



'21

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 62

бр. 6 (децембар)

YU ISSN 04406826
UDC 54.011.93



Хемијски Преглед
www.shd.org.rs/hp.htm

90 година од смрти
**Косџе
Николића**
(1844-1931)

и 70 година од смрти
**Свеџозара
Јовановића**
(1895-1951)

**Први доктори
хемије у Србији**

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД CHEMICAL REVIEW



Годиште 62

број 6
децембар

Editor-in-Chief
RATKO M. JANKOV
Deputy Editor-in-Chief
DRAGICA TRIVIĆ

Volume 62
NUMBER 6
(december)

Publisher
SERBIAN CHEMICAL SOCIETY
Belgrade/Serbia, Karnegijeva 4

Издаје
СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК
Ратко М. Јанков

ПОМОЋНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ УРЕДНИКА
Драгица Тривић

ЧЛАНОВИ РЕДАКЦИЈЕ
Јелена Радосављевић, Наталија Половић и Воин Петровић

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Иван Гутман, Снежана Зарић, Јован Јовановић, Славко Кеврешан, Драган Марковић, Владимир Павловић, Радомир Саичић, Живорад Чековић (председник).

Годишња чланарина, укључује часопис „Хемијски преглед”, за 2021. годину износи:

- за све запослене и студенте докторских студија 2.500,00
- за професоре у основним и средњим школама1.400,00
- за пензионере, студенте основних и мастер студија, ђаке и незапослене.....1.200,00
- претплата за школе и остале институције..... 5.000,00
- за чланове и институције из иностранства. € 70

Чланарину и претплату можете уплатити на рачун СХД:
205-13815-62, позив на број 320.

Web site: <http://www.shd.org.rs/hp/>
e-mail редакције: hempred@chem.bg.ac.rs

Припрема за штампу и штампа:
РИЦ графичког инжењерства Технолошко-металуршког факултета Београд, Карнегијева 4

Насловна страна и Интернет верзија часописа:
Слободан и Горан Ратковић,
RatkovicDesign www.ratkovicdesign.net
office@ratkovicdesign.net

САДРЖАЈ

ЧЛАНЦИ

Тамара ЛАЗАРЕВСКИ
Tamara LAZAREVSKI

СТЕРОИДНИ ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ
КОРАЛА РОДА SCLERONEPHTHYA
STEROIDAL NATURAL PRODUCTS FROM
CORALS OF THE SCLERONEPHTHYA ORDER 126

Анита ЛАЗИЋ
Anita LAZIĆ

ДЕРИВАТИ ФЕНОТИАЗИНА: ВИШЕ ОД
САСТОЈКА ЛИТИЧКОГ КОКТЕЛА
PHENOTHIAZINE DERIVATIVES: MORE THAN
AN INGREDIENT OF LITHIC COCKTAIL 131

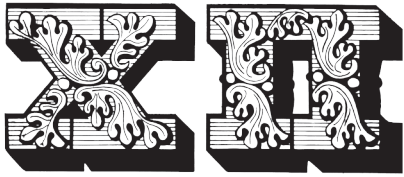
Софија С. БЕКИЋ, Сузана С. ЈОВАНОВИЋ-ШАНТА
Sofija S. BEKIĆ, Suzana S. JOVANOVIĆ-ŠANTA

КВАСАЦ-МОЋАН МОДЕЛ СИСТЕМ ЗА
ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ
ПОТЕНЦИЈАЛНИХ ЛЕКОВА
YEAST - A POWERFUL MODEL SYSTEM FOR
TESTING GENOTOXICITY OF POTENTIAL DRUGS 139

ВЕСТИ из / за ШКОЛЕ

Маријана ЋОСОВИЋ
Marijana ĆOSOVIĆ

СЦЕНАРИО ЕДУКАТИВНЕ РАДИОНИЦЕ:
НЕМЕТАЛИ
SCENARIO OF THE EDUCATIONAL WORKSHOP:
NONMETALS 146



УВОДНИК

Завршавамо још једну календарску годину у оквиру које смо сви трпели торттуру епидемије изазване вирусом *Sogona*. Иако последице ове епидемије јесу примарно здравствене, она је у протекле две године имала огромног утицаја у свим деловима живота свих нас. Највеће дугорочне штете понеће ђаци из система образовања, онакав каквог смо га спроводили током ове две године, са оним што смо имали на располагању или што смо измислили сами у раду са њима и за њих. Колика ће бити реална штета, видеће се тек за неколико година, или чак и деценија.

* * *

Терапијски потенцијал природних производа познат је стотинама година, а биолошки активна једињења биљног порекла још дуже су окосница традиционалне медицине. Протекла деценија бележи пораст интересовања за природне производе изоловане из морских организама који могу да се користе у лечењу рака. С тим у вези, знатно се повећао број таквих природних производа, као водећих антинеопластичних једињења, која се налазе у клиничким или претклиничким студијама. С обзиром на то да је биодиверзитет океана већи од оног на копну, очекује се да ће се откриће нових природних производа из морских организама повећати током година, пружајући нове и побољшане терапеутске лекове за болести људи, као и друге корисне молекуле. Корали су богат извор нових природних производа, нарочито оних терпеноидне и стероидне структуре. Будући да се верује да већина секундарних метаболита корала поседује улогу у хемијској одбрани ових организама, не чуди што многи природни производи изоловани из корала испољавају потенцијално фармаколошки корисне биолошке активности. Колегиница **Тамара Лазаревски** (Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, ПМФ, Универзитет у Новом Саду), у раду под насловом „**Стероидни природни производи корала рода *Scleronephthya***“, дала је преглед природних производа стероидне структуре, изолованих из рода *Scleronephthya*, међу којима је највише прегн-20-ена.

* * *

Фокус медицинске хемије усмерен је ка синтези и развоју “водећих молекула” (енгл. lead molecules), једињења одређене фармаколошке активности, која представљају полазну основу и чијим структурним променама се побољшава активност, повећава селективност и смањује токсичност нових лекова. Последњих двадесетак година, велико интересовање истраживача усмерено је ка различитим хемијским модификацијама на фенотиазинском језгру. Овај ригидни, трициклични систем сачињен из два бензенова прстена међусобно спојена хетероцикличним 1,4-тиазинским прстеном, синтетисао је сасвим случајно 1883. године немачки хемичар Хајнрих Аугуст Бернтсен (Heinrich August Bernthsen), чија је првобитна намера била да потврди хемијску структуру тионина и метиленског плавог. Од пионирског Бернтсеновог рада, па до данашњих дана, синтетисано је преко пет хиљада деривата фенотиазина, од којих је чак стотинак пронашло разнолику примену у кли-

ничкој пракси. Интересанто је да сам фенотиазин не поседује фармаколошку активност, али су зато његови деривати увелико признати у медицини, а нарочито у психофармакологији. О свему овоме **Анита ЛАЗИЋ** (научни сарадник, Иновационог центра Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду) написала је прегледни рад под насловом „*Деривати фенотиазина: више од састojка литичкој коктjела*“.

* * *

Генотоксикологија идентификује супстанце које нарушавају интегритет ДНК, проучава механизме њиховог деловања и одговор испитиваног биолошког система на оштећење. Оштећење ДНК се може идентификовати и квантификовати као учесталост настајања адуката, ланчаних прекида, мутација или хромозомских аберација у молекулима ДНК. Генотоксини могу бити физичког и хемијског порекла. Испољавају три примарна ефекта - канцерогени, мутагени или тератогени. У већини случајева генотоксини изазивају мутације које могу довести до канцера и широког спектра других болести. Агенције за лекове захтевају податке о генотоксичном потенцијалу нових лекова, као део процене безбедности њихове употребе. Осим лекова, важно је и питање потенцијалне генотоксичности супстанци из животне средине и потрошачких производа, са којима смо свакодневно у контакту. На основу свега наведеног не изненађује потреба за развојем ефикасних, осетљивих и репродукцибилних *in vitro* и *in vivo* тестова генотоксичности. У раду под насловом „*КВАСАЦ - моћан модел систем за испитивање генотоксичности и процену генотоксичности лекова*“, колегиница **Софије С. Бекић** и **Сузане С. Јовановић-Шанга** (Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, ПМФ, Универзитет у Новом Саду) дале су преглед одабраних тестова за испитивање генотоксичности у квасцу, као модел организму који поседује огроман потенцијал. Његова моћ се огледа у једноставном и економичном узгајању у лабораторији, генетском систему којим се лако манипулише и, што је најважније, великом проценту конзервираних гена, као код човека. Сваки од описаних тестова има своје предности и ограничења, тако да се за најбољи увид у генотоксичност испитиваног агенса препоручује комбинација више њих.

* * *

У рубрици *Хемија из/за школе*, **Маријана ЂОСОВИЋ**, студент пете године интегрисаних основних и мастер академских студија (Универзитет у Београду-Хемијски факултет), осмислила је „*Сценарио едукативне радионице: неметали*“, с циљевима да ученици на основу атомског броја проналазе место хемијског елемента у Периодном систему, објашњавају којој групи и периоди одређени хемијски елемент припада и да у игри асоцијација повезују појмове из наставне јединице о неметалима, уз објашњавање уочене повезаности.

Ратко М. ЈАНКОВ



ЧЛАНЦИ



Тамара Лазаревски

Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду,
dh.tamara.lazarevski@student.pmf.uns.ac.rs

СТЕРОИДНИ ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ КОРАЛА РОДА *SCLERONEPHTHYA*

Корали су богаћи извор нових природних производа, нарочито оних терпеноидне и стероидне структуре. Будући да се верује да већина секундарних метаболита корала поседује улогу у хемијској одбрани ових организама, не чуди што многи природни производи изоловани из корала испољавају пошеницијално фармаколошки корисне биолошке активности. У овом раду даћ је преглед природних производа стероидне структуре изолованих из рода Scleronephtya, међу којима је највише терпеноидна.

1. УВОД

Терапијски потенцијал природних производа познат је стотинама година, а биолошки активна једињења биљног порекла још су дуже окосница традиционалне медицине [1]. У светским океанима влада изузетно велика разноликост организама. Многим од њих недостају физички одбрамбени механизми, првенствено због ограничене покретљивости, а због тога су развили високо софистициране хемијске одбрамбене механизме засноване на синтези токсичних секундарних метаболита [2].

Протекла деценија бележи пораст интересовања за природне производе изоловане из морских организама који могу да се користе у лечењу рака [2]. С тим у вези, знатно се повећао број морских природних производа као водећих антинеопластичних једињења која се налазе у клиничким или претклиничким студијама [3]. С обзиром на то да је биодиверзитет океана већи од оног забележеног на копну, очекује се да ће се откриће нових морских природних производа повећати током године, пружајући нове и побољшане терапеутске лекове за болести људи, као и друге корисне молекуле [4,5].

Најзначајнији резултати на пољу хемије морских природних производа постигнути су изучавајући сунђере и корале [6]. Ово су еволутивно древни вишећелијски организми које карактерише

једноставна анатомска организација: телесни зид им се састоји из два ћелијска слоја, ектодерма и ендодерма. Ектодерм је окренут према околини (морској води или, у случају корала, егзоскелету) и ограничава њихову спољну површину, а ендодерм према унутрашњим шупљинама кроз које морска вода протиче и филтрира се [6]. Ове животиње изоловане су великим еколошким притисцима у покушајима да настане и колонизују морско дно, да се исхране микроплантоном филтрацијом морске воде, да се заштите од ултраљубичастог зрачења у плиткој води, као и приликом напора да одрже свој микробиом [7].

Корали су велика, разноврсна група морских бескичмењака која обухвата преко 7500 врста. Познати су као изузетно богат извор биоактивних секундарних метаболита [8]. До сада је објављено преко 3400 радова о природним производима из корала, а из њих је изоловано око 5800 нових једињења, што чини око 20% свих познатих морских природних производа [8]. Већина природних производа изолованих из корала су терпеноидне или стероидне структуре настале мевалонатним биосинтетским путем [9]. Пошто ове животиње не поседују механизме физичке одбране, верује се да већина ових једињења делују као вид хемијске одбране од предатора [10]. Око 50% испитаних екстраката меких корала показало је ихтиотоксичне активности [11]. Око 70% природних производа корала изоловано је из врста реда Alcyonacea, које се још називају и меким коралима [8]. Многи цембраноидни дитерпени, секундарни метаболити из меких корала, важни су фактори у еколошким интеракцијама [12], док је за друге метаболите утврђено да испољавају антимикубно [13], цитотоксично [14], антивирусно [15] и антиинфламаторно дејство [16].

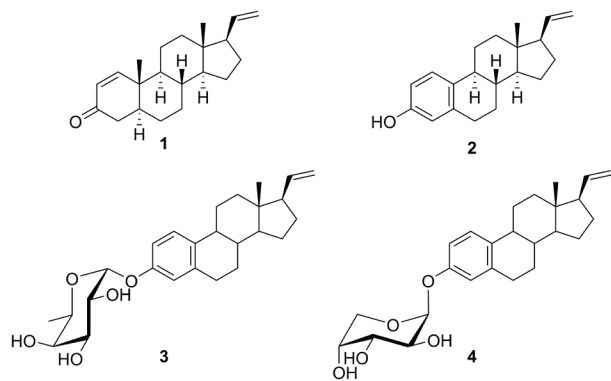
Из меких корала породице Nephtheidae изолован је значајан број природних производа [17]. Сачињавају је корали који граде коралне гребене, а углавном су јарких и привлачних боја. Ова породица садржи род *Scleronephtya*, чији

припадници се због свог изгледа називају још и дрвенастим коралима [18]. У овом раду дат је преглед природних производа стероидне структуре изолованих из овог рода корала, с освртом на њихове биолошке активности и биосинтезу.

2. ПРЕГЛЕД

Међу стероидима рода *Scleronephthya* преовлађују молекули прегнанског скелета, прецизније прегн-20-ени, иначе врло ретки међу морским природним производима [19]. Једињења овог скелета претходно су синтетски добијена; први природни производ овог скелета изолован је из непознатог меког корала [20], а слични молекули пронађени су и у коралима других родова. Једињења су из животињског материјала изолована уобичајеним поступком, односно екстракцијом уситњеног узорка одабраним растварачем, а затим партиционисањем различитим системима растварача, фракционисањем сукцесивним хроматографијама на силикагелу и/или сефадексу. Где није другачије наглашено, структура једињења потврђена је детаљном спектроскопском анализом, помоћу 1D и 2D НМР техника, као и масене спектрометрије високе резолуције и циркуларним дихроизмом.

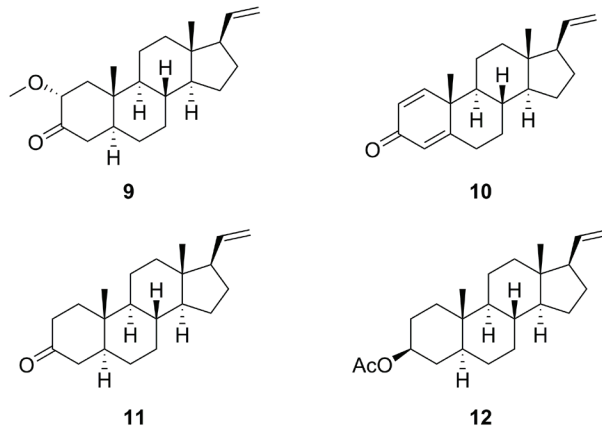
Китакуп (Kittakoop) и сарадници изоловали су прве стероидне молекуле из припадника овог рода [19]. То су била четири (нор)прегнанска стероида 1–4 (слика 1) добијена из хлороформског екстракта узорка врсте *S. pallida*, од којих су прегна-1,20-диен-3-он (1) и 19-норпрегна-1,3,5(10),20-тетраен-3-ол (2) били претходно позната једињења, пронађена у коралима рода *Capnella* [21] и једној непознатој врсти [20]. Једињења 3 и 4 су гликозиди једињења 2 са α -фукопиранозом, односно β -арабинопиранозом. Установили су и да гликозид 3 инхибира размножавање протозое *Plasmodium falciparum* ($EC_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$), као и да испољава цитотоксичност према једној ћелијској линији рака дојке (BCA-1, $ED_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$).



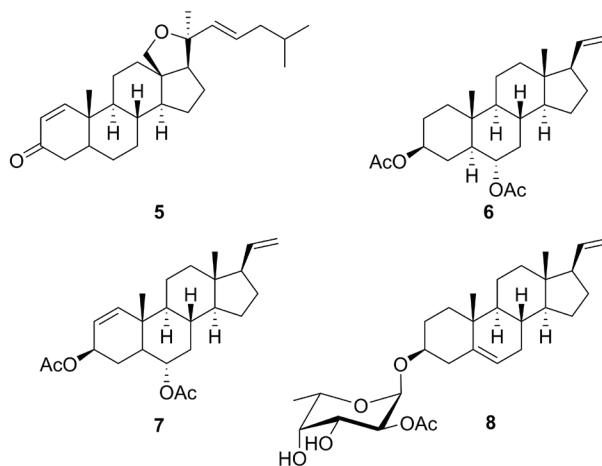
Слика 1

Серија стероида названих ксимастероидима А–D (5–8, слика 2) изоловани су из ацетонског екстракта неидентификоване врсте рода *Scleronephthya* пронађене у близини острва Ксимао, у провинцији Хајинан, НР Кина [22]. Ксимастероид А је C_{27} -стероид који садржи тетрахидрофурански Е прстен који је кондензован за D прстен преко C_{13} – C_{17} везе, што представља ретку одлику међу стероидним природним производима. Ксимастероиди В–D су прегн-20-ени, а ксимастероид D је гликозид са ацетилованом фукозом.

Нови прегн-20-ен 9 (слика 3) изолован је из етанолног екстракта врсте *S. gracillimum* [23], при чему су изолована још четири претходно позната једињења, 1, 10 [24], 11 [25] и 12 [20]. Аутори су предложили да се 2-метокси- и 2-хидроксипрегн-20-ени, будући да нису пронађени у осталим врстама, могу размотрити као хемотаксономски маркери *S. gracillimum*.



Слика 2



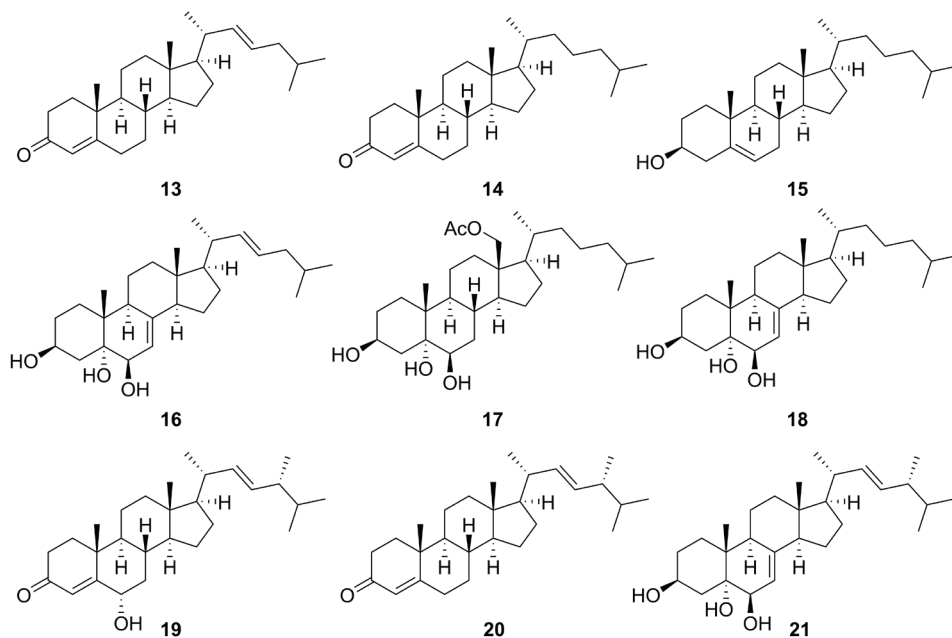
Слика 3

Из етанолног екстракта још једног узорка непознате врсте овог рода изоловано је девет стероидних једињења [26], шест холестана (13–18, слика 4) и три ергостана (19–21), а једињења 13 и 14 су по први пут изолована из корала. Сва једињења показивала су токсичност према морском

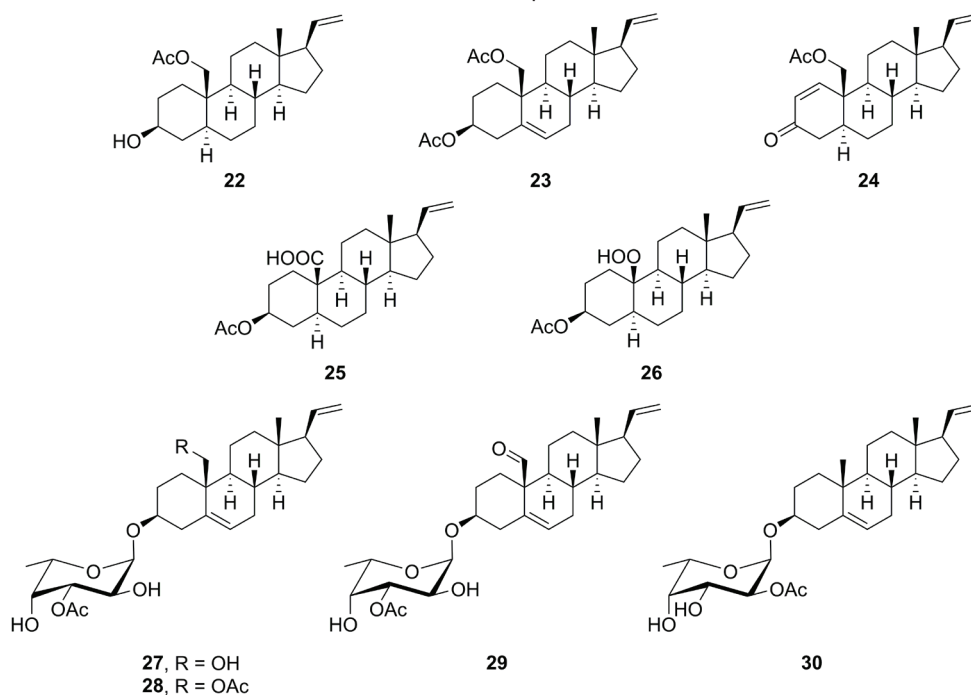
рачићу *Artemia salina*, али нису показале никакву активност према настањивању ларви рака *Balanus amphitrite*¹.

Велики број нових и познатих стероида Шеу (Sheu) и сарадници изоловали су из етил-ацетатног екстракта корала *S. gracillimum* [27]. Серију нових једињења прозвали су склеростероидима

први пут пронађене у роду *Scleronephthya*, али познатим у другим коралним врстама. Једињење **22** показало је цитотоксичност према ћелијским линијама канцера јетре (HepG2), тумора дојке негативног на естрогене рецепторе (MDA-MB-231) и канцера плућа (A-549) у микромоларном опсегу IC_{50} вредности, у ком су и једињења **27** и **28** била



Слика 4

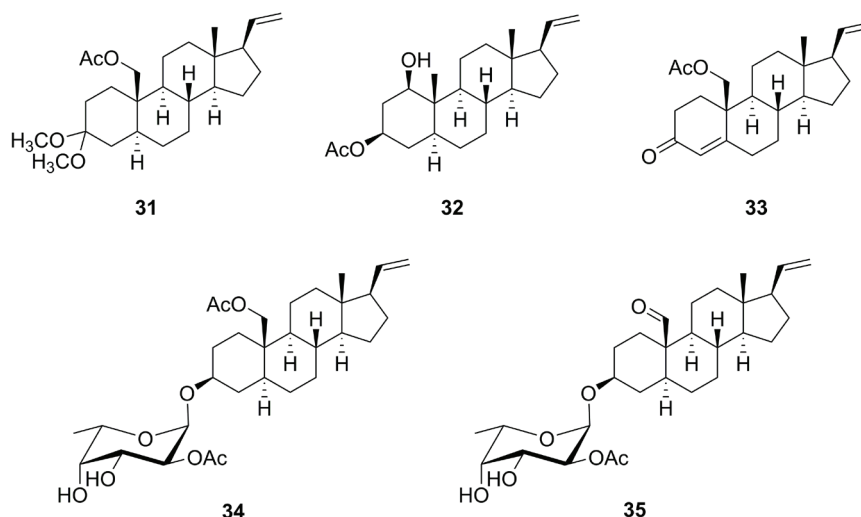


Слика 5

A-I (**22–30**, слика 5). Изузев 19-нор-10-перокси деривата **26**, склеростероиди припадају 19-функционализованим прегнанима, тад по

¹ Ономогућавање настањивања ларви овог и сличних организама корисно је својство, јер се једињења с таквим активностима могу користити у премазима против обрастања уроњених делова бродова и других пловних средстава.

активна на ћелијским линијама HepG2, Hep3B, MDA-MB-231, A-549, као и ћелијским линијама тумора дојке позитивног на естрогене рецепторе (MCF-7) и тумора усне дупље (Ca9-22). Једињења **22**, **23** и **26** показала су значајну инхибицију акумулације проинфламаторног ензима iNOS.

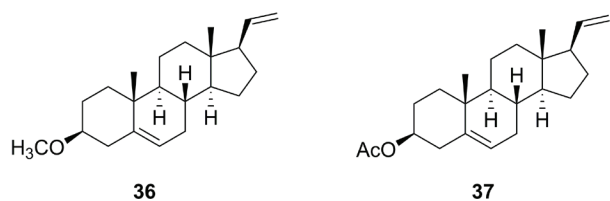


Слика 6

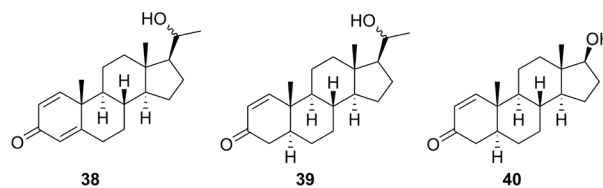
Иста истраживачка група у следећој публикацији описала је изолацију још пет нових секундарних метаболита, склеростероида J-N (31–35, слика 6) [28]. Једињење 34 поседовало је цитотоксична својства према ћелијским линијама HepG2, A-549 и MDA-MB-231 у микроларном опсегу IC_{50} вредности, док је заједно са једињењем 32 показивало и значајну инхибицију акумулације iNOS, што аутори доводе у везу с функционализацијом ангуларне метил-групе C-19.

Из етил-ацетатног екстракта врсте *S. flexilis* група тајванских истраживача изоловала је нови прегн-20-ен 36 (слика 7), стероид 37, претходно изолован из меког корала *Gersemis rubiformis*, чија је структура овом приликом потврђена и рендгеноструктурном анализом, као и стероид 1 [29].

Поред неких претходно наведених једињења, из етил-ацетатног екстракта непознате врсте Џи (Ji) и сарадници изоловали су и два 20-хидроксипрегна, 38 и 39 (слика 8), и андростански стероид 40 [30].



Слика 7



Слика 8

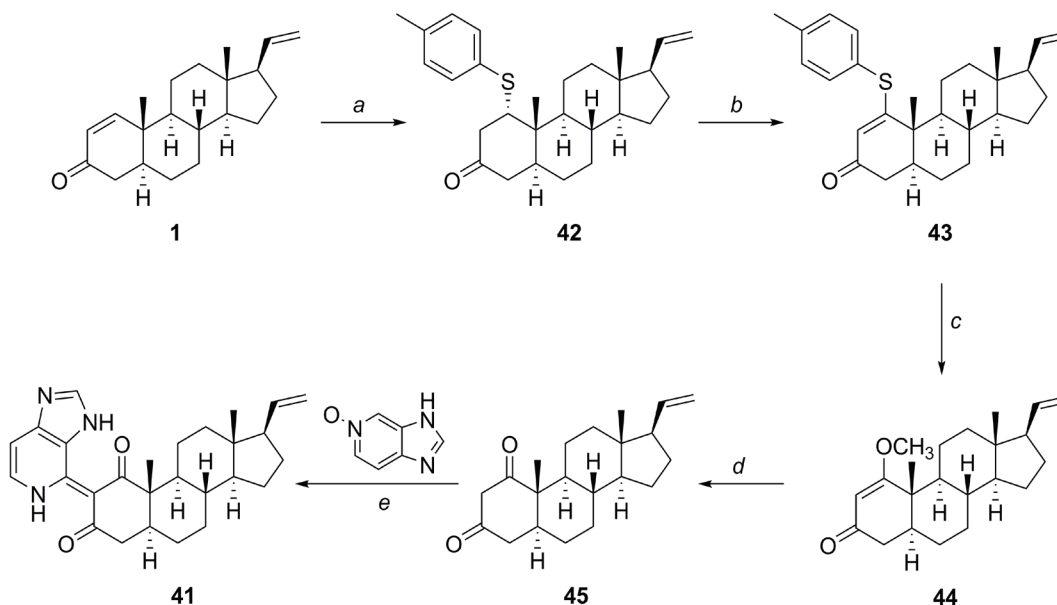


Схема 1: a: 4-метилбензентиол, Et_3N , CH_2Cl_2 , с. т, 5 h; b: $(CClNO)_3$, бензен/ Et_2O , 0 °C, атмосфера азота, 1 h; c: MeONa, MeOH, рефлукс, преко ноћи; d: 1 N HCl, THF, с. т, 8 h; e: Ac_2O , 90 °C, 12 h.

Најскорији рад у којем се извештава о изолацији стероида из корала овог рода објављен је 2017. године, у којем је из етил-ацетатног екстракта непознате врсте изолован стероидни алкалоид **41** (схема 1), који су аутори назвали склеронин [31]. Овај алкалоид показао је значајну дозно-зависну инхибицију миграције туморских ћелија А-549 и В-16 (ћелијска линија мишјег меланома). Извршена је и парцијална синтеза овог природног производа полазећи од стероида **1**; први корак била је региоселективна нуклеофилна адисија 4-метилбензентиола на Δ^1 двоструку везу, праћена дехидрогенавањем хлореалом у инертној атмосфери које даје једињење **43**. Оно се затим натријум-метоксидом преводи у метокси-аналог **44**, из којег се дејством киселине добија диенон **45**, који у кондензацији са 3,5-диазаиндол-*N*-оксидом у ацетанхидриду даје склеронин.

3. ЗАКЉУЧАК

Имајући на уму представљене резултате, може се закључити да иако нису широко заступљени међу морским природним производима, прегнани чине највећи део стероидних природних производа корала рода *Scleronephthya*, при чему су најбројнији прегн-20-ени. Иако је приличан број једињења подвргнут биолошким испитивањима, ни једно од тестираних једињења није показало довољно значајну активност да би се разматрала практична примена.

До сада није предложен биосинтетски пут којим настаје Δ^{20} бочни низ ових једињења, те су с тим циљем неопходна додатна истраживања. Сасвим је могуће да ендосимбионти корала попут динофлателата играју улогу у биосинтези ових једињења, као што је то случај код неких других стероидних природних производа пореклом из корала [32].

ABSTRACT

Steroidal natural products from corals of the *Scleronephthya* order

Tamara Lazarevski, student of the Faculty of Sciences, Novi Sad

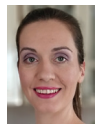
Corals are a rich source of new natural products, especially those of terpenoid and steroidal structure. As it is believed that a majority of coral secondary metabolites play a role in chemical defense mechanisms of these organisms, it is not surprising that many of the natural products isolated from corals display potentially pharmacologically useful biological activities. In this paper, a review of steroidal natural products isolated from corals of the *Scleronephthya*

order is given. These compounds are predominantly pregn-20-enes, some of which are glycosylated or conjugated to nitrogen-bearing structures.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. M. Gordaliza, *Clin. Transl. Oncol.* **9** (2007) 767
2. J. Honek, T. Efferth, *Marine Compounds, y Biodiversity, Natural Products and Cancer Treatment*, V. Kuete, T. Efferth (уред.), World Scientific, Singapore, 2014, 209
3. M. C. Leal, R. Calado, C. Sheridan, A. Alimonti, R. Osinga, *Trends Biotechnol.* **31** (2013) 555
4. M. C. Leal, J. Puga, J. Seródio, N. C. M. Gomes, R. Calado, *PLoS One* **7** (2012) e30580
5. J. H. Miller, J. J. Field, A. Kanakkanthara, J. G. Owen, A. J. Singh, P. T. Northcote, *J. Nat. Prod.* **81** (2018) 691
6. E. Quévrain, I. Domart-Coulon, M.-L. Bourguet-Kondracki, *Marine Natural Products – Chemical Defense/Chemical Communication in Sponges and Corals, y Natural Products: Discourse, Diversity, and Design*, A. Osbourn, R. J. Goss, G. T. Carter (уред.), Wiley, New York, 2014, 39
7. V. J. Paul, M. P. Puglisi, R. Ritson-Williams, *Nat. Prod. Rep.* **23** (2006) 153
8. G. Li, P. Li, X. Tang, *Natural Products from Corals, y Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*, Z. Li (уред.), Springer, New York, 2019, 465
9. H. Gross, G. M. König, *Phytochem. Rev.* **5** (2006) 115
10. M. T. R. Almeida, M. I. G. Moritz, K. C. C. Capel, C. D. Pérez, E. P. Schenkel, *Rev. Bras. Farmacogn.* **24** (2014) 446
11. P. W. Sammarco, J. C. Coll, *The Chemical Ecology of Alcyonarian Corals, y Bioorganic Marine Chemistry*, P. J. Scheuer (уред.), Springer, Berlin, 1998, 87
12. J. C. Coll, *Chem. Rev.* **92** (1992) 613
13. H. Correa, F. Aristizabal, D. Duque, R. Kerr, *Mar. Drugs* **9** (2011) 334
14. S. K. Wang, C. Y. Duh, *Mar. Drugs* **10** (2012) 306
15. T. T. Yeh, S. K. Wang, C. F. Dai, C. Y. Duh, *Mar. Drugs* **10** (2012) 1019
16. E. Reina, C. Puentes, J. Rojas, J. García, F. A. Ramos, L. Castellanos, M. Aragón, L. F. Ospina, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 5888
17. O. H. Abdelhafez, J. R. Fahim, S. Y. Desoukey, M. S. Kamel, U. R. Abdelmohsen, *Chem. Biodivers.* **16** (2019) e1800692
18. H. Utinomi, *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* **14** (1966) 207
19. P. Kittakoop, R. Suttisri, C. Chaichantipyuth, S. Vetchagarun, K. Suwanborirux, *J. Nat. Prod.* **62** (1999) 318
20. M. D. Higgs, D. J. Faulkner, *Steroids* **30** (1977) 379
21. A. J. Blackman, A. Heaton, B. W. Skelton, A. H. White, *Aust. J. Chem.* **38** (1985) 565
22. X.-H. Yan, H.-L. Liu, Y.-W. Guo, *Steroids* **74** (2009) 1061
23. L. Han, C.-Y. Wang, H. Huang, C.-L. Shao, Q.-A. Liu, J. Qi, X.-P. Sun, P. Zhai, Y.-C. Gu, *Biochem. Syst. Ecol.* **38** (2010) 243
24. J. F. Kingston, B. Gregory, A. G. Fallis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1979) 2064
25. Y. Seo, J.-H. Jung, J.-R. Rho, J.-Shin, J.-I. Song, *Tetrahedron* **51** (1995) 2497

26. X.-P. Sun, C.-L. Shao, C.-Y. Wang, X.-B. Li, Y. Xu, P.-Y. Qian, K. Zhao, C.-J. Zheng, *Chem. Nat. Compd.* **48** (2012) 341
27. H.-Y. Fang, C.-C. Liaw, C.-H. Chao, Z.-H. Wen, Y.-C. Wu, C.-H. Hsu, C.-F. Dai, J.-H. Sheu, *Tetrahedron* **68** (2012) 9694
28. H.-Y. Fang, C.-H. Hsu, C.-H. Chao, Z.-H. Wen, Y.-C. Wu, C.-F. Dai, J.-H. Sheu, *Mar. Drugs* **11** (2013) 1853
29. C.-Y. Kuo, Y.-S. Juan, M.-C. Lu, M. Y.-N. Chiang, C.-F. Dai, Y.-C.-Wu, P.-J. Sung, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2014) 10136
30. Y. Yang, Z. Liu, W.-H. Lin, Y.-B. Ji, *Xiandai Yaowu Yu Linchuang* **29** (2014) 11
31. W. Cheng, Z. Liu, Y. Yu, L. van Ofwegen, P. Proksch, S. Yu, W. Lin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27** (2017) 2736
32. L. S. Ciereszko, *Biol. Oceanogr.* **6** (1989) 363



АНИТА ЛАЗИЋ

научни сарадник, Иновационог центра Технолошко-металуршког факултета
e-mail: alazic@tmf.bg.ac.rs

ДЕРИВАТИ ФЕНОТИАЗИНА: ВИШЕ ОД САСТОЈКА ЛИТИЧКОГ КОКТЕЛА

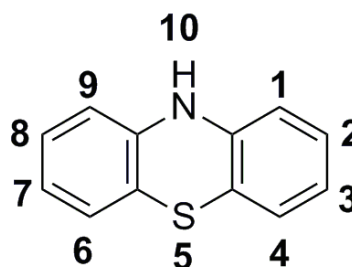
УВОД

Фокус медицинске хемије, усмерен је ка синтези и развоју “водећих молекула” (енгл. lead molecules), односно једињења која поседују одређену фармаколошку активност и као таква представљају полазну основу чијим структурним променама се побољшава активност, повећава селективност и смањује токсичност нових лекова [1]. Последњих двадесетак година, велико интересовање истраживача усмерено је ка различитим хемијским модификацијама на фенотиазинском језгру (слика 1). Овај ригидни, трициклични систем сачињен из два бензенова прстена међусобно спојена хетероцикличним 1,4-тиазинским прстеном, синтетисао је сасвим случајно 1883. године немачки хемичар Хајнрих Аугуст Бернтсен (Heinrich August Bernthsen), будући да му је првобитна намера била да потврди хемијску структуру тионина и метиленског плавог [2, 3]. Од пионирског Бернтсеновог рада, па до данашњих дана, синтетисано је преко пет хиљада деривата фенотиазина, од којих је чак стотинак пронашло разнолику примену у клиничкој пракси [2]. Интересанто је да сам фенотиазин не поседује фармаколошку активност, али су зато његови деривати увелико признати у медицини, а нарочито у психофармакологији. Будући да се везују за различите биолошке рецепторе, стекли су епитет “прљави лекови” (енгл. dirty drugs) [4]. Ова једињења ефикасно инхибирају првенствено допаминске, а потом и хистаминске, серотонинске, ацетилхолинске и α-адренергичке рецепторе, због чега се интензивно примењују у лечењу шизофреније и различитих форми психоза (халуцинација, делузија, биполарних поремећаја, анксиозности, агитација, манија и других облика импулсивног понашања) [4, 5]. Поред револуционарне антипсихотичке активности [6], деривати фенотиазина су изузетно ефикасни у третману неуродегенеративних болести попут Алцхајмерове и Паркинсонове,

а значајни су и као антибиотици, антивирални, антифунгални и антиинфламаторни агенси, антималарици, антиконвулзиви, аналгетици, имуносупресиви. Антипролиферативна, антиканцерогена и хемопревентивна активност (ефикасно инхибирају калмодулинске рецепторе и протеинкиназу C), представљају само једно од небројаних фармаколошких својстава која се могу приписати овој још увек недовољно медицински истраженој групи трицикличних тиазинских једињења [4, 6]. Овај рад је писан са намером да на систематичан начин илуструје вишедеценијска открића везана за евалуацију *in vitro* и *in vivo* фармаколошке активности различитих деривата фенотиазина, пружи увид у везу између њихове хемијске структуре и фармаколошке активности и пружи смернице за синтезу неких нових ефикаснијих деривата.

ХЕМИЈСКЕ МОДИФИКАЦИЈЕ ФЕНОТИАЗИНА

Првобитни Бернтсенов назив за фенотиазин, био је тиодифениламин, будући да га је синтетисао полазећи од дифениламина и сумпора. Поред овог, равноправно се употребљавају и називи 2,3,5,6-добензо-1,4-тиазин и дибензопаратиазин. Хемијска структура заједно са нумерацијом поменутог трицикличног система, представљена је на слици 1 [7, 8]:



Слика 1: Хемијска структура фенотиазина

Модификовањем његове структуре што, између осталог, обухвата:

1) увођење супституената на атом азота у 1,4-тиазинском прстену (положај 10, слика 1),

2) увођење супституената на атоме угљеника у бензеновим прстеновима (положаји 1-4 и 6-9, слика 1),

3) оксидацију атома сумпора до сулфонске и сулфоксидне групе,

4) супституцију једног или оба бензенова прстена хомоароматичним/хетероароматичним прстеновима,

добива се широк спектар потенцијално фармаколошки активних једињења [6, 8].

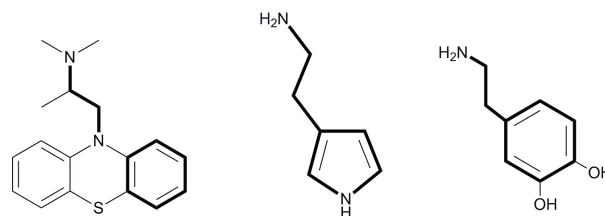
Деривати фенотиазина добијени супституцијом атома водоника амино групе, означавају се као 10Н-деривати, док се једињења добијена модификацијама на атому сумпора, означавају као 5-супституисани деривати [8]. Уопштено говорећи, фармаколошки активне деривате фенотиазина, карактерише присуство алкил ланца везаног за атом азота у положају 10 и он доприноси специфичним својствима ових једињења, док супституенти везани за атом угљеника у положају 2, доприносе њиховој ефикасности. Међу такозваним, "С-2-супституентима", најзначајнији су атоми халогена јер доприносе највећој ефикасности, а посебно се издваја трифлуорметил-група. Ефикасност деривата фенотиазина повећава се ако је липофилност супституента већа, јер ово олакшава пролазак молекула лека кроз липофилну крвно-мождану баријеру [4].

УТИЦАЈ ХЕМИЈСКЕ СТРУКТУРЕ НА АНТИПСИХОТИЧКУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА ФЕНОТИАЗИНА

Деривати фенотиазина се због ефикасног везивања за различите неуротрансмитере у централном нервном систему, увелико примењују у лечењу различитих менталних поремећаја, а превасходно шизофреније [5]. Патофизиологија шизофреније је изузетно комплексна и још увек недовољно дефинисана. Познато је да се јавља код 1% глобалне популације, различитог етничког и социјалног статуса [9]. Пређашње дефиниције засниване су углавном на улози и доприносу допаминских рецептора настанку и развоју овог изузетно комплексног патолошког стања, док новије теорије, узимају у обзир улогу и допринос серотонинских, мускаринских, α -адренергичких и хистаминских рецептора [4, 10]. Према неким литературним наводима, као последица хиперактивности допаминских рецептора у мезолимбичким деловима мозга, јављају се позитивни симптоми шизофреније, као што су халуцинације и делузије [11]. Циљ фармакотера-

пије је да применом одговарајућих антипсихотика све позитивне и негативне симптоме ове болести држи под контролом, како би се пацијенту пружио што квалитетнији живот [5]. Антипсихотике можемо класификовати на оне који припадају првој, другој и трећој генерацији. Типични или антипсихотици прве генерације се према својој хемијској структури деле на: фенотиазинске, бутирофенонске, тиоксантинске, дибензоксантинске, дихидроиндолонске и дифенилбутилпиперидинске, док се према степену инхибиције допаминских рецептора, групишу као високопотентни, средњепотентни и нископотентни. Амфолитични деривати фенотиазина који се употребљавају као антипсихотици, успешно пролазе кроз липидни двослој ћелијских мембрана и крвно-мождану баријеру, захваљујући високом подеоном коефицијенту овог трицикличног система. Њихово успешно везивање за одговарајуће неуротрансмитере у централном нервном систему, резултира следећим:

1) *Антидопамински ефекат деривата фенотиазина*-крџијално својство деривата фенотиазина са антипсихотичком активношћу је њихова способност да селективно инхибирају пет различитих типова допаминских рецептора. Афинитет ових једињења према допаминским рецепторима, објашњава се сличношћу у хемијским структурама која омогућава молекулу фенотиазина да се успешно веже за своје активно место на допаминском рецептору (слика 2) [4].



Слика 2: Структурне сличности између прометазина, хистамина и допамина (редом слева надесно) којим се објашњавају фармаколошка својства прометазина и осталих деривата фенотиазина

Прецизније говорећи, њихов терапијски ефекат заснива се на инхибицији активности D_2 рецептора присутних у деловима мозга као што су: striatum, nucleus accumbens, ventral tegmental nigra и substantia nigra, чиме се веома успешно умањују позитивни симптоми шизофреније.

2) *Антихистамински ефекат деривата фенотиазина*-сви деривати фенотиазина који се примењују у клиничкој пракси, с посебним акцентом на прометазин, изазивају антихистамински ефекат. До њега долази када се инхибира активност H_1 -рецептора који су између осталог одговорни и за појаву алергија. У централном нервном систему, ови рецептори су већим делом смештени у делу који се назива tuberomammillary nucleus и одговор-

ни су за регулацију циклуса сан-јава, регулацију апетита и телесне температуре. Као споредни ефекат инхибиције активности H₁-рецептора, јављају се седација, повећан апетит и хипотермија.

3) *Антиисеротонински ефекат деривата фенотиазина*-антипсихотици из групе фенотиазина, показују велики афинитет ка серотонинским (5-хидрокситриптаминским или 5-HT) рецепторима као биолошким циљевима а међу њима су “најпривлачнији” они који носе ознаке 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} и 5-HT_{2C}. Блокадом ових рецептора јавља се анксиолитички ефекат.

4) *Инхибиција α-адренергичких рецептора*-инхибиција активности α₁-адренергичких рецептора, доприноси развоју симпатолитичких споредних ефеката (хипотензија, рефлексна тахикардија и вртоглавица), док инхибиција активности α₂-адренергичких рецептора доприноси антипсихотичком ефекту.

5) *Антихолинергички ефекат деривата фенотиазина*-деривати фенотиазина са антипсихотичком активношћу, селективно се везују за M₁ и M₂ мускаринске ацетилхолинске рецепторе, непосредно доприносећи инхибицији активности аутономних ганглија која је праћена скупом најразличитијих симптома.

Према врсти супституента у положају С-2 и/или N-10, сви фенотиазински деривати класификују се као: деривати са алифатичним бочним ланцем (прометазин, хлорпромазин и левомепромазин (слика 3)), пиперидински деривати (тиоридазин и мезоридазин) и пиперазински деривати (флуфеназин, перфеназин, прохлорперазин и трифлуорперазин) [4]. При томе је успостављена следећа корелација између хемијске структуре бочног ланца и јачине антипсихотичког дејства: пиперазинска група > пиперидинска група > алифатични бочни ланац. Интересанто је напоменути да су пиперазински деривати фенотиазина фармаколошки најактивнији, али зато изазивају и највише споредних ефеката. Као резултат вишедеценијских истраживања утицаја хемијске структуре на антипсихотичку активност деривата фенотиазина, од елемената који највише доприносе овој активности, сачињен је следећи фармаколошки модел:

1) у положају С-2, круцијално је присуство трифлуорметил-групе,

2) липофилно фенотиазинско језгро и терцијарна amino-група, повезани су пропиленским ланцем,

3) електронегативни атоми/групе везани за С-2 атом, појачавају антипсихотичку активност деривата фенотиазина следећим редоследом: -SO₂NR₂ > -CF₃ > -COCH₃ > -Cl [4].

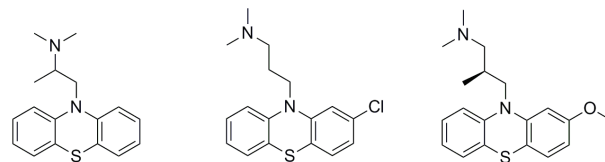
Значајно је напоменути да поједини фармаколошки елементи, постоје и код комерцијално дос-

тупних деривата фенотиазина:

Прометазин (Phenergan®)-будући да је од свих фенотиазинских антипсихотика прве генерације, по својој хемијској структури најсличнији хистамину, испољава најснажнији антагонистички ефекат ка H₁-рецепторима, а поред тога веома се успешно веже за допаминске и холинергичке рецепторе [12]. Због снажног седативног ефекта, анестезиолог Хенри Лаборит (Henri Laborit), примењивао га је као круцијални састојак “литичког коктела”, тј. мешавине наркотика, седатива и хипнотика који је имао за циљ да пацијента уведе у стање “артифицијелне хибернације” и тако смањи компликације приликом буђења из анестезије. Данас се првенствено употребљава као седативни антихистаминик и антиеметик.

Хлорпромазин-иако је у периоду око Другог светског рата, примењиван као синтетски антималарик, Хенри Лаборит га је 1952. године, увео на велика врата у свет психофармакологије, показавши да пацијенте лако уводи у стање релаксираности познато као “хемијска лоботомија” [11]. Полазећи од чињенице да је по хемијској структури најсличнији допамину, јасно је да веома снажно инхибира његову активност, али се и поред тога успешно везује за серотонинске, хистаминске и α-адренергичке рецепторе, смањујући њихову активност у организму [13,14]. Интензивно се примењује у лечењу шизофреније, маније, анксиозности, насилног и импулсивног понашања, а као краткотрајна терапија у лечењу упорног штучања, мучнине и повраћања у терминалним стадијумима болести.

Левомепромазин (Nozinan®)-иако је по хемијској структури и фармакодинамичким својствима јако сличан хлорпромазину, као антипсихотик је чак за 50% слабији од њега. Као базални неуролептик са веома јаким седативним ефектом, користи се у лечењу поремећаја личности, узнемирености, депресије, разних облика психоза и тешких поремећаја сна.



Слика 3: Хемијска структура одабраних антипсихотика из групе фенотиазина: прометазин, хлорпромазин и левомепромазин (редом слева надесно)

УТИЦАЈ ХЕМИЈСКЕ СТРУКТУРЕ НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА ФЕНОТИАЗИНА

Антипролиферативна активност деривата фенотиазина, заснована је на њиховој способности

да инхибирањем механизма за репарацију ДНК и сигналних трансдукцијских путева, индукују програмирану ћелијску смрт (апоптозу) [4] и да инхибирањем активности калмодулинских рецептора, Р-гликопротеина и протеин киназе С, повећавају осетљивост малигнућ ћелија на примењене цитостатике, односно да повећавају ћелијску хемосензитивност. Према мишљењу неких аутора, повећање ћелијске хемосензитивности, супротан је процес у односу на мултиплу резистенцију малигнућ ћелија на примењене лекове (енгл. Multidrug resistance). Резултати SAR студија (енгл. Structure Activity Relationship) показују да би ефикасан инхибитор активности Р-гликопротеина, у оквиру своје хемијске структуре требало да садржи атом азота који ће при физиолошким рН-вредностима, бити протонван. Као један од потенцијалних механизма за повећање ћелијске хемосензитивности, наводе се неспецифичне реакције катјонског липофилног трицикличног деривата фенотиазина са анијонским липидним двослојем ћелијске мембране. Тако је показано да примена пипера-

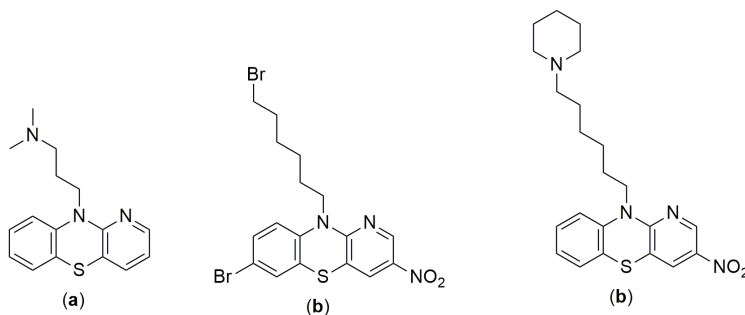
тенцију на лекове) и хемијске структуре деривата фенотиазина, омогућила су постављање следећег фармаколошког модела:

1) у положају С-2, неопходно је присуство карбонилне или етарске групе,

2) супституент у бочном ланцу је пиперазински/пиримидински амин који је са фенотиазинским прстеном спојен бутил ланцем,

3) у молекулу је присутна терминална терцијарна амино-група или 4-супституисани пиперазин [15].

Опсежна двадесетогодишња истраживања Мотохасија (Motohasi) и његовог тима у којима су доказали да трициклични деривати фенотиазина супституисани у положају 10 амидоалкил-, сулфо-намидоалкил-, хлоретилуреидоалкил-групом, или нафталенским прстеном, делују антипролиферативно на велики број ћелијских линија хуманог канцера (леукемија, меланом, канцер плућа, дебелог црева, централног нервног система, бубрега, дојке, јајника и простате), била су инспирација за бројне сличне студије [6, 8]. У једној од њих,



Слика 4. Хемијска структура 10-супституисаног пиридобензотиазина (а) и 10-супституисаних-1-азафенотиазина (б)

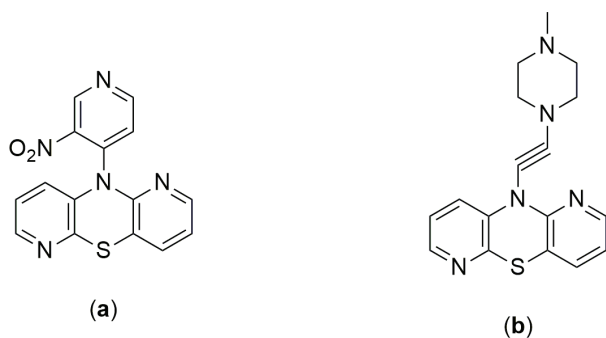
зинског деривата фенотиазина, флуфеназина, изазива флуидизацију структуре липидног двослоја малигнућ ћелија која се завршава инхибирањем ћелијских Р-гликопротеинских одбрамбених механизма. Други начин за повећање ћелијске хемосензитивности је увођење ацетил-, пропионил-, сулфинил-, сулфонил- и сулфонамидне-групе у положај С-2 фенотиазинског прстена, као и увођење ацикличне бутил-групе, односно цикличне пиперазинске и пиперидинске амино-групе у терминалне положаје фенотиазинског прстена. Поред тога, показано је да присуство електрон-акцепторске карбонилне групе на фенотиазинском прстену или у бочном ланцу значајно повећава ћелијску хемосензитивност јер ова група омогућава изградњу јаких интермолекулских водоничних веза са интрамембранским фрагментима Р-гликопротеина [15]. Дугогодишња истраживања корелације хемопреентивне активности (која настаје инхибирањем калмодулинских, Р-гликопротеинских рецептора и протеин киназе С одговорних за мултиплу резис-

дискутована је корелација хемијске структуре и антипролиферативне активности, тип ћелијских линија хуманог канцера на које делују, као и механизам дејства перспективних пиридобензотиазина и дипиридотоазина. Ови изомери азофенотиазина модификовани једним или два пиридинска прстена, због чега се називају и х-моноазафенотиазини и х,у-диазафенотиазини, респективно, смањују број малигнућ ћелија у организму активирањем програмиране ћелијске смрти, односно, апоптозе.

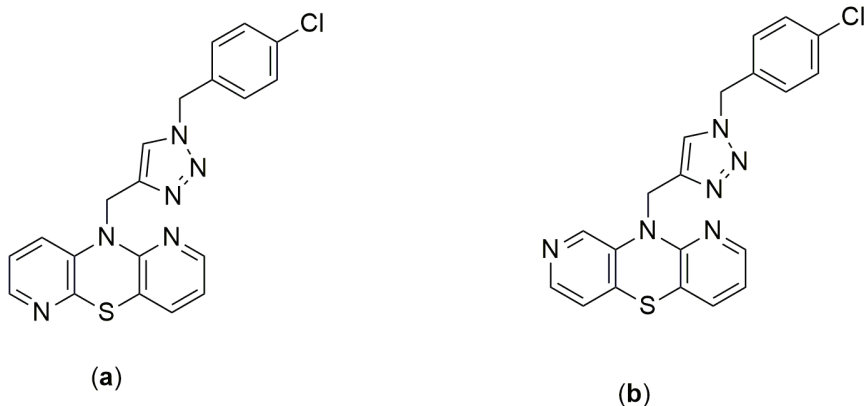
Међу њима, посебну пажњу истраживача, привлачи 10-супституисани пиридобензотиазин, познат под хемијским именом протипендил (Dominal®, Tolnate®) (слика 4а), који је првобитно синтетисан за третман анксиозности и агитације, да би пре кратког времена била потврђена и његова антипролиферативна активност према следећим ћелијским линијама хуманог канцера: SNB-19 (глиобластом), С-32 (меланом), MCF-7 (канцер дојке) и Т47D (дуктални карцином). Његови аналози, односно 10-супституисани-1-азафенотиазини који

садрже аминоксил- и/или бромхексил-групу на 1,4-тиазинском прстену и електрофилну нитро-групу на пиридинском прстену (слика 4б), испољили су завидну активност према ћелијским линијама H460 (канцер плућа), T98G (канцер мозга) и SNU80 (канцер тироидне жлезде).

Од свих шест типова изомерних дипиридоптиазина (линеарних трицикличних система и којима је 1,4-тиазински прстен кондензован са два ароматична пиридинска прстена), њих пет су фармаколошки активна једињења. Ови изомерни 1,6-, 1,8-, 1,9-, 2,7- и 3,6-диазафенотиазини, показали су импресивну антипролиферативну активност са IC₅₀-вредностима мањим од 1 µg и 1 µM. Од свих поменутих једињења, посебно су интересантни 1,6-диазафенотиазини супституисани алкил-, хетероарил-, амидоалкил- и диалкиламиноалкинил-групом, будући да су према ћелијској линији MCF-7, показали већу активност у поређењу са референтним леком, цисплатином (слика 5).



Слика 5. Хемијска структура 1,6-диазафенотиазина супституисаних хетероарил (а) и диалкиламиноалкинил групама (б).

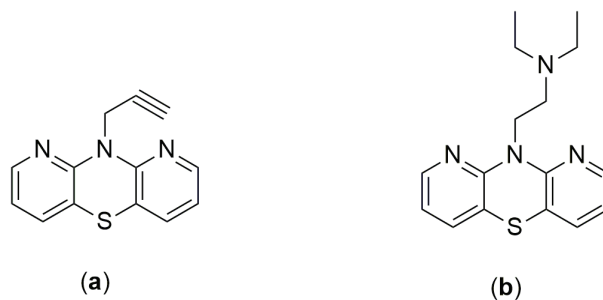


Слика 6. Хемијска структура 1,6-(а) и 1,8-диазафенотиазина (б) супституисаних 1,2,3-триазолским прстеном

Савремене SAR студије, су свој фокус усмериле ка 1,2,3-триазол-дипиридоптиазинским хибриди-ма изграђеним из 1,6- или 1,8-диазафенотиазина и р-хлорбензил супституисаног 1,2,3-триазолског прстена (слика 6), будући да су испољили изузетну антипролиферативну активност према ћелијским линијама SNB-19, Сасо-2 (колоректални карци-

ном), А549 (канцер плућа) и MDA-MB231 (канцер дојке). У оквиру ових студија, доказано је да 1,8-диазафенотиазински хибрид инхибира пролиферацију свих поменутих малигнућ ћелија активирањем протеина који регулишу функцију митохондрија, доприносећи на тај начин програмираној ћелијској смрти.

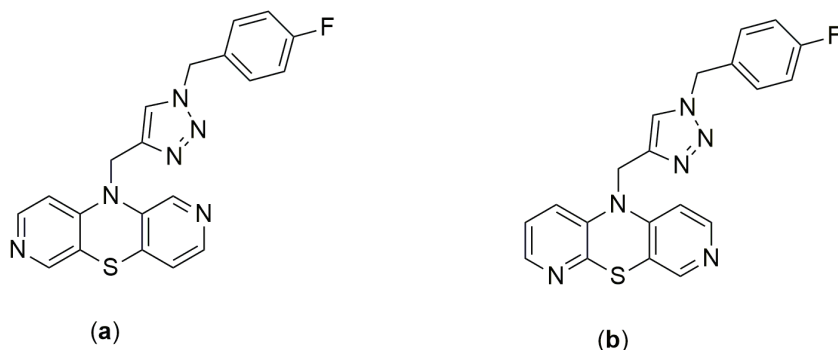
Сличан механизам дејства потврђен је код 10-пропинил-1,9-диазафенотиазина и његовог диетиламиноетил аналога (слика 7), за које је применом одговарајућих квантитативних метода, установљено да селективно редукују експресију пролиферативног маркера, односно хистона H3, као и експресију регулатора ћелијског циклуса, односно гена TP53 и CDKN1A.



Слика 7. Хемијска структура 10-пропинил-1,9-диазафенотиазина (а) и његовог диетиламиноетил аналога (б)

Хибриди 2,7-, односно 3,6-диазафенотиазина и 4-флуорбензил супституисаног 1,2,3-триазолског прстена (слика 8), показују антипролиферативну активност према ћелијским линијама А549 и Сасо-2 хуманог канцера са микроларним IC₅₀-вредностима. Општи закључак који можемо извести

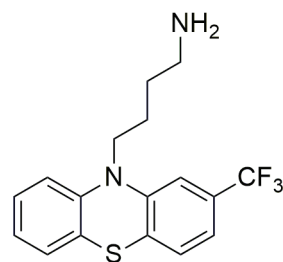
на основу резултата ове опсежне SAR студије је да антипролиферативна активност дисупституисаних дипиридоптиазина увелико зависи од врсте супституента на тиазинском атому азота и природе самог дипиридоптиазинског прстена [9].



Слика 8. Хемијска структура 2,7-(а) и 3,6-диазафенотиазина (б) супституисаних 1,2,3-триазолским прстеном

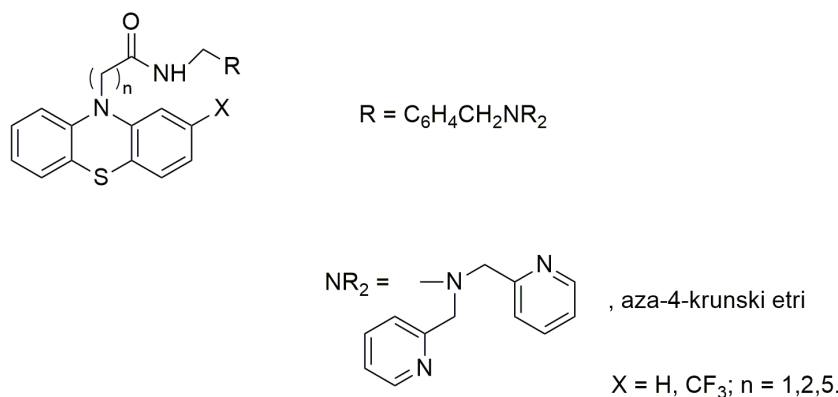
УТИЦАЈ ХЕМИЈСКЕ СТРУКТУРЕ НА АНТИБАКТЕРИЈСКУ И АНТИВИРУСНУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА ФЕНОТИАЗИНА

Бројне студије доказале су да се анимикробна активност деривата фенотиазина остварује кроз директан антибактеријски ефекат или кроз индиректно редуковање/инхибирање антибиотске резистенције путем раличитих механизма. Међу овим механизмима, свакако је најзначајнији, инхибиција протеина одговорних за мултиплу резистенцију на лекове, посебно гликопротеина, који делују као пумпа за избацивање различитих супстрата из ћелије (енгл. *efflux pump*) [16], што онемогућава антибиотицима да достигну своју оптималну бактерицидну концентрацију у цитоплазми. Инхибирањем ових ефлуксних пумпи, бактерије постају поново осетљиве на одговарајуће антибиотике. Поред тога што инхибирају везивање Са²⁺ јона за калцијум-зависне протеине, односно калмодулинске рецепторе, онемогућавајући стандардно функцио-



Слика 9. Хемијска структура 2-трифлуорметил-10-(4-аминобутил)фенотиазина *Salmonela* и *Escherihia coli*.

Специфичан механизам дејства, забележен је код прометазина који својим „ефектом елиминације плазида“, односно инхибирањем репликације бактеријски резистентног плазида (R-фактора) редукује или чак елиминише резистенцију на антибиотике. Захваљујући овом својству, прометазин се заједно са гентамицином, примењује као део синергистичке терапије код рекурентних инфекција изазваних Грам негативном бактеријом *Escherihia coli*. Као један од потенцијалних ме-



Слика 10. Хемијска структура деривата 10-Карбамоилалкилфенотиазина

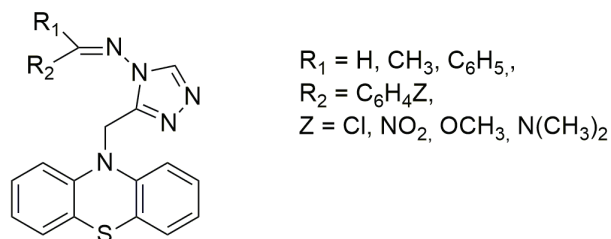
нису ефлуксних пумпи, деривати фенотиазина делују и тако што инхибирањем ДНК-репликације онемогућавају регуларну деобу бактеријске ћелије. Инхибирање ДНК-репликације, ефектнији је механизам заштите у случају инфекције организма мултирезистентном *Mycobacterium tuberculosis*, метицилин резистентном *Staphylococcus aureus*, као и појединим Грам негативним бактеријама (*Shigella*,

ханизма дејства деривата фенотиазина, наводи се и дестабилизација ћелијске мембране која повећава пропустљивост ћелијског зида појединих бактерија и омогућава антибиотицима да лакше продру у цитоплазму. Антибактеријска и антифунгална активност потврђена је код деривата фенотиазина супституисаних у положају 10 (директно или кроз одговарајуће бочне ланце) различитим

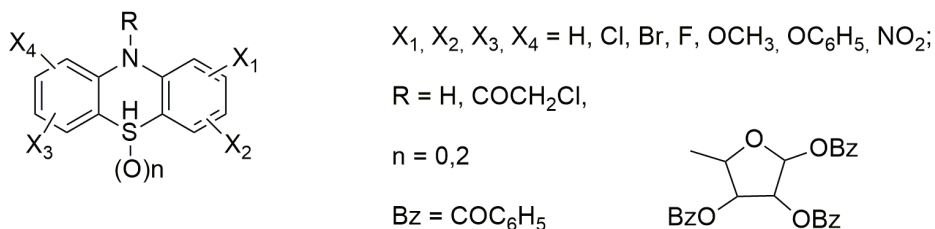
ацил- или хетероарил-групама. Међу малеатима 10-(3-аминпропил)- и 10-(4-аминобутил)фенотиазина, активних према различитим сојевима бактерија и гљивица, издваја се 2-трифлуорметил-10-(4-аминобутил)фенотиазин (слика 9) који се јаким интермолекулским интеракцијама везује за фосфолипидни двослој патогена *Saccharomyces cerevisiae* и *Trichophyton mentagrophites* и у минималним инхибиторским концентрацијама од 0,4 µg/ml и 1,5 µg/ml, респективно, онемогућава њихово нормално функционисање.

10-Карбамоилалкилфенотиазини који у оквиру своје хемијске структуре садрже хелатне групе (терцијарне аminer и аза-4-крунске етре) (слика 10), показују изузетну бактерицидну активност према *Bacillus subtilis* са минималним инхибиторским концентрацијама у опсегу 7,8-30 µg/ml. Као један од потенцијалних механизма дејства, наводи се нарушавање метал-јонске хомеостазе код бактерија, односно, нарушавање саморегулишућих процеса којима живи организми одржавају своју унутрашњу стабилност и свој опстанак, од стране хелатних група.

Примењени у минималним инхибиторским концентрацијама од 50 до 100 ppm, супституисани 1,2,4-триазолилметилфенотиазини (слика 11) делују бактерицидно на следеће патогене *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* и *Salmonella typhimurium*, слично референтном леку стрептомицину, односно анифунгално на гљивице рода *A. nigri*, *A. Flavus*, *Fusarium oxysporium* и *Trichoderms viride* слично референтном леку грисеофулфину.



Слика 11. Хемијска структура супституисаних 1,2,4-триазолилметилфенотиазина



Слика 12. Хемијска структура хлорацетил и рибофуранозил деривата фенотиазина

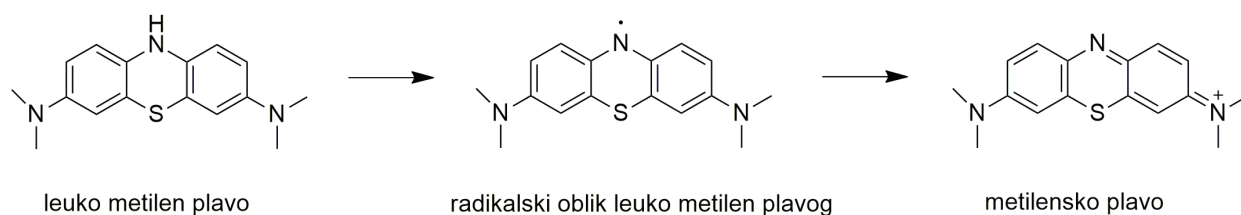
Изузетна антибактеријска и антифунгална активност која превазилази ону постигнуту применом стандардних антимикробних лекова: стрептомицина, флуконазола и микостатина, забележена је код мултисупституисаних фенил деривата фенотиазина и њихових хлорацетил и рибофуранозил деривата (слика 12). Поред тога, применом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразила) и ABTS (2,2-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине)) методе, доказано је да су рибофуранозил деривати фенотиазина снажни антиоксиданси [4].

Резултати нешто скромнијих истраживања усмерених на *in vitro* антивирусну активност деривата фенотиазина, стављају хлорпромазин у епицентар будућих SAR анализа. За сада је показано овај изузетно фармаколошки активан дериват фенотиазина, инхибирањем везивања вируса за одговарајуће рецепторе на ћелијској мембрани, инхибирањем виралне ендоцитозе и инхибирањем виралне ДНК-репликације, онемогућава удвајање генетског материјала хепатитиса Б, аренавируса, Синдбис вируса и вируса хумане имунодефицијенције (ХИВ) [4]. Синергистички ефекат бензофенотиазина и ацикловира, потврђен је код херпес симплекс вируса типа 2. Иако сам механизам дејства још увек није утврђен, сматра се да је заснован на инхибирању виралне ДНК-репликације [7].

УТИЦАЈ ХЕМИЈСКЕ СТРУКТУРЕ НА АНТИОКСИДАТИВНУ АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА ФЕНОТИАЗИНА

Свеобухватна истраживања развоја неуродегенеративних поремећаја спроведена почетком овог века, показују да је главни узрок настанка Паркинсонове и Алцхајмерове болести, оксидативни стрес. Патомеханизам Алцхајмерове болести, везује се за абнормалну агрегацију и складиштење β-амилоидних и тау протеина која води формирању неурофибриларних снопова. Поред тога што редукује оксидативни стрес, као један од најмоћнијих антиоксиданаса из групе фенотиазина, метиленско плаво (слика 13) такође ефикасно редукује патолошку фосфорилацију и агрегацију тау протеина, као и патолошку екстрацелуларну сегрегацију и олигомеризацију β-амилоидних протеина. Ова антиоксидативна активност метиленског плавог,

заснована је на његовој способности да се лако депротонује у положају 10 и тиме пређе у редуковани облик, односно леукометиленско плаво које успешно везује све оксидативне честице и стабилизује протеине [4].



Слика 13. Хемијска структура и редокс циклус метиленског плавог

ЗАКЉУЧАК

Трициклични фенотиазински систем који је превасходно у положају 10 модификован различитим моноцикличним (пиразол, тиазол, оксидазол, тиadiaзол, тетразол), моноцикличним азинским (пиридин и пиримидин) и бицикличним хомоароматичним (нафтален) прстеновима, заслужан је за постојање великог броја фармаколошки активних једињења. У основи антипсихотичке, антибактеријске, антифунгалне, антиканцерогене, антиконвулзивне, антималаричне, антиоксидативне и имunosупресивне активности деривата фенотиазина, налазе се оптимална липофилност овог супституисаног трицикличног система која омогућава неометано продирање деривата кроз фосфолипидни двослој ћелијске мембране и крвно-мождану баријеру, као и адекватан одабир С-2 и N-10 супституената који омогућавају овом трицикличном систему да успостави јаке интермолекуларне интеракције са својим биолошким циљем. Њихова хемопревентивна активност која настаје као последица инхибирања рецептора одговорних за мултиплу резистенцију на лекове, биће израженија ако су у положају С-2 присутне карбонилна или етарска група, ако је супституент у бочном ланцу пиперазински/пиримидински амин који је са фенотиазинским прстеном спојен бутил ланцем и ако је у молекулу присутна терминална терцијарна амино-група или 4-супституисани пиперазин. Циљ овог рада је да кроз систематично представљање фармаколошке активности деривата фенотиазина, описивање хемијских и фармаколошких својстава најактивнијих и комерцијално доступних представника и успостављање корелације између хемијске структуре и фармаколошке активности, пружи смернице за будуће синтезе неких нових, мање токсичних и знатно фармаколошки активнијих једињења.

ABSTRACT

PHENOTHIAZINE DERIVATIVES: MORE THAN AN INGREDIENT OF LITHIC COCKTAIL

ANITA LAZIĆ, research associate, Innovation Centre of the Faculty of Technology and Metallurgy

This review summarizes current status in research of pharmacological properties of remarkably important organic heterocyclic compound, phenothiazine. The main goal of this review is to illuminate the significance of phenothiazine core as one of the potent pharmacophoric moieties for the future synthesis of new compounds possessing plentiful activities.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Graham P. Drug discovery and drug development, In: An introduction to medicinal chemistry, 2nd edition, New York, Oxford University Press, 2001:142–190.
- [2] Gopi C, Dasaratha Dhanaraju M. Recent progress in synthesis, structure and biological activities. *Rev. J. Chem.* 2019;9(2):95–126. doi: 10.1134/S2079978019020018.
- [3] Shweta S, Pandeya S. N, Anupam V, Deepika Y. Synthesis and biological activity of phenothiazine derivatives. *Int. J. Resarch Ayurveda Pharm.* 2011;2(4):130–137.
- [4] Varga B, Csonka A, Csonka A, Molnár J, Amaral L, Spengler G. Possible biological and clinical applications of phenothiazines. *Anticancer Res.* 2017;37(11):5983–5993. doi:10.21873/anticancer.12045.
- [5] Vardanyan R, Hruby V. Antipsychotics, In: Synthesis of best-seller drugs, Academic Press, Massachusetts, 2016:87–110.
- [6] Jhansi Rani V, Ravi Kumar K, Naga Surekha Y. Synthesis, characterization and in-vitro antiinflammatory activity of phenothiazine derivatives. *Am. J. Pharm. Tech Res.* 2020;10(1):15–24, 2020. doi:10.46624/ajptr.2020.v10.11.002.
- [7] Pluta K, Morak-Młodawska B, Jeleń M. Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. *Eur. J. Med. Chem.* 2011;46(9):3179–3189. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.05.013.
- [8] Massie S. P. The Chemistry of phenothiazine. *Chem. Rev.* 1954;54(5):797–833. doi: 10.1021/cr60171a003.
- [9] Morak-Młodawska B, Jeleń M, Pluta K. Phenothiazines modified with the pyridine ring as promising anticancer agents. *Life.* 2021;11(3):1–18. doi: 10.3390/life11030206.
- [10] Marino M.J, Davis E, Meltzer R.H, Knutsen L. J, Williams M. Schizophrenia. In: Taylor J. B, Triggler D. J. (eds.) *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, London, Elsevier, 2007:17–44.
- [11] Hudepohl N.S, Nasrallah H. A. Antipsychotic drugs. In: *Neurobiology of Psychiatric Disorders*, Schlaepfer T, Nemeroff C (eds.), London, Elsevier, 1st ed., 2012;106:657–667.
- [12] Dougherty M. M, Marraffa J.M. Phenothiazines. *Encycl. Toxicol.* Third Ed. 2014;3:881–883. doi: 10.1016/B978-0-

12-386454-3.00769-7.

- [13] Ban T. A. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2007;3(4):495-500.
- [14] Amani A.M. Synthesis and biological activity of piperazine derivatives of phenothiazine. *Drug Res.* 2015;65(1):5-8. doi: 10.1055/s-0033-1364001.
- [15] Jaszczyszyn A, Gasiorowski K, Świątek, P, Malinka W,

Ciešlik-Boczula K, Petrus

- J, Czarnik-Matusiewicz B. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Reports* 2012;64(1):16-23, doi: 10.1016/S1734-1140(12)70726-0.
- [16] Erić S, Ilić K. Inhibitori P-glikoproteina kao modulatori rezistencije na antikancerogene lekove. *Arh. Farm.* 2010;60(3): 271-284.



Софија С. Бекић, научни сарадник

(sofija.bekic@dh.uns.ac.rs)

Сузана С. Јовановић-Шанта, редовни професор

(suzana.jovanovic-santa@dh.uns.ac.rs)

Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет,
Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине

КВАСАЦ-МОЋАН МОДЕЛ СИСТЕМ ЗА ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПОТЕНЦИЈАЛНИХ ЛЕКОВА

1. УВОД

Генотоксикологија идентификује супстанце које нарушавају интегритет деоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и проучава механизме њиховог деловања и одговор испитиваног биолошког система на оштећење. Оштећење ДНК се може идентификовати и квантификовати као учесталост настајања адуката, ланчаних прекида, мутација или хромозомских аберација у молекулима ДНК. Генотоксини могу бити физичког и хемијског порекла. Испољавају три примарна ефекта - канцерогени, мутагени или тератогени. У већини случајева генотоксини изазивају мутације које могу довести до канцера и широког спектра других болести [1,2].

Супстанце које оштећују ДНК свакако нису добри кандидати за развој лекова, стога је главни циљ генотоксиколошких испитивања њихова елиминација у раној фази [2]. Агенције за лекове захтевају податке о генотоксичном потенцијалу нових лекова, као део процене безбедности њихове употребе [1]. Осим лекова, важно је и питање потенцијалне генотоксичности супстанци из животне средине и потрошачких производа, са којима смо свакодневно у контакту. На основу свега наведеног не изненађује потреба за развојем ефикасних, осетљивих и репродуцибилних *in vitro* и *in vivo* тестова генотоксичности.

У овом раду је дат преглед одабраних тестова за испитивање генотоксичности у квасцу, као модел организму који поседује огроман потенцијал. Његова моћ се огледа у једноставном и економичном узгајању у лабораторији, генетском систему којим се лако манипулише и, што је најважније, великом проценту конзервираних гена, као код човека [3]. Сваки од описаних тестова има своје предности

и ограничења, тако да се за најбољи увид у генотоксичност испитиваног агенса препоручује комбинација више њих.

2. КВАСАЦ - МОДЕЛ ОРГАНИЗАМ ВЕЛИКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА

Квасац је уведен као експериментални модел организм средином 1930-их година и од тада се константно проучава и поклоњена му је велика пажња. Многи истраживачи га, захваљући архитектури ћелије и основним ћелијским механизмима, сматрају идеалним системом за биолошка истраживања [4]. Нема сумње да је најбоље проучен једноћелијски еукариотски организм квасац *Saccharomyces cerevisiae*. Његов геном је секвенциран пре 25 година и њиме се успешно манипулише. У односу на бактерије, квасци имају већу генетичку комплексност, што их чини супериорнијим у односу на прокариоте. Затим, одликује их брз раст у дефинисаном медијуму, једноставно и јефино гајење у лабораторијским условима, а с обзиром на то да нису патогени, приликом извођења експеримента није потребна велика предострожност [3]. Поседују митохондрије и нуклеус, где је хромозомска ДНК упакована у структурну форму сличну оној код сисара. Захваљујући развоју широког спектра метода трансформације ћелије квасца су доступне за клонирање жељених гена, а плазмиди могу бити интегрисани у геном или унети као репликујући молекули [3,4]. Треба нагласити и да комплекснији еукариоти показују значајне сличности у механизмима основних ћелијских процеса са квасцима, па се успех овог модел организм заснива, између осталог, и на чињеници да су многи гени и протеини укључени у ове фундаменталне биолошке процесе

конзервирани од квасаца до сисара. Стога не изненађује могућност испитивања гена из различитих еукариота, укључујући и човека, у квасцу као модел систему. Све наведено чини *Saccharomyces cerevisiae* омиљеним модел системом за испитивање еукариотске ћелије и основних питања у ћелијској биологији, подједнако као и у испитивањима генотоксичности потенцијалних лекова и других супстанци [3].

3. ТЕСТОВИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ

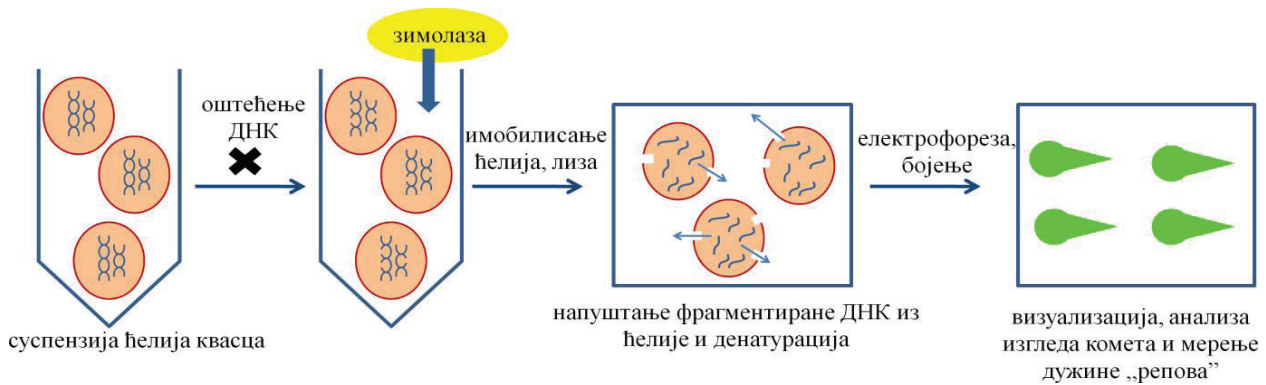
Генотоксини могу да оштете молекуле ДНК директно, прекидањем једног или оба ланца, или индиректно, модификацијама различитих функционалних група овог макромолекула. Већина оштећења је потенцијално опасна, како за ћелију, тако и за цео организам, те је испитивање генотоксичног потенцијала данас међу водећим приоритетима у фармацеутској индустрији, али и у индустрији хране [5]. Скрининг генотоксичности и елиминација генотоксичних једињења у раној фази развоја лека значајно повећава стопу успеха у откривању нових лекова са минималним споредним ефектима. С обзиром на то да је број испитиваних једињења велик, а количина често ограничена, важан предуслов у раној фази овог истраживања је примена HTS тестова токсичности (*enil. high-throughput screening*, тестови за брзо и ефикасно испитивање великог броја супстанци). Традиционални и најчешће коришћени тестови генотоксичности обухватају Амес тест, тест микронуклеуса, тест хромозомских аберација, тест измене сестринских хроматида и испитивање генотоксичности на лимфоцитима миша. Међутим, они су комплексни и временски и економски захтевни, те су стога, бар у садашњем облику, непрактични за рани скрининг великог броја једињења [6]. Из наведених разлога, а такође у циљу редуковања потребе за експериментима на животињама, генотоксиколошка испитивања у квасцу као модел организму добијају све више на значају.

3.1. КОМЕТ ТЕСТ

Гел електрофореза појединачних ћелија (*enil. single cell gel electrophoresis, SCGE*) или комет тест (*enil. comet assay*) представља брзу, једноставну и врло осетљиву методу са широком употребом у идентификацији генотоксичних агенаса. Најчешће коришћени модел системи описани у литератури су бактерије, ћелије сисара и биљака. Милошев (*буј. Miloshev*) и сарадници су први применили ову методу на ћелијама квасаца соја *Saccharomyces cerevisiae* DLH3 (МАТа, *gal1-*, *leu2-3, 112*, *his3-11, 15*) да

би испитали ефекат познатих генотоксичних агенаса - водоник-пероксида и метил-метансулфоната [7]. Водоник-пероксид оксидује пуринске и пиримидинске базе у молекулу ДНК изазивајући једноланчане прекиде посредством високо реактивних хидроксил радикала, док је метил-метансулфонат метилујући агенс. Нарушавање интегритета ћелијског зида квасаца, који представља баријеру и спречава напуштање фрагментиране ДНК из ћелије и издужење „репа” комете под дејством електричног поља, након усађивања ћелија у агарозни гел постиже се хидролитичким ензимима. Захваљујући имобилисању квашчевих ћелија у агарозном матриксу избегава се оштећење сферобласта и структура нуклеуса остаје интактна. Као резултат добија се карактеристична слика комета са остацима нуклеуса и „реповима”, чије су дужина и густина у корелацији са концентрацијом генотоксичних агенаса. Фазе теста обухватају гајење ћелија у комплетном медијуму до логаритамске фазе раста, третман различитим концентрацијама испитиваних једињења, испитивање вијабилности ћелија и nanoшење суспензије ћелија хидролизованых зимолазом на предметно стакло у слоју агарозе. Сферобласти се додатно могу лизирати и детерџентима, а ослобођена ДНК се након денатурације пуфером високе рН вредности излаже електрофоретском раздвајању. На крају се врши бојење нуклеинских киселина специфичним флуоресцентним бојама и, након визуализације, анализира се изглед комета и мери дужина „репова” (Слика 1). Уочено је да ћелије квасаца формирају комете при чак десет пута нижим концентрацијама у односу на ћелије сисара, третиране истим једињењима, што указује на високу осетљивост методе. Упоредивањем ове две методе дошло се и до закључка да су комете код ћелија квасаца мање интензивне, а настали репови и остаци нуклеуса разгранати, са фрагментима различитих величина, док су код ћелија сисара они глатки и хомогени [7].

У литератури је објављено неколико успешних примена овог теста код квасаца. Пеичева (*буј. Peucheva*) и сарадници су применили комет тест у *Saccharomyces cerevisiae* за тестирање генотоксичних ефеката адитива из хране, при чему су детектовали минималне концентрације при којима група одабраних адитива може оштетити ДНК. Изненађујуће, неке од њих су биле чак десет пута ниже од оних концентрација адитива које се додају намирницама приликом индустријске производње хране. Такође, у оквиру исте студије су упоређени резултати комет теста у квасцу и у вишим еукариотима, при чему је потврђена већа осетљивост првог модела [5]. Комет тест у *Saccharomyces cerevisiae* је примењен и за праћење оштећења ДНК изазваног



Слика 1. Принцип комет теста генотоксичности

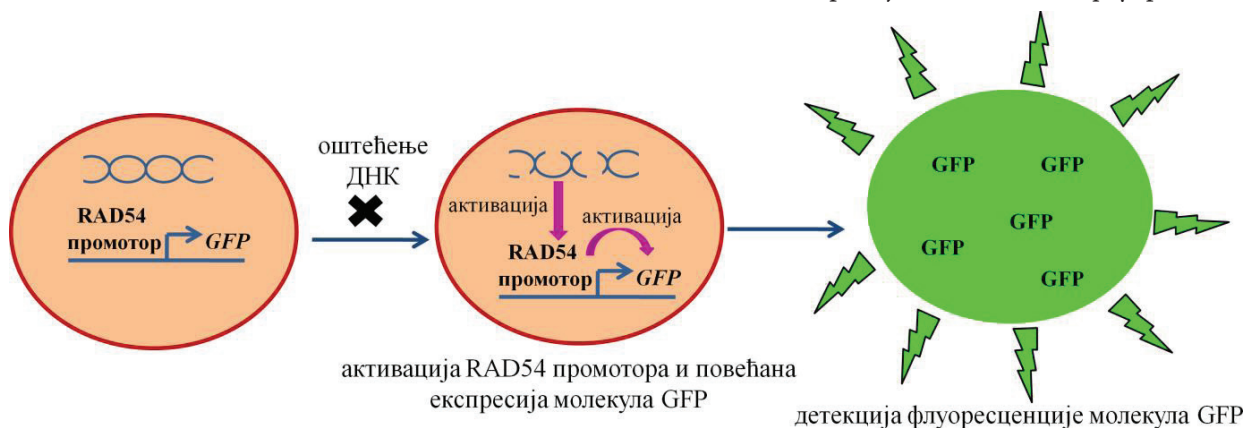
у зрачењем, при чему је однос између дозе зрачења и дужине репова комета био линеаран, док је у проширеној студији праћено скраћивање дужине репова комета као последица активности радиопротектора [8].

3.2. ЗЕЛЕНИ СКРИНИНГ ТЕСТ

Иако им недостају бројни метаболички путеви пронађени код сисара, основни механизми поправке оштећења ДНК код квасаца су врло слични онима код сисара. У квасцу *Saccharomyces cerevisiae* је откривен велики број gena директно или индиректно укључених у поправку оштећења ДНК. Транскрипција већине њих је активирана након излагања генотоксичним хемијским агенсима или зрачењу. RAD54 из групе gena за репарацију ДНК, има улогу у поправци оштећења ДНК у *Saccharomyces cerevisiae* хомоложном рекомбинацијом. У поређењу са дивљим типом, ћелије са мутацијама на овом гену су много осетљивије на јонизујуће зрачење, сугеришући његову улогу у поправци дволанчаних прекида ДНК [9]. Будући да је овај ген транскрипционо активиран широким спектром генотоксина, послужио је као основа за развој теста за испитивање генотоксичног потенцијала у квасцима [10,11].

Зелени скрининг тест (енгл. green screen test, GSC), данас комерцијално доступан као GreenScreen®-тест (Gentronix) представља једнос-

таван, економичан и осетљив тест генотоксичности, развијен за потребе тестирања великог броја једињења, најчешће потенцијалних лекова или адитива. Овај тест као биолошку компоненту биосензора користи генетски модификовани сој квасаца *Saccharomyces cerevisiae* [9,12], а сам назив теста упућује на репортер ген који се користи. Наиме, промоторски регион RAD54 gena је молекуларним клонирањем спојен са геном за зелени флуоресцентни протеин (енгл. green fluorescent protein, GFP), иницијално изолованим из медузе *Aequoria victoria*. GFP је један од најчешћих маркера за експресију gena и субцелуларну локализацију у квасцима [11]. Принцип овог биосензора генотоксичности у квасцима се заснива на експресији молекула GFP под контролом RAD54 промотора, осетљивог на агенсе који оштећују ДНК. Након излагања квасаца генотоксину, услед оштећења ДНК долази до индукције RAD54 промотора, тј. система за поправку ДНК, што резултује продукцијом GFP протеина и емитовањем флуоресцентног сигнала (Слика 2), који се једноставно детектује [9,11]. Што је веће оштећење ДНК, интензивнија је активација система за поправку и производи се пропорционално већа количина флуоресцентног протеина. Дакле, интензитет флуоресценције је у корелацији са генотоксичним ефектом испитиваног агенса. Такође, да би се направила разлика између високе концентрације слабо флуоресцентних ћелија и ниске концентрације интензивно флуоресцент-

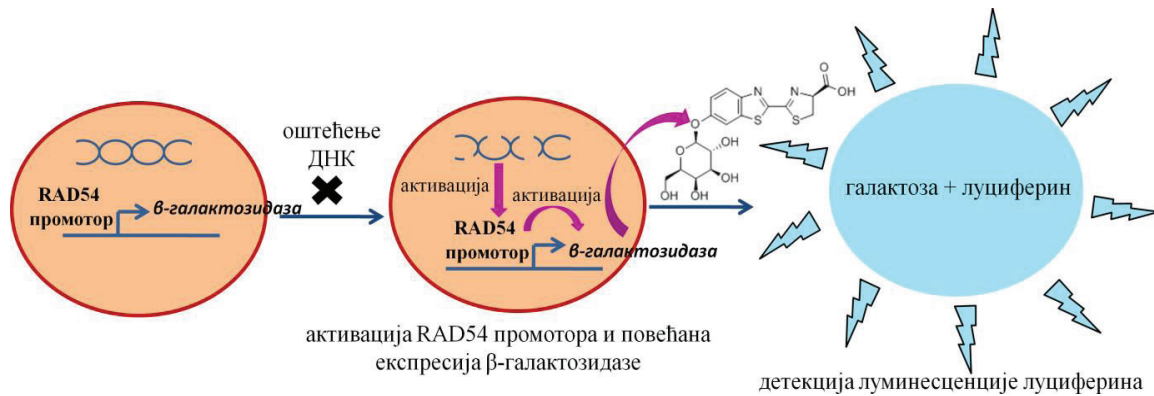


Слика 2. Принцип зеленог скрининг теста генотоксичности

них ћелија неопходно је извршити нормализацију мерењем оптичке густине ћелија [10,12]. Реконбинантне ћелије квасца се гаје у течном селективном медијуму заједно са испитиваним једињењем одређене концентрације, затим се на леду третирају натријум-азидом у циљу инхибиције митохондријалних ензима, након чега се мери флуоресценција интактних или механички лизираних ћелија на флуориметру, а резултати обрађују узимањем у обзир и измерене вредности апсорбанце [9].

ефекта на експресију репортер гена. Експресија β-галактозидазе се квантификује коришћењем супстрата D-луциферин-O-β-галактопиранозида, који се разлаже на галактозу и луциферин, чија се количина одређује луминометријски (Слика 3).

Предност овог теста у односу на зелени скрининг тест је већа осетљивост луминесценције у односу на флуоресценцију и изостанак позадинске аутофлуоресценције, која често омета детекцију. Овај тест се изводи тако што се ћелије квасца, гајене у течном медијуму, помешају са микрозомима



Слика 3. Принцип радар скрининг теста генотоксичности

Извођење овог теста је значајно унапређено заменом GFP репортер молекула другим, тзв. уEGFP протеином (енгл. yeast enhanced GFP, уEGFP), чија је секвенца аминокиселина прилагођена експресији у квасцима, емисиони пик виши, настајање брже, а осетљивост на топлоту мања у односу на GFP. Даље, замена RAD54 промотора промотором RNR2 гена, који се такође појачано експримира у одговору на оштећење ДНК, као и употреба соја *Saccharomyces cerevisiae* са побољшаним системом поправке оштећења ДНК су додатно допринели оптимизацији овог биосензора. Велики значај зеленог скрининг теста је могућност испитивања генотоксичног потенцијала великог броја нових агенаса и идентификација фактора укључених у одговор ћелије на оштећење ДНК [9,10].

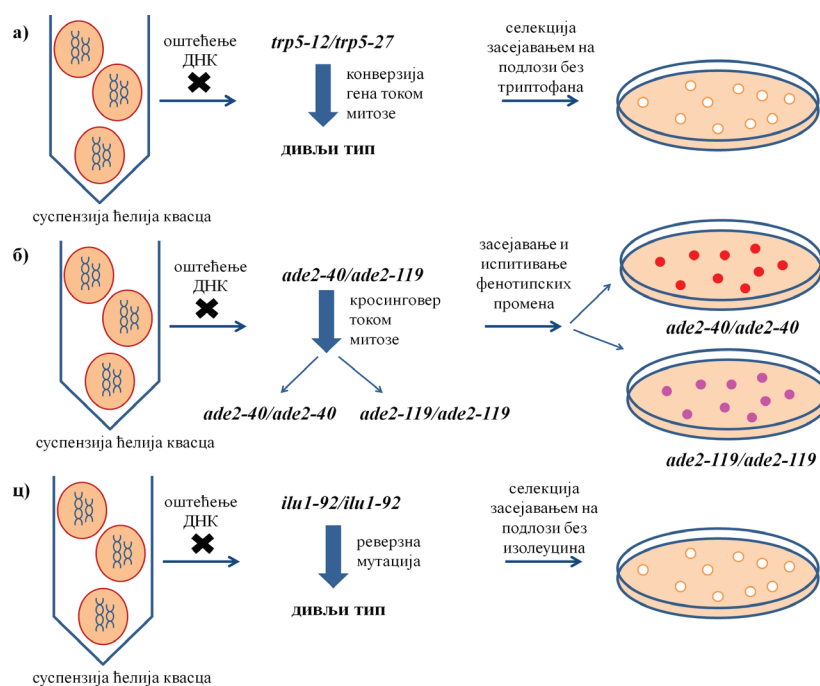
3.3. РАДАР СКРИНИНГ ТЕСТ

Радар скрининг тест (енгл. radar screen assay) је једноставан и осетљив тест за скрининг генотоксичности једињења, који се, слично као и претходни, заснива на репортер систему конструисаном повезивањем RAD54 промотора и гена за β-галактозидазу у квасцу *Saccharomyces cerevisiae* SKAM4 соја. Ген за β-галактозидазу је под транскрипционом контролом RAD54 промотора, који се, као што је раније поменуто, индукује након оштећења ДНК. Генотоксичност једињења додатих у медијум за раст ћелија се на тај начин може једноставно квантификовати испитивањем њиховог

јетре, који представљају модел систем метаболичких процеса у ћелијама сисара, затим се у транспарентним микротитар плочама помешају испитивано једињење и суспензија ћелија и смеша инкубира током одређеног временског периода. Након инкубације важно је одредити и цитотоксичност испитиваног једињења и упоредити га са цитотоксичним ефектом референтног генотоксичног једињења. На крају се ћелије инкубирају са супстратом и мери се луминесценција, која је пропорционална оштећењу ДНК изазваном генотоксичношћу испитиваног једињења [6]. На врло сличан начин, Еки (*jay*. Еки) и сарадници су развили тест у квасцу, осетљив на хемикалијама индуковану генотоксичност, конструисањем реконбинантног соја *Saccharomyces cerevisiae* са интегрисаним геном за луциферазу под контролом промотора квашчевог RNR3 гена, који се као и RAD54 ген активира као одговор на оштећење ДНК [13].

3.4. D7 ТЕСТ

Тест конверзије гена током митозе (енгл. the mitotic gene conversion assay) у *Saccharomyces cerevisiae* је стандардни протокол који Агенција за заштиту животне средине (енгл. Environmental Protection Agency, EPA) препоручује за тестирање мутагеног потенцијала једињења. Овај тест користи сој *Saccharomyces cerevisiae* D7 (MATa/MATa, *ade2-40/ade2-119*, *ilv1-92/ilv1-92*, *trp5-12/trp5-27*), конструисан и описан од стране Цимермана (нем.



Слика 4. Принцип D7 теста генотоксичности а) конверзија гена током митозе, б) кросингвер током митозе, ц) реверзна мутација

Zimmermann) и сарадника. Мутагенеза доводи до промена у фенотипу овог соја на три различита начина, при чему свака од фенотипских промена означава посебан вид мутације и механизам поправке оштећења. На D7 соју је могуће детектовати индукцију конверзије гена током митозе, кросингвера (*enl.* crossing over) и реверзних мутација [14].

Хетероалел *trp5-12/trp5-27* резултује ауксотрофијом на триптофан, те D7 ћелије нису способне да преживе на синтетском медијуму без овог специфичног нутријента. Конверзија гена током митозе на *trp5* локусу, узрокована механизмима поправке услед излагања мутагену, прати се појавом колонија способних да расту на синтетском медијуму без триптофана (Слика 4. а). Кросингвер током митозе се може визуелно детектовати појавом црвених и ружичастих колонија, које настају услед формирања хомоалела *ade2-40/ade2-40* (црвено) и *ade2-119/ade2-119* (ружичасто) из оригиналног хетероалелног стања *ade2-40/ade2-119*, које формира беле колоније (Слика 4. б). Даље, реверзне мутације могу бити идентификоване тестирањем раста на синтетском медијуму без изолеуцина. Наиме, ауксотрофија D7 соја за изолеуцин, услед хомоалелних мутација на *ilu1* локусу, се може превазићи реверзном тачкастом мутацијом, што за последицу има способност раста у одсуству ове аминокиселине (Слика 4. ц).

За извођење овог експеримента ћелије се гаје до сатурације, а потом складиште на 40°C. Током складиштења, због могућих спонтаних реверзних мутација, за даљи рад одабирају се ћелије са нај-

мањим степеном спонтаних мутација и гаје до експоненцијалне фазе, када су најосетљивије на мутагене. Након излагања потенцијалним мутагенима током одређеног временског периода испитују се фенотипске промене, на основу којих се изводе закључци о генотоксичном ефекту испитиваног једињења. Велика предност овог теста представља могућност тестирања више од једне класе мутагена коришћењем само једног соја [14,15].

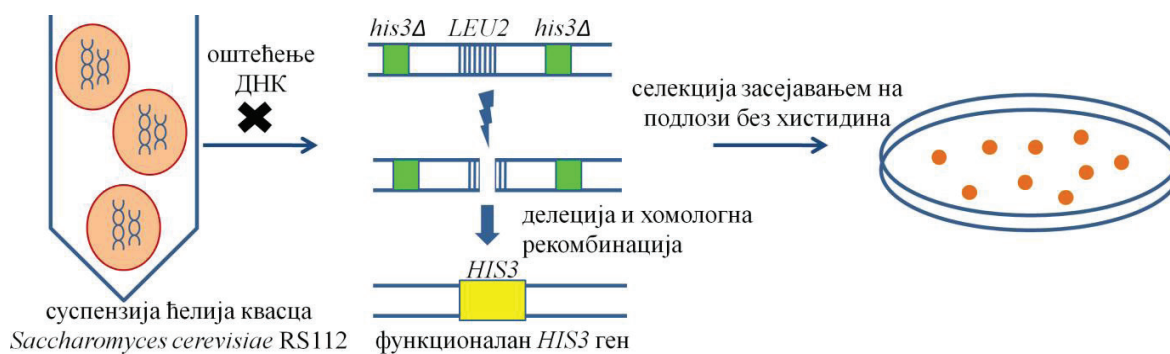
С обзиром на то да поседује ћелијски зид, слаба пермеабилност квасца може представљати потешкоћу приликом испитивања генотоксичности одабраних једињења. Из тог разлога је повећана пермеабилност D7 соја, а тиме и осетљивост самог теста, увођењем мутације на *TS1* гену, која доводи до смањене гликозилације манопротеина, који у великој мери изграђују спољашњи слој ћелијског зида квасца, што доприноси слабијој пермеабилности [16,17]. Оптимизовани D7ts1 тест је показао чак четири до осам пута већу осетљивост на мутагене у односу на првобитни [16] и успешно се примењује за испитивање генотоксичних полутаната из животне средине. Важно је нагласити да је у тесту са повећаном пермеабилношћу ћелијског зида квасца идентификован генотоксични потенцијал агенса за које су у D7 тесту добијени лажно негативни резултати [17].

3.5. DEL ТЕСТ

Због велике повезаности између реаранжмана у генетском материјалу и канцерогенезе, системи којима се одређује учесталост интрахромозомских

хомологних рекомбинација у квасцима, ћелијама сисара и биљкама су кључни за тестирање безбедности примене нових једињења.

DEL тест (*enl.* deletion assay) је развијен у квасцу *Saccharomyces cerevisiae* са циљем да се брзо, једноставно и са великом осетљивошћу детектује делеција, а тиме и широк спектар генотоксина, који изазивају овај тип мутације. Међу једињењима познатим по својој канцерогеној активности показало се да је DEL тестом детектовано више од 50% канцерогена него традиционалним Амес тестом. Због своје поузданости и репродуцибилности овај тест се користи за испитивање генотоксичности фармацеутских производа, пестицида и других супстанци које загађују животну средину, а могуће га је комбиновати и са осталим генотоксиколошким тестовима. Поред тога, примењује се и код проучавања механизма хомологне рекомбинације [18].



Слика 5. Принцип DEL теста генотоксичности

DEL тест је конструисан коришћењем соја *Saccharomyces cerevisiae* RS112 интеграцијом pRS6 плаزمида, који садржи унутрашњи фрагмент *HIS3* гена и *LEU2* маркер, у квашчев *his3* локус, доводећи до прекида *HIS3* гена. Због нефункционалности *HIS3* гена овај сој није способан да преживи у одсуству хистидина. Међутим, изазвано оштећење ДНК резултује хомологом рекомбинацијом и делецијом секвенце, која изазива унутрашњи прекид *his3* локуса, и тиме обновом функционалног дивљег типа *HIS3* гена и растом ћелија у одсуству хистидина (Слика 5). Корелација између изложениости канцерогену и делеције је толико јака да се употреба овог појединачног теста за евалуацију потенцијалних генотоксичних ефеката сматра довољном и може се искључити валидација резултата комбинацијом са другим тестовима генотоксичности [18,19].

Традиционални тест подразумева раст ћелија RS112 соја до сатурације, разблаживање до оптималне оптичке густине и инкубацију у присуству испитиваних једињења током одређеног временског интервала. Култура се првобитно гаји у медијуму без леуцина да би се спречио губитак ин-

тегративног плаزمида, а потом се ћелије засеју на подлоге без хистидина и врши се селекција преживелих колонија [20]. Да би се испитала могућност метаболисања генотоксина тест се изводи у присуству микростома хепатоцита пацова [18].

Оригинални DEL тест је врло моћан када је у питању тестирање ограниченог броја једињења, међутим непрактичан код скрининга библиотека једињења. Из тог разлога тест је модификован тако да се изводи у течној култури у микротитар плочама, док се пролиферација ћелија прати колориметријски, коришћењем тетразолијумове соли, што је много мање временски захтевно него анализирање резултата добијених на чврстим подлогама. Тетразолијумова со се у живим ћелијама конвертује у љубичасто обојени производ формазан, чија се апсорбанца читава на 490 nm. Ова верзија DEL теста је одлична алтернатива тесту на чврстим подлогама и омогућује испитивање генотоксичног

потенцијала великог броја једињења истовремено [20].

4. ЗАКЉУЧАК

Потребе за скринингом генотоксичности потенцијалних терапеутика су из дана у дан све веће, те је развој нових, брзих, осетљивих и ефикасних метода веома значајан. Способност предвиђања безбедности једињења у раном стадијуму развоја лека значајно смањује време од преклиничких испитивања до увођења лекова пацијентима, а тиме и економске губитке. Иако су тестови у бактеријама за испитивање генотоксичности доказано ефикасни, њихов главни недостатак је неспособност прокариотске ћелије да детектује генотоксине који интерреагују са метама специфичним за еукариоте, што је нарочито важно када биосензор треба да укаже на потенцијалне опасности неког агенса по човека. Из тог разлога се све више тежи развоју алтернативних верзија тестова генотоксичности на квасцима, чији геном се практично користи као сурогат за хумани геном.

ABSTRACT

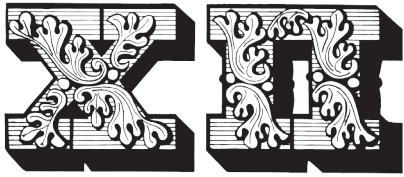
YEAST - A POWERFUL MODEL SYSTEM FOR TESTING GENOTOXICITY OF POTENTIAL DRUGS

Sofija S. Bekić, Suzana S. Jovanović-Šanta, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

Genotoxins cause DNA damage that may lead to the development of wide range of diseases, including cancer. Compounds with this hazard effects are certainly not good candidates for the drug development, so the main goal of genotoxicological studies is their elimination at an early stage. It is also important to identify substances from consumer commercial products, such as additives, pesticides, cosmetics and other industrial products that exhibit genotoxic risk. This paper provides an overview of the most commonly used genotoxicity assays developed in yeast, a model organism with significant potential in biomedical research. Each of the described methods has its advantages, but also limitations, so for the best insight into the genotoxic effect and mechanism of action of tested agent, combined use of assays is recommended. Since there is an increasing interest in genotoxicity screening, development of new, sensitive and efficient genotoxicity assays is of great interest for research community.

5. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Umang, S. S. Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *Journal Of Pharmacy And Biological Sciences*, 1 (2012), 43-54.
- [2] Custer, L. L., Sweder, K. S. The role of genetic toxicology in drug discovery and optimization. *Current drug metabolism*, 9 (2008) 978-985.
- [3] Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 350 (2002) 3-41.
- [4] Feldmann, H. (Ed.). (2012). *Yeast: Molecular and Cell Biology*, Second Edition. John Wiley & Sons, Weinheim, Germany
- [5] Peycheva, E., Alexandrova, R., Miloshev, G. Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity. *LWT-Food Science and Technology*, 59 (2014) 510-517.
- [6] Westerink, W. M., Stevenson, J. C., Lauwers, A., Griffioen, G., Horbach, G. J., Schoonen, W. G. Evaluation of the Vitotox™ and RadarScreen assays for the rapid assessment of genotoxicity in the early research phase of drug development. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 676 (2009) 113-130.
- [7] Miloshev, G., Mihaylov, I., Anachkova, B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 513 (2002) 69-74.
- [8] Nemavarkar, P. S., Chourasia, B. K., Pasupathy, K. Detection of γ -irradiation induced DNA damage and radioprotection of compounds in yeast using comet assay. *Journal of Radiation Research*, 45 (2004) 169-174.
- [9] Billinton, N., Barker, M. G., Michel, C. E., Knight, A. W., Heyer, W. D., Goddard, N. J., Fielden, P. R., Walmsley, R. M. Development of a green fluorescent protein reporter for a yeast genotoxicity biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 13 (1998) 831-838.
- [10] Afanassiev, V., Sefton, M., Anantachaiyong, T., Barker, G., Walmsley, R., Wölfl, S. Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the RAD54 or RNR2 promoter as a test for the genotoxic potential of chemical substances. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464 (2000) 297-308.
- [11] Walmsley, R. M., Billinton, N., Heyer, W. D. Green fluorescent protein as a reporter for the DNA damage-induced gene RAD54 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13 (1997) 1535-1545.
- [12] Cahill, P. A., Knight, A. W., Billinton, N., Barker, M. G., Walsh, L., Keenan, P. O., Milliams, C. V., Tweats, D.J., Walmsley, R. M. The GreenScreen® genotoxicity assay: a screening validation programme. *Mutagenesis*, 19 (2004) 105-119.
- [13] Ochi, Y., Sugawara, H., Iwami, M., Tanaka, M., Eki, T. Sensitive detection of chemical-induced genotoxicity by the Cypridina secretory luciferase reporter assay, using DNA repair-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28 (2011) 265-278.
- [14] Zimmermann, F. K., Kern, R., Rasenberger, H. A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 28 (1975), 381-388.
- [15] Zimmermann, F. K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31 (1975) 71-86.
- [16] Staleva, L., Waltscheva, L., Golovinsky, E., Venkov, P. Enhanced cell permeability increases the sensitivity of a yeast test for mutagens. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 370 (1996) 81-89.
- [17] Terziyska, A., Waltschewa, L., Venkov, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, 109 (2000) 43-52.
- [18] Brennan, R. J., Schiestl, R. H. Detecting carcinogens with the yeast DEL assay. *Genetic Recombination: Reviews and Protocols*, (2004) 111-124.
- [19] Kirpnick, Z., Homiski, M., Rubitski, E., Repnevskaya, M., Howlett, N., Aubrecht, J., Schiestl, R. H. Yeast DEL assay detects clastogens. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582 (2005) 116-134.
- [20] Hontzeas, N., Hafer, K., Schiestl, R. H. Development of a microtiter plate version of the yeast DEL assay amenable to high-throughput toxicity screening of chemical libraries. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 634 (2007) 228-234.



Маријана ЂОСОВИЋ,
студент пете године интегрисаних основних и мастер академских студија Универзитета у
Београду-Хемијског факултета,
E-mail: marijana.cosovic1996@gmail.com

СЦЕНАРИО ЕДУКАТИВНЕ РАДИОНИЦЕ: НЕМЕТАЛИ

Наставна јединица: Неметали

Разред: Осми разред основне школе

Циљеви радионице:

1. Ученици на основу атомског броја проналазе место хемијског елемента у Периодном систему елемената и објашњавају којој групи и периоди одређени хемијски елемент припада.

2. Ученици повезују појмове из наставне јединице неметали у игри асоцијација и објашњавају повезаност појмова.

Материјал потребан за едукативну радионицу: Периодни систем елемената, уџбеник, свеске, рачунар, интернет, таблети или паметни телефони, хамер папири, фломастери, картице са податком о атомском броју хемијског елемента (Прилог 1), картице са појмовима/садржајима (Прилог 2), бели папири, селотејп трака, бојице.

Ток часа:

Корак 1: Подела ученика у групе и давање инструкција о раду (5 минута)

Наставник дели ученике у пет група по пет ученика на основу њихових оцена из хемије, тако да се у свакој групи налазе ученици од највише до најниже оцено (списак ученика по групама припремљен је пре часа и постављен на радним местима). Затим саопштава ученицима да ће о неметалима и својствима неметала учити током два школска часа кроз едукативну радионицу. Објашњава на који начин ће ученици радити у групама и која су њихова задужења.

Корак 2: Ученици идентификују хемијски елемент (15 минута)

По један ученик из сваке групе извлачи картицу са атомским бројем хемијског елемента. Задатак групе је да на картици напише податке који недостају користећи Периодни систем елемената и да идентификује хемијски елемент тако што ће написати симбол елемента, атомски и масени број. Када заврше задатак, ученици решење показују наставнику. Наставник проверава да ли су ученици исправно попунили празна поља на

картицама и у случају погрешних одговора даје потребна објашњења и смернице за кориговање одговора.

Корак 3. Ученици уче о неметалима (25 минута)

Свака група добија по пет појмова/садржаја у вези с хемијским елементом који су идентификовали у претходном кораку и задатак да користећи уџбеник или интернет прикупе податке у вези с тим појмовима. Потребно је да се на нивоу групе ученици договоре ко ће који појам/садржај да обради, тако да сваки ученик обради по један појам. Прикупљене податке ученици записују у своје свеске. Наставник у току рада обилази групе и сугерише, ако је потребно, на шта ученици треба да обрате пажњу.

Корак 4. Ученици праве игру асоцијација (20 минута)

Према записаним подацима ученици у групама праве игру асоцијација (по узору на игру у ТВ Слагалици). Коначно решење је хемијски елемент који је група претходно обрађивала. Игру приказују на хамер папиру. Преко сваког написаног појма на хамеру лепе бели папир помоћу селотејп траке.

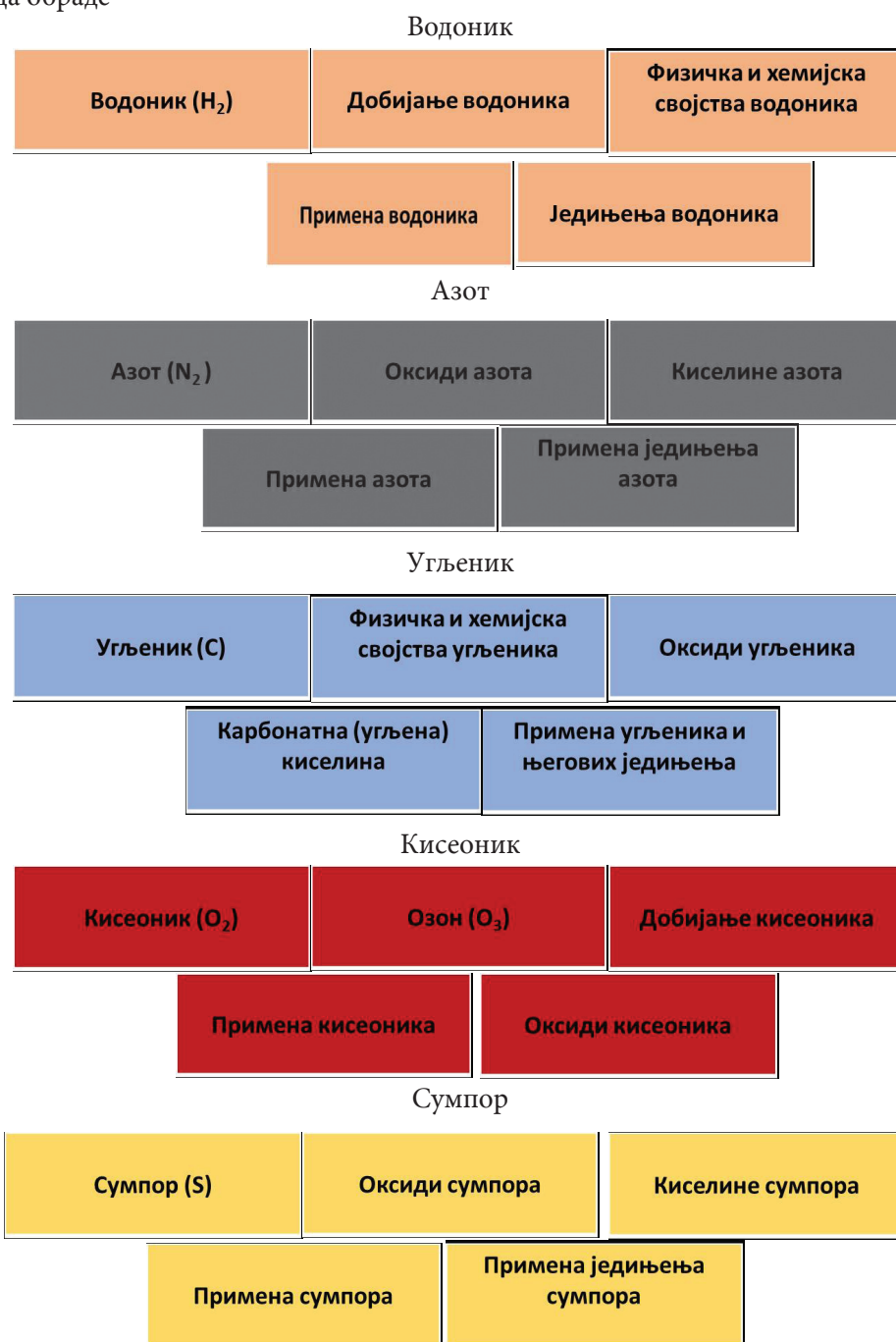
Корак 5. Ученици учествују у игри асоцијација (25 минута)

Представник сваке групе води игру асоцијација. Ученици других група отварају поља у игри (представник групе склања бели папир са одговарајућег поља) и погађају коначан одговор (хемијски елемент који је група обрађивала). Представник групе објашњава повезаност појмова у игри асоцијација са коначним одговором и саопштава додатне информације о хемијском елементу које је група прикупила. Наставник допуњава објашњења сваке групе уколико уочи да су изостављени битни подаци и прави резиме са најважнијим информацијама.

ПРИЛОГ 1. Картице за идентификацију еле-
мента

Атомски број:	1
Група и периода у Периодном систему:	
Симбол са атомским и масеним бројем:	
Атомски број:	6
Група и периода у Периодном систему:	
Симбол са атомским и масеним бројем:	
Атомски број:	7
Група и периода у Периодном систему:	
Симбол са атомским и масеним бројем:	
Атомски број:	8
Група и периода у Периодном систему:	
Симбол са атомским и масеним бројем:	
Атомски број:	16
Група и периода у Периодном систему:	
Симбол са атомским и масеним бројем:	

ПРИЛОГ 2. Картице са појмовима које ученици треба да обраде



ABSTRACT

SCENARIO OF THE EDUCATIONAL WORKSHOP: NONMETALS

Marijana Ćosović, a student of the integrated basic and graduate academic studies, University of Belgrade – Faculty of Chemistry

This paper presents the scenario of an educational workshop on the topic of nonmetals, the realization of which is planned for the eighth grade of primary school.

САДРЖАЈ ЧАСОПИСА ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД ЗА 2021. ГОДИНУ

ЧЛАНЦИ

Милица ФИЛИПОВИЋ, Гордана СТОЈАНОВИЋ <i>Milica FILIPOVIĆ, Gordana STOJANOVIC</i> ЗЕЛЕНА ЉУСКА ОРАХА – АГРОИНДУСТРИЈСКИ ОТПАД СА НАУЧНО ДОКАЗАНИМ ПРИМЕНАМА GREEN WALNUT SHELL - AGRO-INDUSTRIAL WASTE WITH SCIENTIFICALLY PROVEN APPLICATIONS _____	3	Вера ОБРАДОВИЋ <i>Vera OBRADOVIC</i> МЕХАНИЧКА СВОЈСТВА АРАМИДНИХ КОМПОЗИТА MECHANICAL PROPERTIES OF ARAMID COMPOSITES _____	111
Гордана ТАСИЋ, Милена СИМИЋ, Милош ПЕТКОВИЋ <i>Gordana TASIC, Milena SIMIC, Milos PETKOVIC</i> ПАЛАДИЈУМОМ КАТАЛИЗОВАНЕ РЕАКЦИЈЕ АЛИЛНИХ АЛКОХОЛА PALLADIUM CATALYZED REACTIONS OF ALLYL ALCOHOLS _____	11	Милан БЈЕЛИЦА, Марко МАРКОВИЋ, Мирјана СИМИЋ-ПЕЈОВИЋ, Никола ЦВЈЕТИЋАНИН <i>Milan BJELICA, Marko MARKOVIC,</i> <i>Mirjana SIMIC-PEJOVIC, Nikola CVJETICANIN</i> КОМПЈУТЕРИЗОВАНИ СИСТЕМ ЗА ЕЛЕКТРОХЕМИЈСКА МЕРЕЊА COMPUTER-AIDED SYSTEM FOR ELECTROCHEMICAL MEASUREMENTS _____	117
Данијел ЈАКОВЉЕВИЋ <i>Danijel JAKOVljeVIC</i> АМАНИТИН – КАПА СМРТИ AMANITIN - CAP OF DEATH _____	26	Тамара ЛАЗАРЕВСКИ <i>Tamara LAZAREVSKI</i> СТЕРОИДНИ ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ КОРАЛА РОДА SCLERONEPHNTHYA STEROIDAL NATURAL PRODUCTS FROM CORALS OF THE SCLERONEPHNTHYA ORDER _____	126
Милош ШУНДЕРИЋ <i>Milos SUNDERIC</i> ЛОВАЦ У ЖИТУ – КАКО ЈЕ ЦИВИЛИЗАЦИЈА ИЗМЕНИЛА НАЧИН НА КОЈИ СЕ ХРАНИМО? SATHCER IN THE RYE- HOW HAS CIVILIZATION CHANGED THE WAY WE EAT? _____	32	Анита ЛАЗИЋ <i>Anita LAZIC</i> ДЕРИВАТИ ФЕНОТИАЗИНА: ВИШЕ ОД САСТОЈКА ЛИТИЧКОГ КОКТЕЛА PHENOTHIAZINE DERIVATIVES: MORE THAN AN INGREDIENT OF LITHIC COCKTAIL _____	131
Јована МУТАБЏИЈА <i>Jovana MUTABDZIJAJ</i> ХРАНА КАО ЛЕК: МОЛЕКУЛСКИ МЕХАНИЗМИ ЗАШТИТНОГ ДЕЛОВАЊА СЕКУНДАРНИХ МЕТАБОЛИТА БИЉАКА FOOD AS A MEDICINE: MOLECULAR MECHANISMS OF PROTECTIVE ACTION OF PLANT SECONDARY METABOLITES _____	37	Софија С. БЕКИЋ, Сузана С. ЈОВАНОВИЋ-ШАНТА <i>Sofija S. BEKIC, Suzana S. JOVANOVIC-SANTA</i> КВАСАЦ-МОЋАН МОДЕЛ СИСТЕМ ЗА ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПОТЕНЦИЈАЛНИХ ЛЕКОВА YEAST - A POWERFUL MODEL SYSTEM FOR TESTING GENOTOXICITY OF POTENTIAL DRUGS _____	139
Драган М. ПОПОВИЋ <i>Dragan M. PODOVIC</i> ФОТОЛИАЗА – МОЛЕКУЛСКИ МЕХАНИЗАМ ОПРАВКЕ UV-ИНДУКОВАНИХ ДНК ЛЕЗИЈА PHOTOLYASE – MOLECULAR MECHANISM FOR REPAIR OF UV-DAMAGED DNA _____	50	ВЕСТИ ИЗ ШКОЛА / ВЕСТИ ЗА ШКОЛЕ	
Александра СТЕФАНОВИЋ <i>Aleksandra STEFANOVIC</i> ИЗМЕЂУ ЉУБАВИ И МРЖЊЕ: КАРЦИНОМ И РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ UV-ИНДУКОВАНИХ ДНК ЛЕЗИЈА BETWEEN LOVE AND HATE: CANCER AND REACTIVE SPECIES _____	62	Меланија ЂОШИЋ <i>Melanija JOSIC</i> СЦЕНАРИО ЕДУКАТИВНЕ РАДИОНИЦЕ: МЕТАЛИ SCENARIO OF THE EDUCATIONAL WORKSHOP: METALS _____	19
Иван ГУТМАН <i>Ivan GUTMAN</i> ПОЛОНИЈУМ – ОТКРИЋЕ И РАНА ИСТОРИЈА POLONIUM – DISCOVERY AND EARLY HISTORY _____	78	Ана-Андреа ХОЛИК <i>Ana-Andrea HOLIK</i> СЦЕНАРИО ЕДУКАТИВНЕ РАДИОНИЦЕ: „РАЗЛИЧИТЕ ПРОФЕСИЈЕ КАО КОНТЕКСТИ О ПРИМЕНИ АЛКОХОЛА“ SCENARIO OF THE EDUCATIONAL WORKSHOP: DIFFERENT PROFESSIONS AS CONTEXTS OF ALCOHOL USE _____	46
Весна М. МИЛОВАНОВИЋ, Јовица БРАНКОВИЋ <i>Vesna M. MILOVANOVIC, Jovica BRANKOVIC</i> ПИРАЗОЛСКИ ДЕРИВАТИ: „ЗЕЛЕНА“ СИНТЕЗА И МЕДИЦИНСКИ ЗНАЧАЈ PYRAZOLE DERIVATIVES: GREEN SYNTHESIS AND MEDICINAL SIGNIFICANCE _____	80	Катарина ИЛИЋ <i>Katarina ILIC</i> СЦЕНАРИО ЕДУКАТИВНЕ РАДИОНИЦЕ: „ФОРМУЛЕ И НАЗИВИ СОЛИ“ SCENARIO OF THE EDUCATIONAL WORKSHOP: „FORMULAS AND NAMES OF SALTS“ _____	69
Јована РАДУЛОВИЋ, Ференц КИШ, Милан ТОМИЋ, Наташа ЂУРИШИЋ-МЛАДЕНОВИЋ <i>Jovana RADULOVIC, Ferenc KISS, Milan TOMIC,</i> <i>Nataša ĐURISIC-MLADENOVIC</i> ОТПАДНА ЈЕСТИВА УЉА КАО СИРОВИНЕ ЗА ПРОИЗВОДЊУ БИОГОРИВА WASTE COOKING OILS AS FEEDSTOCK FOR BIOFUELS PRODUCTION _____	86	Стеван ЈОКИЋ, Љиљана ЈОКИЋ <i>Stevan JOKIC, Ljiljana JOKIC</i> ПОДУЧАВАЊЕ ПРИРОДНИХ НАУКА НА ПРИМЕРИМА ИЗ ОДРЖИВОГ РАЗВОЈА И КЛИМАТСКИХ ПРОМЕНА TEACHING NATURAL SCIENCES ON EXAMPLES FROM SUSTAINABLE DEVELOPMENT AND CLIMATE CHANGES _____	94
Андреј КУКУРУЗАР, Иван ГУТМАН <i>Andrej KUKURUZAR, Ivan GUTMAN</i> ФОСФИН НА ВЕНЕРИ PHOSPHINE ON VENUS _____	102	Авнија У. ВЕЈСЕЛИ <i>Avnija U. VEJSELI</i> ПИСАНА ПРИПРЕМА ЗА ЧАС ХЕМИЈЕ - КАРБОНИЛНА ЈЕДИЊЕЊА (ПРИРОДА КАРБОНИЛНЕ ГРУПЕ, ДЕФИНИЦИЈА И НОМЕНКЛАТУРА) LESSON PLAN FOR CHEMISTRY CLASS - CARBONYL COMPOUNDS (NATURE OF CARBONYL GROUP, DEFINITION AND NOMENCLATURE) _____	121
Миљан БИГОВИЋ, Марија КАЛУЂЕРОВИЋ, Јована ЈОВАНОВИЋ, Јелена ЧАМЦИЋ, Дамњан НУЦУЛОВИЋ <i>Miljan BIGOVIC, Marija KALUĐEROVIC,</i> <i>Jovana JOVANOVIC, Jelena ČAMDŽIC,</i> <i>Damijan NUCULOVIC</i> ШИФОВЕ БАЗЕ – СТРУКТУРА, СИНТЕЗА И ПРИМЈЕНА SHIFF BASES - STRUCTURE, SYNTHESIS AND APPLICATION _____	104	Маријана ЂОСОВИЋ <i>Marijana COSOVIC</i> СЦЕНАРИО ЕДУКАТИВНЕ РАДИОНИЦЕ: НЕМЕТАЛИ SCENARIO OF THE EDUCATIONAL WORKSHOP: NONMETALS _____	146
		ВЕСТИ ИЗ СХД	
		2020 – ГОДИНА ЕЛЕКТРОХЕМИЈЕ У СРБИЈИ _____	22
		ИЗВЕШТАЈ О РАДУ СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА У 2020. ГОДИНИ _____	70