptore (ER-, PR-, HER2-; tzv. trostruko negativna ćelijska linija kancera dojke)

PC-3: ćelijska linija humanog adenokarcinoma prostate; ne ekspirira androgene receptore (AR-)

HeLa: ćelijska linija humanog adenokarcinoma cerviksa

HT-29: ćelijska linija humanog adenokarcinoma kolona

MRC-5: zdrava ćelijska linija humanih fetalnih pluća

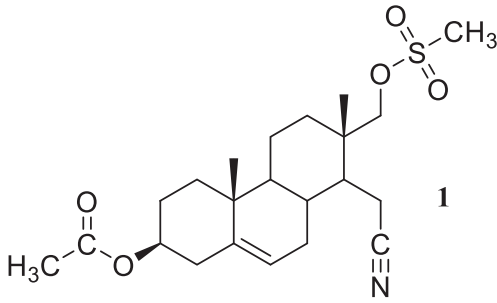
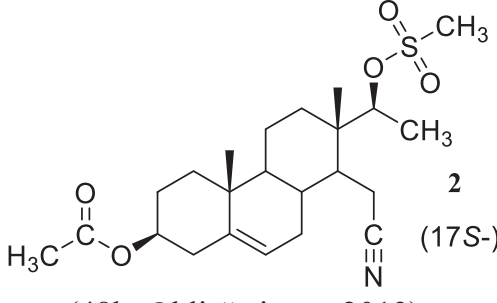
D-Seko steroidi

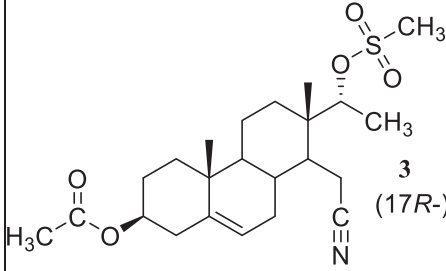
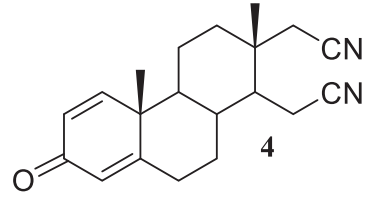
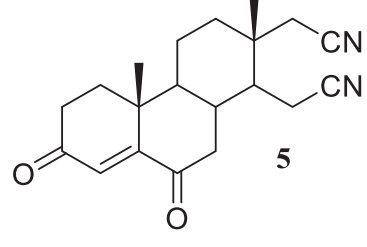
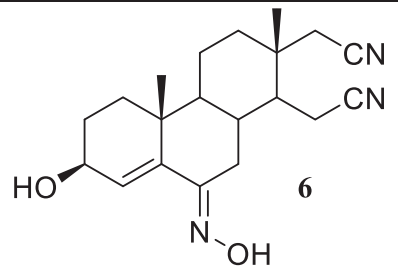
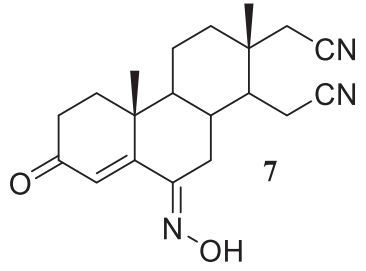
Seko steroidi nastaju raskidanjem neke od C-C veza steroidnog jezgra. U okviru naše istraživačke grupe sintetisan je veliki broj D-seko estranskih i androstanskih derivata, kao i nekih A-, B- ili C-seko steroida, koji su nekada krajnji cilj planirane sinteze, a nekada intemedijeri (Penov Gaši i sar., 2014). Među D-sekoandrostanskim derivatima neki od najboljih citotoksičnih agenasa bili su 16,17-seko 17-meziloksi derivati (Oklješa i sar., 2013; Oklješa i sar., 2019). Stereoizomeri na C-17 asimetričnom centru **2** i **3** ispoljili su jak antiproliferativni efekat na MDA-MB-231 ćelije kancera dojke i na PC-3 ćelije kancera prostate, pri čemu je *S* izomer (**2**) bio donekle aktivniji. Ova dva jedinjenja su 17-metil analozi seko-androst-5-en mezilata

1, koji takođe snažno inhibira rast populacije PC-3 ćelija, kao i MCF-7 ćelija kancera dojke, mada njih nešto slabije (Tabela 10).

Među 16,17-sekodinitrilima najveći inhibitorni efekat na proliferaciju ćelija kancera pokazala su jedinjenja 4-7 (Nikolić i sar., 2015; Nikolić i sar., 2018). Dienon 4 značajno je inhibirao rast obe ćelijske linije kancera dojke: IC₅₀ su submikromolarne vrednosti. 6-Supstituisani derivati 5-7 su smanjivali brojnost populacija većine tretiranih ćelijskih linija, mada neke od njih sa nešto višim IC₅₀ vrednostima (Tabela 10).

Tabela 10 Antiproliferativni efekat D-seko steroida, meren MTT testom i izražen kao IC₅₀ vrednost ispitivanih jedinjenja

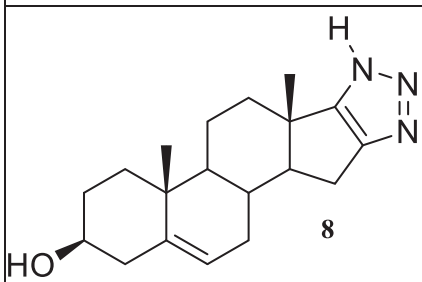
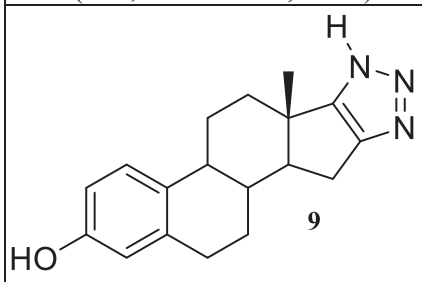
Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>1 (72h; Oklješa i sar., 2019)</p>	16,9	>100	8,6	49,8	>100	>100
 <p>2 (17S-) (48h; Oklješa i sar., 2013)</p>	>100	6,58	5,97	17,5	21,1	>100

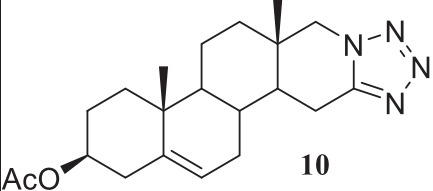
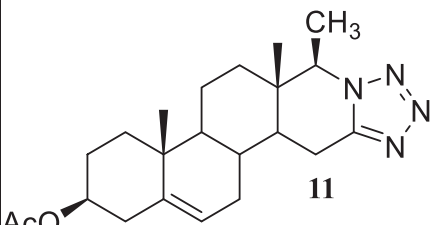
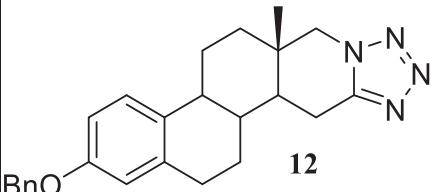
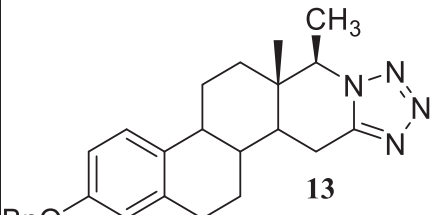
Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>3 (17R-)</p> <p>(48h; Oklješa i sar., 2013)</p>	62,53	8,93	12,2	14,8	38,3	>100
 <p>4</p> <p>(48h; Nikolić i sar., 2015)</p>	0,52	0,11	70,9	12,5	>100	>100
 <p>5</p> <p>(48h; Nikolić i sar., 2018)</p>	>100	7,99	15,9	4,31	>100	>100
 <p>6</p> <p>(48h; Nikolić i sar., 2018)</p>	>100	12,41	17,4	0,48	19,6	>100
 <p>7</p> <p>(48h; Nikolić i sar., 2018)</p>	>100	2,78	>100	2,64	16,1	>100

Heterociklični steroidi sa kuplovanim D prstenom

Androstanski D-kuplovani triazol **8** izazvao je prilično smanjenje rasta populacije PC-3 ćelija, dok je triazol estranske serije **9** uticao samo na MDA-MB-231 ćelije (Tabela 11; Sakač i sar., 2009). Androstanski tetrazoli **10** i **11** skromno su smanjivali proliferaciju MCF-7 i PC-3 ćelija, i to 17-metil derivat nešto snažnije. Estranski tetrazoli delovali su na iste ćelijske linije, ali mnogo jače nego androstanski analozi, pri čemu je 17-metil derivat i u ovom slučaju ispoljio znatno jači efekat na MCF-7 ćelije. Osim toga, delovao je i na HT-29 ćelije kancera kolona (Tabela 10; Penov Gaši i sar., 2013).

Tabela 11 Antiproliferativni efekat heterocikličnih steroida sa kuplovanim D prstenom, meren MTT testom i izražen kao IC₅₀ vrednost ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>8 (48h; Sakač i sar., 2009)</p>	>100	>100	12,27	>100	>100	>100
 <p>9 (48h; Sakač i sar., 2009)</p>	>100	20,24	>100	>100	>100	>100

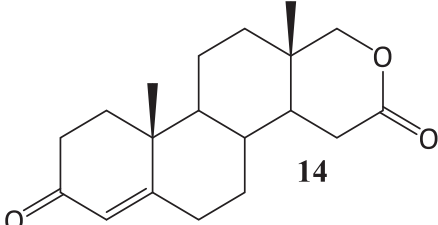
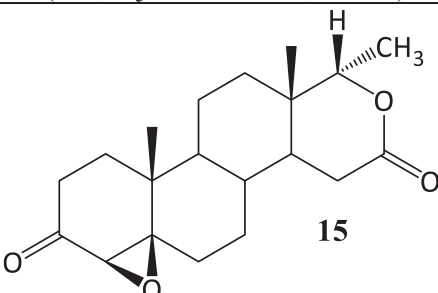
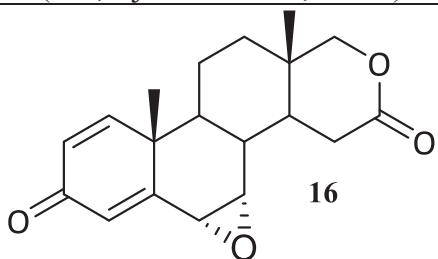
Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>10 (24h; Penov Gaši i sar., 2013)</p>	56,23	>100	78,96	>100	>100	>100
 <p>11 (24h; Penov Gaši i sar., 2013)</p>	25,45	89,56	15,32	>100	>100	>100
 <p>12 (24h; Penov Gaši i sar., 2013)</p>	12,63	>100	65,45	>100	>100	>100
 <p>13 (24h; Penov Gaši i sar., 2013)</p>	4,58	>100	>100	>100	18,02	>100

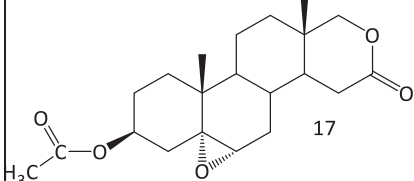
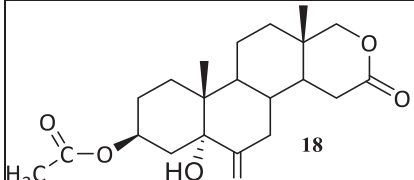
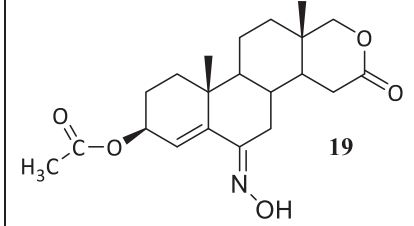
Heterociklični steroidi sa proširenim laktoskim D prstenom

Veliki broj androstanskih modifikovanih steroida sa proširenim laktoskim D prstenom je smanjivao rast ćelijskih kultura kancera, najčešće selektivno, tako da snažno inhibiraju rast jedne ćelijske kulture, bez značajnijeg uticaja na druge ispitivane ćelijske kulture kancera, dok ni jedan od D-laktona nije ispoljio inhibitorski efekat na proliferaciju zdravih ćelija.

Neki od najaktivnijih androstanskih D-homo laktona navedeni su u Tabeli 12. Može se uočiti da se radi o jedinjenjima sa nezasićenim vezama u A prstenu, kao i epoksidima. Oksim **19** je naj snažnije inhibirao HT-29 ćelije. Enon **14**, epoksidi **15** i **17**, ketoalkohol **18** i oksim **19** su selektivno inhibirali proliferaciju MDA-MB-231 ćelija. Epoksid sa proširenom konjugacijom u A prstenu, **16**, snažno je inhibirao rast populacije PC-3 ćelija. Ispitivana jedinjenja, osim D-homo laktonskog sistema, imaju i druge modifikacije, pa nije jednostavno uočiti farmakofore značajne za ispoljavanje citotoksičnog efekta (Djurendić i sar., 2008a; Djurendić i sar., 2012; Savić i sar., 2013).

Tabela 12 Antiproliferativni efekat heterocikličnih steroida sa proširenim laktonskim D prstenom, meren MTT testom i izražen kao IC₅₀ vrednost ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	IC ₅₀ (µM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>14 (48h, Djurendić i sar., 2008a)</p>	>100	9,3	>100	-	-	>100
 <p>15 (48h, Djurendić i sar., 2008a)</p>	66,2	3,6	45,3	-	-	>100
 <p>16</p>	>100	>100	2,2	-	-	>100

(48h, Djurendić i sar., 2008a)						
Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>17 (48h, Djurendić i sar., 2012)</p>	>100	12,98	56,37	-	-	>100
 <p>18 (48h, Djurendić i sar., 2012)</p>	>100	15,67	66,87	-	-	>100
 <p>19 (48h, Savić i sar., 2013)</p>	81,32	11,88	36,65	35,97	3,97	>100

'-' nije testirano

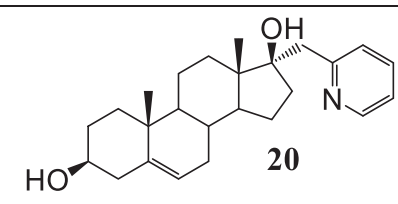
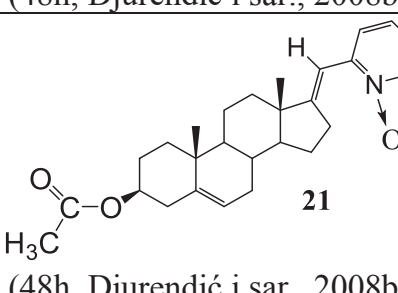
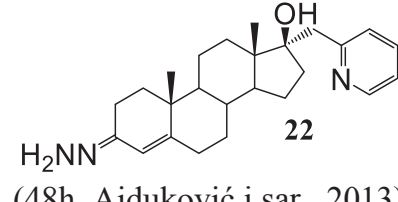
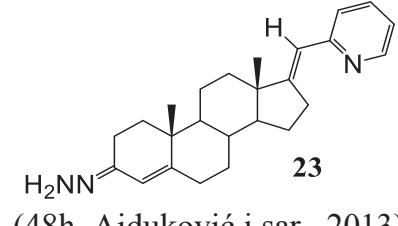
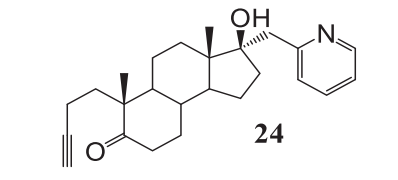
17-Supstituisani steroidi sa heterocikličnim supstumentom

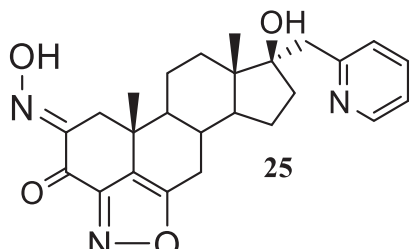
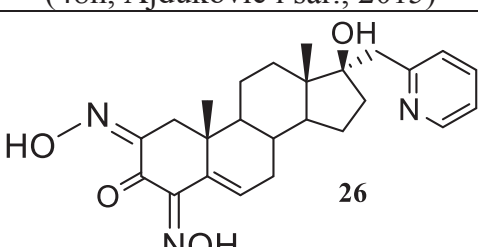
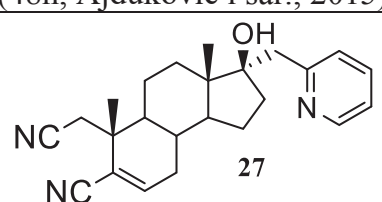
U okviru naše istraživačke grupe najviše je sintetisano 17-supstituisanih steroida koji kao heterociklični supstituent imaju piridil grupu, vezanu u vidu pikolil ili pikolinilidenske funkcije. Veliki broj jedinjenja je sintetisan u obe serije (17-pikolil i 17-pikolinilidenil), a mnoga od njih su ispoljila antiproliferativni efekat na ćelijske linije kancera. Jedinjenja ove klase po pravilu ne smanjuju proliferaciju zdravih, kontrolnih ćelija, odnosno, ispoljavaju selektivnu citotoksičnost na ćelije kancera. Takođe, najčešće selektivno utiču na neku od tretiranih ćelijskih linija.

U Tabeli 13 predstavljena su odabrana jedinjenja 17-pikolil- i 17-pikolinilidenske serije, koja su snažno inhibirala rast populacija ćelija kancera. Sva jedinjenja su bila selektivno citotoksična, odnosno, delovala su

samo na ćelije kancera, bez uticaja na zdrave ćelije. Osim toga, selektivno su delovala na neku od više tretiranih ćelijskih linija. Za jedinjenja ove grupe ne može se u potpunosti izvesti SAR analiza, ali se mogu uočiti neke interesantne činjenice u vezi strukture i biološke aktivnosti. Na primer, pikolinski i pikolinilidenski 3-hidrazoni **22** i **23** selektivno su delovali na po jednu ćelijsku liniju, ali su delovali na različite ćelijske linije: **22** na MCF-7, a **23** na PC-3 ćelije (Ajduković i sar., 2013). Pikolini **20**, **25** i **26** su selektivno delovali na PC-3 ćelije, sa sličnim IC_{50} vrednostima, manjim od 10 μ M, dok je dioksimski derivat **26** takođe snažno smanjivao proliferaciju i MCF-7 ćelija estrogen receptor pozitivnog karcinoma dojke (Djurendić i sar., 2008b; Ajduković i sar., 2015) . Najsenzitivnija ćelijska linija na jedinjenja ove grupe bila je PC-3 ćelijska linija karcinoma prostate, što se verovatno može povezati sa postojanjem piridil grupe u položaju 17, slično kao kod abiraterona, inhibitora enzima CYP17A1, koji se koristi u terapiji karcinoma prostate. Ovakvom zaključku bi možda mogla da ide u prilog i činjenica da N-oksid **21** izuzetno jako inhibira rast ove ćelijske kulture (IC_{50} vrednost 0,55 μ M; Djurendić i sar., 2008b), a poznato je da se abirateron u organizmu metaboliše do N-oksidnih metabolita, koji takođe imaju pozitivan efekat u terapiji karcinoma prostate (Acharya i sar., 2013). Da za ispoljavanje citotoksičnosti nije neophodna celovitost steroidnog jezgra, potvrda je snažna citotoksičnost A-sekosteroida **26** na MCF-7 ćelije (Ajduković i sar., 2015).

Tabela 13 Antiproliferativni efekat 17-supstituisanih steroida sa heterocikličnim supstutuentom, meren MTT testom i izražen kao IC₅₀ vrednost ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>20 (48h, Djurendić i sar., 2008b)</p>	>100	96,1	6,3	-	-	>100
 <p>21 (48h, Djurendić i sar., 2008b)</p>	47,3	>100	0,55	-	-	>100
 <p>22 (48h, Ajduković i sar., 2013)</p>	6,3	32,5	>100	>100	>100	>100
 <p>23 (48h, Ajduković i sar., 2013)</p>	13,6	17,1	5,9	>100	51,7	>100
 <p>24 (48h, Ajduković i sar., 2013)</p>	>100	>100	>100	>100	6,5	>100

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)					
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	MRC-5
 <p>25 (48h, Ajduković i sar., 2015)</p>	50.,	25,3	6,6	>100	>100	>100
 <p>26 (48h, Ajduković i sar., 2015)</p>	1,7	40,1	8,7	81,8	10,3	>100
 <p>27 (48h, Ajduković i sar., 2015)</p>	7,9	18,2	31,5	>100	>100	>100

'-' nije testirano

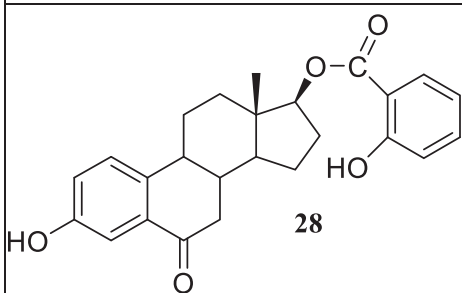
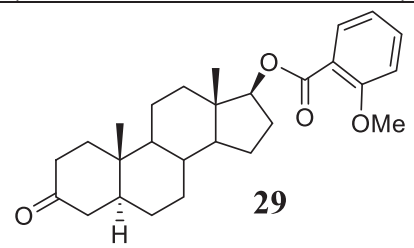
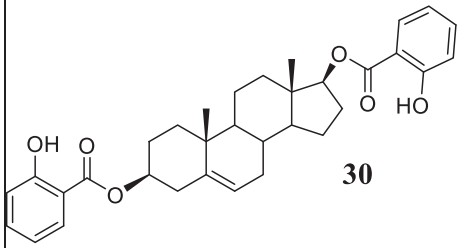
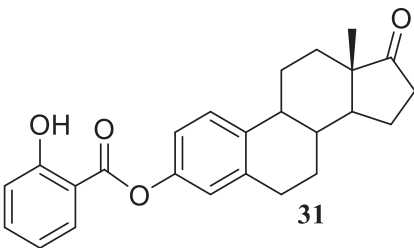
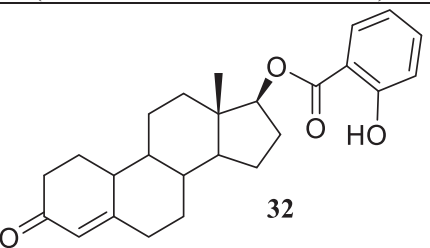
Steroidni salicilati

Poznato je da se kombinovanjem struktura dva biološki aktivna jedinjenja mogu dobiti konjugati sa poboljšanim ili dualnim/višestrukim biološkim efektima. Stoga su sintetisani i ispitani, između ostalih, i derivati salicilne kiseline sa steroidima androstanske i estranske serije. U Tabeli 14 predstavljene su strukture i IC₅₀ vrednosti za različite ćelijske linije odabranih jedinjenja ove grupe, koja su ispoljila izvesnu citotoksičnost.

Među svim testiranim steroidnim salicilatima androstanske i estranske serije najjači efekat su jedinjenja ispoljila na MDA-MB-231 ćelije, dok je veliki broj steroidnih salicilata smanjivao brojnost populacije PC-3 ćelija, mada sa slabijim efektom (IC₅₀ su viših vrednosti).

6-Ketoestratrienski 17-saliciloiloksi derivat **28** je inhibirao proliferaciju MDA-MB-231 ćelija, mnogo jače nego njegov strukturni analog bez keto funkcije u položaju 6, a takođe i mnogo jače nego njegov 17-hidroksi analog, bez saliciloiloksi grupe (Penov Gaši i sar., 2012). Na proliferaciju ovih ćelija takođe su snažno uticali i 3-keto androstanski 17- saliciloiloksi derivat **29** i 3-ketoestra-4-enski 17-saliciloiloksi derivat **32**, dok su ostala jedinjenja ispoljila slabiji efekat (Penov Gaši i sar., 2012; Penov Gaši i sar., 2015; Klisurić i sar., 2016).

Tabela 14 Antiproliferativni efekat steroidnih salicilata, meren MTT testom i izražen kao IC₅₀ vrednost ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)			
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	MRC-5
 <p>28 (48h, Penov Gaši i sar., 2012)</p>	>100	10,40	85,24	>100
 <p>29 (48h, Penov Gaši i sar., 2015)</p>	68,32	3,45	58,31	>100
 <p>30 (48h, Penov Gaši i sar., 2015)</p>	48,25	88,01	51,75	>100
 <p>31 (48h, Klisurić i sar., 2016)</p>	57,42	>100	15,54	>100
 <p>32 (48h, Klisurić i sar., 2016)</p>	>100	8,99	>100	>100

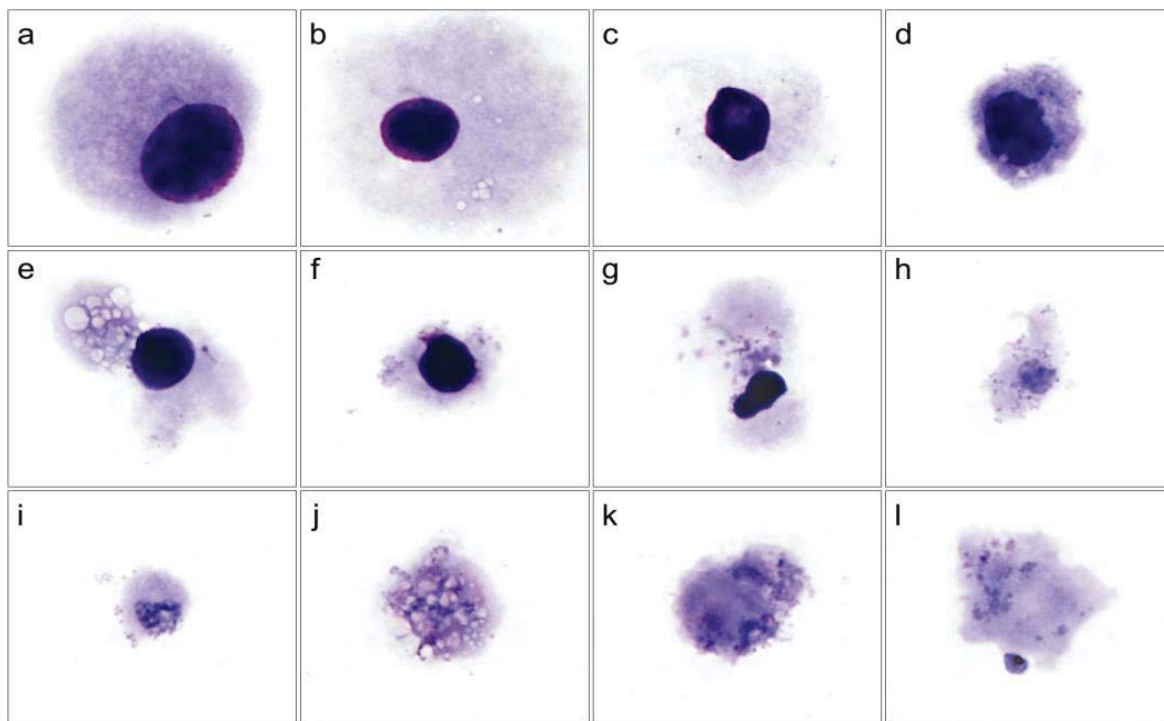
Ispitivanje mehanizama koji su u osnovi antiproliferativnog efekta jedinjenja na ćelije kancera

Efekat jedinjenja na ćelije kancera može se ispitivati vizuelnim proučavanjem morfologije tretiranih ćelija pod mikroskopom, te uočavanjem promena u odnosu na netretirane (kontrolne) ćelije, ili se ćelije kod kojih se desila neka promena mogu sortirati i brojati protočnim citometrom. Obe ove metode zasnivaju se na obeležavanju ćelija, tj. određenih biomolekula u ćelijama, fluorescentnim bojama (OECD Guideline, 2016; Henry i sar., 2013; Hingorani, 2013; Jakimov i sar., 2015). Osim ovih metoda, često se koriste i druge: meri se ekspresija određenih proteina (receptora, enzima i/ili proteina koji na neki način učestvuju u signalnim putevima) nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima, ekspresija molekula iRNK, specifičnih za određene proteine ili se meri aktivnost nekih enzima. Koje će se metode koristiti, zavisi prvenstveno od postavljene hipoteze, a u velikoj meri i od mogućnosti, tj. dostupnosti opreme.

Za neke od modifikovanih steroida kojima je IC₅₀ koncentracija bila niža od 10 µM ispitan je mehanizam po kojem smanjuju broj živih ćelija kancera tokom tretmana. Najviše jedinjenja je izazivalo apoptozu ćelija kancera, neke su u izvesnoj meri izazivale nekrozu, dok je efekat na ćelijski ciklus bio manje izražen. Zapravo je za neka jedinjenja proučavanjem apoptotske morfologije, te brojanjem ćelija u nekoj od faza apoptoze ili brojanjem apoptotičnih i nekrotičnih ćelija protočnim citometrom utvrđen citotoksični efekat (Ajduković i sar., 2015; Jakimov i sar., 2015; Nikolić i sar., 2018).

Apoptotska morfologija ćelija je ispitivana vizuelnom opservacijom pomoću svetlosnog mikroskopa i beleženjem morfoloških promena koje se pripisuju apoptozi (Oklješa i sar., 2013; Nikolić i sar., 2018; Ajduković i sar., 2015). Na preparatima na kojima su tretirane ćelije obojene Giemsa bojom lako su se pod mikroskopom mogle uočiti i izbrojati ćelije u različitim fazama apoptoze. Većina ćelija bila je normalne morfologije (Slika 19a). Moglo se uočiti kondenzovanje jedra (tamno, kondenzovano i zaobljeno

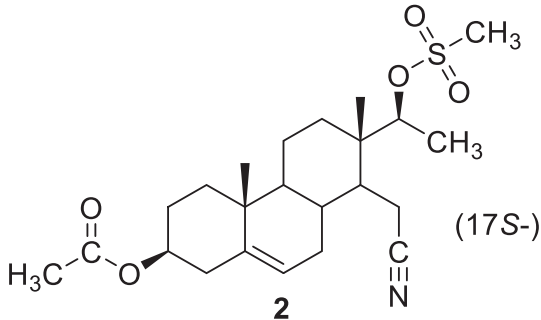
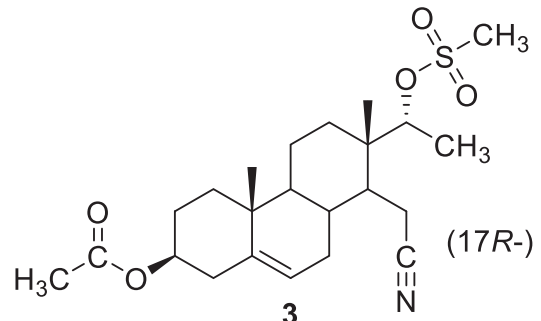
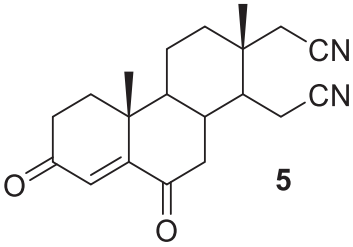
jedro), vakuolizovana citoplazma (Slike 19b-e), degradacija jedra i citoplazme (Slike 19f-k) i formiranje apoptotskih tela (Slika 19l).

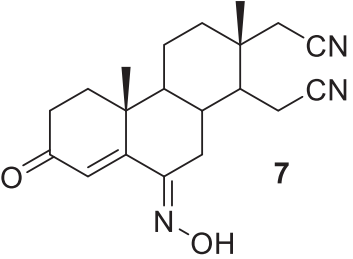
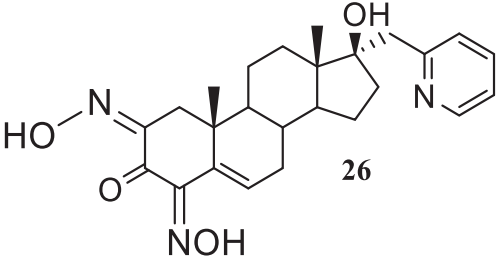
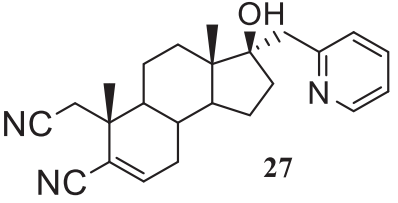


Slika 19 Morfološke karakteristike ćelija kancera tretiranih modifikovanim steroidima (Oklješa i sar., 2013)

Najveći broj ćelija apoptotske morfologije uočen je prilikom tretiranja HeLa i MDA-MB-231 ćelija androstanskim seko-dinitrilima **5** i **7**, koji su izazivali apoptozu u dvostruko većem broju ćelija u odnosu na kontrolu. Imajući u vidu ovoliki proapoptotski efekat i vrlo niske IC_{50} koncentracije, ova jedinjenja se izdvajaju od ostalih po izraženijem antikancerskom efektu (Nikolić i sar., 2018) (Tabela 15). Indukovanje apoptoze u MDA-MB-231 ćelijama prilikom tretiranja androstanskim 17-meziloksi derivatima **2** i **3** bilo je nešto manje: 1,4 odnosno 1,9 puta intenzivnije nego u kontrolnim ćelijama, redom (Oklješa i sar., 2013). Pikolini **26** i **27** su takođe izazvali apoptozu MCF-7 ćelija u priličnoj meri: 1,7, tj. 2,3 puta više apoptotičnih ćelija je bilo u tretiranim u odnosu na kontrolne ćelije, redom (Ajduković i sar., 2015).

Tabela 15 Apoptoza ćelija kancera, tretiranih ekvitoksičnim koncentracijama modifikovanih steroida, vizuelno kvantifikovana na osnovu morfoloških promena svojstvenim apoptozi

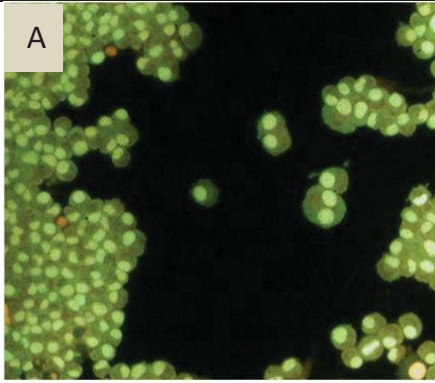
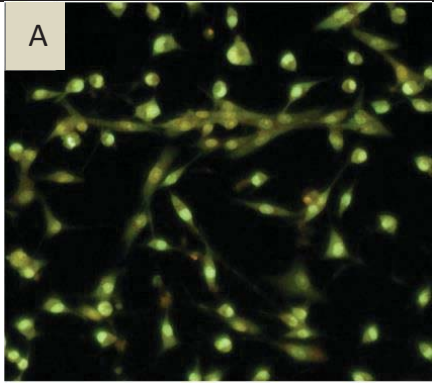
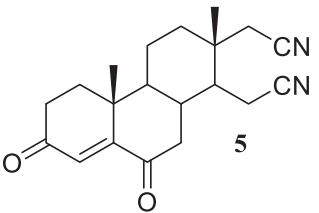
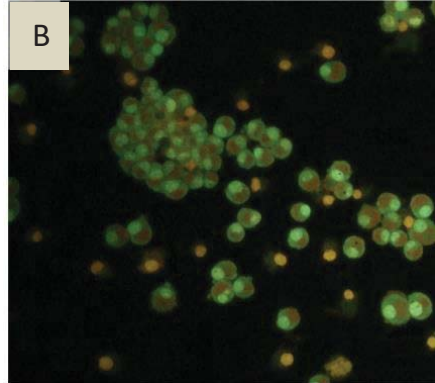
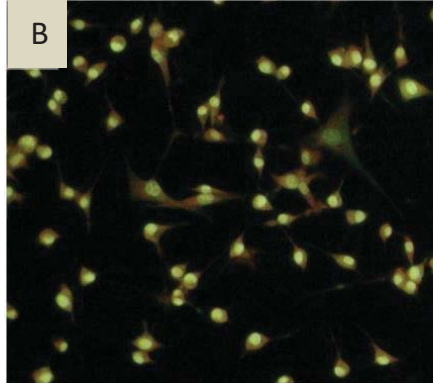
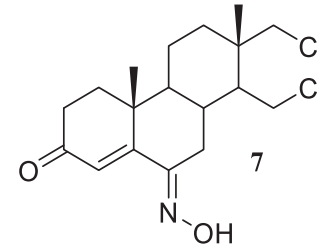
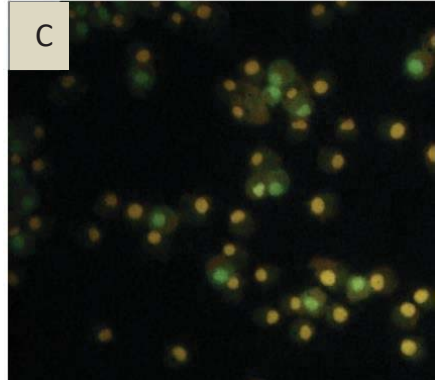
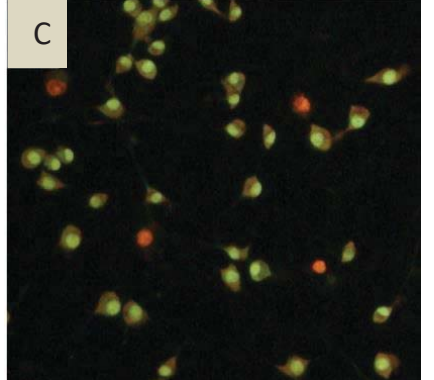
Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)	Ćelijska linija	% apoptotičnih tumorskih i normalnih ćelija
 <p>2 (17S-) (48h; Oklješa i sar., 2013)</p>	6.58	MDA-MB-231	14.27% (kontrola: 10,4%)
 <p>3 (17R-) (48h; Oklješa i sar., 2013)</p>	8.93	MDA-MB-231	19.71% (kontrola: 10,4%)
 <p>5 (48h; Nikolić i sar., 2018)</p>	7.99	MDA-MB-231	17,2% (kontrola: 10,6%)
	4.31	HeLa	23,4% (kontrola: 12,4%)

Jedinjenje	IC ₅₀ (μ M)	Ćelijska linija	% apoptotičnih tumorskih i normalnih ćelija
 <p>7 (48h; Nikolić i sar., 2018)</p>	2.78	MDA-MB-231	17,7% (kontrola: 10,6%)
	2.64	HeLa	26,8% (kontrola: 12,4%)
 <p>26 (48h, Ajduković i sar., 2015)</p>	1.7	MCF-7	12,15% (kontrola: 7,29%)
 <p>27 (48h, Ajduković i sar., 2015)</p>	7.9	MCF-7	16,83% (kontrola: 7,29%)

Nakon tretiranja ćelija kancera nekim od ispitivanih jedinjenja, te dvostrukim bojenjem sa etidijum bromidom i akridin narandžastim, uočena je i semikvantitativno procenjena apoptoza tretiranih ćelija (Nikolić i sar., 2018). Naime, posmatranjem pod mikroskopom moglo se u nekim ćelijama uočiti kondenzovano ili fragmentirano jedro, što su morfološke karakteristike tipične za apoptotične ćelije. Dvostrukim bojenjem sa etidijum bromidom i akridin narandžastim ćelijama u ranoj fazi apoptoze jedra se oboje zeleno, usled usvajanja prve boje, te su jedra dobro vidljiva, a tokom kasne apoptoze, usled narušavanje integriteta membrane, usvaja se i druga boja, pa se jedra boje crveno-narandžasto. Stoga se na osnovu intenziteta zelene odnosno

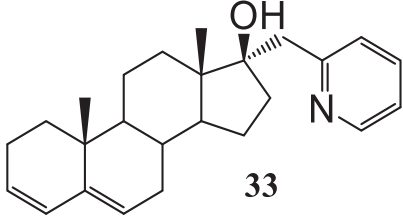
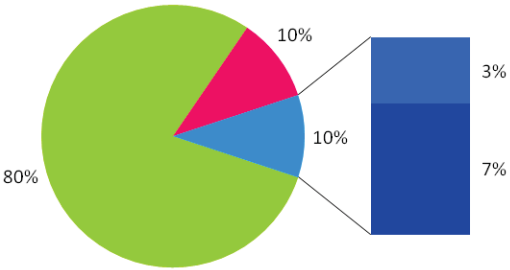
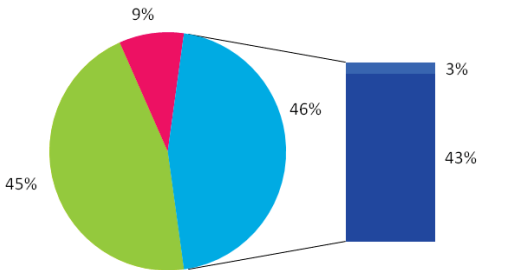
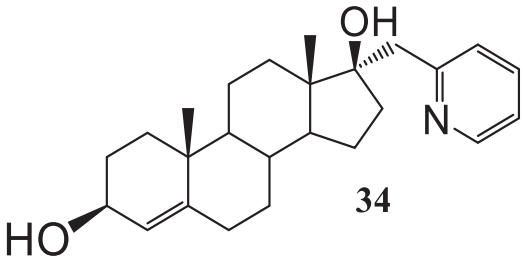
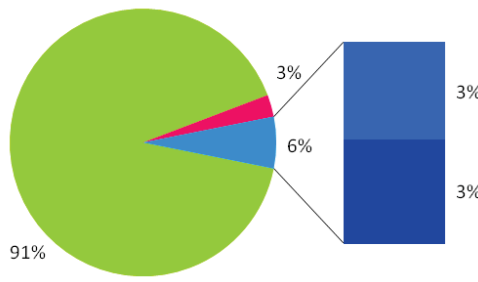
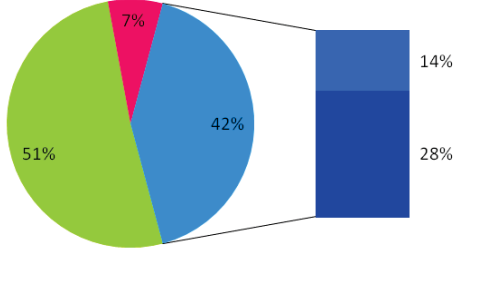
crveno-narandžaste fluorescencije može proceniti broj ćelija u ranoj odnosno kasnoj apoptozi. Tako se u preparatima ćelija MDA-MB-231 i HeLa linija tretiranih serijom androstanskih sekodinitrila, praćenim dvostrukim bojenjem etidijum bromidom i akridin narandžastim, moglo uočiti da ta jedinjenja izazivaju apoptozu obe ove ćelijske linije, u različitom procentu. U Tabeli 16 date su slike preparata na kojima se može uočiti intenzivna apoptoza, tako da su ti rezultati u skladu sa rezultatima merenja apoptoze vizuelnom opservacijom i kvantifikacijom posmatranjem preparata pod mikroskopom, nakon bojenja Giemsa bojom (Nikolić i sar., 2018).

Tabela 16 Apoptoza ćelija kancera, tretiranih ekvitoksičnim koncentracijama modificovanih steroida, procenjena semikvantitativno na osnovu usvajanja dve fluorescentne boje (Nikolić i sar., 2018).

Ćelijska linija Tretman	MDA-MB-231	HeLa
Kontrolna kultura		
 5 (48h; Nikolić i sar., 2018)		
 7 (48h; Nikolić i sar., 2018)		

Pouzdanija i objektivnija u odnosu na vizelnu je kvantifikacija apoptoze protočnim citometrom. Pojedinačne ćelije iz suspenzije tretiranih i na odgovarajući način pripremljenih ćelija aparat detektuje na osnovu usvojenih fluorescentnih boja i sortira ih i/ili broji po grupama. Tako se na osnovu usvajanja aneksina V i propidijum jodida može proceniti integritet ćelija, odnosno mogu se razlikovati ćelije u ranoj ili kasnoj apoptozi od nekrotičnih i normalnih ćelija. Naime, aneksin se vezuje za fosfolipidne konstituente membrane, pa je intenzitet obojenosti koji potiče od vezivanja ove boje srazmeran permeabilnosti ćelijske membrane. S druge strane, propidijum jodid se vezuje za DNK, pa se intenzitet boje koja potiče od njega može odnositi na ćelije sa narušenim integritetom membrane. Kod nekih jedinjenja može se uočiti različit obrazac biološkog efekta nakon 48-časovnog i 72-časovnog tretiranja MDA-MB-231 ćelija (Jakimov i sar., 2015). U Tabeli 17 predstavljeni su rezultati protočno-citometrijske analize MDA-MB-231 ćelija tretiranih androstanskim pikolinima **33** i **34**. Ukupna apoptoza posle 72 sata tretmana ekvitoksičnim koncentracijama koje odgovaraju IC₅₀ koncentracijama je skoro jednaka u kulturi ćelija tretiranih ovim jedinjenjima, mada je broj ćelija u ranoj, odnosno kasnoj apoptozi različit. Apoptoza tokom kraćeg tretiranja je bila mnogo manja.

Tabela 17 Apoptoza i nekroza MDA-MB-231 ćelija, tretiranih ekvivalentnim koncentracijama (IC_{50} koncentracijama) modificovanih steroida **33** i **34**, kvantifikovana protočnom citometrijom (Jakimov i sar., 2015)

Apoptoza i nekroza MDA-MB-231 ćelija posle tretmana jedinjenjem 33	
 <p style="text-align: center;">33</p>	
Posle 48 tretmana ($IC_{50} = 2,17 \mu M$)	Posle 72 tretmana ($IC_{50} = 0,61 \mu M$)
	
Apoptoza i nekroza MDA-MB-231 ćelija posle tretmana jedinjenjem 34	
 <p style="text-align: center;">34</p>	
Posle 48 tretmana ($IC_{50} = 2,50 \mu M$)	Posle 72 tretmana ($IC_{50} = 1,61 \mu M$)
	
<p> ■ Žive ćelije ■ Nekrotične ćelije ■ Ćelije u ranoj apoptozi ■ Ćelije u kasnoj apoptozi </p>	

ZAKLJUČAK

Medicinska hemija, po definiciji, obuhvata istraživanja u različitim oblastima hemije, biologije, farmacije i medicine, čiji rezultati istraživanja mogu da doprinesu razvoju terapeutika u saradnji sa istraživačima iz drugih oblasti, komplementarnih po sadržaju i značaju. Organska sinteza se smatra osnovom u dizajnu i sintezi novih jedinjenja, kandidata za lekove, međutim, hemija kompleksa takođe igra važnu ulogu u razvoju novih lekova. Fizičko-hemijske, biohemijske, biološke i farmaceutske nauke su od izuzetnog značaja za karakterizaciju i merenje efikasnosti sintetisanih ili izolovanih jedinjenja, a sve u saradnji sa stručnjacima iz oblasti medicine u završnim fazama razvoja lekova. Racionalni dizajn lekova u velikoj meri oslanja se na kompjuterske tehnike i simulacije.

Saradnjom stručnjaka iz različitih oblasti nauke krajnji cilj medicinske hemije postaje dostupniji. Tako su i dizajn, sinteza, karakterizacija novih steroidnih jedinjenja i ispitivanje njihove pretpostavljene farmakološke aktivnosti od velikog značaja za razvoj preparata za lečenje obolelih od hormonski zavisnih bolesti. Neki modifikovani steroidi, derivati estrogenih i androgenih hormona, menjaju aktivnost enzima steroidogeneze, neki kompetituju sa receptorima, dok neki indukuju smrt ćelija kancera.

Jedinjenja estranske serije su u datom pregledu uglavnom bila antagonisti estrogenih receptora, izazivajući antiestrogeni efekat kod eksperimentalnih životinja. Neka su inhibirala ili aktivirala enzime steroidogeneze, menjajući dostupnost aktivne forme hormona, estradiola. Androstanski derivati različitih modifikacija, uglavnom na D prstenu, ispoljili su inhibitorni efekat na CYP 17 (17 α -hidroksilazu/17,20-lijazu) i CYP19 (aromatazu), kao i na izoenzim 3 17 β -hidroksisteroiddehidrogenaze (17 β HSD3). S druge strane, prilikom tretmana ćelijskih linija kancera veliki broj androstanskih modifikovanih steroida smanjivao je proliferaciju ovih ćelija selektivno, bez uticaja na zdrave ćelije. Za neka od jedinjenja, efikasnih antiproliferativnih agenasa, dokazano je da deluju citotoksično, odnosno, da izazivaju apoptozu, programiranu ćelijsku smrt ćelija kancera.

Mogućnosti medicinske hemije steroida su brojne i raznovrsne. Imajući u vidu strukturne karakteristike biološki aktivnih derivata estrogenih i androgenih hormona, njihove fizičko-hemijske osobine i biološku i farmakološku aktivnost, može se uočiti veliki diverzitet bioloških aktivnosti, koje ponekad nisu očigledno i neposredno povezane sa strukturama tih jedinjenja. Korelacijom strukture i aktivnosti većeg broja jedinjenja slične strukture, koji sadrže izostere ili bioizostere, mogu se uočiti farmakofore važne ili neophodne za ispoljavanje određenog tipa aktivnosti. Na ovakvim SAR istraživanjima se zasniva dizajn novih molekula, potencijalnih lekova, te su istraživanja bazirana na njima u ekspanziji.

S druge strane, skriningom velikog broja jedinjenja mogu se identifikovati jedinjenja velikog biološkog ili farmakološkog efekta na neki model-sistem. Validacija terapijskog cilja – najčešće proteina – i ispitivanje aktivnosti jedinjenja koja su hemijske ili biološke izostere prvobitno identifikovanog biološki aktivnog molekula mogu da usmere dizajn novih potencijalnih lekova velike selektivnosti. Pri tome se u dizajnu, sintezi i biomedicinskim ispitivanjima u pronalaženju lekova za hormonski zavisne bolesti uvek mora voditi računa o sveobuhvatnosti istraživanja, što je moguće ostvariti saradnjom u okviru multidisciplinarnih istraživačkih timova.

SUMMARY

Medicinal chemistry, by definition, includes research in various fields of chemistry, biology, pharmacy and medicine, whose research results can, in collaboration with researchers in other fields, complementary in content and importance, contribute to the development of therapeutics. Organic synthesis represents the basis of the design and synthesis of new compounds, candidates for medicines, however, the chemistry of complexes also play an important role in the development of new drugs. Physico-chemical, biochemical, biological and pharmaceutical sciences are of great importance for the characterization and measurement of the efficiency of synthesized or isolated compounds, all in cooperation with experts in the field of medicine in the final stages of drug development. Rational drug design relies to a large extent on computer technology and simulation.

The cooperation of experts from different fields of science enables the ultimate goal of medical chemistry to become more accessible. Thus, the design, synthesis, characterization of new steroid compounds and testing of their presumed pharmacological activity are of great importance for the development of preparations for the treatment of patients with hormone-dependent diseases. Some modified steroids, derivatives of estrogenic and androgenic hormones, alter the activity of the steroidogenesis enzyme, some compete with receptors, while some induce the death of cancer cells.

The compounds of the estrone series in the given review were mainly estrogen receptor antagonists, causing an antiestrogenic effect in experimental animals. Some inhibited or activated steroidogenesis enzymes, altering the availability of the active form of the hormone, estradiol.

Androstane derivatives of various modifications, mainly of D-ring, showed an inhibitory effect on CYP 17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) and CYP19 (aromatase), as well as on the isoenzyme 3 of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β HSD3). On the other hand, during the treatment of cancer cell lines, a large number of androstane-modified steroids reduced the proliferation of these cells selectively, without affecting healthy cells. Some

of the compounds, which are effective antiproliferative agents, have been shown to be cytotoxic, that is, to induce apoptosis, the programmed cell death of cancer cells.

The possibilities of medicinal chemistry of steroids are numerous and diverse. Having in mind the structural characteristics of biologically active derivatives of estrogenic and androgenic hormones, their physicochemical properties, as well as their biological and pharmacological activity, a great diversity of biological activities can be observed, which sometimes are not obviously and directly related to the structures of these compounds. By correlating the structure and activity of a number of compounds of similar structures, containing isosteres or bioisosteres, pharmacophores important or necessary for the expression of a particular type of activity can be noticed. Such SAR study is a basis of the design of new molecules, potential drugs, and research based on them is in expansion.

On the other hand, screening a large number of compounds can identify compounds with a large biological or pharmacological effect on some model system. Validation of a therapeutic target - most commonly a protein - and examination of the activity of compounds that are chemical or biological isosters of the originally identified biologically active molecule can guide the design of new potential drugs of high selectivity. In the design, synthesis and biomedical research in finding drugs for hormone-dependent diseases, the comprehensiveness of research must always be taken into account, which can be achieved through cooperation within multidisciplinary research teams.

LITERATURA

Acharya M., Gonzalez M., Mannens G., De Vries R., Lopez C., Griffin T., Tran N., A phase I, open-label, single-dose, mass balance study of ¹⁴C-labeled abiraterone acetate in healthy male subjects. *Xenobiotica* 2013, 43(4): 379–389

Ačanski M. M., Vujić Đ. N., Nježić Z. B., Jovanović-Šanta S. S., Retention and lipophilicity of newly synthesized 3-benzyloxy steroid derivatives in normal- and reversed-phase HPLC. *Anal. Tech. Szeged*. 2012, 6-16.

Ačanski M. M., Jovanović-Šanta S. S., Jevrić L. R., Normal and reversed phase thin-layer chromatography of new 16,17-secoestrone derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.* 2003, 68 (1): 57-63.

Ačanski M. M., Vujić Đ., Jovanović-Šanta S., Separation and lipophilicity of some new steroidal derivatives in normal- and reversed phase high performance liquid chromatography. *CI&CEQ* 2011, 17 (4): 535-542.

Ačanski M., Dobrijević J., Redžepović A., Vujić Đ., Jovanović-Šanta S., Normal and Reversed-Phase Behaviour of 16,17-Secoestrone Derivatives on Cyanopropyl-Bonded Gel. *Chromatographia* 2009, 70 (11/12): 1679-1683.

Ačanski M., Dobrijević J., Redžepović A., Vujić Đ., Sakač M., Jovanović-Šanta S., Reversed-Phase Behaviour of 16,17-Secoestrone in LC. *Chromatographia* 2010, 71 (9/10): 913-916.

Ajduković J. J., Djurendić E. A., Petri E. T., Klisurić O. R., Čelić A. S., Sakač M. N., Jakimov D. S., Penov Gaši K. M., 17(E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21: 7257–7266.

Ajduković J. J., Penov Gaši K. M., Jakimov D. S., Klisurić O. R., Jovanović-Šanta S. S., Sakač M. N., Aleksić L. D., Djurendić E. A., Synthesis, structural analysis and antitumor activity of novel 17 α -picolyl and 17(E)-picolinylidene A-modified androstane derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23: 1557–1568.

Aslantürk Ö. S., In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, u *Genotoxicity, A Predictable Risk to Our Actual World*, Urednik Larramendy M. L., OntechOpen, 2018, eBook (PDF) ISBN: 978-1-83881-236-2, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71923>.

Avendano C., Menendez J. C., *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 1. izdanje, Elsevier, Oxford, 2008.

Bachmann W. E., Cole W., Wilds A. L., The Total Synthesis of the Sex Hormone Equilenin and Its Stereoisomers. *J. Am. Chem. Soc.* 1940, 62 (4): 824-839. <https://doi.org/10.1021/ja01861a036>

- Bacsa I., Jójárt R., Wölfling J., Schneider G., Herman B. E., Szécsi M., Mernyák E., Synthesis of novel 13α -estrone derivatives by Sonogashiracoupling as potential 17β -HSD1 inhibitors. *Beilstein J. Org. Chem.* 2017,13: 1303–1309.
- Bowler J., Lilley T.J., Pittam J.D., Wakeling A.E., Novel steroidal pure antiestrogens. *Steroids* 1989, 54: 71-99.
- Brodie A. M. J., Schwarzel W. C., Brodie H. J., Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis in the rat ovary. *J. Steroid. Biochem.* 1976, 7: 787–93.
- Brown D. G., Boström J., Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? *J. Med. Chem.* 2016, 59: 4443–4458.
- Buckle D. R., Erhardt P. W., Ganellin C. R., Kobayashi T., Perun T. J., Proudfoot J., Senn-Bilfinger J., Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II - IUPAC Recommendations 2013, *Pure Appl. Chem.* 2013, 85(8):1725–1758.
- Campbell I. B., Macdonald S. J. F., Procopiou P. A., Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. *Drug Discov. Today*, 2018, 23(2): 219-234.
- Cortés-Benítez F., Roy J., Perreault M., Maltais R., Poirier D., A- and D-Ring Structural Modifications of an Androsterone Derivative Inhibiting 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3: Chemical Synthesis and Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.* 2019, 62 (15): 7070–7088.
- Deeb O., Recent Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design u *Medicinal chemistry and drug design*, urednik Ekinci D., InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
- Djurendić E. A., Savić M. P., Klisurić O. R., Sakač M. N., Bogdanović G. M., Jakimov D. S., Penov Gaši K.M., Synthesis, X-ray structural analysis, and cytotoxic activity of some new androstane D-homo lactone derivatives. *Struct. Chem.* 2012, 23: 1761.
- Djurendić E., Ajduković J., Sakač M., Čanadi J., Kojić V., Bogdanović G., Penov Gaši K., 17-Picolinylidene-substituted steroid derivatives and their antiaromatase and cytotoxic activity, *ARKIVOC* 2009 (xiii) 311-323
- Djurendić E., Daljev J., Sakač M., Čanadi J., Jovanović-Šanta S., Andrić S., Klisurić O., Kojić V., Bogdanović G., Djurendić-Brenesel M., Novaković S., Penov-Gaši K., Synthesis of some epoxy and/or N-oxy 17-picolyl and 17-picolinylidene-androst-5-ene derivatives and evaluation of their biological activity. *Steroids* 2008, 73: 129-138.
- Djurendić E.A., Sakač M.N., Zaviš M.P., Gaković A.R., Čanadi J.J., Andrić S.A., Klisurić O.R., Kojić V.V., Bogdanović G.M., PenovGaši K.M., Synthesis and biological evaluation of some new A,B-ring modified steroidal D-lactones. *Steroids* 2008, 73: 681–688.

EFMC Position Paper on Medicinal Chemistry, http://www.efmc.info/content.php?langue=english&cle_menus=1201086391, pristupljeno 12.08.2020.

Ekinci D. (urednik), Medicinal chemistry and drug design, InTech, Rijeka, Croatia, 2012.

Emmens C. W.: "Estrogens", u *Hormone Assay*, Emmens C.W. (urednik), New York, Academic Press, 1950.

Fleming F. F., Yao L., Ravikumar P. C., Funk L., Shook B. C., Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore. *J. Med. Chem.* 2010, 53(22): 7902–7917.

Frank E., Schneider G., Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity. *J. Steroid Bioch.* 2013, 137: 301-315

Furr B. J. A. (urednik) Aromatase Inhibitors, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 2006.

García-Godoy M. J., López-Camacho E., García-Nieto J., Del Ser J., Nebro A. J., Aldana-Montes J. F., Bio-inspired optimization for the molecular docking problem: State of the art, recent results and perspectives. *Appl. Soft Comput.* 2019, 79: 30–45.

Gaši K., Bajin K., Jovanović-Vlaović J., Miljković D., Sinteza 3 β -acetoksi-17-pikoliniliden-5 α -androstan-16-ona (Synthesis of 3 β -acetoxy-17-picolinylidene-5 α -androstan-16-one). *Review of Research, Faculty of Science, University of Novi Sad*, 1983, 2: 19-28.

Grbović Lj. M., Pavlović K. J., Jovanović-Šanta S. S., Vasiljević B. R., Microwave-Assisted Synthesis of Bile Acids Derivatives: An overview. *Curr. Org. Chem.* 2019, 23: 256-275.

Gunić E., Tabaković I., Gaši K. M., Miljković D., Juranić I., Products and mechanisms in the anodic oxidation of solanidine-type steroidal alkaloids. *J. Org. Chem.* 1994, 59 (6): 1264-1269

Hanson J. R., Steroids: partial synthesis in medicinal chemistry. *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23: 100–107.

Hanson J. R., Steroids: partial synthesis in medicinal chemistry. *Nat. Prod. Rep.* 2010, 27: 887–899.

Hanson J. R., Steroids: reactions and partial synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 2005, 22: 104–110.

Henry C. M., Hollville E., Martin S. J., Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 2013, 61: 90–97.

Herman B. E., Kiss A., Wölfling J., Mernyák E., Szécsi M., Schneider G., Synthesis of substituted 15 β -alkoxy estrone derivatives and their cofactor-dependent inhibitory effect on 17 β -HSD1. *J. Enz. Inhib. Med. Ch.* 2019, 34 (1): 271-1286.

- Hingorani R., Deng J., Elia J., McIntyre C., Mittar D., Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System, *Methods* 2013, 61: 90-103.
- Holbrook S. Y. L., Garneau-Tsodikova S., What is medicinal chemistry? – Demystifying a rapidly evolving discipline!, *Med. Chem. Commun.* 2017, 8: 1739-1941.
- Hüser J. (Urednik), *High-Throughput Screening in Drug Discovery*, 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Ibrahim-Ouali M., Botsi-Nkomendi N., Rocheblave L., Synthesis of heterosteroids. First synthesis of oxa steroid from cholic acid. *Tetrahedron Lett.* 2010, 51: 93-95.
- Ibrahim-Ouali M., Hamzea K., Rocheblave L., Synthesis of 12-oxa, 12-aza and 12-thia cholane triols. *Steroids* 2011a, 76: 324-330.
- Ibrahim-Ouali M., Zoubir J., Romero E., A ring-closing metathesis approach to secosteroidal macrocycles. *Tetrahedron Lett.* 2011b, 52: 7128-7131.
- Ilić M., Ačanski M., Pastor K., Popović Lj., Jovanović-Šanta S., New challenge in the Lipophilicity Determination and Separation of biologically active 16,17-Secoesterone Derivatives by HPLC -use of Pentafluorophenyl-propyl column. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 2020, 43 (3-4): 106-117.
- Jakimov D. S., Kojić V. V., Aleksić L. D., Bogdanović G. M., Ajduković J. J., Djurendić E. A., Penov Gaši K. M., Sakač M. N., Jovanović-Šanta S. S., Androstane derivatives induce apoptotic death in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23: 7189–7198.
- Jin L., Borrás M., Lacroix M., Legros N., Leclercq G., Antiestrogenic activity of two 11 β -estradiol derivatives on MCF-7 breast cancer cells. *Steroids* 1995, 60: 512-518.
- Jordan V. C., Furr B. J. A. (urednici) *Hormone Therapy in Breast and Prostate Cancer*, Springer, New York, 2009.
- Jorgensen W. L., The Many Roles of Computation in Drug Discovery, *Science* 2004, 303: 1813-1818.
- Jovanović-Šanta S. S., Andrić S., Andrić N., Bogdanović G., Petrović J. A., Evaluation of biological activity of new hemiesters of 17-hydroxy-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene-16-nitrile. *Med. Chem. Res.* 2011, 20: 1102-1110.
- Jovanović-Šanta S. S., Gaborov S. L., Petrović J. A., Synthesis of 3-benzyloxy-17-malexyloxy-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene-16-nitrile. *Proc. Nat. Sci., Matica Srpska, Novi Sad* 2002, 103: 5-9.
- Jovanović-Šanta S. S., Pejanović V. M., Petrović J. A., A novel route to 3-hydroxy-16,17-seco-estrone derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.* 1999, 64: 393-396.

Jovanović-Šanta S., Andrić S., Kovačević R., Pejanović V., Synthesis and biological activity of new 16,17-secoestrone derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2000, 5: 77-82.

Jovanović-Šanta S., Biološka aktivnost novosintetisanih D-seko- i D-homoestratrienskih derivata u *in vivo* i *in vitro* uslovima, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2010.

Jovanović-Šanta S., Đurendić E., Lazar D., Stanković S., Alternative syntheses of 3-hydroxy-17-bromo-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene 16-nitrile and crystallographic studies of two intermediates, *J. Serb. Chem. Soc.* 2005, 70 (4): 569-577.

Jovanović-Šanta S., Petri E., Klisurić O., Szecsi M., Kovačević R., Petrović J., Antihormonal potential of selected D-homo and D-seco estratriene derivatives. *Steroids* 2015, 97: 45–53.

Jovanović-Šanta S., Petrović J., Andrić S., Kovačević R., Đurendić E., Sakač M., Lazar D., Stanković S., Synthesis, structure, and screening of estrogenic and antiestrogenic activity of new 3,17-substituted -16,17-seco-estratriene derivatives. *Bioorg. Chem.* 2003, 31: 475-484.

Jovanović-Šanta S., Petrović J., Sakač M., Žakula Z., Isenović E., Ribarac-Stepić N., The influence of 17-oxo- and 17-hydroxy-16,17-seco-estratriene derivatives on estrogen receptor, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2006, 71: 532-542.

Jovanović-Šanta S., Proučavanje interakcija novosintetizovanih D-seko-estronskih derivata sa estrogenim receptorima, Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2000.

Klisurić O. R., Szécsi M., Djurendić E. A., Szabó N., Herman B. E., Jovanović-Šanta S. S., Dojčinović-Vujašković S. V., Nikolić A. R., Pavlović K. J., Ajduković J. J., Oklješa A. M., Petri E. T., Kojić V. V., Sakač M. N., Penov Gaši K. M., Structural analysis and biomedical potential of novel salicyloyloxy estrane derivatives synthesized by microwave irradiation. *Struct. Chem.* 2016, 27: 947–960.

Lanišnik Rižner T., Estrogen biosynthesis, phase I and phase II metabolism, and action in endometrial cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013, 381: 124–139

Lengauer T., Rareyt M., Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, 6: 402-406.

Lespérance M., Barbeau X., Roy J., Maltais R., Lagüe P., Poirier D., Chemical synthesis of C3-oxiranyl/oxiranylmethyl-estrane derivatives targeted by molecular modeling and tested as potential inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Steroids* 2018, 140: 104–113.

Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997, 23: 3-25.

- Lombardino J. G., Lowe III J. A., The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. *Nature Rev. - Drug Discovery* 2004, 3: 853-862.
- Lord C. J., Ashworth A., Biology-driven cancer drug development: back to the future. *BMC Biology* 2010, 8: 38-49.
- Maltais R., Tremblay M. R., Ciobanu L. C., Poirier D., Steroids and Combinatorial Chemistry. *J. Comb. Chem.* 2004, 6(4): 443-456.
- Maryanoff B. E., Drug discovery and medicinal chemist, *Future Med. Chem.* 2009, 1(1): 11-15.
- Miller W. L., Auchus R. J., The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Rev.* 2011, 32(1): 81–151.
- Miljković D., Čanadi D., Petrović J., Stanković S., Ribár B., Argay G., Kálmán A., Ozonation of 3 β -acetoxy-5 α -chloro-cholestane in solution. X-ray study of 3 β -acetoxy-5 α -chloro-14-cholestene-ozonide. *Tetrahedron Lett.* 1984, 25 (13): 1403-1406.
- Miljković D., Gaši K., 3-Acetoxy-17-picolinylidene-5-androsten-16-one, the key intermediate in the 21,27-bisnorsolanidine synthesis. *Bull Chem Soc Beograd*, 1981, 46: 263-268.
- Miljković D., Gaši K., Kindjer M., Stanković S., Argay G., Synthesis, crystal and molecular structure, and hyperconjugation of the isomeric 17,20-epoxy-17-picolyl derivatives of 5-androstene and 5 α -androstane. *Tetrahedron* 1987, 43 (3): 631-641.
- Miljković D., Kuhajda K., Hranisavljević J., Selective C-12 Oxidation of Cholic Acid. *J. Chem. Res. S* 1996, 2: 106-107.
- Miljković D., Kuhajda K., Stanković S., Argay G., Kálmán A., Formation of a bis-lactone from 3-O-acetyl-deoxycholic acid. *Tetrahedron Lett.* 1987, 28 (46): 5737-5740.
- Miljković D., Penov-Gaši K., Djurendić E., Sakač M., Medić-Mijačević L., Pejanović V., Stanković S., Lazar D., A novel rearrangement of steroidal α -hydroxy grimes, *Tetrahedron Lett.* 1997, 38 (26): 4683-4684.
- Miljković D., Petrović J., Hadžić P., Some new ring-D seco steroids. *Tetrahedron* 1978, 34: 3575–3577.
- Miljković D., Petrović J., Stajić M., Miljković M., The Beckmann Fragmentation Reaction of Some α -Hydroxy Ketoximes. *J. Org. Chem.* 1973, 38: 3585-3588.
- Miljković D., Petrović, J., Beckmann Fragmentation Reaction of 3-methoxy-17 β -hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-16-one oxime. *J. Org. Chem.* 1977, 42: 2101-2102.
- Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65: 55-63.

- Nicolaou K.C., The Chemistry-Biology-Medicine Continuum and the Drug Discovery and Development Process in Academia. *Chemistry & Biology* 2014, 21: 1039-1045.
- Nikolić A. R., Kuzminac I. Z., Jovanović-Šanta S. S., Jakimov D. S., Aleksić L. D., Sakač M. N., Anticancer activity of novel steroidal 6-substituted 4-en-3-one D-seco dinitriles. *Steroids* 2018, 135: 101-107.
- Nikolić A. R., Petri E. T., Klisurić O. R., Čelić A. S., Jakimov D. S., Djurendić E. A., Penov Gaši K. M., Sakač M. N., Synthesis and anticancer cell potential of steroidal 16,17-seco-16,17a-dinitriles: Identification of a selective inhibitor of hormone-independent breast cancer cells. *Bioorgan. Med. Chem.* 2015, 23: 703–711.
- Obadović D. Ž., Stojanović M., Jovanović-Šanta S., Cvetinov M., Lazar D., Vajda A., Eber N., Ristić I., Study of Binary Cholesteric Liquid Crystalline Mixtures Doped with Some Chiral Nonmesogenic Estradiol Derivatives. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2011, 547: 46-53.
- Obadović D. Ž., Vajda A., Jovanović-Šanta S., Stančić M., Petrović J., The influence of new chiral additives on phase transitions of binary mixtures of some cholesteric liquid crystals. *Mater. Sci. Forum* 2000, 321-324: 1131-1136.
- Obadović D. Ž., Vajda A., Stančić M., Jovanović-Šanta S., Petrović J., Lazar D., The synthesis of the chiral non-mesogenic D-seco estrone derivatives and their influence on the phase transitions of the cholesteric liquid crystals. *Phase Transit.* 2001, 74, 509-519.
- Obadović D., Stojanović M., Jovanović-Šanta S., Lazar D., Vajda A., Eber N., The Influence of New D-Seco-Estrone Derivatives on the Behavior of the Cholesteric Liquid Crystals Binary Mixtures. *Int J Modern Physics B* 2006, 20 (21): 2999-3013.
- Obadović D., Stojanović M., Jovanović-Šanta S., Nikolov J., Lazar D., Cvetinov M., Vajda A., Eber N., Phase Transition Temperature Shifts in Binary Cholesteric Liquid Crystalline Mixtures Doped with some Chiral Nonmesogenic Additives. *J. Res. Physics* 2009, 33 (1): 29-35.
- OECD (2016), Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>, preuzeto 01.06.2020.
- Oklješa A., Jovanović-Šanta S., Klisurić O., Sakač M., Djurendić E., Jakimov D., Aleksić L., Penov Gaši K., Structural Analysis and Antitumor Activity of Androstane D-Seco-mesyloxy Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 2013, 24 (10): 1613-1622.
- Oklješa A., Klisurić O.R., Jakimov D., Penov Gaši K., Sakač M., Jovanović-Šanta S., Structural, computational and anticancer activity studies of D-seco-17-mesyloxy androstane derivatives. *J. Mol. Struct.* 2019, 1187: 14-22.
- Ottow E., Weinmann H. (urednici) *Nuclear Receptors as Drug Targets*, WILEY-VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008.

Patel S. S., Savjani J. K., Systematic review of plant steroids as potential anti-inflammatory agents: Current status and future perspectives. *J Phytopharm* 2015, 4(2): 121-125

Patil S. A., Role of Medicinal Chemist in the Modern Drug Discovery and Development. *Org. Chem. Curr. Res.* 1:e110. 2012, doi:10.4172/2161-0401.1000e110

Patrick G. L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 5. izdanje, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2013.

Pawar G., Madden J. C., Ebbrell D., Firman J. W., Cronin M. T. D., In Silico Toxicology Data Resources to Support Read-Across and (Q)SAR. *Frontiers in Pharmacol.* 2019, www.frontiersin.org, 10: Article 561

Pejanović V. M., Petrović J. A., Csanádi J. J., Stanković S. M., Miljković D. A., Synthesis and unusual beckmann fragmentation reaction of syn-3-Methoxy-6 α ,17 β -Dihydroxyestra-1,3,5(10)-trien-7-one oxime. *Tetrahedron* 1995, 51 (48): 13379-13384.

Pejanović V. M., Sakač M. N., Jovanović-Šanta S. S., Petrović J. A., 17-Acetals of 3-methoxy-17-oxo-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile. *Proc. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad* 1999, 97: 5-10.

Penov Gaši K. M., Čolic D. R., Arcson O. N., Sakač Z. O., Djurendić E. A., Sakač M. N., Medić-Mijačević L., Miljković D. A., Improved methods for obtaining immonium perchlorates and enamines of solanidine type steroidal alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1996, 61 (11): 1655-1661.

Penov Gaši K. M., Djurendić E. A., Szécsi M., Gardi J., Csanadi J. J., Klisurić O. R., Dojčinović-Vujašković S. V., Nikolić A. R., Savić M. P., Ajduković J. J., Oklješa A. M., Kojić V. V., Sakač M. N., Jovanović-Šanta S. S., Microwave assisted synthesis and biomedical potency of salicyloyloxy and 2-methoxybenzoyloxy androstane and stigmastane derivatives. *Steroids* 2015, 94: 31-40.

Penov Gaši K. M., Miljković D. A., Medić Mijačević L. D., Djurendić E. A., Stojanović S. Z., Sakač M. N., Djurendić M. D., Stanković S. M., Lazar D., Andrić S., Kovačević R., Synthesis, X-ray crystal structures and biological activity of 16-amino-17-substituted-D-homo steroid derivatives. *Steroids* 2003, 68 (7-8): 667-676.

Penov Gaši K. M., Oklješa A. M., Petri E. T., Čelić A. S., Djurendić E. A., Klisurić O. R., Csanadi J. J., Batta G., Nikolić A. R., Jakimov D. S., Sakač M. N., Selective antitumour activity and ER α molecular docking studies of newly synthesized D-homo fused steroidal, tetrazoles. *Med. Chem. Commun.* 2013, 4: 317-323.

Penov Gaši K. M., Stojanović S. Z., Sakač M. N., Popsavin M., Jovanović-Šanta S., Stanković S. M., Klisurić O. R., Andrić N., Kovačević R., Synthesis and anti-aromatase activity of some new steroidal D-lactones. *Steroids* 2005, 70: 47-53.

Penov Gaši K., Djurendić Brenesel M., Djurendić E., Sakač M., Čanadi J., Daljev J., Armbruster T., Andrić S., Sladić D., Božić T., Novaković I., Juranić Z., Synthesis

and biological evaluation of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androst-5-ene derivatives. *Steroids* 2007, 72: 31–40.

Penov Gaši K., Djurendić E., Dojčinović-Vujašković S., Gaković A., Jovanović-Šanta S., Kojić V., Sakač M., Synthesis, anti-oxidant activity, and cytotoxicity of salicyloyl derivatives of estra-1,3,5(10)-triene and androst-5-ene. *Chem. Pap.* 2012, 66 (4): 284–294.

Penov Gaši K., Sakač M., Jovanović-Šanta S., Djurendić E., An Overview of Partial Synthesis and Transformations of Secosteroids. *Curr. Org. Chem.* 2014, 18: 216–259.

Penov Gaši K., Stojanović S., Sakač M., Djurendić E., Csanádi J., Molnar-Gabor D., Lazar D., Kovačević R., Synthesis And Biological Of Some 17a-Substituted Homolactones Of Androst-5-Ene Derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2005, 70: 1387-1396.

Penov Gaši K., Stojanović S., Sakač M., Djurendić E., Jovanović-Šanta S., Stanković S., Andrić N., Popsavin M., Synthesis, crystal structure and antiaromatase activity of 17-halo-16,17-seko-5-androstene derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.* 2003, 68: 707-714.

Penov Gaši K.M., Djurendić E.A., Čolić D.R., Sakač, M.N. Arcson O.N., Mijačević L.M., Miljković D.A., 16-Dehydropregnenolone acetate from solanidine. *J. Serb. Chem. Soc.* 1997, 62 (6): 451-454.

Penov Gaši K.M., Miljković D.A., Medić Mijačević Lj.D., Djurendić E.A., Stojanović S.Z., Sakač M.N., Djurendić M.Dj., Stanković S.M., Lazar D., Andrić S., Kovačević R., Synthesis, X-ray crystal structures and biological activity of 16-amino-17-substituted-D-homo steroid derivatives, *Steroids* 2003, 68: 667–676.

Penov Gaši K.M., Stanković S. M., Csanadi J. J., Djurendić E. A., Sakač M. N., Medić Mijačević Lj., Arcson O. N., Stojanović S. Z., Andrić S., Molnar Gabor D., Kovačević R., New D-modified androstane derivatives as aromatase inhibitors. *Steroids* 2001, 66: 645– 653.

Penov-Gaši K., Miljković D., Medić-Mijačević L., Djurendić E., Petrović J., Pejanović V., Stanković S., Lazar D., A novel fragmentation-cyclization reaction of steroidal α -hydroxy oximes, *Tetrahedron Lett.* 1998, 39 (52): 9759-9760.

Pérez Carrión R., Alberola Candel V., Calabresi F., et al., Comparison of the selective aromatase inhibitor formestane with tamoxifen as first-line hormonal therapy in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* 1994, 5 (7): S19–24.

Petrović J. A., Pejanovic V. M., Miljković D. A., Hranisavljević J. T., Synthesis and estrogen activity screening of some new D-secoestrone derivatives. *Steroids* 1990, 55 (6): 276-278.

- Petrović J. A., Pejanović V. M., Jovanović-Šanta S. S., Gaborov S. L., Synthesis of 2-acetyl-3-methoxy-17-tosyloxy-16,17-secoestra-1,3,5(10)-trien-16-nitrile. *Proc. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad* 2001, 100: 71-75.
- Petrović J. A., Pejanović V. M., Miljković D. A., Hranisavljević J.T., Synthesis and estrogen activity screening of some new D-secoestrone derivatives. *Steroids* 1990, 55 (6): 276-278.
- Petrović J. A., Sakač M. N., Penov-Gaši K. M., Pejanović V. M., Jovanović-Šanta S., Synthesis of some D-homo-D-aza estratriene derivatives, *Acta Period. Technol.(APTEFF)* 2004, 35: 225-230.
- Petrović J. A., Stepić T. Z., Pejanović V. M., Medić-Mijačević L. D., Kovačević R. Z., Andrić S. A., Stanković S. M., Synthesis and biological activity of two new D-secoestrone derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.* 1998, 63 (2): 113-116.
- Petrović S., Sakač M., Jovanović-Šanta S., Steroid Structure and Retention in Normal- and Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography. *J. Planar Chromat.* 2000, 13: 106-113.
- Radulović D., Vladimirov S., *Farmaceutska hemija I deo*, Grafopan, Beograd, 2005.
- Rasmussen N., Steroids in Arms: Science, Government, Industry, and the Hormones of the Adrenal Cortex in the United States, 1930-1950. *Med. Hist.* 2002, 46: 299-324
- Reymond J.-L., Awale M., Exploring Chemical Space for Drug Discovery Using the Chemical Universe Database. *ACS Chem. Neurosci.* 2012, 3: 649-657.
- Sakač M. N., Gaković A. R., Csanádi J. J., Djurendi E. A., Klisurić O., Kojić V., Bogdanović G., Penov Gaši K. M., An intramolecular one-pot synthesis of steroidal triazoles via 1,3-dipolar cycloadditions of in situ generated diazo compounds. *Tetrahedron Lett.* 2009, 50: 4107-4109.
- Sakač M. N., Miljković D. A., Penov Gaši K. M., Popsavin M., Klisurić O. R., Stanković S. M., Andrić S., Kovačević R., Synthesis, x-ray crystal structure and antiestrogenic activity of 17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2005a, 70 (1): 63-71.
- Sakač M. N., Penov Gaši K. M., Djurendić E. A., Andrić S., Miljković D. A., Synthesis and biological evaluation of 17-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2007, 72 (3): 403-410.
- Sakač M. N., Penov Gaši K. M., Popsavin M., Djurendić E. A., Andrić S., Kovačević R. M., Synthesis and estrogenic activity screening of some 6,9-disubstituted estradiol derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2005b, 70 (4): 479-486.

Sakač M., Gaković A., Stojanović S., Djurendić E., Kojić V., Bogdanović G., Penov K. Gaši, Synthesis and biological evaluation of a series of A,B-ring modified 16,17-secoandrostane derivatives. *Bioorg. Chem.* 2008, 36: 128–132.

Savić M. P., Djurendić E. A., Petri E. T., Čelić A., Klisurić O. R., Sakač M. N., Jakimov D. S., Kojić V. V., Penov Gaši K. M., Synthesis, structural analysis and antiproliferative activity of some novel D-homo lactone androstane derivatives. *RSC Advances* 2013, 3: 10385-95.

Shlens M., Stoltz M. R., Benjamin A., Orthopedic applications of liquid crystal thermography. *West J. Med.* 1975, 122: 367-370.

Singh R., Panda G., An overview of synthetic approaches for heterocyclic steroids. *Tetrahedron* 2013, 69: 2853e2884

Slater L. B., Industry and Academy: The Synthesis of Steroids. *Hist. Stud. Phys. Biol.* 2000, 30(2) : 443-480

Stanković S., Kálmán A., Argay G., Miljković D., Kuhajda K., Vicković I., Bruwo M., Ori O., A novel 1:1 canal inclusion network formed by deoxycholic acid dimers (bislactones) with benzene molecules: an x-ray study. *J. Mol. Struct.* 1990, 221 C: 271-282.

Stanković S., Kuhajda K., Lazar D., Miljković D., Courseille Ch., Study of lactonization process in deoxycholic acid analogs by modeling: Structure of 3 α -acetoxy-24-nor-5 β -cholano-12 α ,24-lactone. *Z. Kristallogr.* 1998, 213 (3): 151-154.

Stefanović M., Mićović I. V., Jeremić D., Miljković D., Intracelular cyclization of 3 β -acetoxy-16-picolinylidene-5-androsten-17-one by catalytic hydrogenation. *Tetrahedron* 1970, 26: 2609-2617.

Stefanović M., Miljković D., Miljković M., Jokić A., Stipanović B., Studies on catalytic hydrogenation of 16-furfurylidene-17 β -hydroxy steroids. *Tetrahedron Lett.* 1966, 32: 3891-3895.

Szabó N., Ajduković J., Djurendić E., Sakač M., Ignáth I., Gardi J., Mahmoud G., Klisurić O., Jovanović-Šanta S., Penov Gaši K., Szécsi M., Determination of 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P45017 α) enzyme activities and their inhibition by selected steroidal picolyl and picolinylidene compounds. *Acta Biol. Hung.* 2015, 66 (1): 41–51.

Tarkovská D., Plants are Capable of Synthesizing Animal Steroid Hormones. *Molecules* 2019, 24: 2585.

Teutsch G., Ojasoo T., Raymond P., 11 β -substituted steroids, an original pathway to antihormones. *J. Steroid. Biochem.* 1988, 31: 549-565.

Thomas G., *Fundamentals of Medicinal Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2003.

Thomas G., *Medicinal Chemistry*, 2. izdanje, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2007.

Toxicology Skills for Drug Discovery - Why is Toxicology in Drug Discovery important? <https://www.rsb.org.uk/>, pristupljeno 12.05.2020.

Vallamkondu J., Corgiat E. B., Buchaiah G., Kandimalla R., Reddy P. H., Liquid Crystals: A Novel Approach for Cancer Detection and Treatment. *Cancers* 2018, 10: 462-482.

Valler M. J., Green D., Diversity screening versus focussed screening in drug discovery. *Drug Discov. Therap.* 2000, 5(7): 286-293.

Velluz L., Valls J., Nominé G., Recent Advances in the Total Synthesis of Steroids, *Angewandte Chemie*. 1965, 4(3):181-270.

Wakeling A.E., Valcaccia B., Newbould E., Green L.R., Non-steroidal antioestrogens—Receptor binding and biological response in rat uterus, rat mammary carcinoma and human breast cancer cells. *J. Steroid. Biochem.* 1984, 20: 111-120.

Wermuth C. G., Ganellin C. R., Lindberg P., Mitscher L. A., Glossary of terms used in medicinal chemistry - IUPAC Recommendations 1998, *Pure App. Chem.* 1998, 70(5):1129-1143.

Yin L., Hu Q., CYP17 inhibitors - Abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents, *Nat. Rev. Urol.* 2014, 11: 32–42.

Zeelen F. J., *Medicinal Chemistry of Steroids*, chapter 22, *Principles of Medical Biology* Vol. 8, 1997, str. 427-463.

Zheng W., Thorne N., McKew J. C., Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov. Today*. 2013 18: 1067–1073.

BIOGRAFIJA AUTORA



Suzana Jovanović-Šanta diplomirala je 1994. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu na smeru Diplomirani hemičar. Magistarsku tezu pod nazivom: „Proučavanje interakcija novosintetizovanih D-seko-estronskih derivata sa estrogenim receptorima” odbranila je 2000., a doktorsku tezu pod nazivom: „Biološka aktivnost novosintetisanih D-seko- i D-homo-estratrienskih derivata u *in vivo* i *in vitro* uslovima“ 2010. godine, na istom fakultetu, čime je stekla zvanje magistra, odnosno doktora biohemijskih nauka.

U zvanje docenta birana je 2011., a u zvanje vanrednog profesora za užu naučnu oblast Biohemija 2016. godine. Učestvovala je u izvođenju nastave na više predmeta na osnovnim, master i doktorskim studijama biohemije i hemije: Biohemija, Klinička biohemija, Biohemija hormona, Biohemija steroida, Enzimologija, i Ćelijske kulture u medicinskoj hemiji. Gostujući je predavač u okviru Erasmus+ programa razmene univerzitetskog osoblja, kao i u Istraživačkoj stanici Petnica. Koautor je dva praktikuma za vežbe iz biohemije. Mentor je tri doktorske disertacije i više od 80 diplomskih i master završnih radova.

Naučno-istraživački rad dr Suzane Jovanović-Šanta obuhvata ispitivanje bioloških aktivnosti modifikovanih steroida i drugih jedinjenja *in vitro* na ćelijskim kulturama i životinjskim tkivima i *in vivo* na animalnim modelima: ispitivanje antiestrogene, antikancerske i antioksidativne aktivnosti, kao i merenje uticaja na enzime steroidogeneze. Publikovala je oko 50 naučnih radova, a sa oko 100 saopštenja učestvovala na naučnim skupovima. Aktivan je recenzent u priznatim naučnim časopisima. Kao istraživač je do sada učestvovala na sedam nacionalnih i pet međunarodnih projekta. Rukovodilac je dva projekta bilateralne saradnje između Republike Belorusije i Republike Srbije. Potpredsednik je Biohemijskog društva Srbije i član upravnog odbora Srpskog hemijskog društva. Veoma dobro govori, čita i piše engleski i koristi se ruskim jezikom. Udata je i majka troje dece.

